

GRIGORE MIHAESCU

**IMUNOLOGIE
si
IMUNOCHIMIE**

**EDITURA UNIVERSITATII DIN BUCURESTI
2001**

Referenti stiintifici: Prof. dr. Tatiana Vassu
Prof. dr. Toma Nicolae

© Editura Universitatii din Bucuresti
Sos. Panduri, 90–92, Bucuresti – 76235; Telefon/Fax: 410.23.84
E–mail: editura@unibuc.ro
Internet: www.editura.unibuc.ro

Tehnoredactare computerizata: Victoria Iacob

Descrierea CIP a Bibliotecii Nationale

MIHAESCU GRIGORE

Imunologie si imunochimie / Grigore Mihaescu, Bucuresti:

Editura Universitatii din Bucuresti, 2001

456 p.

Bibliogr.

ISBN 973-575-556-4

57.08

CUPRINS

<i>Cuvânt înainte</i>	3
Introducere	5
<i>Etapele dezvoltării Imunologiei ca știință</i>	7
<i>Diviziunile Imunologiei</i>	11
Capitolul 1. Caracterizarea generală a antigenelor	13
<i>Modelul general de structură a unui antigen</i>	14
<i>Proprietățile definitorii ale antigenelor</i>	15
Clasificarea și imunogenitatea antigenelor	16
Antigene naturale	16
<i>Antigene moleculare</i>	16
<i>Haptene</i>	22
<i>Antigene corpusculare</i>	23
Antigene artificiale	25
Antigene sintetice	29
Determinanții antigenici	30
<i>Efectul de carrier</i>	32
Factorii care condiționează imunogenitatea	33
Antigene endogene	37
Antigene heterofile	38
Adjuvanții	40
Capitolul 2. Imunoglobulinele (Anticorpii)	43
<i>Structura moleculei de imunoglobulină</i>	44
<i>Funcțiile moleculei de imunoglobulină</i>	49
Heterogenitatea anticorpilor	51
<i>Heterogenitatea izotipică</i>	51
<i>Variantele alotipice</i>	53
<i>Variantele idiotipice</i>	54
IgG	55
IgA	57
<i>Structura moleculei de sIgA</i>	58
<i>Funcțiile efectoare ale sIgA</i>	61
IgM	63
IgE	65
IgD	66
Interacțiuni Ag-Ac	67
<i>Bazele moleculare ale interacțiunii Ag-Ac</i>	68
Bazele moleculare ale reacțiilor imune încrucisate	71
<i>Exemple de reacții imune încrucisate</i>	72
Capitolul 3. Sistemul imunocitar (limfoid)	75
Mecanisme de apărare la nevertebrate	76
Organizarea sistemului imunitar la vertebrate	78
Limfocitele	79
<i>Limfocitele B</i>	81
<i>Limfocitele T</i>	83
<i>Receptorul de antigen al limfocitelor T (RCT)</i>	84

<i>Celulele NK</i>	87
Bazele genetice ale diversitatii receptorilor de antigen	88
<i>Mecanismele genetice ale diversitatii imunoglobulinelor</i>	91
<i>Mecanismele genetice ale diversitatii RCTi</i>	98
Dezvoltarea ontogenetica a sistemului imunocitar	100
<i>Rolul bursei lui Fabricius în diferentierea limfocitelor B</i>	103
<i>Diferentierea limfocitelor B la mamifere</i>	104
<i>Timusul la mamifere si rolul lui în diferentierea limfocitelor T</i>	105
<i>Arhitectura timusului</i>	106
<i>Maturarea limfocitelor T în timus</i>	108
<i>Factorii celulari si moleculari ai diferentierii limfocitelor</i>	111
Organele limfoide secundare (periferice)	113
<i>Ganglionii limfatici</i>	116
<i>Splina</i>	119
<i>Sistemul imunitar al mucoaselor</i>	122
Recircularea limfocitelor	128
<i>Bazele moleculare ale fenomenului homing</i>	131
<i>Recircularea limfocitelor în structurile limfoide ale mucoaselor</i>	132
<i>Recircularea limfocitelor în compartimentul tertiar nelimfoid</i>	133
Capitolul 4. Antigenele complexului major de histocompatibilitate	136
<i>Structura moleculara a antigenelor CMH clasa I</i>	137
<i>Structura moleculara a antigenelor CMH clasa II</i>	439
<i>Determinismul genetic al moleculelor CMH</i>	140
<i>Evaluarea diferentelor antigenice ale moleculelor CMH</i>	143
<i>Distributia tisulara a moleculelor CMH si semnificatia lor evolutiva</i>	144
Capitolul 5. Raspunsul imun	146
Particularitatile generale ale raspunsului imun	147
Etapele raspunsului imun	149
<i>Celulele prezentatoare de antigen</i>	150
<i>Prelucrarea antigenelor</i>	152
<i>Rolul moleculelor CMH în prezentarea antigenelor</i>	154
<i>Antigenele exogene sunt prezentate în asociatie cu moleculele CMH II</i>	156
<i>Antigenele endogene sunt prezentate în asociatie cu moleculele CMH I</i>	157
<i>Modelul recunoasterii antigenelor de catre limfocitul T</i>	162
<i>Prezentarea antigenelor în asociatie cu moleculele CD₁</i>	163
<i>Activarea limfocitelor T</i>	164
<i>Activarea limfocitelor B</i>	168
<i>Stimularea nespecifica a limfocitelor B</i>	171
<i>Cooperari celulare în elaborarea raspunsului imun</i>	173
<i>Activarea limfocitelor sub actiunea antigenelor timo-independente</i>	174
<i>Activarea limfocitelor B₁</i>	175
<i>Efectele stimulării antigenice asupra tesutului limfoid secundar</i>	176
Dinamica raspunsului imun mediat humoral	176
Raspunsul imun humoral secundar	178
<i>Factorii care conditioneaza intensitatea raspunsului imun</i>	182
<i>Anticorpi naturali</i>	184
<i>Biosinteza imunoglobulinelor</i>	186
<i>Catabolismul imunoglobulinelor</i>	187

<i>Utilizari ale serurilor imune</i>	188
Imunitatea mediata celular	188
Mediatorii moleculari ai reactivitatii imunitare	196
Interleuchine	198
IL-1	198
IL-2	203
Alte citochine	208
Interferonii si mecanismele actiunii lor	209
<i>Activitati biologice efectoare ale interferonilor</i>	211
<i>Bazele moleculare ale activitatii interferonilor</i>	213
<i>Perspectivile producerii si utilizarii interferonilor</i>	217
Bazele celulare si moleculare ale memoriei imunitare	218
Reglarea raspunsului imun	221
Toleranta imunitara	226
<i>Factorii care conditioneaza inducerea starii de toleranta</i>	229
<i>Toleranta fatului</i>	230
Capitolul 6. Surse de gamaglobuline omogene	232
Proteinele de mielom	232
Surse artificiale de gamaglobuline omogene. Tehnologia hibridomului	233
<i>Etapele obtinerii hibridomului</i>	235
<i>Avantajele biotehnologiei hibridomului</i>	239
<i>Aplicatii practice ale AMC</i>	240
Capitolul 7. Mecanisme de aparare antiinfectioasa	243
Raspunsul imun specific antiinfectios	244
<i>Structura antigenica a celulei bacteriene</i>	244
<i>Mecanisme prin care microorganismele evita apararea gazdei</i>	247
Raspunsul imun în infectiile virale	249
<i>Raspunsul imun primar</i>	250
 <i>Rolul anticorpilor în imunitatea antivirala</i>	251
<i>Imunitatea antivirala mediata celular</i>	254
<i>Mecanisme prin care celulele infectate evita efectorii raspunsului imun</i>	257
Tipurile de imunitate dobândita	258
<i>Imunitatea dobândita artificial activ</i>	260
Vaccinurile	260
Vaccinuri de origine bacteriana	261
Vaccinuri virale	262
<i>Imunitatea dobândita artificial pasiv</i>	269
Rezistenta antiinfectioasa înascuta nespecifica	270
Sisteme celulare cu rol în rezistenta antiinfectioasa nespecifica	275
Sistemul fagocitar mononuclear	276
<i>Receptorii membranari ai macrofagului</i>	280
<i>Activarea macrofagului</i>	282
<i>Endocitoza</i>	283
<i>Rolul macrofagului în apararea fata de bacteriile cu localizare intracelulara</i>	288
<i>Alte functii ale macrofagului</i>	291
Sistemul fagocitar polimorfonuclear	292
<i>Diferentierea neutrofilelor</i>	294
<i>Sisteme bactericide active în PMNN</i>	295

Deficiente functionale ale sistemului PMNN	300
Sistemul complement	301
Mecanismul general de activare a sistemului complement	302
Calea clasica de activare a complementului	303
Sistemul de activare enzimatica	304
Calea alterna a fixarii complementului	308
Funcțiile complementului	310
Proteine reglatoare ale activitatii sistemului complement	313
Epuizarea experimentală a complementului seric	314
Biosinteza componentelor sistemului complement	315
Rolul complementului în apărarea antiinfecțioasă	315
Procesul inflamator	317
Diapedeza	318
Chimiotaxia	321
Tipuri de reacții inflamatorii	323
Mediatorii reacției inflamatorii	324
Rolul citochinelor în procesul inflamator	325
Reactanții de fază cutanată	326
Capitolul 8. Reacții imunitare <i>in vivo</i>	332
1. Reacțiile de hipersensibilitate	332
Clasificarea reacțiilor de hipersensibilitate	333
Reacțiile de hipersensibilitate imediată de tip I	334
Declansatorii	336
Mediatorii reacțiilor de hipersensibilitate de tip I	340
Mecanismul celular și molecular al reacțiilor de hipersensibilitate tip I	342
Efectele mediatorilor mastocitari	345
Exemple de stări de hipersensibilitate de tip I	345
Testarea stărilor atopice	351
Reacțiile de hipersensibilitate imediată de tip II	352
Aloimunizarea post-transfuzională	354
Aloimunizarea feto-maternă în incompatibilitatea Rh	355
Reacția imunoalergică antierytrocitară determinată de medicamente	356
Reacțiile de hipersensibilitate imediată de tip III	358
Epurarea complexelor imune și cauzele persistenței lor în organism	359
Maladii determinate de complexe imune	362
Modelul experimental al complexelor imune	362
Modelul clinic al maladiei cu complexe imune	364
Reacția de hipersensibilitate de tip IV (Hipersensibilitatea întârziată)	366
Declansatorii reacțiilor de hipersensibilitate întârziată	366
1. Reacția de hipersensibilitate întârziată de tip tuberculinic	367
Efactorii celulari ai reacției de hipersensibilitate întârziată	368
2. Reacția de hipersensibilitate întârziată de tip granulomatos	370
Teste <i>in vivo</i> pentru detectarea hipersensibilității întârziate	371
3. Hipersensibilitatea de contact (dermatita de contact)	372
2. Conflictul imunitar. Maladiile autoimune	375
Mecanisme ipotetice ale inițierii conflictului autoimun	376
Inducerea experimentală a maladiilor autoimune	378
Mecanisme celulare și moleculare ale progresiei maladiilor autoimune	381
Maladii autoimune ale țesutului conjunctiv (colagenoze)	383
Lupusul eritematos diseminat	383

<i>Artrita reumatoida</i>	386
<i>Biologia moleculara a artritei reumatoide</i>	387
<i>Febra reumatismala</i>	389
Biologia moleculara a maladiilor autoimune cu specificitate de organ	390
<i>Diabetus mellitus insulino-dependent</i>	391
<i>Maladii autoimune tiroidiene</i>	391
<i>Anemia pernicioasa</i>	395
<i>Myasthenia gravis</i>	396
<i>Ciroza biliara primitiva</i>	398
<i>Maladia Addison</i>	399
<i>Boala Crohn si colita ulcerativa</i>	400
<i>Anemiile hemolitice autoimune</i>	400
<i>Purpura trombocitopenica</i>	402
<i>Pemphigus</i>	402
Capitolul 9. Imunodeficientele	404
<i>Imunodeficientele înascute</i>	405
<i>Imunodeficientele dobândite</i>	406
<i>Imunodeficienta consecutiva infectiei cu HIV</i>	407
Capitolul 10. Imunologie tumorala	410
Antigene tumorale	410
Raspunsul imun antitumoral	416
<i>Efectorii raspunsului imun antitumoral</i>	418
<i>Rolul celulelor NK</i>	419
<i>Citotoxicitatea mediata de macrofage</i>	420
<i>Imunitatea mediata de limfocitele T</i>	421
<i>Mecanisme de scapare a celulelor tumorale</i>	422
<i>Abordari terapeutice ale neoplaziilor</i>	424
Capitolul 11. Imunitatea în transplantul de tesuturi si organe	429
<i>Argumente ale rolului reactivitatii imunitare în respingerea grefei</i>	431
Evolutia respingerii grefei de piele	432
<i>Respingerea grefei de rinichi</i>	432
<i>Antigenele declansatoare ale respingerii grefei</i>	433
<i>Teste de histocompatibilitate</i>	436
<i>Xenotransplantarea</i>	437
<i>Imunosupresia</i>	439
Capitolul 12. Interactiunile sistemului imunitar cu sistemul neuroendocrin	442
<i>Rolul hormonilor corticosteroizi în reglarea functiei imunitare</i>	444
<i>Rolul sexosteroizilor</i>	445
<i>Factorii neuroendocrini favorizanti ai maladiilor autoimune umane</i>	447
Bibliografie	449

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 bolilor 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 *bolilor 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, caruia 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 adreseaza tuturor studentilor si absolventilor mai noi, dar mai ales celor vechi, ai facultatilor de *Biologie, Medicina umana si Medicina veterinara*, precum si specialistilor ale caror preocupari profesionale, practice sau teoretice, interfera cu domeniul Imunologiei.

Tin sa multumesc anticipat tuturor acelora care vor studia lucrarea *Imunologie si Imunochimie* si vor face observatii critice întemeiate, de care voi tine seama într-o viitoare editie a acestei carti.

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 urias de celule bacteriene (circa 10^{14}), 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 "imune". 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 tesuturilor, celulelor și moleculelor care conditionează 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.

Toleranta imunitara este rezultatul unui proces de selectie a clonelor de limfocite, selectie ce are loc în perioada dezvoltarii embrionare a limfocitelor, ele fiind celulele efectoare ale raspunsului imun. Selectia consta în eliminarea clonelor de limfocite potential autoreactive (potential reactive fata de moleculele proprii)

Componentele chimice proprii organismului, pe care sistemul imunitar le tolereaza, sunt incluse în notiunea de "self" (*self*, englez = propriu), iar cele straine, care se abat de la structura chimica programata genetic a organismului, poarta denumirea de *substante nonself* sau *antigene*. Astfel, *functia imunitara este o functie biologica esentiala, prin intermediul careia organismele diferentiaza prompt si cu mare sensibilitate, componentele self de substantele nonself.*

Functia imunitara are un rol determinant pentru pastrarea homeostaziei mediului intern si a individualitatii chimice a fiecarui organism, prin faptul ca sistemul imunitar recunoaste si tolereaza moleculele proprii, dar se activeaza la contactul cu substantele straine care se abat de la programul biochimic tolerat.

Dupa ce învata sa tolereze self-ul, chiar din perioada dezvoltarii embrionare, functia imunitara realizeaza un permanent "control de calitate" a moleculelor self.

Asa cum aparatul genetic asigura stabilitatea si integritatea unei specii ca sistem biologic, sistemul imunitar asigura pastrarea homeostaziei biochimice a organismului.

Functia imunitara este mediata de molecule cu rol de receptori de pe suprafata *limfocitelor* si de molecule solubile în umorile organismelor.

Obiectul de studiu al Imunologiei s-a diversificat odata cu progresul general al stiintelor biologice si în special, odata cu aprofundarea cunoasterii functiei de aparare. Începând din anii '60, interesul stiintific pentru Imunologie a crescut considerabil din doua motive:

1) În primul rând s-a demonstrat ca functia imunitara este *esentiala* pentru organism, insuficienta sa marind riscul infectiilor cu microorganisme patogene sau potential patogene, iar disfunctia imunitara severa este incompatibila cu viata.

2) S-a demonstrat ca activarea functiei imunitare nu este totdeauna benefica pentru organism, ci uneori, stimularea ei determina leziuni tisulare severe, chiar ireversibile, asociate cu *starile de hipersensibilitate* sau initiaza evolutia unor stari patologice grave, ca de exemplu, *maladiile autoimune*. Exemplul clasic este oferit de infectia cu *Mycobacterium tuberculosis* sau cu *M. leprae*. Leziunile tisulare, materializate în existenta granuloamelor, se datoreaza chiar raspunsului

imun, care este asa de amplu încât produce manifestarile patologice.

Starile de hipersensibilitate definesc o stare de reactivitate imunitara crescuta si se caracterizeaza prin aceea ca, la primul contact cu o substanta nonself, nu se produce un raspuns imun detectabil, ci organismul dobândește o stare speciala de *sensibilizare imunitara* fata de un antigen. La contactul secundar ulterior, chiar cu cantitati foarte mici ale antigenului sensibilizant, organismul raspunde cu manifestari patologice de intensitati variabile, al caror rezultat final poate fi fatal. Asa se întâmpla în starile de hipersensibilitate (alergii) la polen, la diferite medicamente (de exemplu, penicilina), la veninul insectelor sau la diferite substante alimentare. Modificarile patologice consecutive alergiilor pot fi locale sau generalizate.

Un domeniu vast, în continua expansiune, dar relativ recent al Imunologiei îl constituie *maladiile autoimune*. În esenta, maladiile autoimune semnifica întreruperea starii de toleranta perfecta pe care sistemul imunitar o manifesta fata de componentele self. Datorita unor stari fiziologice legate de procese de îmbatrânire, unor procese infectioase, datorita unor procese patologice degenerative sau ca urmare a utilizarii substantelor medicamentoase, în organism se produc modificari chimice tisulare care sunt detectate de celulele sistemului imunitar. Consecinta este declansarea unui raspuns imun fata de componentele self modificate chimic. Astfel se initiaza un conflict autoimun, în cursul caruia sistemul imunitar genereaza efectorii sai – *celule activate si molecule* – care recunosc specific moleculele self modificate.

Respingerea grefelor de tesuturi si organe este consecinta activarii functiei imunitare. Antigenele tesutului grefat, solubile sau fixate pe suprafata celulelor din grefa, activeaza limfocitele (celulele efectoare ale raspunsului imun). Autogrefele sunt totdeauna tolerate. În conditiile unei reactivitati imunitare normale, alogrefele si xenogrefele sfârsesc prin a fi respinse. Cu cât diferentele genetice si implicit biochimice între organismul donor si cel receptor de grefa sunt mai accentuate, cu atât grefa este respinsa mai repede.

Etapele dezvoltarii Imunologiei ca stiinta

Imunologia este o stiinta relativ tânara, care a aparut initial ca un domeniu a Microbiologiei, care la începuturile sale a studiat mecanismele reactiilor de aparare a organismului uman si animal fata de agresiunea infectioasa. Imunologia a fost fundamentata de

descoperirile lui Pasteur si Metchnikoff si pastreaza înca legaturi de esenta cu disciplina mama - Microbiologia, desi astazi ea este una dintre ramurile cele mai importante si mai dinamice ale stiintelor biologice.

Aparitia Imunologiei ca stiinta a fost precedata cu milenii, de *observatii empirice* referitoare la faptul ca vindecarea unor maladii infectioase era urmata de o stare de rezistenta permanenta la reinfectie sau cel mult de forme usoare de îmbolnavire. Cu 2-3 secole î.C., în China si India s-a observat ca unele maladii foarte grave (variola, pesta, ciuma), lasa în urma o stare de rezistenta permanenta la reinfectie sau cel mult, persoanele faceau forme foarte usoare de îmbolnavire.

În infectia variolica, apar leziuni caracteristice mai ales pe tegumentul fetei. Mai întâi apar vezicule mici, pline cu lichid clar, al caror continut se tulbura datorita infiltratului celular si fac crusta, iar dupa vindecare, lasa o cicatrice ce se pastreaza toata viata (varsat de vânt). S-a trecut la infectarea artificiala a persoanelor sanatoase în scopul declansarii unei îmbolnaviri usoare, care sa instaleze starea de imunitate. Practica *variolizarii* prin prizarea pe nas a mojaratului de cruste uscate, recoltate de la cei trecuti prin boala, era însoțita de infectii grave, datorita cantitatii mari de virus inhalat.

În 1418, procedeul variolizarii a fost introdus în Anglia de Mary Wortley Montagu si s-a practicat o perioada, cu toate riscurile îmbolnavirii cu severitate necontrolata.

Vaccinarea antivariolica a fost introdusa de E. Jenner (1796). Ca vaccin, el a utilizat un virus de la bovine (cowpox). Metoda s-a bazat pe observatia empirica a rezistentei în cursul marilor epidemii de variola, a mulgatorilor care fusesera infectati cu virusul cowpox. Acesta, produce o infectie pustulara si fiind înrudit antigenic cu virusul variolei, conferea protectie antivariolica. Vaccinarea persoanelor sanatoase s-a facut cu lichidul recoltat din pustulele de pe ugerul vacilor.

Perioada stiintifica a Imunologiei a fost inaugurata de L. Pasteur, prin descoperirea unor *vaccinuri* cu o larga aplicatie practica. Denumirea de "vaccin" a fost data de Pasteur, în amintirea produsului recoltat de Jenner din leziunile de pe ugerul vacii. Denumirea s-a pastrat pentru toate produsele folosite în practica, pentru a crea o stare de rezistenta preventiva fata de eventualul contact cu agentul patogen.

Pasteur a fundamentat stiintific practica producerii si utilizarii *vaccinurilor*. El a demonstrat ca proprietatile biologice (patogenitatea si virulenta) bacteriilor si virusurilor patogene nu sunt fixe. In anumite conditii, aceste proprietati se pot diminua prin anumite artificii de tehnica, asa încât un agent virulent care de regula determina o infectie mortala, poate fi transformat într-un agent care produce o infectie usoara, fara semne clinice, dar creeaza o rezistenta foarte solida.

Vaccinurile atenuate îndeplinesc aceste deziderate. Pasteur a atenuat virulenta agentilor patogeni prin doua metode: prin *învechirea culturilor* si prin *cultivarea la temperaturi ridicate*. Pasteur a descoperit trei vaccinuri: al holerei gainilor, al antraxului la ovine si al rabiei.

Agentul patogen al *holerei gainilor* – *Yersinia pestis* – este o bacterie foarte virulenta. Un inocul de câteva celule este suficient pentru a produce îmbolnavirea si moartea organismelor sensibile. Cultura virulenta de *Yersinia*, prin mentinere la temperatura camerei (învechire) se atenuaza si dupa inoculare la gainile normale, nu mai produce îmbolnavirea. Pasarile inoculate cu cultura bacteriana atenuata, devin rezistente la reinfectia cu o cultura virulenta, spre deosebire de pasarile lotului martor, care se îmbolnavesc si mor. Cultura bacteriana veche a creat o stare de imunitate, adica a avut rolul unui *vaccin*. Atenuarea virulentei prin învechirea culturii este un proces necontrolat si probabil se datoreaza modificarilor biochimice sau genetice ale celulelor, sub influenta produselor de catabolism acumulate în mediul de cultura sau se datoreaza epuizarii mediului în substantele esentiale pentru crestere.

Agentul patogen al *infectiei carbunoase* (anthrax) este *Bacillus anthracis*, o bacterie sporulata. Sporul se formeaza la 37^o. Cultura bacteriana crescuta la 42^o, își modifica proprietatile biologice, pierde capacitatea de sporulare (devine asporogena). Aceste modificari se însotesc de pierderea progresiva a virulentei. Incubarea la 42^o este o modalitate a obtinerii dintr-o cultura virulenta, a unei culturi cu virulenta progresiv atenuata pentru organismul gazda (oaie, iepure, cobai, soarece).

Carbunele este o boala grava a oilor, ce se transmite si la om. Pasteur a imaginat o schema de vaccinare a ovinelor, începând cu un inocul bacterian virulent pentru soarece si continuând cu inocul bacterian cu virulenta mai mare. A creat o stare de imunitate a ovinelor, carora le-a conferit rezistenta la bacteriile foarte virulente.

Agentul infectios al *rabiei* nu a fost evidentiat de Pasteur. Autorul a utilizat tesut nervos medular sau creier de la iepurele infectat experimental, pe care l-a modificat prin uscare în prezenta potasei caustice. A obtinut un vaccin care, administrat cât mai repede dupa muscatura animalului rabid, creeaza o stare de rezistenta, în absenta careia infectia rabica evolueaza invariabil spre moarte.

Cercetarile lui Pasteur au pus bazele *Imunologiei medicale* si ale obtinerii si utilizarii pe baze stiintifice a *vaccinurilor*. A urmat o perioada în cursul careia s-au înregistrat progrese importante în obtinerea si administrarea vaccinurilor.

Bazele conceptului *imunitatii humorale* au fost puse de Behring si

Kitasato (1890), care au evidentiat 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 Babes și de Institutul Cantacuzino.

În 1894, Pfeiffer a descris fenomenul de *bacterioliza*, 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 evidentiat 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 celulare* 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 înghloba prin procesul de fagocitoză, care sunt digerate și eliminate din celula fagocitară. Metchnikoff a făcut observații pe crustaceul *Daphnia magna*, ale cărui celule fagocitare înghlobează și digeră spori 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 evidentiat 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° 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 pastrează proprietățile imunogene și induce o stare de rezistență a organismelor imunizate. Sub acțiunea combinată a formolului și temperaturii, toxinele difterice și tetanice 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.

Mc Farlane 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 pasări.

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 bolilor cu substrat imunitar (alergii, boli autoimune), pentru prevenirea respingerii grevelor de țesuturi și organe și pentru imunoterapia neoplazilor. Va fi o perioadă a reîntoarcerii 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 la anul 1960. Treptat însă, 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 statatoare. 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 – funcția de apărare. Studiază substratul biologic al răspunsului imunitar (celulele imunitare, originea și mecanismele diferențierii lor, factorii celulari și humoral care asigură diferențierea lor), mecanismele celulare și moleculare ale biosintezei anticorpilor, explica implantarea celulelor tumorale și geneza cancerului clinic în condițiile acțiunii efectorilor sistemului imunitar. Studiază mecanismele imunitare ale respingerii grevelor de țesuturi și organe, mecanismele reactivității imunitare în filogenie și ontogenie, precum și bazele celulare și moleculare ale stărilor de hipersensibilitate și ale bolilor autoimune.

Imunochimia este o disciplină de graniță ce aparține *Imunologiei* și *Biochimiei*, care studiază funcția imunitară sub aspect biochimic. Preocuparea esențială a constă 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 largit sfera de activitate și studiază următoarele aspecte:

- factorii moleculari ai răspunsului imunitar și în special ai imunității mediate celular;
- moleculele de histocompatibilitate;

- markerii antigenici specifici diferitelor populatii de celule limfoide;
- moleculele cu functie de receptor de antigen, pe suprafata celulelor limfoide;
- factorii de cooperare celulara în cursul elaborarii raspunsului imun (interleuchine);
- componentele complementului etc.

Termenul de *Imunochimie* a fost introdus de chimistul suedez Arrhenius (1907). El si-a intitulat astfel studiul cu privire la reactiile chimice care se produc în organismul uman si animal, dupa imunizare. Fondatorul Imunochimiei este P. Ehrlich. El a introdus metode cantitative în studiul reactiilor antigen-anticorp si a elaborat o teorie generala asupra recunoasterii imune (teoria catenelor laterale sau a receptorilor). Dupa 1950, Imunochimia s-a dezvoltat spectaculos, datorita descoperirilor din domeniul biochimiei, datorita utilizarii unor metode fizico-chimice de analiza a macromoleculelor si prin aplicarea acestora la domeniul Imunologiei. S-a nascut un set de metode, în esenta biochimice, puse în slujba analizei moleculelor implicate în functia imunitara. Domeniul s-a numit *analiza imunochimica* si utilizeaza metode care deriva din îmbinarea tehnicilor fizico-chimice cu cele imunologice. Imunochimia este deservita de metoda *imunodifuziei*, *imunofluorescentei*, *RIA*, *ELISA*, *dializa la echilibru* etc. Efectul utilizarii acestor metode de investigare a fost cunoasterea mecanismelor moleculare care stau la baza raspunsului imun, îndeosebi humoral si aplicarea în laboratorul clinic, a unor noi metode de diagnostic.

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

Imunogenetica studiaza determinismul genetic al raspunsului imun: mecanismele genetice care asigura diversitatea anticorpilor si a antigenelor de histocompatibilitate.

Imunohematologia s-a nascut odata cu stabilirea diferentelor antigenice ale eritrocitelor umane si cu precizarea grupelor sanguine (K. Landsteiner, 1901) si s-a dezvoltat dupa ce s-a stabilit existenta unor diferente fine între diferite tipuri de eritrocite si, în special, dupa descoperirea factorului Rh si a rolului sau în patologia sarcinii.

Imunologia medicala umana si veterinara s-a dezvoltat în trei directii:

- *directia profilactica*, orientata spre descoperirea si producerea unor noi vaccinuri, capabile sa creeze o stare de rezistenta. Ea se preocupa, de asemenea, de schemele de vaccinare, de posibilitatea asocierii diferitelor vaccinuri si de posibilitatea stimulării raspunsului

imun cu ajutorul adjuvantilor;

– *directia terapeutica* studiaza posibilitatea obtinerii serurilor imune. Ele contin anticorpi si se administreaza organismelor care prezinta riscul îmbolnavirii prin infectii;

– *directia diagnosticului* studiaza posibilitatea identificarii agentilor etiologici ai diverselor maladii infectioase, cu ajutorul reactantilor imunologici (seruri imune si antigene).

Imunopatologia studiaza fenomenele imunitare în relatie cu diferite maladii. In multe situatii patologice, raspunsul imun (activarea functiei imunitare) are efecte defavorabile, prejudiciante asupra organismului. Raspunsul imun se instituie drept cauza, dar în special ca mecanism, pentru producerea unor manifestari patologice. Afectiunile generate de activarea sistemului imunitar (imunopatii) se grupeaza în doua categorii:

- starile de hipersensibilitate (alergiile);
- maladiile autoimune.

Imunopatologia studiaza, de asemenea, *imunodeficientele* (înascute si dobândite), *imunitatea de transplant* si *imunitatea antitumorală*, *raspunsul imun în maladiile infectioase virale si bacteriene*, precum si în *maladiile parazitare*.

Serologia (Imunoserologia) s-a dezvoltat ca o ramura practica, dedicata studiului tehnicilor de explorare a reactiilor imune *in vitro*.

Capitolul 1

CARACTERIZAREA GENERALA A ANTIGENELOR

GR. MIHAESCU, CAMELIA MIHAESCU

Conventional, antigenele se definesc ca substante straine, care, consecutiv introducerii în organismul uman sau animal pe o *cale parenterala* (alta decât cea digestiva), declanseaza sinteza anticorpilor cu care se combina specific. Definitia este incompleta din câteva motive.

1. Calea *digestiva* de administrare a antigenelor nu exclude totdeauna posibilitatea declansarii raspunsului imun. Pentru agentii infectiosi care se multiplica în tractul digestiv, administrarea orala asigura o buna imunizare (de exemplu, vaccinul polio se administreaza oral, desi calea parenterala este mai eficienta).

2. Unele substante nonsel sunt în mod eronat considerate ca neantigenice, deoarece, desi *in vivo* stimuleaza reactivitatea imunitara si induc sinteza unei cantitati mici de anticorpi, *in vitro* nu produc reactii vizibile antigen-anticorp.

3. Fata de unele antigene, organismele nu declanseaza raspunsul imun, ci manifesta o stare de toleranta.

4. Unele molecule în stare nativa nu induc un raspuns imun, ci numai dupa cuplarea covalenta cu o molecula purtator. Molecula nativa își pastreaza proprietatea de a se combina specific cu anticorpii sintetizati. Astfel de molecule se numesc *hapten*.

J. F. Bach (1976) defineste *antigenele* ca fiind *molecule care, consecutiv introducerii în organism pe o cale adecvata, induc un raspuns imun materializat prin proliferarea celulelor limfoide si sinteza moleculelor de recunoastere (anticorpi si receptori celulari), cu care se combina in vivo si in vitro.*

Modelul general de structura a unui antigen

O molecula antigenica este alcatuita din doua componente;
– componenta *purtator* (“carrier”), care corespunde celei mai mari parti a moleculei:

gruparile determinante de specificitate sau epitopi, localizate pe suprafata componentei purtator si formate din secvente specifice de monomeri. Epitopii, prin secventa proprie a monomerilor si prin configuratia spatiala specifica, confera individualitate chimica si specificitate antigenica moleculei nonself. Gruparile determinante de specificitate sunt echivalentii moleculari si functionali ai *haptenei*.

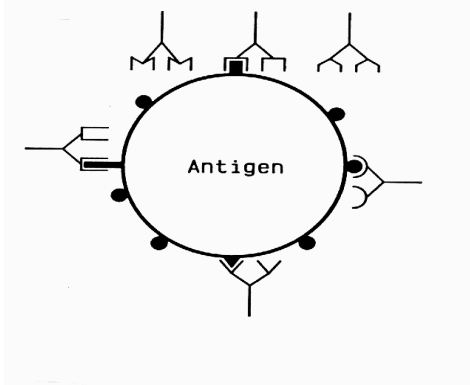


Fig. 1. Modelul general de structura a unui antigen. Cea mai mare parte a oricarei molecule antigenice este reprezentata de gruparea carrier, pe care sunt localizati epitopii cu diferite configuratii spatiale, stimulatori ai reactivitatii imunitare. Unii epitopi pot fi unici, iar altii sunt multipli. Uneori, epitopii stimuleaza sinteza anticorpilor cu afinitati diferite.

Gruparile determinante de specificitate se gasesc în numar variabil pe suprafata purtatorului si pot fi *identice* atât în ceea ce priveste compozitia chimica, cât si configuratia spatiala (ca în cazul antigenelor polizaharidice cu epitopi repetitivi) sau sunt *diferite*, atât ca secventa a monomerilor cât si în privinta configuratiei spatiale.

Proprietatile definitorii ale antigenelor

În studiile experimentale asupra imunogenitatii unor molecule sintetice, M. Sela (1969) a descris doua proprietati esentiale ale antigenelor:

1. *Imunogenitatea sau antigenitatea* este proprietatea unui antigen complet, format din gruparea carrier si epitopi, de a declansa un raspuns imun, humoral sau celular, ori de câte ori patrunde în organism pe o cale adecvata. Proprietatea de imunogenitate este asociata cu gruparea *carrier* a moleculei de antigen, grupare care într-o oarecare

masura influenteaza si specificitatea anticorpilor.

2. *Specificitatea* defineste capacitatea antigenului întreg sau numai a epitopilor sai de a se combina specific cu anticorpii sau cu receptorii celulari a caror sinteza a fost indusa. Proprietatea de specificitate este dependenta, în primul rând de *epitopi*, dar este influentata într-o masura mai mare sau mai mica si de gruparea carrier.

Notiunea de *imunogen*, uneori, este distincta de aceea de *antigen*. Notiunea de *imunogen* este mai restrictiva si semnifica proprietatea unei substante, în stare nativa, de a stimula raspunsul imun, fara sa necesite conjugarea cu o alta molecula.

Notiunea de *antigen* este mai larga, deoarece desemneaza molecule nonself care sunt imunogene în stare nativa sau devin imunogene dupa conjugarea cu o molecula purtator. *Antigenul* poate fi uneori incapabil, în forma sa nativa, sa stimuleze raspunsul imun.

Clasificarea si imunogenitatea antigenelor

Dupa originea lor, antigenele sunt *exogene* si *endogene*.

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

Antigene naturale

Antigenele naturale formeaza categoria cea mai cuprinzatoare. Aici sunt incluse toate macromoleculele naturale din virusuri, microorganisme, fungi, plante si animale.

Dupa dimensiuni se disting *antigene moleculare* ("solubile") si *antigene corpusculare*.

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

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

Antigenele moleculare

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

Proteinele sunt cele mai numeroase si mai importante antigene

moleculare. Diversitatea lor chimica, generata de variatia secventei de aminoacizi este uriasa. Practic, fiecare tip de molecula proteica nonspecific din lumea vie este un antigen pentru organismul animal si uman, deoarece are o secventa unica de aminoacizi, care determina o structura secundara si tridimensionala proprie si implicit, existenta unor epitopi proprii ca secventa a aminoacizilor si conformatie spatia.

Imunogenitatea este o proprietate generala a proteinelor, a celor cu *rol structural* (colagenul, cheratina, elastina, fibroina viermelui de matase, proteinele capsidului viral), a celor cu *rol functional* (miozina, actina, albumina, hemoglobina, mioglobina, enzime, hormoni, imunoglobuline), a celor cu *rol de depozit* de aminoacizi (ovalbumina, cazeina, gliadina – din semintele de grâu). Toate proteinele si polipeptidele cu o greutate moleculara mai mare de 1000 D sunt imunogene, într-o masura mai mare sau mai mica.

De cele mai multe ori, pentru antigenele proteice, nu se face distinctia dintre epitopii inductori ai raspunsului imun si gruparea carier, deoarece proteinele posedă un spectru *continuum de determinanti antigenici*, ce corespund unor secvente discrete ale suprafetei moleculare localizate în zonele cele mai expuse contactului cu receptorii sistemului imunitar. Antigenitatea moleculelor *globulare* este determinata adeseori, de configuratia lor spatia, rezultata din plierea tridimensionala. Pentru cele mai multe proteine globulare (mioglobina, hemoglobina, lizozimul, ribonucleaza etc.), aproape toti determinantii antigenici sunt *conformationali*, adica sunt rezultatul plierii spatiale a moleculei, iar altii sunt *secventiali*, adica sunt reprezentati de o secventa particulara de aminoacizi. Moleculele proteice *fibrilare* (cheratina, colagenul, fibroina) au configuratii mai simple decât cele globulare, catenele lor fiind aranjate sau rasucite pe o singura dimensiune. Determinantii antigenici ai acestor proteine sunt *secventiali*, formati din 3-6 aminoacizi.

Sistemul imunitar al unui organism recunoaste un numar limitat de determinanti antigenici ai unei molecule proteice. Epitopii, conformationali sau secventiali, care stimuleaza raspunsul imun *in vivo*, iar *in vitro* induc proliferarea limfocitelor, se numesc *epitopi dominanti*. O parte a determinantilor antigenici ai unei molecule native, cel mai adesea, sunt neimunogeni (imunosilentiosi), nefiind accesibili sistemului imunitar al organismului, dar se pot exprima într-un anumit set de conditii de imunizare (gazda, adjuvant etc.). Acestia sunt *epitopi interni* ai proteinelor globulare. Un determinant intern poate fi silentios în molecula nativa, dar devine imunostimulator dupa clivarea enzimatica a moleculei, *in vivo* sau *in vitro*. De aceea, M. Sela a recomandat

utilizarea termenului de “grupare imunodominanta”, pentru epitopul sau epitopii care se exprima în anumite conditii(gazda, adjuvant, cale de administrare) si determina specificitatea raspunsului imun.

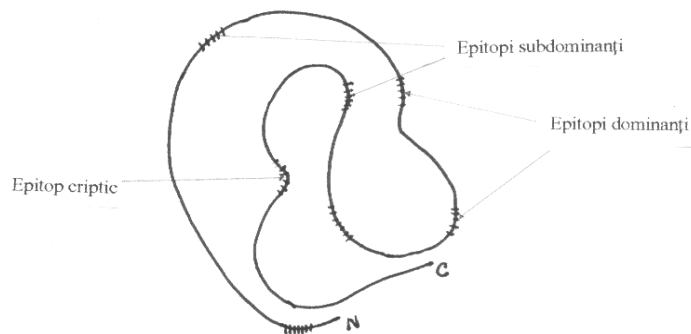


Fig. 2. Epitopii dominanți sunt localizați la suprafața moleculei globulare. Epitopii subdominanți devin accesibili după clivarea moleculei în etapa prelucrării în macrofag, iar epitopii cryptici sunt inaccesibili fenomenului de recunoaștere imunitară.

Imunogenitatea antigenelor proteice se modifică în diferite condiții.

Denaturarea moleculelor native sub acțiunea agenților chimici și a căldurii, *modificarea configurației* moleculei sub acțiunea agenților reductori sau *hidroliza enzimatică*, modifică imunogenitatea. Anticorpilor 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 formaldehida, 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-aza 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 conformationali.

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 conformationali 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 calitate 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 enzimă 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 conformationale care survin după reacția antigen-anticorp, sau rămâne intactă. Foarte rar, complexul enzimă-anticorp are un efect catalitic superior, comparativ cu enzimă nativă.

Hormonii sunt molecule slab imunogene, 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, insulină, 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 slab imunogene 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 greutăți mai mici 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.

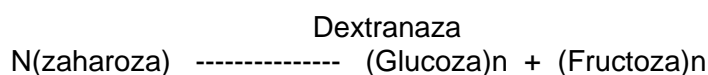
Din punctul de vedere al structurii moleculare, se disting două tipuri de polizaharide: a) cele care au o catenă centrală pe care se inseră ramificațiile laterale; b) polizaharide lipsite de o catenă centrală, iar ramificațiile sunt dispuse aleatoriu, fără nici o simetrie. Rolul catenelor centrale în 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 terciară (globulară). Uneori, configurația spațială a polimerului glucidic este determinanta pentru specificitatea sa antigenică. Schimbările conformationale ale polizaharidelor se produc mai ușor decât ale proteinelor, pentru că au bariere energetice scăzute. Pentru polizaharide, denaturarea este practic necunoscută, ceea ce le

confera stabilitate. Daca imunogenitatea polizaharidelor native este slaba, adeseori ele se comporta ca haptene, adica devin antigenice dupa cuplarea cu un purtator proteic, rezultând *lectine*, cu o foarte larga distributie în lumea vie. In calitate de haptene, polizaharidele au proprietatea de specificitate, adica se combina cu anticorpii complementari fata de complexul glicoproteic.

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

Dextranii sunt polimeri ramificati de glucoza, resturile glucozil fiind unite mai ales prin legaturi de tip α 1-6, dar în functie de specia producatoare, punctele de ramificatie ale catenelor polimere pot fi 1-2, 1-3 sau 1-4.

Dextranii sunt sintetizati în special de unele bacterii lactice, din zaharoza, dupa reactia:



Dextranii au greutate moleculare foarte diferite (pâna la 10^6 D), în functie de gradul de polimerizare. Nu sunt imunogeni si de aceea se folosesc ca înlocuitori ai plasmiei. Prin transfuzii repetate cu solutii de dextran la om si prin injectare repetata la soarece, s-au sintetizat anticorpi antidextran. Specificitatea anticorpilor antidextran este foarte înalta. In serul animalelor imunizate cu dextrani s-au detectat doua tipuri de anticorpi: unii specifici fata de resturile de glucozil legate 1-2 si altii specifici fata de resturile de glucozil legate 1-3, ce nu dau reactii încrucisate, desi deosebirea dintre cele doua categorii de molecule de dextran consta numai în modul diferit de legare a resturilor de glucozil între ele.

Polizaharidele capsulare se pot gasi fie sub forma moleculelor libere ("solubile"), fie sub forma corpusculara (atasate celulelor bacteriene capsulate).

Variatiile biochimice ale polizaharidelor capsulare, determinate de compozitia glucidica a catenei, de secventa monomerilor sau de modul de legare a lor în catena, confera tulpinilor bacteriene, specificitate antigenica de tip. La *Str. pneumoniae* s-au identificat peste 80 de tipuri antigenice ale polizaharidelor capsulare. In compozitia lor intra hexoze, pentoze, derivatii lor aminati, metilati etc. Specificitatea antigenica a polizaharidelor capsulare depinde atât de compozitia chimica, cât si de succesiunea monomerilor în catena polizaharidica. Ca vaccinuri, polizaharidele induc starea de toleranta.

Acizii nucleici în stare purificata sunt molecule neimunogene,

datorita uniformitatii 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 haptena. Majoritatea epitopilor conjugatului sunt conformationali. O fractie din anticorpii anti-conjugat se combina cu acizii nucleici. Anticorpii anti-acizi nucleici se combina cu acizii nucleici în stare pura, indiferent de provenienta. Proteinele asociate acizilor nucleici confera o noua specificitate antigenica si determina sinteza anticorpilor care se combina cu proteina putator.

Experimental, anticorpii anti-acizi nucleici se obtin pe una din urmatoarele cai:

1. *Imunizarea cu bacteriofagi* din seria T par (T_2 , T_4 , T_6), supusi socului osmotic. ADN al acestor fagi se deosebeste de ADN din celulele eucariote, prin prezenta *5-hidroxi-metilcitozinei glicozilate*, în locul citozinei. Anticorpii au specificitate fata de bazele glicozilate, ceea ce explica lipsa reactiilor încrucisate cu alti acizi nucleici.

2. *Imunizarea cu ribosomi* din celulele vegetale sau animale. Anticorpii sintetizati reactioneaza cu ARN de origine bacteriana, vegetala sau animala, precum si cu polinucleotidele sintetice (poli-A, poli-C, poli-U), dar nu reactioneaza cu ADN nativ si nici cu ADN denaturat.

3. *Imunizarea cu conjugate haptena-proteina*, în care haptena este reprezentata de baze azotate, ribonucleozide, dezoxiribonucleozide, nucleotide, dinucleotide si trinucleotide. Anticorpii sintetizati reactioneaza atât cu haptena cât si cu ADN nativ sau denaturat.

4. *Imunizarea cu complexe formate din acizi nucleici si albumina metilata*. Cele doua molecule formeaza un complex necovalent, datorita interactiei dintre gruparile negative ale acizilor nucleici si cele pozitive ale proteinei. Anticorpii sintetizati reactioneaza cu complexul molecular, cu proteina, cu acidul nucleic nativ si denaturat de diferite origini.

5. Anticorpii anti-acizi nucleici se gasesc în sângele pacientilor cu lupus eritematos diseminat (LED).

Anticorpii sintetizati fata de acizii nucleici cu rol de haptene în conjugatele cu proteine nu au specificitate, deoarece precipita ADN monocatenar, ARN de diferite origini, poliribonucleotide si acizii nucleici dublu catenari.

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

O haptena lipidica cu o importanta practica deosebita este *cardiolipina*, din cordul mamiferelor. In sângele indivizilor infectati cu *T. pallidum* se gasesc anticorpi care reactioneaza cu cardiolipina înalt

purificata (reactie încrucișata), extrasa din cordul bovin.

Un alt antigen lipidic este *antigenul Forssman*, inductor al sintezei anticorpilor hemaglutinanti și în prezenta 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 molecula 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 "haptena" 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 forma 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 antigene", 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 haptena complexă. Haptenele simple sunt reprezentate de polinucleotide, alcooli, formaldehidă, 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

imunogenitatii conjugatelor haptena-molecula purtator a permis determinarea marimii gruparilor determinante de specificitate ale antigenelor si indirect, determinarea situsului de combinare a anticorpilor. Pe aceiasi cale s-a evaluat specificitatea, afinitatea si heterogenitatea anticorpilor. Haptenele au fost folosite pentru studiile de cristalografie cu raze X a unui complex antigen-anticorp.

Haptene autocuplante sunt molecule cu greutate moleculara mica, a caror particularitate consta în aceea ca, dupa injectare, în organism se combina spontan cu proteinele tisulare si formeaza conjugate haptena-proteina, *in vivo*. Conjugatele haptena-proteina induc sinteza anticorpilor si determina procese de hipersensibilitate sau initiaza maladii autoimune. Astfel se comporta derivatii dinitrofenolului substituiti cu clor sau fluor, unii produși de degradare a penicilinei.

Antigenele corpusculare

Antigenele corpusculare sunt, în esenta, antigene moleculare asociate virusurilor si celulelor. Proteinele capsidale si glicoproteinele învelisului viral sau proteinele prezentate pe suprafata celulelor infectate cu virusuri, sunt foarte imunogene si stimuleaza raspunsul imun al gazdei. De aceea, imunitatea consecutiva infectiei virale este, de obicei, de lunga durata.

Antigenele bacteriene sunt fie *solubile* (eliminate în mediul extracelular), fie *corpusculare* (legate de celula). Din prima categorie fac parte exotoxinele si 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.

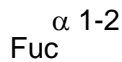
Antigenele eritrocitare sunt glicoproteine ale suprafetei eritrocitare, cu determinism biochimic cunoscut, în sistemul A, B, O. Glicoproteinele eritrocitare de grup sanguin se gasesc si pe suprafata celulelor tisulare, dar si în secretiile exocrine (saliva, suc gastric etc.), la circa 75% dintre indivizi, denumiti "secretori". Glicoproteinele din secretii sunt hidrosolubile si studiul lor a fost mai usor decât al moleculelor eritrocitare.

Gruparile glucidice ale glicoproteinelor membranei eritrocitare au rol dominant în determinarea specificitatii de grup sanguin, asa cum au evidentiat studiile de digestie enzimatica controlata. Eritrocitele tuturor grupelor sanguine au un precursor antigenic comun – *antigenul H* (codificat de gena H), bine exprimat pe suprafata antigenelor de grup O si în cantitati progresiv descrescând pe hematiile de grup A, B si AB.

Specificitatea antigenica de grup O este conferita de *L-fucoza*. Grupul A are o gena ce codifica sinteza glicozil-transferazei, enzima ce adauga N-acetil-D-galactozamina, la galactoza preterminala a moleculei

H. De aceea, specificitatea antigenică a eritrocitelor de grup A este conferită de trizaharidul *N-acetil-galactozamina, galactoză și L-fucoză*:

N-acetil galactozamina (α 1-3) Gal – R (R = restul catenei polizaharidice)



Indivizii de grup B au o gena ce adaugă D-galactoză (în loc de N-acetil galactozamina) la galactoză preterminală a moleculei H, având un determinant antigenic format din două resturi terminale de *D-galactoză și L-fucoză*.

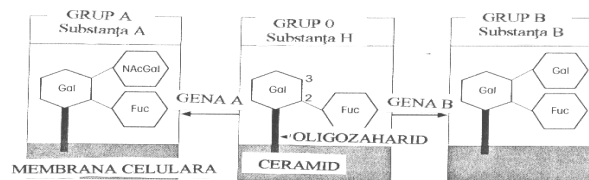


Fig. 3. Oligozaharidele cu rol de epitopi determinanți ai grupelor sanguine ABO. Oligozaharidul este ancorat în membrana eritrocitului prin intermediul sfingomielinei, denumită ceramidă. 85% din indivizii umani secreta substanțele de grup sanguin în salivă. La indivizii "secretori", oligozaharidele sunt prezente sub formă 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 sau 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 tesuturilor. 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 greșirea unui țesut sau a unui organ, moleculele de histocompatibilitate se comporta

ca antigene și declanșează răspunsul imun al organismului receptor, care determină respingerea greței.

Antigenele individuale de histocompatibilitate se evidențiază prin reacția de respingere a greței. 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 (înbred). Verificarea purității genetice a unei populații de organisme se face prin transplantul de piele. Dacă greța este acceptată, organismele respective aparțin aceleiași linii înbred. Termenii "izoantigen" și "înbred" 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* = strain) 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

specificitate de combinare cu anticorpii, în raport cu molecula de origine.

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

a) *conjugate haptena-proteina*, prin reactia de diazotare, iodurare si respectiv substitutie nucleofila;

b) *conjugate proteina-proteina*, prin intermediul unor agenti bifunc-tionali de legare (diizocianatii si carbodiimidele);

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

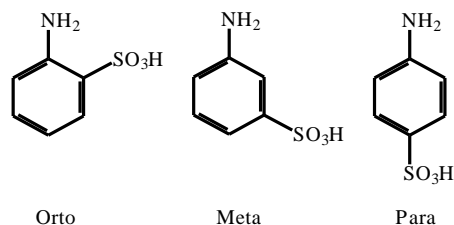
a) *Conjugatele haptena-proteina* au fost utilizate de Landsteiner, în studiile cu privire la mecanismele raspunsului imun. In conjugate, haptenele îndeplinesc rolul de *epitopi* (grupari determinate de specificitate), iar moleculele proteice au rolul de *carrier*. Raspunsul imun nu este orientat strict fata de epitopii haptenici, ci si fata de determinanti antigenici ai gruparii carrier.

Cuplarea haptena-purtator necesita existenta unei grupari reactive a haptenei, care sa se lege covalent cu gruparile functionale ale purtatorului, cu conditia pastrarii integritatii functionale a celor doi reactanti. Haptenele se pot cupla cu purtatori foarte diversi, dar proteinele naturale (albumina, globulinele) furnizeaza conjugate foarte imunogene.

Landsteiner a cuplat amino-benzen-sulfonatul cu molecule proteice, prin reactia de diazotare si a obtinut azoproteine:

Dupa cuplarea haptenei cu Tir, His sau Lys din structura unei proteine, rezulta un antigen artificial care induce formarea a doua categorii de anticorpi cu specificitati diferite, dupa cum reactioneaza cu haptena, sau cu molecula purtator.

Conjugatele azoproteice au permis studiul influentei configuratiei spatiale a haptenei, asupra specificitatii antigenice. Gruparea sulfonat a fost legata în pozitia *orto*, *meta* sau *para* a haptenei aminobenzen. Antiserurile obtinute au specificitate fata de fiecare izomer. Izomerul *meta* al aminobenzen-sulfonatului, cuplat cu proteina, pastreaza capacitatea de a precipita cu anticorpii specifici fata de proteina nativa, în timp ce conjugatele cu izomerii *orto*- si *para*- dau reactie foarte slaba de precipitare. Concluzia este ca izomerii de pozitie induc modificari sterice (conformationale) ale haptenei.



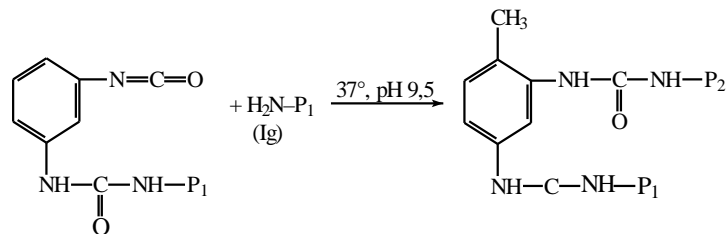
Conjugatele haptena-proteina se pot obtine prin *reactia de iodurare*. Proteinele puternic iodurate își modifica specificitatea antigenica. Ele induc sinteza anticorpilor care dau reactii încrucisate de precipitare cu proteinele iodurate heterologe. Semnificatia este ca prin iodurare, proteinele își pierd specificitatea antigenica. Toate proteinele iodurate induc sinteza anticorpilor fata de o grupare iodurata, în special fata de tirozina iodurata, indiferent de specificitatea gruparii purtator.

O alta reactie de obtinere a conjugatului haptena-proteina este cea de *substitutie nucleofila*. Cele mai folosite haptene sunt 2,4-dinitrofenolul(DNP) si 2,4,6-trinitrofenolul(TNP).

Mecanismul molecular al cuplarii este urmatorul: un atom de H din gruparea OH^- , NH_2^+ sau S-SH a proteinei, este înlocuit de gruparea haptena prin eliminarea apei. Proteina pierde electroni, iar nucleul benzenic îi accepta. Gruparile donoare de electroni sunt OH^- , NH_2^+ , S-SH. Gruparile DNP si TNP sunt cuplate cu proteina purtator sub forma 2,4-dinitrobenzen-sulfonatului de Na, a 2,4,6-trinitrobenzen-sulfonatului de Na sau sub forma derivatilor halogenati.

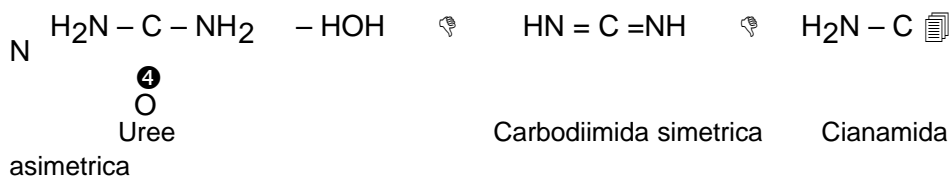
Reactia dintre o proteina si 2,4-dinitrobenzen-sulfonatul de sodiu ilustreaza mecanismul *atacului nucleofilic*, reactie în care proteina cedeaza electroni, iar nucleul benzenic îi accepta.

b) *Conjugatele proteina-proteina* se obtin prin intermediul agentilor bifunctionali de legare: diizocianatii si carbodiimidele. Deoarece gruparile *ciano* au reactivitate diferita, reactia de cuplare se realizeaza în trepte. De exemplu, gruparea din pozitia 4 a toluien-diizocianatului este mai reactiva decât gruparea *ciano* din pozitia 2. Aceasta permite ca una dintre proteine sa se cupleze în pozitia 4, iar ulterior, într-o noua etapa a reactiei, cea de a II-a proteina se va cupla la gruparea *ciano* din pozitia 2:

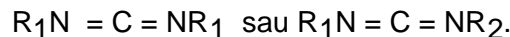


Etapa a II-a a reacției de cuplare

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



Carbodiimidele pot fi substituie simetric sau asimetric cu molecule proteice:



Agentii bifuncționali de cuplare permit obtinerea conjugatelor proteice (conjugate anticorpi-feritina, insulina-albumina), dar se folosesc si ca mediatori ai legării diferitelor molecule proteice pe suprafața eritrocitelor.

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

c) *Conjugatele proteina-suport insolubil* se obtin 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, sepharoza, 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

leaga necovalent de imunosorbent, dupa care poate fi eluat cu un agent chimic.

Anticorprii pot fi imobilizati pe un suport insolubil, prin tratamentul cu un agent de legare încrucisata (glutaraldehida), dar multe din situsurile reactive pt fi denaturate sau ramân ascunse.

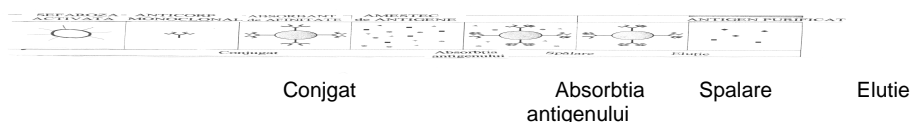


Fig. 4. Principiul functional al *imunosorbentilor* utilizati în cromatografia de afinitate. Coloana contine sefaroza, pe care sunt fixate moleculele de anticorp. Amestecul de antigene este trecut prin coloana, unde va fi retinut numai antigenul care recunoaste specific anticorpul fixat.

Cel mai bun suport de imobilizare este agaroză, un polizaharid obtinut prin fractionarea 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 anticorprii, ci și antigenele sau chiar celulele intacte.

Imunosorbentii 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 secvența 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 greutății moleculare și a conformației moleculare, ușurând studiul imunochimic al grupurilor 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. Prezenta

aminoacizilor aromatici confera o anumita rigiditate a epitopilor si implicit, o imunogenitate superioara.

Pentru a fi imunogeni, copolimerii trebuie sa fie catabolizati de aparatul enzimatic al celulelor care prelucreaza si prezinta antigenul. Polipeptidele formate din D-aminoacizi sunt slab imunogene, datorita incapacitatii organismului de a cataboliza polimerul. Polipeptidele sintetice s-au dovedit a fi foarte utile în studiile de imunochimie, cu privire la:

- determinarea marimii gruparii determinante de specificitate si indirect, a situsului de combinare a anticorpilor specifici;
- rolul dimensiunilor moleculei asupra proprietatilor de imunogenitate;
- rolul configuratiei spatiale a moleculei în conferirea proprietatii de imunogenitate;
- identificarea epitopilor secventiali si conformationali.

Determinantii antigenici

De cele mai multe ori, antigenele sunt macromolecule complexe sau chiar celule întregi, dar raspunsul imun, dupa injectarea lor în organism, este orientat predominant fata de situsuri discrete, strict limitate ale antigenului, denumite *grupari determinante de specificitate (gds)*, *situsuri antigenice*, *determinanti antigenici* sau *epitopi*.

Epitopul este regiunea limitata a antigenului care induce un raspuns imun specific, se combina cu situsul activ al moleculei de anticorp si determina specificitatea reactiei antigen-anticorp.

Antigenele proteice prezinta cea mai mare diversitate de epitopi, atât în privinta compozitiei chimice, cât si a configuratiei spatiale. Studiile de cristalografie cu raze X permit identificarea atomilor individuali ai unei molecule si determinarea mobilitatii lor, exprimata în *factori de temperatura atomica*. Factorii de temperatura ridicata corespund regiunilor moleculare cu mobilitate înalta (regiuni calde). În molecula proteica, epitopii corespund zonelor moleculare cu o mobilitate înalta a atomilor. La temperatura biologica, aceste secvente necesita cantitati mici de energie, pentru a trece dintr-o conformatie în alta. Invers, regiunile moleculare cu mobilitate atomica redusa au factori termici de valoare scazuta (regiuni reci) si necesita o cantitate mai mare de energie pentru schimbarea conformatiei. Adeseori, epitopii antigenici sunt localizati în regiunile calde ale moleculei.

Capacitatea unei regiuni a moleculei de antigen de a functiona ca epitop (adica de a stimula raspunsul imun) se numeste *imunopotenta*.

Marimea gruparii determinante de specificitate s-a apreciat indirect prin determinarea marimii haptenei capabila sa "umpla" complet situsul de combinare al anticorpului. În acest scop s-a utilizat *sistemul dextran-antidextran*, într-o reactie de precipitare. Dextranul cu greutate moleculara de 50 kD este imunogen si prin injectare repetata la iepure, se obtine serul imun anti-dextran. Artificial se prepara oligozaharide cu dimensiuni controlabile. Reactia de precipitare dextran-anticorpi specifici este inhibata progresiv de oligozaharidul de glucoza si este completa în prezenta hexazaharidului. *Oligomerul cu 6 resturi de glucoza* corespunde celui mai bun *ligand* care se cupleaza cu anticorpii anti-dextran (ligandul este orice molecula capabila sa formeze un complex cu o alta molecula). Heptazaharidul, ca si oligozaharidele cu mai putin de 6 resturi de glucoza inhiba mai putin eficient reactia de precipitare a sistemului dextran-antidextran.

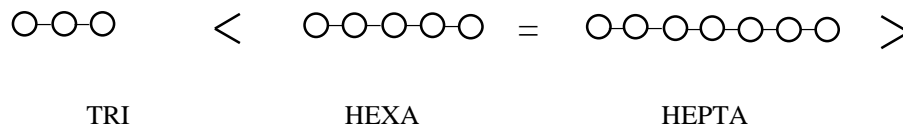


Fig. 5. Oligozaharidul format din 6-7 resturi de glucoza, blocheaza cu cea mai mare eficienta, reactia de precipitare dintre dextran si anticorpii specifici antidextran. Oligozaharidele mai mari sau mici nu se combina eficient cu anticorpii si inhiba într-o masura progresiv mai mica reactia de precipitare cu dextranul.

Cercetari similare s-au facut cu homopolimeri de aminoacizi (poli-Lys, poli-Ala), legati de proteine purtator. Serul imun obtinut pe iepure, fata de aceste conjugate, contine predominant anticorpi specifici fata de haptena homopolimerica. Reactia de precipitare dintre serul specific si conjugatul haptena-proteina, este inhibata de *pentamerul de alanina*, ceea ce denota ca acesta se leaga cu cea mai mare afinitate de situsul de combinare al anticorpului. Pentamerul corespunde marimii epitopului antigenic al conjugatului si reflecta, indirect, marimea situsului de combinare al anticorpilor specifici.

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

Valenta antigenului s-a definit conventional prin numarul de epitopi ai unui antigen. Numarul de epitopi ai unei molecule antigenice variaza în raport cu marimea si complexitatea sa structurala.

Valenta se evalueaza prin numarul moleculelor de anticorp care reactioneaza cu o molecula de antigen. Pentru evaluarea numarului de epitopi ai unui antigen, trebuie avut în vedere ca molecula de anticorp

este bivalenta (leaga doi epitopi), dar si faptul ca un antiser nu contine anticorpi fata de toti epitopii unui antigen.

Studiile privind reactia antigen-anticorp *in vitro*, au condus la concluzia existentei a trei tipuri de valente antigenice (epitopi):

– *valentele functionale conformationale* sunt conferite de epitopii conformationali, situati la suprafata moleculei native de antigen si sunt accesibili sistemelor imunitare de recunoastere specifica a moleculei. Numarul lor este proportional cu greutatea moleculara a antigenului si este dependent de complexitatea conformationala a moleculei. Un situs antigenic, teoretic, s-ar gasi la fiecare câteva mii de daltoni;

– *valentele functionale interne* sunt reprezentate de epitopi interni, care, în molecula nativa sunt inaccesibile sistemului imunitar. Ele devin functionale, *in vivo*, dupa degradarea partiala a moleculei, în celulele care prelucreaza antigenul;

– *valente nefunctionale*, reprezentate de epitopi criptici care nu devin functionale dupa prelucrarea antigenului *in vivo*, dar se pot releva dupa clivarea enzimatica *in vitro* a moleculei.

Numarul total al epitopilor unui antigen nu se cunoaste, dar se poate evalua cu aproximatie, dupa degradarea partiala a moleculei de antigen. De exemplu, albumina serica bovina nativa are 6 situsuri functionale conformationale. Dupa scindarea enzimatica menajata *in vitro*, rezulta 9 fragmente peptidice, fiecare dintre ele dând reactie de precipitare cu serul anti-albumina nativa. Pentru ca reactia de precipitare sa aiba loc, sunt necesari cel putin doi epitopi, ceea ce înseamna ca molecula de albumina serica bovina are cel putin 18 epitopi, care devin functionali dupa scindarea enzimatica a moleculei si induc sinteza anticorpilor specifici.

Efectul de carrier

Antigenele prezinta o dualitate functionala evidenta, conferita de faptul ca specificitatea raspunsului imun este orientata predominant, dar nu exclusiv, fata de gruparile determinante de specificitate. La rândul sau, suportul macromolecular (carrier) are proprietatea de imunogenitate, dar confera si un grad de specificitate a raspunsului imun. Rezultatele experimentale cu *conjugate haptena-proteina* (dinitrofenol-albumina serica) au evidentiat ca în cazul în care suportul carrier este nonself, raspunsul imun este mai intens. Antigenul artificial s-a obtinut prin cuplarea DNP cu albumina de soarece. Injectarea conjugatului la soarece induce un raspuns imun slab, cu un titru scazut al anticorpilor anti-DNP(anti-haptena). Conjugatul DNP-albumina serica bovina, injectat la soarece, stimuleaza intens raspunsul 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, cuplata 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, cuplata 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. Moleculile 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, dacă purtătorul a fost un antigen T-dependent. Moleculile neimunogene nu au calități de carrier pentru haptene.

"Efectul de carrier" denotă că haptena și epitopii purtătorului sunt recunoscuți separat, de limfocitele B și respectiv T. Cele două subpopulații de celule cooperează pentru a induce sinteza anticorpilor cu specificitate de haptena.

FACTORII CARE CONDITONEAZA IMUNOGENITATEA

Antigenul este o substanță nonself, care, la contactul cu celulele sistemului imunitar, declanșează sinteza anticorpilor specifici și a receptorilor celulari cu care se combină *in vitro* și *in vivo*. Definiția este nesatisfăcătoare, pentru că se referă la *ce face* antigenul, fără să-l definească în termeni proprii. Definiția completă a antigenului este rezultatul însumării unei serii de proprietăți, fiecare dintre ele fiind o condiție necesară a imunogenității, dar nu și suficientă.

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

1. *Caracterul strain al moleculei* este condiția majoră a imunogenității. O moleculă nonself este cu atât mai imunogenă, cu cât este mai diferită de moleculele organismului receptor. În esență, caracterul nonself al unei molecule nu este strict dependent de raporturile taxonomice ale organismului donor cu cel receptor de

antigen, ci este consecinta deosebirilor de structura moleculara.

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 imunogena pentru iepure, desi celelalte proteine de cal sunt imunogene. Caracterul nonself nu implica în mod obligatoriu existenta unor molecule cu totul noi, neîntâlnite la organismul receptor, ci numai modificari minime ale moleculei, conferite de existenta câtorva aminoacizi diferiti în anumite pozitii ale catenei proteice. Pentru restul secventei, molecula nonself poate fi asemanatoare proteinelor proprii organismului receptor de antigen. Micile diferente de secventa a aminoacizilor, au rolul de epitopi. De regula, proteinele aparute timpuriu în evolutie au un grad superior de asemanare chimica interspecifica si sunt slab imunogene pentru speciile înrudite (de exemplu, albumina serica), iar cele aparute mai târziu (de exemplu, globulinele serice) sunt mai heterogene si mai imunogene.

2. *Marimea moleculei* influenteaza imunogenitatea moleculelor nonself. Pentru a fi imunogena, o molecula trebuie sa aiba dimensiuni care sa depaseasca un prag limita. Moleculele cu o buna imunogenitate sunt mai mari de 10 kD. Cu cât o molecula este mai mare, cu atât numarul epitopilor sai este mai mare. Secventele de aminoacizi cu rol de epitopi au sansa repetarii de mai multe ori într-o molecula mai mare. Proteinele mari (de exemplu, ovalbumina – 40 kD, albumina serica - 70 kD, hemocianina – 6000 kD) sunt foarte imunogene, iar cele cu molecula mica (insulina – 5,7 kD, histonele – 6 kd, glucagonul – 3,5 kD) sunt putin imunogene. Glucagonul este cea mai mica molecula naturala fata de care s-au obtinut anticorpi, iar cea mai mica molecula sintetica imunogena este un polipeptid de 1,4 kD.

Pentru polizaharide, limitele minime pentru imunogenitate sunt mai mari. Dextranii sunt antigenici daca au peste 50 kD, cu variatii mari de raspuns imun de la o specie la alta (omul si soarelele raspund bine, cobaiul – foarte putin).

Moleculele mici neimunogene sau slab imunogene pot dobândi o imunogenitate optima, dupa adsorbția pe particule inerte de colodiu, caolin sau de carbune. Acestea au rol de purtatori si asigura cresterea taliei moleculare.

3. *Complexitatea moleculara*. Dimensiunile mari ale unei molecule nonself nu sunt totdeauna suficiente pentru a-i conferi imunogenitate. De exemplu, moleculele de polimeri sintetici (poli-acrilamida, nylonul) sunt foarte mari, fiind formate dintr-un numar mare de monomeri repetitivi, dar nu sunt imunogene pentru ca nu au complexitatea moleculara minima necesara.

Moleculele naturale, în special proteinele au un grad înalt de complexitate, datorita diversitatii monomerilor componenti. Fiecare tip de molecula proteica are o configuratie tridimensionala unica, determinata de secventa specifica de aminoacizi.

Proteinele globulare au cea mai mare complexitate antigenica, derivata din configuratia lor terciara. Ele poseda *epitopi exprimati pe suprafata moleculei native*, accesibili fenomenului de recunoastere de catre celulele sistemului imunitar si *epitopi interni*, care pot stimula raspunsul imun, dupa clivarea enzimatica a moleculei în celulele specializate pentru prelucrarea antigenelor. De exemplu, serul imun anti- albumina serica bovina precipita cu fiecare din cele 9 fragmente peptidice rezultate prin clivajul enzimatic al moleculei native, ceea ce sugereaza ca *in vivo*, molecula este scindata si astfel se releva epitopi interni, fata de care se sintetizeaza anticorpi specifici.

Complexitatea unei molecule nu depinde numai de diversitatea monomerilor, ci si de secventa lor si de efectul secventei asupra structurii secundare, terciare si eventual quaternare a moleculei.

4. *Starea fizica a antigenului.* Imunogenitatea unei molecule este conditionata de o anumita rigiditate a epitopilor sai. Lipsa rigiditatii ar explica imunogenitatea redusa a gelatinei, o proteina denaturata, derivata din hidroliza colagenului, foarte bogata în glicocol (21-35%).

În mod obisnuit, rotatia libera a unei molecule are loc numai între C α si legatura peptidica. Glicocolul nu realizeaza ramificatii ale catenei polipeptidice în pozitia C α , ceea ce face ca molecula de gelatina sa prezinte rotatii libere în jurul axului longitudinal. Gelatina are o proportie foarte mica de aminoacizi aromatici (Tir, His), iar cisteina si triptofanul lipsesc.

Legarea L-Tir, în proportie de 2% marestea gradul de imunogenitate a gelatinei. Complexul induce sinteza anticorpilor care precipita gelatina nativa.

5. *Solubilitatea.* Conditia solubilitatii unui antigen pentru a fi imunogen este sugerata de urmatoarele observatii:

– polimerii macromoleculari sintetici care nu sunt solubilizati, adica nu sunt hidrolizati, sunt lipsiti de imunogenitate;

– organismele cu echipamente enzimatice hidrolitice mai active (soarece) elaboreaza un raspuns imun mai amplu fata de un antigen greu solubil (de exemplu, polizaharidul de pneumococ), în raport cu organismele care hidrolizeaza mai greu (de exemplu, iepurele);

– antigenele corpusculare (celule, virioni) devin imunogene dupa solubilizarea si eliberarea componentelor imunogene în macrofag, unde are loc degradarea menajata a antigenelor.

Hidroliza enzimatica a antigenului nu este totdeauna o conditie prealabila obligatorie a imunogenitatii. Studiile cu antigene sintetice au aratat ca, în momentul recunoasterii de catre celulele sistemului

imunitar, o parte a epitopilor sunt intacti, identici cu aceia ai moleculei native.

6. *Accesibilitatea determinantilor antigenici*. Pentru ca un epitop sa fie imunogen, trebuie sa fie expus la suprafata moleculei, pentru a fi accesibil mecanismelor de recunoastere imunitara. De exemplu, un polimer de L-Lys, cu rol de purtator pentru tripeptidul Tir-Ala-Glu este imunogen. Dupa mascarea epitopilor tripeptidici cu catene de poli-Ala, molecula își pierde imunogenitatea.

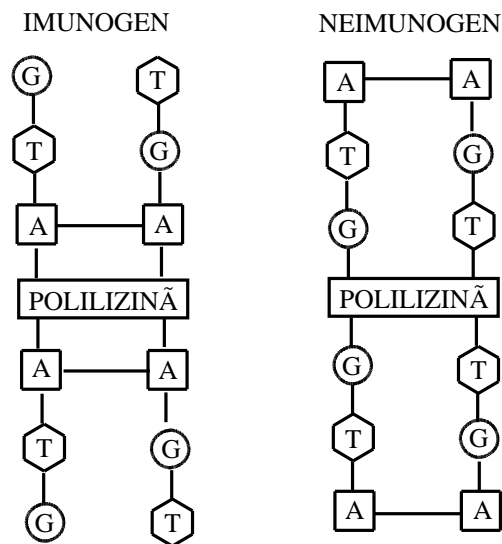


Fig. 6. Rolul accesibilitatii *determinantilor antigenici* în imunogenitate. Copolimerul multicatenar format din acidul L-glutamic (G) și tirozina (T), legat prin intermediul poli-L-alaninei (A-A), de purtatorul polilizina este imunogen. Acelasi copolimer, legat direct de purtatorul polilizina, dar mascat de polialanina, este neimunogen.

7. *Configuratia spatiala a moleculei* este un factor decisiv pentru imunogeneza. Studiile privind imunogenitatea antigenelor sintetice, au evidentiat ca cel mai adesea, anticorpilor se formeaza fata de o anumita secventa de aminoacizi, care are rol de epitop. Dar, uneori, anticorpilor sunt specifici fata de *configuratia spatiala* a unui determinant antigenic. Concluzia a reiesit din specificitatea distincta a anticorpilor fata de doua polipeptide sintetice cu aceiasi compozitie chimica, dar cu configuratii spatiale diferite. In primul caz, determinantul antigenic este tripeptidul Tir-Ala-Glu, legat de un polimer sintetic, cu rol de purtator. La iepure, se sintetizeaza anticorpi specifici fata de tripeptidul Tir-Ala-Glu.

În al II-lea caz, prin polimerizarea tripeptidului se obtine o molecula cu structura periodica a secventei Tir-Ala-Glu, care dobândește configuratie α -helicala. Dupa imunizarea iepurelui, se

sintetizeaza anticorpi care precipita moleculele cu structura spatiala α -helicala, dar nu precipita tripeptidul simplu. Pe baza acestor observatii, M. Sela recunoaste existenta a doua tipuri de determinanti antigenici:

– *determinanti secventiali*, a caror specificitate este data de secventa subunitatilor componente (aminoacizi, monozaharide), indiferent de structura spatiala a moleculei. Epitopii secventiali sunt comuni pentru toate polipeptidele care au secvente de aminoacizi identice sau asemanatoare si existenta lor este o sursa a reactiilor imune încrucisate;

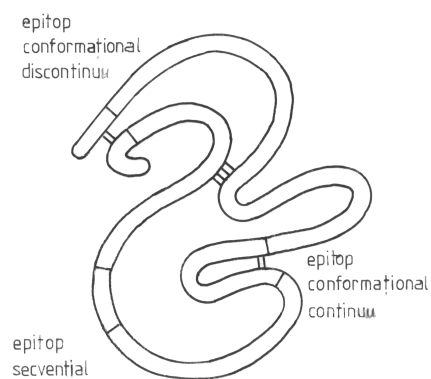


Fig. 7. Tipuri de epitopi. Epitopi secventiali si conformationali, continui si discontinui.

– *determinanti antigenici conformationali*, a caror specificitate deriva din configuratia spatiala a moleculei. Epitopii conformationali sunt de doua feluri: *continui* si *discontinui*. Cei discontinui sunt formati din regiuni distincte ale moleculei, care ajung în juxtapozitie când molecula se pliaza în configuratia sa nativa.

Mentinerea integritatii determinantilor conformationali este conditionata de integritatea legaturilor S-S. Dupa fragmentarea enzimatice a moleculei, epitopii conformationali discontinui își pierd integritatea si semnificatia functionala, iar cei continui au o soarta variabila: își pierd sau își pastreaza configuratia avuta în molecula nativa.

Importanta epitopilor conformationali a fost evidentiata pentru molecula de lizozim din albusul de ou de gaina. Bucla formata de aminacizii 64-80 este închisa de o legatura S-S între doua resturi de cisteina. Secventa buclei a fost sintetizata artificial si legata de polimerul

Ala-Lys, cu rol de carrier. Complexul format induce sinteza anticorpilor

la iepure, specifici fata de aceasta secventa, dar dau reactie de precipitare si cu molecula nativa de lizozim.

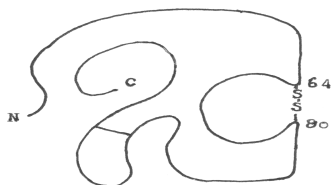


Fig. 8. Bucla formata din aminoacizii 64-80 ai secventei moleculei de lizozim din albusul de ou, formeaza un *determinant conformational*.

În general, anticorpilor care se sintetizează față de antigenele proteice naturale au specificitate, în primul rând, față de epitopii conformationali 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

sa stimuleze reactivitatea imunitara. Se disting doua categorii de antigene endogene: 1) *antigene sechestrare* (mascate) si 2) *antigene alterate*.

Antigenele sechestrare sunt substante cu localizare *intracelulara* si de aceea nu sunt accesibile sistemului imunitar pentru a fi recunoscute în cursul dezvoltarii ontogenetice. Sub actiunea unor factori (fizici, chimici, biologici), inductori ai unor procese de liza celulara, moleculele cu localizare intracelulara se pot elibera si sunt recunoscute ca nonself de sistemul imunitar. De exemplu, anticorpii antimitocondriali care caracterizeaza ciroza biliara primitiva, se sintetizeaza dupa liza unor celule si eliberarea acestor organite.

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

– *proteinele cristalinelor*, delimitate de cristaloida, se elibereaza în cursul interventiilor chirurgicale, dupa traumatisme care sparg capsula sau dupa afectiuni care permeabilizeaza cristaloida. Ele sunt recunoscute ca molecule nonself si stimuleaza raspunsul imun anti-cristalin, ce poate afecta irisul, procesele ciliare si coroida;

– *proteinele spermatiche*, în starile de spermatozoizi, induc sinteza locala a autoanticorpilor în structurile epididimului. Anticorpii recunosc specific un antigen al spermatozoizilor si rezultatul este imobilizarea sau chiar aglutinarea, cu consecinta sa, sterilitatea imunitara;

– *caseina din lapte* poate stimula reactivitatea autoimunitara.

Antigenele alterate sunt molecule normale ale suprafetei celulare, legate de membrana, care, din diferite cauze (uzura fiziologica sau sub actiunea diferitilor factori – fizici, chimici, biologici) își modifica structura chimica si sunt recunoscute ca molecule nonself. De exemplu, unele medicamente, dupa legarea cu diferite molecule din plasma sau de pe suprafata eritrocitelor, le modifica conformatia nativa si acestea sunt recunoscute ca nonself. Virusurile induc sinteza în celula infectata, a antigenelor proprii, dar adeseori moleculele specific virale determina modificarea unor molecule self, care sunt recunoscute ca molecule straine si initiaza conflictul autoimun.

În conditii normale, antigenele sechestrare si alterate sunt neutralizate si eliminate, fara consecinte patologice. În 1900, Ehrlich a formulat conceptul “horror autotoxicus”, care semnifica preponderenta actiunii mecanismelor homeostatice. In conditiile unei reactivitati imunitare crescute, activarea raspunsului imun fata de aceste componente chimice are drept consecinte, declansarea *maladiilor autoimune*, considerate ca fiind expresia patologica a functiei imunitare.

Antigene heterofile

Antigenele heterofile sunt substante 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 încrucisate: 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 tesuturile de cobai. J. Forssman a descoperit că serul imun obținut prin imunizarea iepurei cu omogenat tisular de cobai, aglutinează eritrocitele de berbec. Este o reacție încrucisată, pe care autorul a denumit-o *reacție heterologa*. Termenul "heterolog" s-a păstrat pentru reacțiile încrucisate previzibile, pe care le manifestă diferite antigene înrudite (de exemplu, albumina serică de om și de primat). Denumirea "heterofil" s-a atribuit reacțiilor încrucisate pe care le produc antigene neînrudite.

Regnul animal poate fi împărțit în specii *Forssman pozitive* (cobai, hamster, soarece, oaie, capra, cal, pisica, câine, pui de găină etc.) și specii *Forssman negative* (om, iepure, sobolan, maimuțe, bou, găscă). 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 iepurei 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 încrucisată 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 încrucisate pe care antigenele de tip Forssman le dau cu serul imun obținut față de unul din antigenele grupului se explică prin asemanarea 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 asemanătoare din punct de vedere chimic, chiar

daca apartin unor organisme cu pozitie sistematica foarte diferita. Antigenul Forssman este un glico-sfingolipid, la care determinantul antigenic este format din doua resturi de N-acetil-galactozamina.

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

Cele mai importante sisteme heterofile sunt cele cu semnificatie biologica sau importanta medicala: sistemul Forssman, sistemul Paul-Bunnell (P-B) si sistemul Hanganutziu-Deicher(H-D).

Anticorprii caracteristici *mononucleozei infectioase* (Paul si Bunnell, 1932) apar la 90% dintre pacientii infectati cu virusul Epstein-Barr si sunt IgM care se evidentiaza într-o reactie de aglutinare cu eritrocite de ovine sau bovine. Anticorprii serici recunosc doua antigene distincte: un antigen prezent numai pe eritrocitele bovine (B) si un al II-lea antigen, existent atât pe eritrocitele de bovine cât si pe cele de ovine (BS). Majoritatea pacientilor cu mononucleoza infectioasa sintetizeaza anticorpi anti-B si anti-BS, dar o mica proportie contin numai anticorpi anti-B. Anticorprii P-B se sintetizeaza fata de un antigen, ce pare a fi o glicoproteina codificata de virus.

Anticorprii H-D, descrisi de Hanganutziu (1924) si Deicher (1926) sunt declansatori ai maladei serului, la pacientii care au primit injectii de ser heterolog. Sinteza lor este indusa de antigenul H-D, care se gaseste în tesuturile mamiferelor, dar lipseste din tesuturile normale umane, însa reapare în unele tesuturi umane patologice (limfoame si mieloame). Din punct de vedere chimic, antigenul H-D este acid N-glicolil-neuraminic.

Alte antigene heterofile. Antigenele grupului Rh se gasesc pe eritrocitele maimutei *Macaccus rhesus* si pe eritrocitele a circa 85% dintre indivizii umani.

Antigenul H de pe eritrocitele umane de grup 0 este foarte asemanator cu un polizaharid al celulelor de *Yersinia pestis* (agentul ciumei), iar antigenul eritrocitar uman de grup A este asemanator cu un antigen al virusului variolei (smallpox). Dezavantajul asemanarii chimice dintre antigenele unor agenti patogeni si antigenele de grup sanguin este evident: indivizii umani de grup sanguin 0 si A reactioneaza mai slab la contactul cu antigenele asemanatoare, iar procesul infectios se instaleaza mai rapid.

O importanta practica deosebita au antigenele heterofile de *T. pallidum* si cele de *Proteus* 0x19. Fractia majora a anticorpilor specifici fata de *T. pallidum* aglutineaza o suspensie de celule bacteriene de *Proteus* 0x19. Aceiasi fractie a anticorpilor se combina cu *cardiolipina*, ceea ce permite ca în reactia de fixare a complementului pentru determinarea infectiei cu *T. pallidum* sa se utilizeze antigenul cardiolipinic, mult mai usor de obtinut.

Adjuvantii

Substantele sau amestecurile de substante, care în asociatie cu un antigen sau injectate simultan cu acesta, intensifica raspunsul imun specific fata de antigenul respectiv sunt denumite *adjuvanti* (*adjuvere*, latin = a ajuta).

Punctul de plecare al introducerii adjuvantilor în practica imunologica a fost un fapt de observatie: dupa asocierea unui vaccin bacterian celular, cu un vaccin macromolecular (anatoxina), raspunsul imun antitoxina este mult mai intens decât în cazul în care cele doua vaccinuri se administreaza separat. Dupa injectarea vaccinului celular anti-tifoparatic A si B, împreuna cu anatoxina tetanica (TAB), titrul anticorpilor fata de anatoxina tetanica este de 20-30 de ori mai mare decât în cazul injectarii separate a anatoxinei tetanice. Explicatia acestui fenomen a fost data ulterior: la locul injectarii vaccinului, corpii celulari bacterieni determina un proces inflamator, adica un aflux local de celule efectoare ale raspunsului imun (limfocite, macrofage). Macrofagele capteaza si fixeaza anatoxina într-un stoc, de unde este eliberata treptat si astfel se prelungeste durata de stimulare a sistemului imunitar.

Cel mai cunoscut si folosit pentru studiul experimental al imunogenitatii antigenelor este adjuvantul Freund, o emulsie de apa în ulei mineral de parafina. Antigenul se suspenda în apa. Emulsia de apa în ulei se realizeaza cu un emulgator care contine grupari lipofile si hidrofile (lanolina, arlacel A). Acesta este adjuvantul *Freund incomplet*. Dupa adaugarea celulelor omorâte de *M. tuberculosis*, rezulta adjuvantul *Freund complet*. Principiul imunostimulator al celulelor de *M. tuberculosis* este reprezentat de glicolipidele si glicolipopeptidele (denumite ceruri) din structura peretelui celular. Glicolipopeptidele sunt formate din *acizi micolici* esterificati cu un polizaharid (arabinogalactan) ce contine arabinoza, galactoza, manoza, la care se leaga un fragment peptidic ce contine D si L-alanina, acid D-glutamic, acid diaminopimelic.

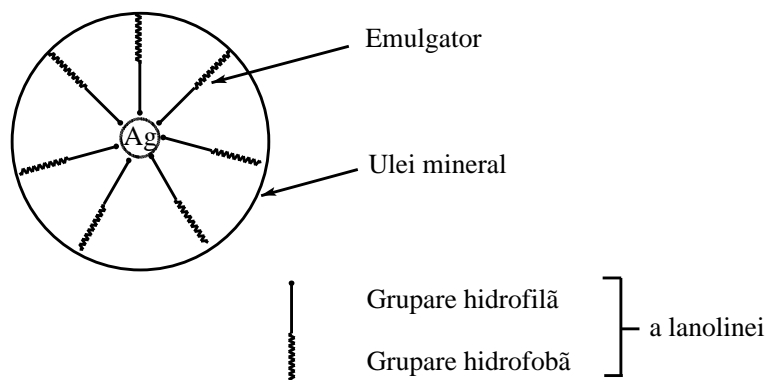


Fig. 9. Reprezentarea schematica a interactiunii moleculelor componente ale adjuvantului Freund.

Adjuvantul Freund determina urmatoarele efecte: a) persistenta antigenului în organism prin întârzierea degradarii sale si eliberarea treptata în circulatie; b) picaturile de emulsie vehiculeaza antigenul pe cale limfatica, în tot organismul, inclusiv spre ganglionii limfatici, unde se va declansa raspunsul imun; c) adjuvantul Freund complet si incomplet fac imunogene doze mici de antigene, care altfel nu ar fi imunogene si maresc semnificativ titrul anticorpilor fata de oricare antigen.

Amestecul de adjuvant si antigen se administreaza subcutan sau intradermic. Administrarea intravenoasa anuleaza efectul adjuvantului. Este posibila administrarea decalata la interval de câteva zile (mai întâi a adjuvantului), daca cele doua injectari se fac în acelasi loc.

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

Endotoxinele bacteriilor Gram negative (*Salmonella*, *Brucella*, *Bordetella* etc.) au efect adjuvant. Ele sunt în acelasi timp adjuvanti, antigene, toxine si factori pirogeni. Efectul maxim se obtine numai daca endotoxina se administreaza simultan sau la mai puțin de 6 ore dupa injectarea antigenului. Nu se adauga vaccinurilor umane pentru ca produce febra.

Sarurile de aluminiu ($Al(OH)_3$, $Al(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$), fosfatul de aluminiu si cele de *calciu* au efect adjuvant, deoarece se combina cu imunogenul si formeaza un complex insolubil la situsul subcutan sau intramuscular al injectarii, marind intervalul de timp în care celulele imunitare pot fi activate. Se stimuleaza afluxul de fagocite si functia de

fagocitoza.

Compusii aluminiului sunt singurii adjuvanti acceptati în clinica umana si veterinara, desi prezinta unele dezavantaje: stimuleaza raspunsul imun mediat humoral, dar nu si imunitatea mediata celular; vaccinurile care contin compusi ai Al nu pot fi conservate prin înghet si nici liofilizate si de aceea necesita transport refrigerat.

Alti adjuvanti actioneaza prin stimularea activitatii enzimelor lizosomale. *Vitamina A* si *sarurile de beriliu, de siliciu, sarurile quaternare de amoniu* mobilizeaza macrofagele la locul injectarii si stimuleaza activitatea lor fagocitara si degradativa.

Capitolul 2

IMUNOGLOBULINELE (ANTICORPII)

Existenta anticorpilor a fost demonstrata de Behring si Kitasato (1890), în serul animalelor imunizate experimental cu toxina tetanica. Serul lor neutralizeaza toxina *in vitro* si o face inofensiva pentru animalele de experienta. Autorii au folosit denumirea de “anticorp” pentru a desemna substantele protectoare ce apar în ser, cu specificitate fata de un antigen corpuscular (bacterii).

Heidelberger (1930) a purificat anticorpii din ser si a evidentiat ca apartin fractiei *proteice*. Tiselius si Kabat (1938) au demonstrat experimental ca, de cele mai multe ori, functia de anticorp este asociata cu *fractia gama a proteinelor serice* si le-au dat denumirea de *gamaglobuline*.

În 1970, prin consens între specialisti, OMS a stabilit ca substantele cu proprietati de anticorp, sa fie grupate în categoria *imunoglobulinelor*, pornind de la faptul ca toate substantele din acest grup au functie imunitara si sunt cuprinse în fractia globulinica a serului. Anticorpii nu sunt numai gamaglobuline. Exista si alte globuline cu functie de anticorp, dupa cum exista si gamaglobuline care nu au activitate de anticorp (de exemplu, proteinele patologice Bence-Jones).

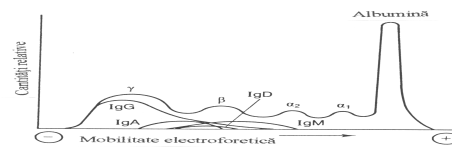


Fig. 10. Mobilitatea *electroforetica* a imunoglobulinelor serice. IgG are cea mai heterogena sarcina electrica si migreaza în regiunile gama si beta. IgE are are mobilitate similara cu a IgD, dar nu poate fi identificat pe electroforegrama datorita

nivelului seric scazut.

Anticorpii sunt imunoglobuline care se sintetizeaza în organism dupa patrunderea unui antigen si au proprietatea de a se cupla specific cu antigenul inductor si de a-i anihila actiunea nociva. Termenul de “anticorp” în acceptiunea sa actuala, a fost folosit de Ehrlich (1891) în lucrarea “Studii experimentale asupra imunitatii”.

Anticorpii formeaza 20% din totalul proteinelor plasmatiche, dar se

gasesc și în lichidele extravasculare, în secrețiile exocrine (saliva, lapte, lacrimi) și ca molecule *receptor de anti-gen* pe suprafața limfo-citelor 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 forma 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 puncte S-S intercatenare. Această secvență se numește *regiunea balamă*. Este sensibilă la acțiunea proteazelor fiind clivată de papaină, pepsină etc. La IgM și IgE, regiunea balamă lipsește, dar cea omologă balamalei este clivată de proteaze. Regiunea balamă 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 puncte 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 terciară a fiecărui lanț polipeptidic.

– *legături intercatenare*, între lanțurile H ce aparțin unor monomeri

diferiti, la IgA₂ si IgM, care formeaza complexe moleculare polimerice:

Domeniile moleculei de Ig se formeaza prin plierea fiecareia din cele 4 catene polipeptidice si prin rasucirea lor în spirala. Domeniile sunt regiuni globulare ale moleculei, legate între ele prin secvente lineare scurte. Domeniile se pliază într-o conformatie stabila, conferita de secventa proprie de aminoacizi. Comparativ cu secventele lineare, domeniile pliate sunt mai rezistente la proteoliza.

Catena L are doua domenii: unul corespunzator regiunii variabile (VL) si altul corespunzator regiunii constante (CL).

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

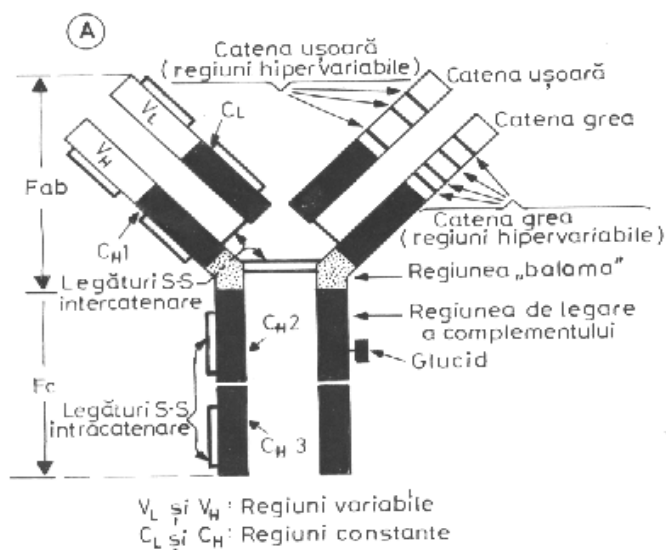


Fig. 11. a. Reprezentarea schematică a structurii primare a moleculei de imunoglobulină.

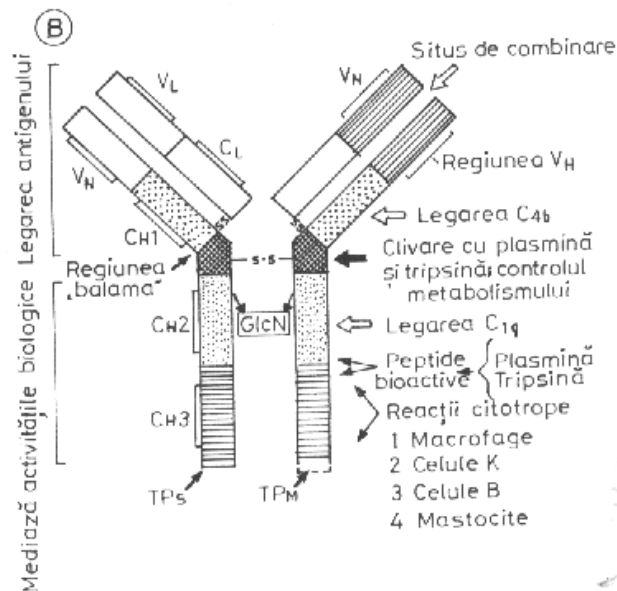


Fig. 11. b. Localizarea diferitelor funcții ale moleculei de anticorp.

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

Secvența de legătură între regiunea constantă (CH₁) și cea variabilă a fiecărei catene se numește *zona 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.

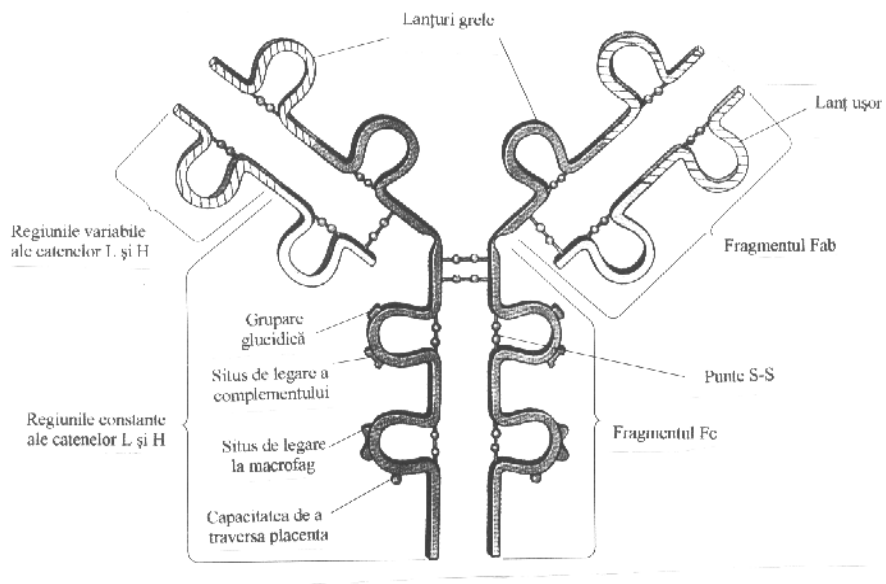


Fig. 12. Reprezentarea schematica a *domeniilor* pliate si stabilizate ale moleculei de IgG.

Moleculele de imunoglobuline exista sub doua forme: *secretate*, ca anticorpi în umorile organismului si *legate* de membrana limfocitelor B, îndeplinind functia de receptori de antigen. Forma legata prezinta o secventa hidrofoba la capatul C-terminal, de circa 30 de aminoacizi, care strabate membrana si se ancoreaza în structura ei.

Metodele de *clivare* si de *denaturare chimica* a moleculei de imunoglobulina au contribuit la înțelegerea structurii si functiei sale. Clivarea s-a realizat cu enzime proteolitice (papaina, pepsina, tripsina) sau prin cianoliza cu BrCN.

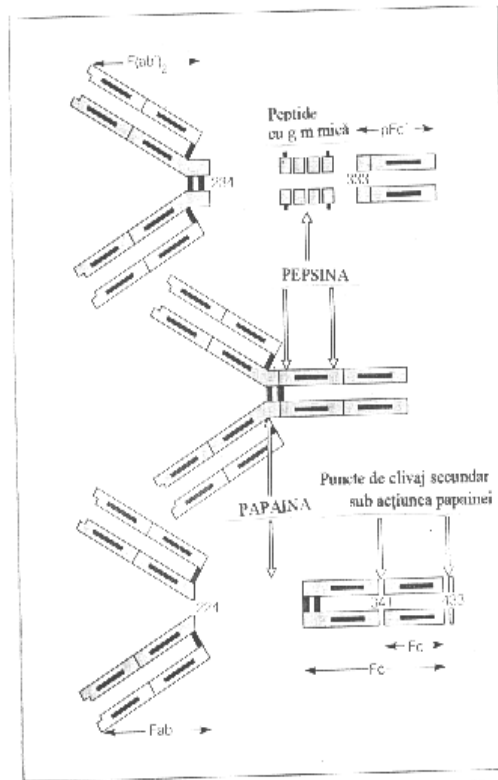


Fig. 13. Clivajul enzimatic al moleculei de IgG₁ umane. Pepsina cliveaza catena H si elibereaza fragmentele F(ab')₂ si regiunea Fc (segmentul cristalizabil). Hidroliza prelungita taie fragmentul Fc' în peptide scurte. Papaina cliveaza molecula în regiunea balama (la restul 224) si elibereaza doua fragmente Fab si un fragment Fc (dupa Roitt, 1984).

Papaina scindeaza molecula de imunoglobulina la nivelul regiunii balama (aminoacidul 224) si elibereaza doua fragmente *Fab* (Fragment antigen binding) si fragmentul *Fc* (cristalizabil). Fiecare fragment *Fab* (50 kD) contine un lant L întreg si jumatarea N-terminala a lantului H, notata cu *Fd* (difficult), care cuprinde domeniile VH si CH₁. Fragmentul *Fab* poate fi scindat transversal si rezulta fragmentul *Fv* (variabil) format din domeniile VL si VH, se-parat de domeniile CL si CH₁.

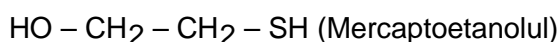
Fragmentul *Fc* (50 kD) este format din jumatatile C-terminale ale celor doua catene H, unite printr-o legatura S-S si prin legaturi necovalente.

Pepsina cliveaza lan-turile H sub regiunea balama si elibereaza fragmentul Fc', mai mic decât fragmentul Fc papainic si doua 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 homoserina. 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 imunoglobulina prin reducerea legăturilor S-S. Agenții reductori (mercaptoetanolul, mercaptoetanolamina, ditioneitolul) au o grupare SH liberă și reduc legăturile S-S intercatenare și intracatenare.



Legăturile intercatenare (H-H sau H-L) sunt reduse mai ușor, iar cele intracatenare, care stabilizează buclele domeniilor moleculei de imunoglobulina, sunt disociate 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 imunoglobulina

În ansamblul efectorilor sistemului imunitar, moleculele de imunoglobulina 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 imunoglobulina este conferită de situsul sau de combinare. Marea diversitate a moleculelor de anticorpi, asigură o diversitate uriașă a situsurilor de combinare, de ordinul a $10^8 - 10^9$ 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 imunoglobulina, 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 spatiala dintre situsul de combinare al moleculei de anticorp si epitopul specific, din punctul de vedere al configuratiei spatiale, este perfecta. Eventualele imperfectiuni geometrice pot fi ocupate de moleculele de apa. Potrivirea perfecta a celor doua unitati combinante este sugerata de metafora "cheie-broasca".

Dupa combinarea cu antigenul, modificarile spatiale ale situsului de combinare a anticorpului sunt minime, nedectabile. Epitopul antigenic are un rol important în potrivirea conformationala perfecta cu situsul de combinare a anticorpului, deoarece corespunde unei regiuni moleculare cu factor de temperatura mai ridicata, ceea ce sugereaza o flexibilitate mai accentuata a secventei moleculare respective.

Flexibilitatea unui determinant antigenic îi permite sa se adapteze mai usor într-un situs de legare preexistent al moleculei de anticorp, chiar daca epitopul nu se potrivește exact geometriei situsului de combinare a anticorpului. Datorita flexibilitatii epitopului, legarea antigenului cu anticorpul se aseamana cu "întâlnirea a doi nori" si nu cu aceea a "doua pietre".

Anticorpii specifici fata de secventele peptidice mobile (calde) ale antigenului proteic, se leaga cu afinitate mai mare de proteina nativa. Aceste rezultate sunt foarte importante din punct de vedere practic, pentru selectarea segmentelor peptidice în vederea obtinerii vaccinurilor sintetice subunitare.

Dimensiunile situsului de combinare s-au dedus indirect, prin determinarea marimii haptenei care blocheaza reactia de combinare a anticorpilor cu antigenul nativ: oligozaharidul format din *6-8 unitati monomerice* ocupa complet situsul de combinare al moleculei de anticorp. Oligozaharidele mai mici inhiba partial reactia specifica de precipitare. Pentru anticorpii specifici fata de antigene proteice, *tetrapeptidele* au blocat cu maxima eficienta reactia de precipitare dintre anticorpi si antigenul nativ.

Functiile biologice efectoare sunt amorsate de reactia antigen-anticorp. Numarul functiilor biologice efectoare este mai mic si sunt dependente de regiunile constante ale moleculei de imunoglobulina.

Fiecare domeniu al regiunii constante a moleculei de imunoglobulina îndeplineste anumite functii:

– legarea antigenului pe imunoglobulinele de suprafata care functioneaza ca receptori pe limfocitele B, declanseaza *proliferarea si diferentierea* lor, iar legarea antigenului cu imunoglobulinele citotrope pentru mastocite, declanseaza *degranularea* acestor celule;

– dupa cuplarea cu antigenul, moleculele de imunoglobulina expun fragmentul Fc, recunoscut ulterior de receptorii specifici pentru Fc de pe suprafata monocitelor, macrofagelor, PMNN. Astfel se stimuleaza

procesul de fagocitoza a celulelor nonself tapetate cu imunoglobuline, denumit *imunofagocitoza*;

- 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 determinantii 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, componenta 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 – 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-imunoglobulina. Variațiile de ordin chimic ale imunoglobulinelor se evidențiază prin metode imunochimice de precipitare între moleculele de imunoglobulina cu rol de antigen și anticorpii anti-imunoglobulina din serul imun.

Din punctul de vedere al manifestării imunopotenței determinantilor 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 imunoglobulina 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 γ , μ , α , δ , ϵ , corespunzătoare celor 5 clase de imunoglobuline: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE. Serul imun față de un determinant antigenic de clasă nu da reacții încrucisate 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 γ , obținut pe iepure, va precipita numai anticorpii 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 doua variante antigenice, notate cu k si λ , care se gasesc la toate cele 5 clase de imunoglobuline. Cele doua tipuri structurale de lanturi L (k si λ) prezinta deosebiri de secventa a aminoacizilor în regiunea constanta si nu au determinanti antigenici comuni. De aceea, nu dau reactii imune încrucisate. Serul imun heterolog anti-moleculă de imunoglobulină umană cu catena L k , obtinut pe iepure, precipita toate moleculele de imunoglobulină umană care contin catena L k , indiferent de clasă. Serul imun anti-L k nu precipita moleculele de imunoglobulină care contin catena L λ .

O moleculă de imunoglobulină are doua catene de tip k sau λ . Formula generală a diferitelor clase de imunoglobuline este γ_2k_2 (sau $\gamma_2\lambda_2$), μ_2k_2 ($\mu_2\lambda_2$), α_2k_2 ($\alpha_2\lambda_2$).

Catenele L de tip k si λ determina *tipurile moleculare* de imunoglobuline. La om, raportul Ig k/λ este 7/3, iar la soarece este 19/1, valori care probabil reflecta raportul numeric al genelor codificatoare pentru cele doua tipuri de catene.

Izotipurile catenelor H nu influenteaza functia de specificitate a moleculelor de imunoglobulină: acelasi antigen poate fi legat de oricare din cele 5 clase de imunoglobulină.

Pe lângă variantele antigenice mentionate – clase si tipuri – s-au identificat diferite mai subtile ale moleculelor de IgG si IgA, în ceea ce priveste proprietatile fizice, chimice si biologice, diferite care corespund *subclaselor* antigenice. Aceasta înseamna ca, pe lângă determinantii antigenici de clasă, exista si alte variante antigenice ale *regiunii constante ale catenei H*, corespunzătoare subclaselor. Ele se noteaza cu litera clasei, urmată de o cifra: IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, respectiv IgA₁, IgA₂.

Moleculele de imunoglobulină ale subclaselor au în comun determinantii 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 si 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 artrita cronică reumatoidă se gasesc molecule de tip special, încadrate în categoria factorilor reumatoizi (FR).

Factorii reumatoizi sunt molecule de auto-anticorpi, adica IgM anti- IgG.

Factorii reumatoizi se evidentiaza *in vitro*, prin capacitatea lor de a determina aglutinarea eritrocitelor tapetate cu o doza subaglutinanta de anticorpi specifici antieritrocitari (IgG).

Grubb (1956) a observat ca FR seric, uneori, aglutineaza hematiile tapetate cu auto-anticorpi specifici (care se sintetizeaza în anemia hemolitica autoimuna) ale unor pacienti, iar alteori, reactia de hemaglutinare nu se produce, testul evidentierii FR *in vitro* fiind fals negativ. Concluzia reactiei de hemaglutinare pe care, uneori, FR din serul pacientilor de artrita reumatoida o produce asupra hematiilor tapetate cu o doza subaglutinanta de anticorpi specifici, a fost urmatoarea: autoanticorpii de pe suprafata eritrocitelor unor indivizi cu anemie hemolitica autoimuna, posedea determinanti antigenici diferiti, pe care FR poate sa-i recunoasca. Astfel s-a dedus ca moleculele de imunoglobulina de la indivizi diferiti, sunt diferite din punct de vedere antigenic. În consecinta, imunizarea unui individ cu imunoglobulinele provenite de la alt individ al aceleiasi specii, determina sinteza anticorpilor fata de determinantii antigenici ai moleculelor imunoglobulinice ale donorului.

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

Semnificatia variantelor antigenice alotipice ale moleculelor de imunoglobuline este analoga celei a antigenelor de grup sanguin. Fenomenul este general, adica si alte molecule provenite de la un organism pot fi imunogene pentru alte organisme ale aceleiasi specii, la care se comporta ca aloantigene.

Variantele alotipice ale imunoglobulinelor se detecteaza în reactia de precipitare cu aloantiseruri obtinute pe organisme ale aceleiasi specii, dar cu alotip diferit de acela al organismului donor al antigenului imunoglobulinic.

Variantele moleculare alotipice sunt consecinta existentei genelor alele perechi (aa), o caracteristica generala a organismelor diploide. Prin mutatii succesive, în acelasi locus, apar mai multe alele care formeaza

o serie polialelica - $a_1, a_2, a_3, \dots, a_n$. Genele alele ocupa acelasi locus pe cromosomii omologi, ca si gena de tip salvatic a . Fiecare individ va avea o combinatie de gene alele: aa_1, aa_2, \dots, aa_n sau a_1a_2, a_1a_3, \dots

a₁a_n, cu variante antigenice distincte.

Alotipurile 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 s e c v e n t a 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 homozigoti sau heterozigoti pentru genele care codifică markerii. Genele se exprimă codominant și se transmit în descendența 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 rezultă 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 aglutinanti anti *S. typhi*;

– anticorpii aglutinanti 1 (produsi de organismul A) s-au injectat la organismul C (iepure din aceiasi linie genetica). Se sintetizeaza anticorpi anti-anticorpi 1, evidentiati în reactia de precipitare.

Surprinzator, anticorpii anti-anticorpi 1 nu precipita anticorpii 2, desi anticorpii 1 si anticorpii 2 au aceiasi specificitate fata de antigenele *S. typhi*, iar organisme A, B, C apartin aceluiasi alotip.

Concluzia este ca anticorpii 1 si anticorpii 2, desi au aceiasi specificitate fata de antigenul de *S. typhi*, la rândul lor, au determinanti antigenici proprii. De aceea, anticorpii anti-anticorpi 1 nu precipita anticorpii 2, sintetizati de un alt organism. Moleculele de anticorpi cu aceiasi specificitate de combinare fata de un antigen, sintetizate de organisme identice genetic, au o individualitate antigenica distincta, denumita *specificitate idiotipica*.

Heterogenitatea idiotipica este consecinta determinantilor idiotipici, localizati în regiunile hipervariabile ale catenelor H si L. Specificitatea idiotipica a moleculelor de anticorpi sintetizati de o clona de celule este conferita de unicitatea secventei de aminoacizi de la nivelul secventelor hipervariabile ce participa la formarea situsurilor de combinare, care determina epitopi cu caracter strict individual denumiti *idiotopi*. Unii idiotopi sunt localizati chiar în interiorul situsului de combinare sau în imediata sa vecinatate. Dovada o constituie faptul ca legarea epitopului specific de situsul de combinare a anticorpului, blocheaza într-o masura mai mare sau mai mica, legarea anticorpilor anti-idiotipici.

Colectia de idiotopi ai situsului de combinare a unei molecule de imunoglobuline formeaza *idiotipul* ei. Idiotipul este rezultatul configuratiei spatiale unice a regiunilor hipervariabile ale catenelor H si L, conferita de o secventa unica a aminoacizilor.

Repertoriul idiotipurilor este de acelasi ordin de marime cu acela al specificitatii situsurilor de combinare. Pentru situsul de combinare al moleculei de imunoglobulina s-a propus denumirea de *paratop*.

La alcatuirea idiotipului participa ambele catene. Cele doua catene disociate nu pot sa lege anti-idiotipul sau îl leaga cu o eficienta foarte scazuta.

IgG

Imunoglobulinele reprezinta circa 20% din totalul proteinelor serice. IgG este dominanta cantitativ în serul uman normal, reprezentând 70-75% din cantitatea totala de imunoglobuline. Concentratia sa medie în ser este de 1250 mg/100 ml, cu variatii

individuale normale între 800 – 2000 mg/100 ml.

IgG este cea mai heterogena dintre imunoglobuline în ceea ce privește sarcina electrică. Din această cauză, în câmpul electroforetic se distribuie în fracțiile $\gamma 1$ și $\gamma 2$ 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.

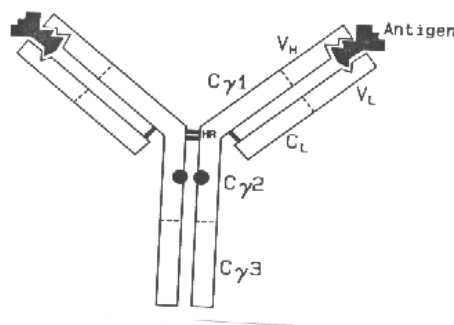


Fig. 15. Modelul structural al IgG₁. Domeniile variabile ale celor două catene (V_H și V_L) formează situsul de legare a antigenului. Cercurile negre indică poziția grupurilor glucidice. HR = regiunea balama.

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 γ : 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 $\gamma 3$ și are o regiune balama extinsă, codificată de câțiva exoni, iar IgG₄ are o regiune balama scurtă și rigidă, ceea ce produce o nepotrivire sterica pentru fixarea complementului.

IgG este singura imunoglobulină care traversează placentă, asigurând astfel protecția fătului și nou-născutului în primele luni de viață. Pe membrana sincitio-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

participa la reactiile de aglutinare si 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) α și două catene ușoare (L) de tip λ sau κ .

Unitatea monomerică $(\alpha-\lambda)_2$ sau $(\alpha-\kappa)_2$ 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 descrescând.

La microscopul electronic, molecula de IgA monomerică 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: salivă, lacrimă, gastrică vaginală, intestinală, biliară, pancreatică, lactată.

Pe baza unor diferențe de structură moleculară (numărul punților S-S, secvența aminoacizilor în regiunea balamă) 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 balamă 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 balamă.

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

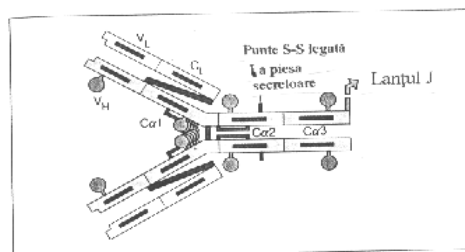


Fig. 16. Structura IgA₁ umana. Sunt indicate pozițiile punților disulfurice inter- și intracatenare, precum și poziția ipotetică a catenelor polizaharidice. O punte disulfurică suplimentară stabilizează domeniul C_α2 și o alta leagă lanțul J în polimerul de IgA.

IgA serică este reprezentată în primul rând de IgA₁ (90%) și este monomerică în proporție de 80%. Cățelele 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 caucaziene) și A₂m₂ (la populațiile mongoloide-negroide)

Funcțiile IgA seric nu sunt bine precizate, datorită dificultăților de purificare. Rolul sau 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".

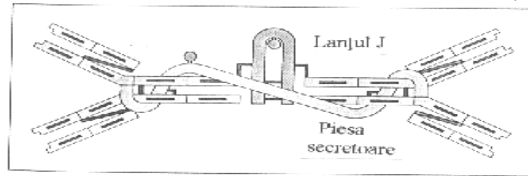


Fig. 17. Structura sIgA₁ umana. Piesa secretoare, probabil este rasucita în jurul dimerului de IgA și se leaga prin punți disulfurice de domeniul C α 2 al fiecărui monomer. Piesa J este amplasată la jonctiunea celor doi monomeri. Puntea disulfurică ce leaga domeniul C α 2 de regiunea balama nu este figurată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

sIgA se găsește în special în forma 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 proprie 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 *componenta secretoare* (CS). Formula generală a sIgA dimer este (IgA)₂ J CS și are greutatea moleculară de 385 kD și constantă 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. Prezenta catenei J s-a stabilit la imunoglobulinele polimerice de la toate clasele de vertebrate, iar ARNm pentru catenă J s-a detectat la numeroase nevertebrate. În complexe moleculare cu un grad superior de polimerizare, numai două molecule

de IgA sau IgM se leaga prin intermediul catenei J, celelalte fiind legate una de alta prin puncti S-S. Polimerizarea moleculelor de IgA în citoplasma celulei producatoare este esentiala pentru transportul lor la suprafata mucoasei. Lantul J se gaseste în citoplasma limfocitelor B, în cursul diferentierii spre plasmocit. Aproape toate limfocitele din structurile limfoide asociate mucoaselor (digestiva, respiratorie), din tesutul interstitial mamar, salivar si lacrimal, exprima lantul J intracelular. Catena J este sintetizata si de unele celule care produc IgG sau IgD din aceste structuri, dar este degradata în citoplasma. Plasmocitele din maduva osoasa care produc IgA sau IgG sunt negative pentru lantul J.

Componenta secretoare a sIgA este o glicoproteina din categoria betaglobulinelor, neînrudita cu imunoglobulinele, bogata în glucide (8,7%). Secventa catenei cuprinde 750 de aminoacizi, distribuiti în trei domenii: domeniul citoplasmatic (103 aminoacizi), transmembrantar (23 aminoacizi) si extracelular (circa 625 aminoacizi), la care se adauga o secventa semnal de 18 aminoacizi, care este clivata dupa sinteza.

Componenta secretoare se sintetizeaza în *celulele epiteliale ale mucoaselor*. Dupa prelucrarea în complexul Golgi (unde are loc glicozilarea), CS migreaza pentru a fi integrata în plasmalema bazala si laterala a celulelor. Sinteza CS este independenta de IgA. La noul nascut, CS se sintetizeaza în saptamâna a 8-a (înainte de aparitia plasmocitelor). Este prezenta chiar la persoanele în ale caror secretii IgA lipseste.

Funcțiile componentei secretoare. Componenta secretoare are rol de *receptor* pentru moleculele dimere si polimere de IgA si IgM, care au legat lantul J (receptor poli-Ig). Legarea lantului J pare sa determine o schimbare conformationala a acestor molecule. Moleculele de IgA secretate ca monomeri, ca si polimerii care nu au legat lantul J nu se pot complexa cu CS si trec în circulatie.

IgA dimeric trebuie sa ajunga în contact cu celulele epiteliale, pentru a fi transportat la suprafata mucoasei. Teoretic, IgA polimeric poate veni în contact cu celulele epiteliale care au lantul CS inserat în membrana, pe una din urmatoarele doua cai:

- difuzia libera prin tesutul conjunctiv adiacent plasmocitelor din lamina propria a mucoasei, unde are loc sinteza;
- translocatia din circulatie la nivelul capilarelor mucoasei.

Componenta secretoare este inserata în membrana laterobazala a celulei epiteliale. Din aceasta pozitie, prin domeniul sau extracelular, CS leaga dimerii de IgA care contin lantul J, printr-un mecanism necunoscut. Una din ipotezele privind mecanismul legarii presupune ca

CS s-ar înfășura în jurul dimerului de IgA, extinzându-se de la o regiune balama la cealalta, marind astfel rezistenta dimerului la proteoliza. Complexul format este endocitat în vezicule de pinocitoza si este eliberat pe fata luminala a celulelor epiteliale, în secretia lor externa. Un astfel de transport are loc în celulele epiteliale ale mucoasei tubului digestiv, ale mucoasei bronsice, la nivelul epitelului vezicii biliare si al tractului biliar, al acinilor glandelor mamare, al acinilor pancreatici si salivari. CS leaga chiar complexe imune care contin IgA polimeric, formate în lamina propria a mucoasei. Acestea sunt transferate la suprafata luminala a epitelului prin acelasi mecanism ca si IgA polimeric. Anihilarea pe aceasta cale a antigenelor este foarte importanta în tractul intestinal, unde componentele antigenice alimentare si ale microbiotei pot dobândi acces la lamina propria.

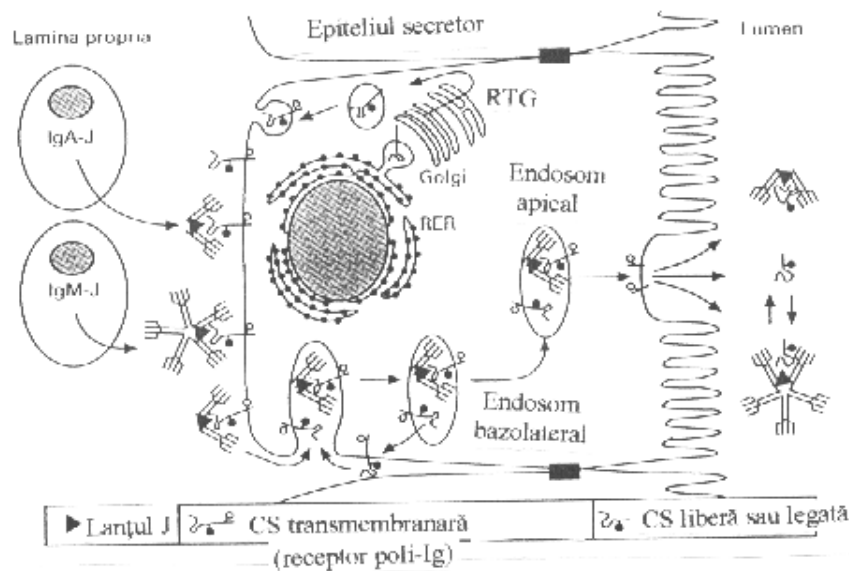


Fig. 18. Reprezentarea schematica a diferitelor trepte care se succed în generarea sIgA si IgM umane, pe calea transportului epitelial mediat de receptorul de poli-Ig (pIgR). IgA polimeric care contine lantul J (IgA-J) si IgM pentameric (IgM-J) sunt secretate de plasmocitele locale. Componenta secretorie (CS) este sintetizata în reticulul endoplasmic granular (REG) al celulelor epiteliale si se matureaza prin glicozilare în complexul Golgi. In retea transgolgi (TG), este fosforilat si este expus ca receptor

de poli-Ig, pe membrana plasmatica bazolaterală. Endocitoza ligandului complexat cu receptorul de poli-Ig, ca și a receptorului poli-Ig liber, este urmată de transitoza la endosomii apicali 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 exocitoza la suprafața celulei epiteliale nu sunt recirculați și nici nu se refac prin sinteza *de novo*.

Funcțiile efectoare ale sIgA

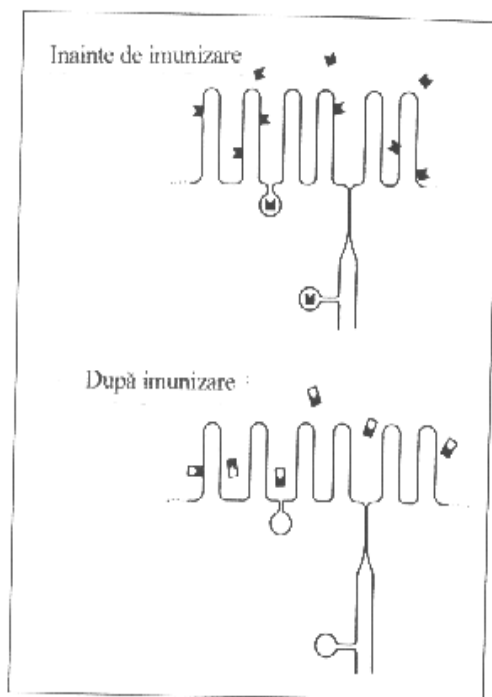


Fig. 19. Reprezentarea schematică a fenomenului de "excludere imună", pe care-l produc anticorpii din secreția mucoasei intestinale. Înainte de imunizare, o mică parte a antigenului proteic ingerat, scapă digestiei intraluminale, este preluat de enterocit și transportat în spațiile intercelulare. După 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 patrundă de la exterior pe calea mucoaselor digestive, respiratorii, genito-urinare. 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 patrunderea 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 sau 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 zece de ore la alte mamifere.

La unele mamifere (ovine, bovine), sIgA din secretia lactata materna este transportat foarte activ în circulatia noului nascut. Efectul protector antiinfectios al sIgA de origine materna se exercita prin faptul ca moleculele ramân legate de celulele epiteliale ale mucoasei digestive si blocheaza astfel aderența microorganismelor si a virusurilor.

Moleculele de IgA nu sunt transferate prin placenta. Sângele noului nascut nu contine IgA. Nivelul seric al IgA caracteristic adultului, este atins la 9-10 luni.

În conditii naturale, în tractul intestinal se sintetizeaza IgA fata de multe antigene exogene. IgA din secretia intestinala poate sa treaca intacta prin tubul digestiv si sa-si pastreze activitatea.

Persoanele cu deficit congenital al IgA (1/500-700) au sensibilitate mare la infectiile mucoaselor, desi celulele epiteliale sintetizeaza CS. Aceleasi persoane sunt predispuse la maladii autoimune, deoarece, în absenta sIgA, mucoasa digestiva este traversata de o mare diversitate de antigene, care induc sinteza unor anticorpi ce interactioneaza nu numai cu antigenul exogen inductor, ci si cu componente moleculare proprii.

In vivo, sIgA nu activeaza cascada complementului, dar moleculele agregate artificial, *in vitro*, activeaza calea alterna.

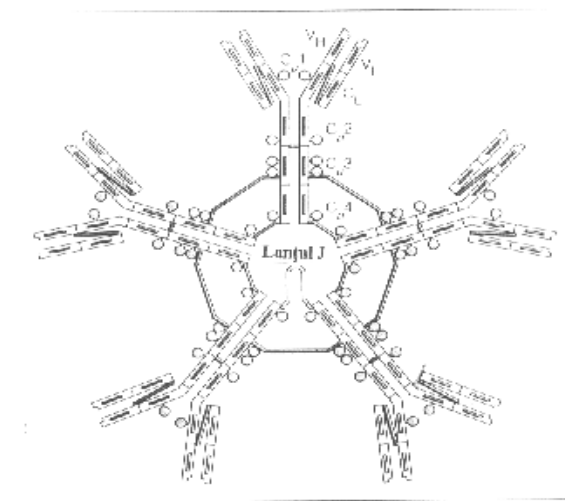


Fig. 20. Structura IgM pentameric. Catenele grele de IgM uman au 5 domenii. Monomerii sunt legati prin punți disulfurice între domeniile C μ 3 si C μ 4. Sunt reprezentate catenele oligozaharidice, ca si pozitia ipotetica a catenei J

(dupa Roitt, 1984).

IgM

Caracteristica structurala a IgM este prezenta unui lant greu al izotipului μ , alcatuit din 576 aminoacizi. IgM contine 5 grupari prostetice oligozaharidice, care constituie 12% din greutatea moleculara totala. Secventa de aminoacizi a lantului H cu specificitate antigenica μ este organizata în 5 domenii: unul variabil si 4 constante ($C_{\mu 1}$, 105 amino-acizi – $C_{\mu 4}$, 111 aminoacizi), codificati de exoni diferiti. Lipseste regiunea balama, fiind înlocuita cu domeniul CH_2 , sensibil la actiunea proteazelor.

IgM se gaseste sub doua forme:

– *monomera*, legata de membrane

– *polimera*, libera în ser.

IgM legat de membrana unor limfocite, are în plus o secventa COOH-terminala, hidrofoba, formata din 41 de aminoacizi, care întrerupe transportul lanturilor μ prin membrana si ancoreaza molecula în structura sa. IgM este molecula majora cu rol de receptor de antigen, pe suprafata limfocitelor B.

IgM serica are structura unui pentamer ($L_2 \mu_2$), cu greutatea moleculara de 950 kD. Fiecare pentamer contine un lant polipeptidic J, bogat în cisteina, foarte acid, cu rol în polimerizarea monomerilor. Cele 5 unitati monomere sunt asezate radiar, cu regiunile Fc orientate spre centru, unite prin puncti S-S, formate între domeniile CH_3 si prin lantul J. Bratele (Fab)₁₀ sunt orientate spre exterior, chiar în unghi drept fata de discul (Fc)₅

La microscopul electronic, pentamerul IgM are aspect de stea cu 5 brate, dispuse în jurul discului central. Fiecare brat are forma literei Y. Bratele pot lua pozitii diferite, ceea ce denota existenta unei zone mobile pentru fiecare subunitate. Fiecare unitate monomerică este mobila la nivelul articulatiei în discul central, astfel ca dupa legarea cu epitopii de pe o suprafata membranara, IgM poate adopta configuratia asemanatoare unui crab, iar regiunile multiple Fc devin accesibile lui C1q.

IgM poate sa existe în forma hexamerica, de 10-20 de ori mai eficienta în liza mediata de activarea C, decât în varianta pentamerica.

Valenta pentamerului este teoretic 10, dar aceasta s-a determinat numai în reactia cu haptenele mici. În reactia cu antigenele complexe, valenta scade la 5 sau chiar mai putin, datorita probabil insuficientei flexibilitati a moleculei. Valenta IgM este dependenta 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 particulare. 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 soarece. Anticorpii sintetizați după stimularea policlonală a limfocitelor, leaga o varietate de antigene: virusuri, bacterii, protozoare, paraziti 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 nonself, ci și cu molecule self: cu hormoni (insulina, tiroglobulina), cu constituenți celulari (ADN, miozina, actina, tubulina etc.), cu fragmentul Fc al IgG autolog (FR = factorul reumatoid).

IgM reprezintă forma sub care se găsesc anticorpii naturali ai grupelor sanguine (aglutininele α și β), precum și anticorpii 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 constantă a secvenței de aminoacizi.

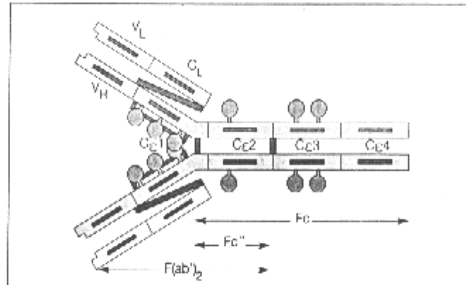


Fig. 21. Structura IgE umana. Molecula este formata din 4 domenii constante si un domeniu variabil. Este indicata pozitia punctilor disulfurice inter- si intracatenare, precum si pozitia catenelor oligozaharidice. Clivajul enzimatic al IgE poate elibera fragmentele $F(ab')_2$, fragmentele Fc si Fc' .

IgE

Denumirea de IgE vine de la "eritem", deoarece aceasta clasa de anticorpi este unul din mediatorii reactiilor vasculare eritematoase.

IgE a fost izolata si caracterizata de Ishizaka (1966), dintr-un mielom producator al acestui izotip. Molecula de IgE are doua catene L identice cu catenele L ale celorlalte clase de imuno-globuline si doua catene grele H cu specificitate antigenica ϵ , fiecare cu câte 550 de aminoacizi, distribuiti în 5 domenii: 4 domenii în regiunea constanta si unul în regiunea variabila. Catenele H sunt reunite prin doua legaturi S-S, localizate în domeniul C₂.

Continutul glucidic este de pâna la 11,7%.

IgE este sintetizata în celule din mucoasa respiratorie, gastrointestinala si în ganglionii regionali.

În sânge, IgE se gaseste în concentratii foarte mici (250 ng/ml). Nivelul sau caracteristic adultului este atins la 10-15 ani. IgE nu strabate bariera placentara.

Concentratia serica a IgE creste în parazitoze si în starile alergice. În cazurile de astm alergic, concentratia IgE ajunge la 1550 ng/ml.

IgE este o molecula *citotropa*: interactioneaza *in vivo* prin regiunea Fc, cu receptorii specifici de pe suprafata mastocitelor si bazofilelor, dar si *in vitro* cu celulele aceleiasi specii sau ale speciilor înrudite. Incalzirea serului la 56° anuleaza activitatea citotropa a IgE.

Rolul fiziologic principal al IgE pare a fi acela de protectie a

situsurilor anatomice expuse traumatismelor si patrunderii agentilor patogeni. IgE recruteaza factorii plasmatici si celulele efectoare, stimulând reactia inflamatorie acuta.

IgE ar fi unul din efectorii mecanismelor de îndepartare a parazitilor intestinali. Actiunea sa s-ar exercita prin efectul chimiotactic pozitiv fata de eozinofile, în focarul de parazitoza si prin stimularea contractiilor rapide si prelungite a musculaturii netede. IgE marestre permeabilitatea vasculara si permite anticorpilor serici si celulelor eozinofile sa penetreze mucoasa si sa participe la reactiile de aparare. Eozinofilele elibereaza continutul enzimatic al lizosomilor si produc liza parazitului.

IgE este declansatoare a reactiilor de hipersensibilitate imediata de tip *anafilactic*. In reactiile de hipersensibilitate imediata, mastocitele si bazofilele care leaga IgE se activeaza. Activarea ar fi rezultatul formarii unor punti antigenice între moleculele de IgE adiacente, care leaga un antigen(alergen) multivalent. Moleculele de IgE conectate prin puntea antigenica genereaza semnalul activarii celulare, a carei consecinta este eliberarea moleculelor vasoactive (histamina, serotonina, ECF, SRSA).

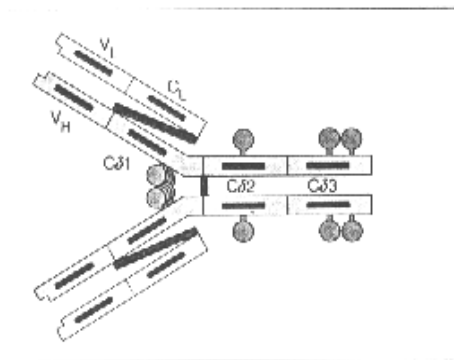


Fig. 22. Structura IgD umana. Schema ilustreaza pozitia punctilor disulfurice inter- si intracatenare, precum si pozitia ipotetica a catenelor oligozaharidice.

IgD

IgD s-a descoperit în 1965 ca o proteina de mielom, cu proprietati speciale, care nu are specificitate antigenica a IgG, IgA sau IgM, dar precipita cu anticorpilor specifici fata de catenele L ale imunoglobulinelor si este alcatuita din cele 4 catene. Ulterior IgD s-a identificat în serul

uman normal, dar si la toate speciile de mamifere si pasari.

IgD se gaseste în sânge, în cantitate foarte mica (0,2% din cantitatea totala de imunoglobuline).

Molecula de IgD este monomera. Lanturile L sunt în special de tip λ , iar catenele H au specificitate antigenica δ . Lantul H are 4 domenii: 3 în regiunea constanta si unul în regiunea variabila. Regiunea balama este foarte extinsa si este sensibila la actiunea proteazelor.

Functii. Aproape toata cantitatea de IgD are rol de *receptor de antigen*, împreuna cu IgM, pe suprafata majoritatii limfocitelor B mature. Moleculele membranare au un domeniu transmembranar si o scurta extensie citoplasmatica, analoga formei membranare a catenei μ . Cele doua izotipuri membranare (δ si μ) au acelasi tip de catena L, iar situsul lor de legare este identic, adica recunosc acelasi epitop. Nu exista molecule hibride μ/δ , deoarece cele doua catene H nu se împerecheaza. Raportul dintre cele doua izotipuri de pe suprafata limfocitelor B este variabil si semnificatia functionala a acestui raport nu se cunoaste.

IgD scade pe suprafata limfocitelor B de memorie si dispare complet pe masura ce celulele se diferentiaza spre plasmocit.

IgD seric are o concentratie de 3-40 $\mu\text{g/ml}$, fiind produs de un numar mic de plasmocite splenice si tonsilare. Sinteza într-un numar mic de celule si timpul de înjumatare scurt (de 2,8 zile) explica nivelul seric scazut al IgD. Numarul mic de plasmocite producatoare de IgD explica raritatea mieloamelor producatoare de IgD. Dupa stimularea antigenica repetata nu se sintetizeaza anticorpi ai izotipului IgD. IgD nu are functie de anticorp efector. Dupa stimularea limfocitelor B care au ca receptor de suprafata molecule de IgD, diferentierea nu urmeaza o cale din care sa rezulte celule angajate în secretia de IgD. La pacientii cu deficit al sintezei de IgA, în glandele lacrimale, în parotide si în glandele nazale, plasmocitele producatoare de IgA sunt înlocuite cu cele producatoare de IgD, iar în mucoasa intestinala, cu cele care sintetizeaza IgG si IgM. Totusi, IgD nu este o imunoglobulina caracteristica secretiilor, deoarece în secretii nu este mai concentrata decât în ser.

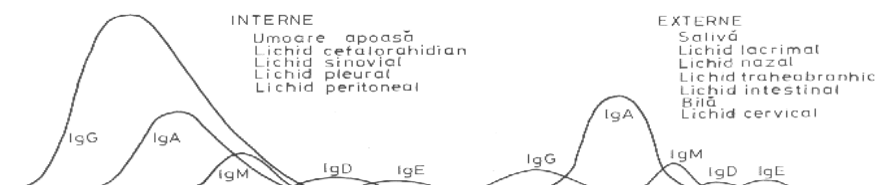


Fig. 23. Reprezentarea grafica a distributiei cantitative a diferitelor clase de imunoglobuline în umorile interne si externe.

Interactiuni antigen-anticorp

Reactiile Ag-Ac sunt consecinta proprietatii esentiale a imunoglobulinelor, aceea a *specificitatii de legare* cu determinantul antigenic care a indus sinteza lor.

Cele mai multe date referitoare la natura interactiunii s-au obtinut în reactia dintre anticorpii specifici fata de haptene si epitopul haptenei. Haptenele au avantajul ca, teoretic, prezinta un singur epitop.

Reactia Ag-Ac poate fi considerata ca prototip al interactiunilor macromoleculare, dar se deosebeste de interactia enzima-substrat prin doua caracteristici:

- reactiile Ag-Ac, *in vivo*, sunt totdeauna reversibile, deoarece anticorpii nu altereaza ireversibil antigenul, asa cum o enzima modifica substratul ei;

- heterogenitatea anticorpilor nu are echivalenta la alte categorii de proteine.

Reactiile Ag-Ac pot fi clasificate, dupa efectele pe care le produc: *reactii primare, secundare si tertiare*.

Reactiile *primare* semnifica recunoasterea specifica si legarea celor doi reactanti. Reactiile primare se studiaza prin metoda dializei la echilibru, a imunofluorescentei, RIA.

Reactiile *secundare* pot sa apara *in vitro*, ca o consecinta directa, dar nu obligatorie, a interactiunii primare. Ele se evidentiaza în timp prin fenomene de aglutinare sau de precipitare, în functie de natura antigenului.

Reactiile *tertiare* exteriorizeaza consecintele biologice ale reactiilor primare *in vivo*. Ele au un caracter complex, deoarece sunt influentate de factorii organismului: de concentratia complementului, de mediatorii eliberati de alte celule (mastocite), de afinitatea receptorilor de antigen. Reactiile tertiare pot fi protectoare, daca au ca efect imobilizarea bacteriilor, neutralizarea toxinelor si a virusurilor sau pot avea efecte nocive: soc anafilactic, anafilaxie locala, hemoliza intravasculara.

Bazele moleculare ale interactiunii Ag-Ac

Interactiunile Ag-Ac, *in vivo* sunt totdeauna reversibile. Factorii care conditioneaza interactiunea Ag-Ac sunt:

– *complementaritatea structurala* dintre determinantul antigenic si situsul de combinare al anticorpului. Acesta este factorul exclusiv al specificitatii reactiei. Complementaritatea structurala presupune adaptarea conformationala a celor doua grupari reactante si a fost gândita în termeni structurali, pe principiul cheie-broasca;

– *complementaritatea electrochimica* a gruparilor reactante este consecinta complementaritatii structurale si semnifica intrarea în actiune a unor forte intermoleculare care stabilizeaza si consolideaza interactiunea celor doua grupari. Formarea legaturilor intermoleculare necesita existenta unor grupari atomice suficient de apropiate pe cele doua molecule. Distanța dintre ele este invers proportionala gradului de complementaritate.

Desi complementaritatea structurala stricta nu este obligatorie, o potrivire spatiala cât mai înalta este mai favorabila interactiunii. Ea se exprima prin congruenta suprafetelor de contact care furnizeaza forte de atractie intermoleculara ce stabilizeaza complexul.

La interactiunea Ag-Ac participa urmatoarele tipuri de legaturi necovalente: *legaturile de H, fortele electrostatice, legaturi van der Waals si legaturi hidrofobe*. Toate sunt forte nespecifice cu valoare mica si natura lor face ca reactia sa fie reversibila.

Legaturile de H se formeaza când doi atomi au în comun un nucleu atomic de H (un proton). Protonul comun se gaseste între doi atomi de N sau de O sau între unul de N si unul de O. Nucleul de H este legat covalent de unul dintre cei doi atomi (de N sau de O). Legatura de H are energia de legare de 3-7 kcal/mol.

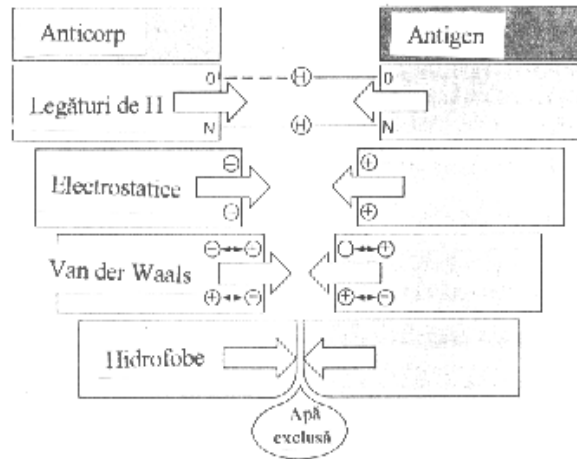


Fig. 24. Forțele intermoleculare implicate în formarea complexului Ag-Ac. Acțiunea acestor forțe necesită un contact strâns între cele două grupuri reactante. Legăturile de H rezultă prin formarea unei punți de H între doi atomi apropiați. Forțele electrostatice se datorează atracției grupelor ionice 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 asocierea grupurilor nepolare și hidrofobe, de unde moleculele de apă sunt excluse. Distanța optimă între grupurile 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 grupuri 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 \AA) dintre grupurile 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 grupuri reactante ($1/d^2$).

Legăturile van der Waals, cele mai slabe forțe de interacțiune, sunt active pe distanțe foarte mici dintre grupurile reactante. Energia de legare este de $1\text{-}2 \text{ kcal/mol}$. 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

fluctuanta, pe care un dipol o induce în dipolul învecinat. Aceste forte se mai numesc si *forte de dispersie*. Intensitatea lor depinde de distanta dintre gruparile implicate si este invers proportionala cu puterea a 7-a a distantei. Valoarea lor este optima la 1-2 Å.

Legaturile hidrofobe (sau apolare) apar între grupari nepolare (neionizate) în solutii apoase si sunt consecinta tendintei de excludere a retelei ordonate de molecule de apa, dintre molecula de antigen si cea de anticorp. Aceste legaturi sunt favorizate de aminoacizii cu grupari apolare, care au tendinta de asociere, diminuând numarul moleculelor de apa din vecinatatea lor. Prin eliminarea moleculelor de apa dintre gruparile reactante, distanta dintre situsurile active scade foarte mult si creste valoarea fortelor stabilizatoare.

Complementaritatea spatiala sau fortele intermoleculare nu sunt, fiecare în parte, suficiente pentru a forma legaturi stabile. Pentru stabilitatea interactiunii Ag-Ac sunt necesare ambele conditii. Cu cât energia de legare a reactantilor este mai mare, cu atât complexele Ag-Ac sunt mai stabile,

Interactiunea gruparilor reactante ale antigenului si anticorpului este definita de doi parametri: *afinitatea si aviditatea anticorpilor*.

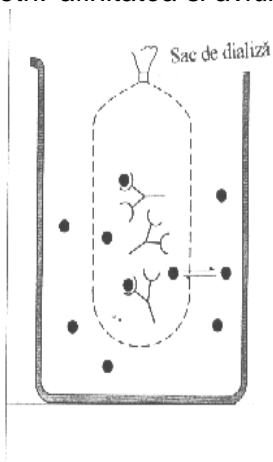


Fig. 25. Masurarea afinitatii anticorpilor prin dializa la echilibru. Interactiunea Ag-Ac este reversibila. In interiorul sacului de dializa, haptena este partial sub forma libera si partial legata cu anticorpul, în functie de afinitatea anticorpilor. Prin membrana sacului de dializa poate difuza numai haptena libera si concentratia sa externa va egala concentratia haptenei libere din interiorul sacului. Masurarea concentratiei haptenei în sacul de dializa permite calculul cantitatii de haptena legata de anticorpi. Reînnoirea constanta a tamponului duce la disocierea totala si la pierderea haptenei din sacul de dializa, ceea ce denota natura reversibila a legaturii Ag-Ac (dupa Roitt, 1997).

Afinitatea anticorpilor masoara *forta de legare* dintre un determinant antigenic si situsul complementar de legare al unui anticorp specific. Afinitatea este rezultanta fortelor de atractie si de respingere, care mediaza interactiunea celor doi reactanti. Forta acestor interactiuni se masoara în reactia dintre un antigen monovalent (a unei haptene) cu anticorpii specifici. O interactiune cu afinitate înalta presupune structuri complementare perfecte, în timp ce complementaritatea imperfecta a gruparilor reactante determina o afinitate scazuta, deoarece fortele de atractie sunt active numai pe distante foarte mici si sunt diminuate de fortele de respingere.

Metoda de masurare a afinitatii anticorpilor este *dializa la echilibru*. Metoda se bazeaza pe proprietatea *haptenelor mici*, monovalente (care nu dau reactii de precipitare cu anticorpii specifici), de a traversa membrana de dializa, impermeabila pentru anticorpi, ca si pentru complexele haptena-anticorpi.

Solutia concentrata de anticorpi se repartizeaza într-un sac de dializa si se imerseaza într-un volum cunoscut de solutie tampon, la pH 7,4, ce contine o concentratie cunoscuta a haptenei. Haptena libera difuzeaza prin membrana, în compartimentul cu anticorpi si se combina partial cu acestia. La echilibru, se masoara concentratia haptenei libere la exterior, egala cu concentratia haptenei libere din interior. Concentratia totala a haptenei în sacul de dializa este mai mare, deoarece o proportie a moleculelor sale este legata de anticorpi.

Diferenta dintre concentratia initiala si cea finala a haptenei, în compartimentul exterior, masoara afinitatea ei de legare cu anticorpii specifici, în conditiile unui exces de molecule haptenice, care favorizeaza disocierea complexelor antigen-anticorp.

Aviditatea este un parametru al interactiunii Ag-Ac, care rezulta din multivalenta antigenului. Cele mai multe antigene posedă mai mult decât un determinant antigenic. De exemplu, celulele bacteriene sau virionii, dar si polizaharidele, au pe suprafata un numar mare de determinanti antigenici repetitivi. Antigenele proteice au totdeauna determinanti antigenici multipli, dar diferiti.

Antigenele multivalente leaga un numar echivalent de molecule de anticorpi. Energia totala de legare a epitopilor multipli ai unui antigen, cu situsurile anticorpilor specifici este mult superioara comparativ cu energia separata a fiecarei interactiuni dintre situsul de combinare si epitop. Aviditatea caracterizeaza energia medie de legare a unui antigen multivalent cu anticorpii specifici si masoara forta rezultanta a afinitatii dintre epitopii multipli ai unui antigen si paratopii complementari. Complexele Ag-Ac formate de antigenele multivalente sunt stabile,

disocierea lor fiind dificila, deoarece este necesara ruperea tuturor legaturilor existente.

Afinitatea furnizeaza date cu privire la natura fizico-chimica a reactiei Ag-Ac, iar aviditatea este semnificativa pentru antigenele naturale multivalente.

Afinitatea si aviditatea conditioneaza proprietatile fiziologice ale anticorpilor. Cei cu afinitate mare sunt mai eficienti în reactiile biologice: în protectia antibacteriana si antivirala, în reactia de precipitare *in vitro*.

Complexele Ag-Ac formate de anticorpi cu afinitate mica, persista în circulatie si se depun pe membrana bazala a glomerulilor renali. Complexele formate de anticorpii cu afinitate mare se elimina rapid din circulatie, fara efecte defavorabile asupra functiei renale.

Interactiunea Ag-Ac este caracterizata permanent prin formarea si anularea diferitelor tipuri de legaturi intermoleculare. *In vivo*, probabil toate reactiile Ag-Ac sunt reversibile, dar reactiile secundare, *in vitro* (aglutinarea, precipitarea), în conditiile echilibrului reactantilor, sunt ireversibile.

Bazele moleculare ale reactiilor imune încrucisate

Trasatura dominanta a reactiilor Ag-Ac este *specificitatea*, derivata din însasi caracterul raspunsului imun. In general, anticorpii reactioneaza numai cu antigenul *homolog*, adica antigenul inductor al sintezei lor, dar exista si exceptii, când anticorpii unui ser imun reactioneaza si cu antigene *heterologe*, adica altele decât cel folosit la imunizare, dar înrudite chimic cu acesta.

Molecula de imunoglobulina, cu o structura tridimensionala unica, poate sa lege un numar de determinanti antigenici diferiti, similari ca structura chimica cu antigenul inductor sau cu o structura chimica distincta, daca epitopul sau se potriveste spatial, cel putin cu o zona limitata a situsului de combinare al anticorpului.

Energia interactiunii anticorpului cu antigenele heterologe este totdeauna mai mica. *Posibilitatea ca o molecula de anticorp sa interactioneze cu antigene heterologe sta la baza multispecificitatii imunoglobulinelor sub aspect molecular si a reactiilor încrucisate sub aspect serologic.*

Din punct de vedere molecular, posibilitatea legarii unor epitopi diferiti, cu un anticorp unic în ceea ce priveste situsul sau de combinare, se explica prin faptul ca la nivelul subunitatilor sale structurale, se leaga epitopi diferiti, cu dimensiuni mai mici si configuratie complementara

acestora.

Capacitatea unui situs de combinare al unei molecule de anticorp, de a lega doua antigene diferite, corespunde *reactivitatii serologice încrucisate adevarate*. Legarea epitopilor heterologi se face totdeauna cu afinitate mai mica. Pentru antigenele proteice, reactivitatea încrucisata este determinata de existenta unor epitopi asemanatori din punct de vedere spatial, cu mici diferente ale secventei de aminoacizi, care induc usoare modificari ale epitopilor. *Esenta reactivitatii încrucisate adevarate este ca situsul moleculei de anticorp leaga epitopi diferiti.*

O alta cauza de ordin molecular a reactiilor încrucisate o constituie *heterogenitatea configuratiei spatiale a situsului de combinare* al moleculelor de anticorpi ale unui ser imun. Heterogenitatea anticorpilor este consecinta faptului ca nu exista nici un antigen care sa aiba un singur epitop. Cea mai simpla haptena poate induce sinteza câtorva specificitati de combinare a anticorpilor. Heterogenitatea specificitatii de combinare a anticorpilor unui ser imun, mareste sansa unei reactii cu antigene heterologe.

Din punct de vedere serologic, capacitatea anticorpilor unui ser imun, cu diferite specificitati de legare, de a reactiona imunologic cu antigene heterologe se numeste *reactivitate încrucisata de tip II* si reflecta capacitatea unei subpopulatii a anticorpilor serici de a lega un antigen heterolog.

Exemple de reactii imune încrucisate

Reactiile imune încrucisate au fost initial detectate pentru serurile imune fata de celulele bacteriene, datorita complexitatii antigenice a acestora. Orice celula bacteriana contine un numar mare de antigene distincte (flagelare, somatice, capsulare, piliare, fimbriale, etc.). Serul imun specific contine anticorpi (în diferite proportii) fata de toate categoriile de antigene celulare, unele fiind comune mai multor linii bacteriene.

La rândul lor, moleculele mari contin numerosi determinanti antigenici, unii dintre ei putând fi comuni moleculelor omologe ale diferitelor specii.

Reactiile încrucisate sunt mai frecvente pentru antigenele care au epitopi de natura glucidica, deoarece glucidele realizeaza polimeri cu configuratii spatiale limitate ca diversitate.

Antigenele *heterofile* de tip Forssman, de natura polizaharidica, cu o larga distributie în lumea vie (om, animale, plante, microorganisme), se caracterizeaza prin capacitatea lor de a reactiona cu un ser imun

specific fata de unul din antigenele grupului.

Antigenele *proteice* din surse taxonomice înrudite, dau frecvent reactii încrucisate. De exemplu, antiserul fata de albumina de ou de gaina, precipita albumina din oul de rata; albumina serica bovina si cea equina sau fibrinogenul uman si cel bovin reactioneaza încrucisat cu serul imun obtinut fata de una din aceste proteine. Anticorpilor anti-Hbg de cal, sintetizati de iepure, reactioneaza nu numai cu antigenul specific, dar si cu Hbg a unor specii înrudite: zebra, vaca, porcul, însa reactioneaza foarte putin cu Hbg de rozatoare, de pasari, de amfibieni.

Reactia Ag-Ac a fost un instrument util pentru determinarea diferentelor structurale dintre proteinele omologe, care constau în secventa aminoacizilor. Cu cât doua specii de organisme sunt mai apropiate filogenetic, cu atât proteinele lor omologe sunt mai asemanatoare si dau reactii încrucisate mai intense.

Capacitatea antigenelor distincte, dar înrudite chimic, de a induce sinteza anticorpilor care reactioneaza încrucisat, a creat complicatii în tratamentul bolnavilor cu diabet insulino-dependent. Insulina de origine animala (porcina, bovina, ovina), asemanatoare cu cea umana, a determinat la unii pacienti aflati sub tratament de lunga durata, sinteza anticorpilor anti-insulina, datorita micilor deosebiri ale secventei aminoacizilor din pozitiile 8, 9, 10. Anticorpilor specifici fata de insulina unei specii, reactioneaza cu insulina celorlalte specii.

		8	9	10
Insulina	bovina	Ala	Ser	Val
	oaie	Ala	Gly	Val
	cal	Thr	Gly	Ileu
	porc	Thr	Ser	Ileu

Alta complicatie a derivat din utilizarea preparatelor de insulina, contaminate cu proinsulina. Insulina este sintetizata în celulele B ale insulelor Langerhans, ca *preproinsulina*, care se deosebeste de proinsulina printr-o secventa de 20 de aminoacizi la capatul N. Dupa scindarea acestei secvente ramâne *proinsulina*, la care aminoacidul 1 din catena A si aminoacidul 30 din catena B, sunt legati prin catena C (33 aminoacizi). Peptidul C are rol în formarea puntilor S-S între catenele A (21 aminoacizi) si B (30 aminoacizi).

Injectarea preparatelor de proinsulina determina formarea autoanticorpilor anti-insulina. Eliberarea proinsulinei în organism prin liza celulelor insulare B are acelasi efect.

Reactiile imune încrucisate reciproce sunt frecvente, dar nu

obligatorii. De exemplu, serul imun de iepure anti-albumina serica bovina precipita ovalbumina, dar reactia reciproca nu are loc.

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

Serurile imune de la pacienții cu maladii infectioase 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 *cardiolipina* 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 încrucisată a stat la baza explicației reacțiilor autoimune care se produc între antigene ale mușchiului cardiac sau antigene valvulare și anticorpii anti-proteina M de *Str. haemolyticus*.

Capitolul 3

SISTEMUL IMUNITAR

Existenta tuturor organismelor vii este conditionata de activitatea unor mecanisme de rezistenta si de imunitate, capabile sa protejeze individualitatea lor chimica, prin mecanisme de recunoastere si diferentiere a substantelor proprii (self) de cele straine (nonself). In mod normal, aceste mecanisme sunt perfect tolerante fata de moleculele self, dar se activeaza si reactioneaza mai mult sau mai putin viguros pentru a îndeparta, a neutraliza sau a distruge substantele nonself.

Mecanismele de rezistenta si imunitate sunt prezente pe toata scara evolutiva a organismelor, începând cu bacteriile si se complexeaza în evolutie.

Celulele bacteriene posedă mecanisme de protectie a individualitatii genetice, reprezentate de:

- *fenomenele de restrictie* mediate de prezenta unor sisteme enzimatiche specifice (enzime de restrictie), care recunosc moleculele straine de ADN, le cliveaza la nivelul unor situsuri specifice, rezultând fragmente mai mici, sensibile la actiunea exo- si endonucleazelor;

- *fenomenele de reparatie genetica* dependente de activitatea unor sisteme enzimatiche care recunosc modificarile ADN induse de mutatii sau de lipsa de fidelitate a mecanismelor de replicare, transcriere si traducere genetica, 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 aparare specifica, aparent sunt absente, dar exista o gama larga de modalitati de aparare nespecifica:

- continuitatea si integritatea tesuturilor epidermice, acoperite sau impregnate cu substante impermeabile pentru virusuri si microorganisme;

- rezistenta fiziologica conferita de continutul înalt de zaharuri

reducatoare, prezenta taninurilor, a diferitelor acizi organici, a pseudoanticorpilor cu activitate hemaglutinanta în sucurile vegetale.

La *protozoare*, procesele de recunoastere asigura selectia hranei, identificarea partenerilor pentru conjugare la parameci, iar la cele parazite, procesele de recunoastere mediaza interactiunea cu gazda.

Mecanisme de aparare la nevertebrate

Desi nu au sistem limfoid, nevertebratele recunosc si raspund la substantele nonself, la fel de eficient ca si vertebratele. La ele functioneaza o diversitate de mecanisme, unele fiind *inductibile*. Raspunsul este de scurta durata si nu are specificitate fata de agentul infectios patogen. Raspunsul imun al nevertebratelor se aseamana calitativ cu cel înscut al vertebratelor mediat de celulele fagocitare si de moleculele neimunoglobulinice.

La nevertebrate, apararea organismului este asigurata de bariere fizico-chimice complexe: *secretia mucoasa* care acopera corpul celenteratelor, anelidelor, molustelor si protocordatelor, omoara potentialii patogeni. Exoscheletul dur al celenteratelor, molustelor, artropodelor, echinodermelor si protocordatelor, formeaza o bariera protectoare eficace fata de agentii infectiosi. Majoritatea nevertebratelor superioare au sistem circulator cu celule albe, denumite *hemocite* sau *celomocite*, în functie de natura cavitatii corpului. Lipsesc hematiile.

În mediul intern al nevertebratelor se gasesc fagocite, factori antimicrobieni constitutivi si inductibili cu efect neutralizant si litic, factori de coagulare a macromoleculelor straine. Toate nevertebratele, chiar cele care nu au cavitati ale corpului (spongieri, anemone, viermi lati), au fagocite, uneori de mai multe tipuri. Ca si la vertebrate, fagocitele sunt efectorii raspunsului inflamator, sintetizeaza enzime lizosomale si poseda mecanisme citocide dependente de superoxid.

Reactiile de aparare (repararea tisulara, fagocitoza, reactia de încapsulare)sunt mediate de fagocite si de celulele hemostatice. Ingestia microorganismelor invadatoare este rezultatul actiunii fagocitelor, iar un numar mare de microorganisme si de metazoare parazite este încapsulat de celulele hemostatice si de tip fagocitar. Endoparazitul care patrunde în organismul nevertebratelor este fagocitat, sau daca are dimensiuni prea mari, este încapsulat. Incapsularea este rezultatul unei fagocitoze fruste. Adeseori, endoparazitul încapsulat, este omorât sub actiunea intermediarilor toxici

ai unei cascade enzimatice.

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

Nevertebratele nu au proteinele cascadei complementare, dar viermii, insectele, crustaceii contin sistemul *profenoloxidazei*. Componentele acestui sistem sunt activate de o serie de enzime. La capatul cascadei de activare se formeaza enzima activa *fenoloxidaza*, cu rol esential în îndepartarea substantelor nonself.

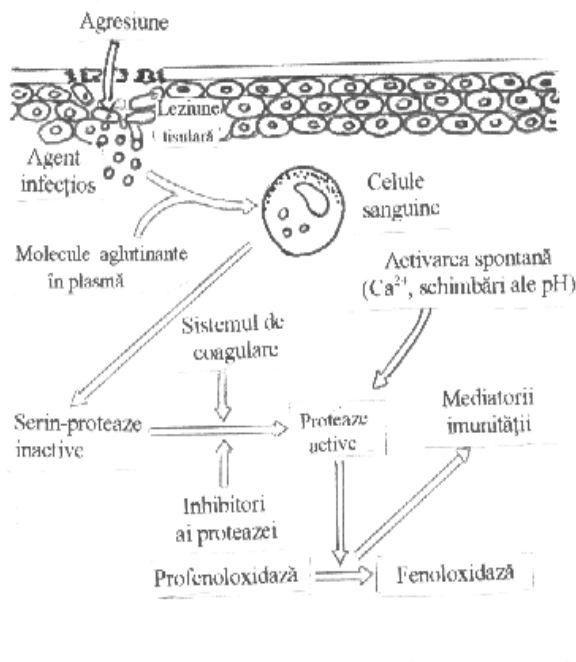


Fig. 26. Un mecanism posibil de activare a profenoloxidazei la fenoloxidaza, la artropode. Activarea este stimulata de leziunile tisulare, de infectia cu microorganisme, de schimbari ale concentratiei ionilor de Ca^{2+} si ale valorii pH, care pot duce la coagularea plasmei si generarea factorilor care mediaza evenimentele ulterioare ale imunitatii (dupa Roitt, 1997).

Fagocitoza este foarte activa si este stimulata de aglutininele si bactericidele cu rol de opsonine. Din punct de vedere functional, aglutininele si bactericidele sunt similare anticorpilor. Acestea sunt lectine, cu rolul de a lega componenta glucidica a glicoproteinelor de pe

suprafata celulelor nonself, rezultatul fiind aglutinarea.

Lectinele sunt molecule care au aparut timpuriu în evolutie si sunt ubicvitare: se gasesc la bacterii, plante, nevertebrate si vertebrate. Ele tapeteaza microorganismele invadatoare si au rolul de a le imobiliza, dar au si rol opsonizant, usurând fagocitoza. In functie 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 caror sinteza rapida este indusa de infectie. Din punct de vedere structural sunt de doua tipuri:

- peptide ciclice, care contin puncti S-S (de exemplu, drosmycina), active fata de bacteriile Gram pozitive si fata de fungi;
- peptide lineare (cecropine bogate în Gly si Pro), active fata de bacteriile Gram negative.

Componentele celulare si humorale cu functii protectoare mediaza reactii de aparare nespecifice (inascute), fara raspuns accelerat la stimularea antigenica secundara.

ORGANIZAREA SISTEMULUI IMUNITAR LA VERTEBRATE

La vertebrate, apararea este asigurata de mecanisme complicate celulare si humorale, de rezistenta si imunitate. Functia esentiala a sistemelor de aparare este protectia fata de agentii patogeni invadatori. Interactiunea permanenta cu microorganismele are un rol hotarâtor în dobândirea complexitatii structurale si functionale a sistemului imunitar. Dovada o constituie faptul ca la animalele germ-free (axenice), numarul limfocitelor B si titrul anticorpilor serici naturali sunt de 5-10 ori mai mici decât la organismele conventionale. Evolutia a generat tipuri celulare specializate, tot mai eficiente functional, care neutralizeaza, sechestreaza, omoara sau îndeparteaza agentii infectiosi.

La vertebrate, reactiile de aparare sunt rezultatul actiunii unor *factori humoralii nespecifici* (complement, substante bactericide) si *specifici* (anticorpi) si a unor *populatii de celule* specializate, *cu actiune nespecifica* (fagocite) sau *specifica* (limfocite).

Din punct de vedere structural, în conceptia moderna, sistemul imunitar al organismelor superioare este considerat ca *un organ difuz* sui-generis, alcatuit dintr-un numar foarte mare de molecule si celule, reunite într-o retea de interactiuni complexe, a carei functie este asigurarea integritatii si individualitatii 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 alcatuirea sistemului imunitar intra o serie de celule accesorii cu rol esențial în declansarea 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 10^{12} , iar al moleculelor de imunoglobuline, de ordinul a 10^{20} . Împreună, aceste componente formează *organul difuz*, cu greutatea de circa 910 g (1-2% din greutatea corpului), a cărui 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 ubicuitatea 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* (înscuțată) 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 (bivalentă) 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 principala 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.

Numarul 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 '50, 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 – 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 citoplasma se găsesc granulații azurofile. Se numesc *limfocite granulare*

mari (LGL). *In vitro*, limfocitele sunt neaderente și nu fagocitează.

Astăzi, Imunologia are la baza 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 nonself corespunzătoare.

După ce limfocitul și-a dobândit competență 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 *viața scurtă* (efectoare ale răspunsului imun);

- cu *viața 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 divida.

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

- *efectoare*, cele care direct sau indirect, prin molecule efectoare, 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.

Moleculele receptoare de imunoglobulina sunt inclavate cu capatul

C-terminal în membrana. Între IgM legat de membrana (IgM_m), cu funcția de receptor de antigen și IgM seric (IgM_s), sunt două deosebiri majore:

- IgM_m conține o secvență C-terminală hidrofobă, prin care se

ancoreaza în membrana limfocitelor mature neangajate, care nu au venit în contact cu antigenul;

– IgMm este monomer, iar IgM seric este pentamer.

Secventa C-terminala a IgMm cuprinde 25 de aminoacizi hidrofobi ce formeaza domeniul transmembrantar, urmat de o secventa cationica Lys-Val-Lys. Ca la toate proteinele ancorate în membrana, acest domeniu formeaza un α -helix, cu o lungime suficienta pentru a strabate membrana. Fiind hidrofoba, secventa de aminoacizi are interactiuni strânse cu lipidele membranei. Secventa cationica se extinde în citoplasma, marind gradul de stabilitate a moleculei în membrana celulara.

Dupa stimularea antigenica, sinteza se comuta la IgM seric. Trecerea de la IgMm la IgMs este rezultatul unor diferente ale modului de prelucrare a ARN premesager. Copia de ARN premesager pentru sinteza catenei μ (H) are doua situsuri potientiale de clivare si atasare a resturilor de poli-A, ce marcheaza capatul ARNm. Dupa stimularea antigenica, din ARN premesager sunt clivate secventele codificatoare ale domeniului C-terminal hidrofob si se sintetizeaza molecule de IgM fara secventa C-terminala de aminoacizi hidrofobi.

Comutarea IgMm --- IgMs nu modifica lantul L al moleculei. Cele doua forme ale IgM au domenii identice VH si VL, adica au aceiasi specificitate de legare a antigenului (au acelasi idiotip).

Limfocitul B are receptori membranari pentru substantele mitogene, pentru complement (C_{3b}), pentru regiunea Fc a imunoglobulinelor, pentru insulina etc. Receptorul pentru C_{3b} functioneaza si ca receptor pentru virusul Epstein-Barr. Limfocitele B neactivate au receptori de mica afinitate pentru IL-2, dar dupa stimularea antigenica, ele exprima rapid, receptori pentru IL-2 de înalta afinitate. Limfocitele B raspund la efectul stimulator al IL-2, prin proliferare rapida si secretia IgM. Pe suprafata limfocitelor B se gasesc la densitate înalta, moleculele CMH II.

Limfocitele T

Limfocitele T reprezinta pâna la 80% din totalul limfocitelor circulante. Valorile normale în sânge, pentru limfocitele T sunt cuprinse între 1620-4320/mm³, între una si 18 luni de viata si între 590-3090/mm³, dupa 18 luni.

Proportia limfocitelor T se poate determina prin metoda rozetelor

cu hematii de berbec sau prin metoda imunofluorescentei cu anticorpi monoclonali fata de receptorul de antigen.

Limfocitele T mature exprima markerul CD_4^{**} sau CD_8 . Aceste molecule apartin suprafamiliei imunoglobulinelor. Celulele CD_4 au de obicei functie *helper*, iar cele ce exprima markerul CD_8 sunt *citotoxice*.

Limfocitele T îndeplinesc functii complexe, atât *efectoare* ale raspunsului imun mediat celular cât si *reglatoare*, prin intermediul unor factori humoral pe care-i secreta, denumiti *limfochine*. Limfocitele T realizeaza urmatoarele functii:

- lizeaza celulele care exprima molecule nonsell pe suprafata lor;
- regleaza raspunsul imun;
- mediaza reactiile de hipersensibilitate întârziata.

Aceste functii sunt rezultatul heterogenitatii functionale si se datoreaza activarii unor subpopulatii distincte de limfocite T:

– *limfocite T_c* (T_{cl} , citotoxice sau citolitice) exprima pe suprafata lor markerul T_8 (CD_8);

– *limfocite T_h* (*helper*) au pe suprafata markerul CD_4 . Acestea sunt cele mai numeroase, reprezentând 60-65% din numarul total de limfocite T ale organismului uman;

– *limfocite T_s* (*supresoare*), purtatoare ale markerului CD_4 ;

– *limfocite T_D* sau *T_{DH}* (*delayed hypersensitivity*) exprima markerul CD_8 .

Functiile limfocitelor T_h se realizeaza prin intermediul limfochinelor secretate. In functie de limfochinele pe care le sintetizeaza, limfocitele T_h se clasifica în doua subseturi: T_h-1 si T_h-2 .

Celulele T_{h-1} (T_h-c) secreta IFN gama, IL-2 si TNF beta (citochine de tip 1, stimuloare ale imunitatii mediate celular). Citochinele de tip 1 produc urmatoarele efecte: stimuleaza reactia de citotoxicitate si inflamatorie asociata cu reactiile de hipersensibilitate întârziata. In esenta, limfocitele T_h-1 au rol în edificarea unui *raspuns imun mediar celular* (RIMC).

Celulele T_{h-2} (T_h-b) secreta citochine de tip 2: IL-4, IL-5, IL-6 si IL-10 (dar nu secreta IL-2) si stimuleaza activitatea limfocitelor B de memorie. Citochinele tip 2 (IL-4, IL-5) stimuleaza *raspunsul imun humoral* fata de parazitii extracelulari (stimuleaza diferentierea limfocitelor B spre plasmocit) si instalarea starilor alergice prin capacitatea lor de a induce sinteza IgE si de a stimula mastocitele. In esenta, limfocitele T_h-2 sunt implicate în edificarea raspunsului imun mediat humoral (RIMH). Prin toate aceste efecte, limfocitele T_h sunt amplificatoare ale raspunsului imun

Limfocitele CD₈ (T citototoxice) reprezinta 25-35% dintre

limfocitele T circulante. Functia lor consta în *efectul litic* prin contact celular direct asupra celulelor infectate cu virusuri, malignizate sau alogenice.

Limfocitele T_D sunt mediatoare ale reactiilor de *hipersensibilitate întârziata* (*delayed*) de tip tuberculinic. Ele secreta limfochine cu efecte locale asupra macrofagelor si limfocitelor din focarul inflamator.

Limfocitele Ts sunt inhibitoare ale amplitudinii raspunsului imun, dupa epuizarea antigenului. Ele au rolul de a diminua intensitatea RIMC si RIMH, mentinând în limite fiziologice intensitatea reactiilor imunitare. Se pare ca își exercita rolul supresor asupra raspunsului imun, prin inhibarea activitatii limfocitelor Th, dar au si efect supresor direct asupra limfocitelor T si B efectoare. Limfocitele Ts au rol important în inducerea starii de toleranta fata de antigenele exogene, ca si fata de moleculele self. Deficientele functionale ale limfocitelor Ts creeaza predispozitii pentru maladiile autoimune.

Distinctia functionala între limfocitele TCD₄ si TCD₈ nu este totdeauna neta. Unele clone de limfocite TCD₄ au proprietati citotoxice, iar unele clone TCD₈, dupa contactul cu antigenul, prolifereaza si secreta limfochine, ca si limfocitele TCD₄.

Receptorul de antigen al limfocitelor T (RCT)

Desi moleculele de anticorpi au fost printre primele a caror structura chimica s-a identificat, caracterizarea biochimica a receptorului de antigen al celulelor T s-a facut 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, dupa ce a fost posibila cultivarea liniilor de hibridom de celule T.

Moleculele receptoare de antigen ale limfocitelor T au o larga variatie biochimica, corespunzatoare specificitatii de legare a spectrului foarte larg de antigene.

Ca si în cazul anticorpilor, pentru receptorul de antigen al celulelor T, se foloseste termenul de "idiotip" (Ti), pentru a desemna o molecula a RCT cu un set unic de epitopi asociati, derivati din configuratia sa spatiala unica, complementara pentru legarea specifica a unui epitop antigenic.

Pentru izolarea si identificarea receptorului Ti s-au utilizat anticorpi monoclonali (AMC) anti- Ti, care precipita specific moleculele Ti dintr-un amestec complex de proteine membranare. Examinarea peptidelor în imunoprecipitatele diferitelor clone de celule T, prin metoda electroforezei în SDS-poliacrilamida, a evidentiat ca RCT este un

heterodimer și constă dintr-o glicoproteină de 80-90 kD, care în condiții reductoare se disociază în două peptide de 40 și respectiv 43 kD. Molecula întreaga constă dintr-o pereche de lanțuri peptidice, similare ca dimensiuni, legate prin punți S-S.

Lanțul α

Lanțul β

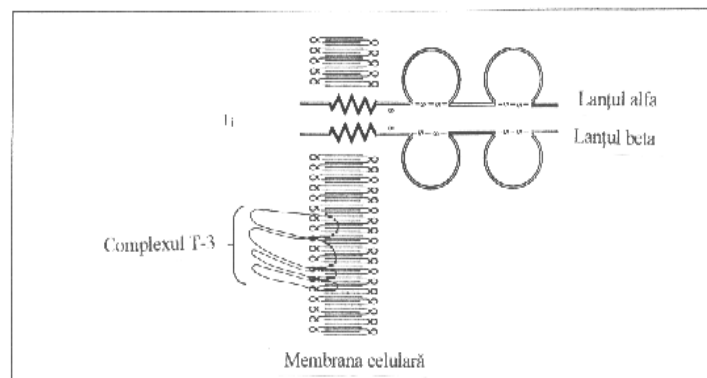


Fig. 27. Structura receptorului de antigen al limfocitului T. Molecula este un heterodimer format din lanțurile α și β , care se extind prin membrana celulară și au scurte porțiuni citoplasmice. Complexul T₃ este alcătuit din 4 subunități proteice (γ , δ și 2ϵ), localizate în stratul lipidic și în citoplasma.

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.

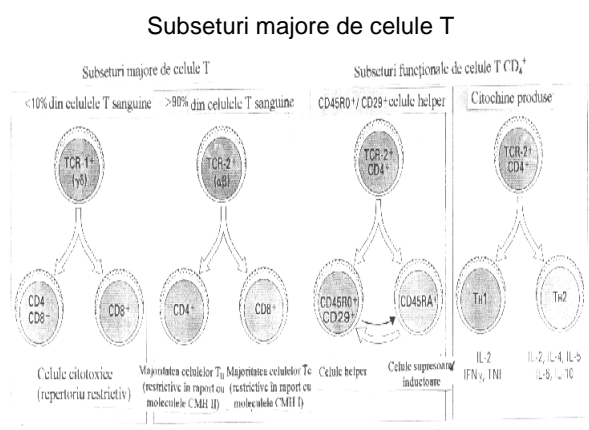
Fiecare catenă are 4 domenii: unul variabil ($V \alpha$, respectiv $V \beta$), unul constant ($C \alpha$, respectiv $C \beta$), unul transmembranar și unul intracitoplasmatic. Astfel alcătuită, molecula RCT face parte din suprafamilia moleculelor imunoglobulinice. Prin dimensiuni se aseamăna cu lanțul L al imuno-globulinelor: domeniul variabil al fiecărui lanț are 110 aminoacizi, dar pentru că se ancorează în membrana, se aseamăna 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 alcatuit din *regiunile hipervariabile* sau regiunile determinante de complementaritate –RDC (3 ale catenei α si 4 ale catenei β) si este aplatizat, adaptat functiei sale de a lega suprafata aplatizata a moleculelor CMH.

La om, RCT heterodimer este asociat cu molecula T₃, o grupare de trei peptide asociate necovalent. Functia probabila a lui T₃ este aceea de *transductor* al semnalului de activare, de la Ti la citoplasma, constituind, prin modificari conformationale, un canal de trecere a ionilor de Ca²⁺ prin membrana, dupa ce receptorul a legat epitopul specific.

S-au identificat doua tipuri de RCT:



Subseturi functionale de celule T CD₄⁺

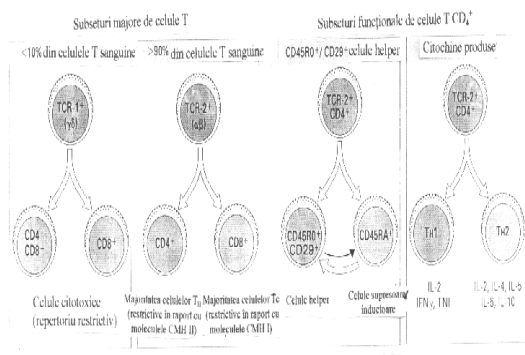


Fig. 28. Subseturi de limfocite T, în functie de tipul de RCT (RCT-1, RCT-2). Limfocitele RCT-1 au un repertoriu restrâns de interaciune cu antigenul, dar nu manifesta fenomenul restrictiei CMH. Limfocitele RCT-2 exprima CD₄ sau CD₈, care determina

recunoasterea antigenului asociat cu moleculele CMH II sau CMH I. Limfocitele TCR-2⁺ CD4⁺ sunt divizate pe baza limfochinelor pe care le secreta, în subseturi de celule Th1 (stimulatoare ale IMC) și Th2 (stimulatoare ale IMH) (dupa Roitt, 1997).

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

– RCT-1 este asemanator structural cu RCT-2, dar consta din polipeptidele γ și δ , cu o alta specificitate antigenica, identificata prin intermediul anticorpilor monoclonali. Se gaseste pe suprafata a 0,5-15% dintre limfocitele T circulante umane, dar este mai frecvent pe limfocitele intraepiteliale ale mucoasei intestinale.

Limfocitele T γ/δ exprima markerul CD3 și recunosc antigenul printr-un mecanism asemanator cu acela al limfocitelor T α/β , adica recunosc epitopii asociati cu moleculele CMH I și II, dar frecvent par sa interactioneze cu molecule CMH neclasice, iar specificitatea interactiunii lor cu epitopii antigenici este limitata. Aceste limfocite pot sa recunoasca antigene neconventionale, ca de exemplu, *proteinele de soc termic și antigenele nepeptidice (glucidice)*.

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

Unele studii sugereaza ca aceste celule contribuie la raspunsul initial al gazdei, la diferiti agenti infectiosi: virusuri, bacterii (în special micobacterii), paraziti, dar și la raspunsul anti-tumoral. Ele par sa constituie “prima linie de aparare”. Ipoteza este în acord cu localizarea lor anatomica, la poarta de intrare în organism, în tesuturile nelimfoide (tegument, intestin), dar și în situsurile inflamatorii. Limfocitele T γ/δ se aglomereaza în focarele inflamatoare cronice (membrana sinoviala, leziunile asociate cu lupusul eritematos diseminat).

La rumegatoare, 30-80% din totalul limfocitelor T circulante au receptor γ/δ , valorile maxime înregistrându-se la organismele nou-nascute. La alte specii, numarul acestor limfocite T este mic. Abundenta lor numerica la rumegatoare este corelata, probabil, cu bacteriemia masiva care însoteste procesul digestiv.

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

Limfocitele T au un marker distinctiv pe suprafata lor, fata de limfocitele B: Thy 1 (CD90). Acest marker poate fi exprimat și pe alte tipuri celulare și lipseste la o mica proportie a limfocitelor T.

Celulele NK

Celulele NK (natural killer) reprezintă circa 15% din totalul limfocitelor sanguine. Ele deriva din maduva 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 citoplasma 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 viața 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 soarecele nud (fără timus) sau la soarecii timectomizați neonatal. După activare, celulele NK eliberează IFN γ .

Cel mai studiat receptor membranar al celulelor NK este receptorul de mică afinitate pentru Fc al IgG (CD 16).

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 $Fc \gamma$* . Acțiunea lor principală este *citotoxicitatea mediata de anticorpi* (ADCC), față de celulele modificate antigenic.

In vitro, limfocitele T din sânge, sub acțiunea stimulatorie a unor

denumite *LAK* (*lymphokine activated killers*). *In vitro*, prin adaugarea IL-2 si a antigenului tumoral, devin citotoxice fata de celulele tumorale omologe.

Bazele genetice ale diversitatii 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 (10^8 - 10^9 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 membranal 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 considera, 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 haptena-proteina), neîntâlnite niciodată în natură și astfel specificitatea anticorpilor a fost explicată prin *teoriile instructive* (Breinl și Haurovitz, 1930). Aceste teorii atribuiau un rol important grupărilor determinante de specificitate. Epitopii ar pătrunde în celulă care sintetizează anticorpi și ar acționa ca matrită, 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 descendentele ei produc anticorpi cu o specificitate unică față de un epitop.

În 1959, Mc Farlane Burnet a formulat *teoria selectiei clonale*, care postuleaza ca sistemul imunitar este reprezentat de un numar urias de clone de limfocite, corespunzator unui numar echivalent de epitopi. Clona este o populatie de celule identice din punct de vedere genetic, descendente ale unei singure celule de origine. Diversitatea clonelor este reflectata în specificitatea fiecareia de a recunoaste un anumit epitop si este generata în timpul diferentierii celulelor limfoide din celulele de origine. Toate celulele unei clone poarta pe suprafata lor, molecule identice de imunoglobulina, care functioneaza ca receptori specifici de antigen. Dupa interactiunea cu antigenul, molecula receptor va fi sintetizata si secretata, cu o rata foarte înalta, ca anticorp. Epitopii antigenici selectioneaza din aceasta colectie imensa, clonele de limfocite care au receptori complementari din punctul de vedere al configuratiei spatiale si determina proliferarea si diferentierea lor în celule producatoare de anticorpi. Toate celulele clonei au aceiasi specificitate pentru antigen.

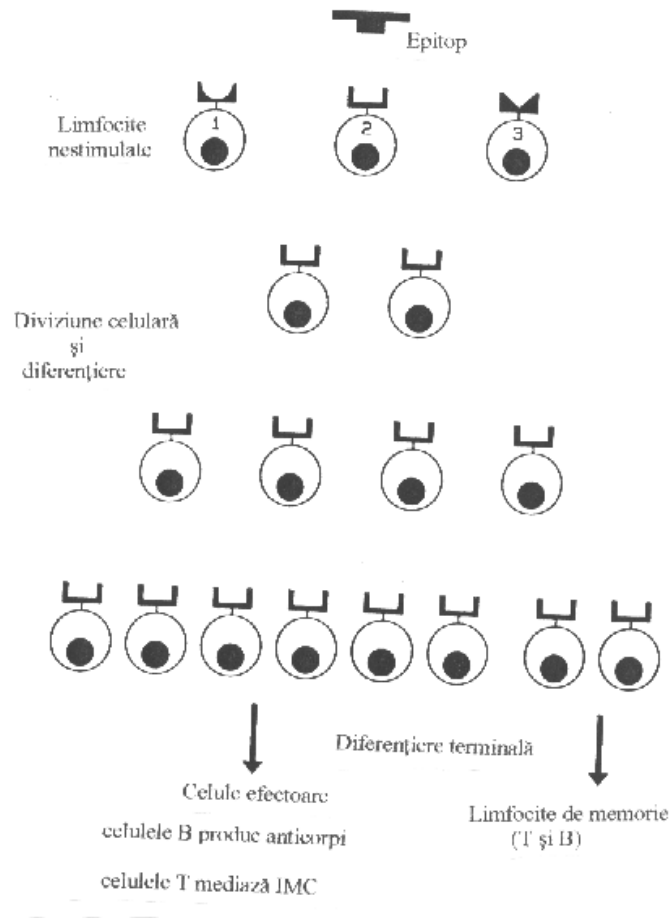


Fig. 29. Ilustrarea schematică a teoriei selecției clonale. Fiecare clonă de limfocite are pe suprafața sa, un receptor de antigen, specific pentru un epitop antigenic complementar. La patrunderea în organism, antigenul selectează acele clone care pot să lege specific epitopii complementari. Celulele 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 specificitati distincte pentru diverse antigene: de exemplu, numai 1-2% dintre limfocite leaga albumina serica bovina. Numarul celulelor care leaga un anumit antigen creste mult dupa imunizarea cu antigenul respectiv;

– limfocitele unei clone au receptori si produc anticorpi cu o singura specificitate, fata de un singur epitop. Faptul ca initial se sintetizeaza IgM si ulterior IgG, nu este un contraargument, deoarece anticorpii celor doua clase au regiuni variabile identice si au aceiasi specificitate de legare cu epitopul;

– clona de celule cu specificitate de legare a unui epitop se poate elimina selectiv prin pasajul celulelor pe o coloana de afinitate, cu bile de sticla tapetate cu antigenul specific. Celulele care au receptori pentru antigen adera de coloana, iar celelalte trec, ceea ce denota ca limfocitele sunt angajate sa raspunda la un antigen, înainte de a se întâlni cu el, prin receptorii lor specifici preformati;

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

Mecanismele genetice ale diversitatii imunoglobulinelor

Sustinuta de dovezi experimentale, teoria selectiei clonale este acceptata. Se pune problema modalitatii de codificare genetica a sintezei unei mari diversitati moleculare de anticorpi. Potentialului imens al unui organism de a sintetiza milioane de tipuri de molecule diferite de anticorpi, ar trebui sa-i corespunda un numar egal de gene codificatoare. Generarea potentialului urias de diversitate genetica s-a explicat în diferite moduri:

– teoria *liniei germinale* considera ca genele care codifica sinteza domeniilor VL si VH se gasesc în celula germinala. In genomul fiecarui individ s-ar gasi un numar imens de cistroni care s-ar transmite ereditar. Pentru cele $10^8 - 10^9$ specificitati de legare ale moleculelor de anticorpi, ar exista tot atâtea gene codificatoare. Teoria nu explica modalitatile de pastrare în cursul evolutiei, a acestui numar urias de gene si nici posibilitatea sintezei anticorpilor specifici fata de antigenele sintetice;

– teoria *recombinarilor somatice* presupune existenta unui numar limitat de cistroni codificatori ai domeniilor variabile ale moleculei de anticorp, în linia germinala. Diversificarea specificitatii de combinare a anticorpilor s-ar realiza prin recombinari somatice între un numar limitat de cistroni, asociate cu diviziunile celulare în cursul diferentierii limfocitelor;

– teoria *mutatiilor somatice* considera ca 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 (pastrarea 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 sinteza 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 înșasi 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 atât de variații corespunzătoare capatului NH₂ al catenei polipeptidice și să rămână constantă pentru secvența codificatoare a capatului COOH. Nu se cunoaște nici o situație în care segmentul ADN corespunzător regiunii constante a unei proteine să fie ramă 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 constanta regiunii C-terminale este acceptarea ideii că molecula de imunoglobulină este codificată de mai multe gene distincte – 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 constantei genomului pe toată perioada de dezvoltare a unui organism;
- dogma imposibilității rearanjării genelor într-o celulă somatică;

– dogma continuitatii informatiei genetice. Din aceste motive, ipoteza nu a fost acceptata.

Teoria *genelor multiple* codificatoare ale unei molecule de imunoglobulina a fost confirmata ulterior prin tehnica cineticii de hibridare (Leder si Swan, 1971). Autorii au aratat ca atât în celulele limfoide embrionare cât si în celulele tumorii de mielom, *regiunea constanta* a catenelor H si L ale moleculei de imunoglobulina este codificata de o singura gena, iar *regiunea variabila* este codificata de mai multe gene.

Prin tehnica hibridarii, s-a comparat distributia genelor codificatoare în ADN din doua surse:

- dintr-o tumora de mielom de soarece, ce secreta un lant k;
- din celulele limfoide embrionare (imature) de soarece, ce nu sintetizeaza imunoglobuline.

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

Fragmentele codificatoare ale lantului k au fost identificate prin hibridare cu ADNc, obtinut prin transcrierea inversa a ARNm al lantului k. S-au folosit doua tipuri de ARNm ale lantului k:

- un fragment pentru lantul Lk întreg (cu domeniile Vk si Ck);
- un fragment corespunzator jumatatii 3' a ARNm, codificator al domeniului Ck;

Pentru ambele categorii de molecule de ARNm s-au obtinut fragmentele de ADNc corespunzatoare.

În proba cu ADN obtinut din limfocitele embrionare, ADNc al fragmentului Ck a hibridat cu un fragment de ADN ce contine gena Ck, iar ADNc pentru întregul lant k a hibridat atât cu fragmentul genei Ck, cât si cu un alt fragment de ADN rezultat prin clivarea cu enzimele de restrictie, care probabil contine gena Vk.

În concluzie, *în celulele limfoide embrionare, cele doua gene codificatoare ale catenei k se gasesc situate la distanta, în fragmente de restrictie diferite.*

În proba cu ADN obtinut din celulele limfoide de mielom, ambele probe de ADNc, corespunzatoare domeniului Ck si lantului întreg Vk au hibridat într-un singur fragment.

În concluzie, *în limfocitele mature, cele doua fragmente codificatoare ale lantului k se gasesc în vecinatate imediata, în acelasi fragment de restrictie.*

În esenta, genele functionale pentru sinteza imunoglobulinelor în celulele mature sunt rezultatul rearanjarii prin *proces de transpozitie*, a unor segmente genice mici, mostenite în ADN al liniei germinale.

Rearanjarile au loc în limfocite, pe măsura ce ele se diferențiază din celule imature precursoră, 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 soarece);

– *grupul genelor k*, codificatoare ale lanțului L_k (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 soarece 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 L_k și L λ , atât din limfocitele embrionare, cât și din celulele limfoide mature de mielom, producătoare de imunoglobuline.

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

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

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

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

Segmentul genic C λ 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 λ : *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 asemanatoare celei a genelor catenei L. Segmentele genice codificatoare ale catenei H sunt mai numeroase si au o organizare mai complexa, deoarece contin în plus secvente codificatoare D (diversity), intercalate între secventele VH si JH. Cele circa 12 secvente genice D codifica fiecare 5-15 aminoacizi si amplifica diversitatea biochimica a anticorpilor. Ele confera cea mai mare variatie biochimica a catenei H.

Secventele genice VH par a fi în numar de câteva sute. Fiecare segment VH este asociat cu segmentul LH, codicator al secventei leader. La soarece sunt 200-300 de segmente genice VH, 10-20 segmente D, 4 gene JH si 10 gene CH, iar la om sunt circa 100 segmente genice VH (din care circa jumătate sunt functionale), circa 30 de gene D si 9 gene J, din care 6 sunt functionale. Genele VH sunt diseminate în 4 aglomerari.

Genele CH, codificatoare ale regiunii constante ale claselor si subclaselor de catene H, se gasesc în ordinea: μ , δ , γ_3 , γ_1 , ϵ ϕ (nefunctionala), α_1 , γ_2 , γ_4 , ϵ , α_2 .

Fiecare segment genic CH contine mai multi exoni. Fiecare exon codifica un domeniu structural al moleculei de imunoglobulina.

Asamblarea genei active pentru catena L. Pentru a rezulta o gena functionala Lk, unul din cele circa 250 segmente genice Vk se uneste cu unul din cele 4 segmente genice functionale Jk, printr-un proces de recombinare probabilistica. Impreuna cu gena Ck, se formeaza ansamblul VJC, codicator al catenei Lk, transcris ulterior în ARN premesager. Prin procesul de clivare si înadire, intronii sunt eliminati si rezulta ARNm pentru catena Lk. Se sintetizeaza lantul polipeptidic, iar secventa leader este clivata în cursul transferului prin membrana reticulului endoplasmic. Rearanjarea functionala a genei pentru catena L, stopeaza rearanjarea genelor ce codifica acelasi izotip (fenomenul excluderii alelice).

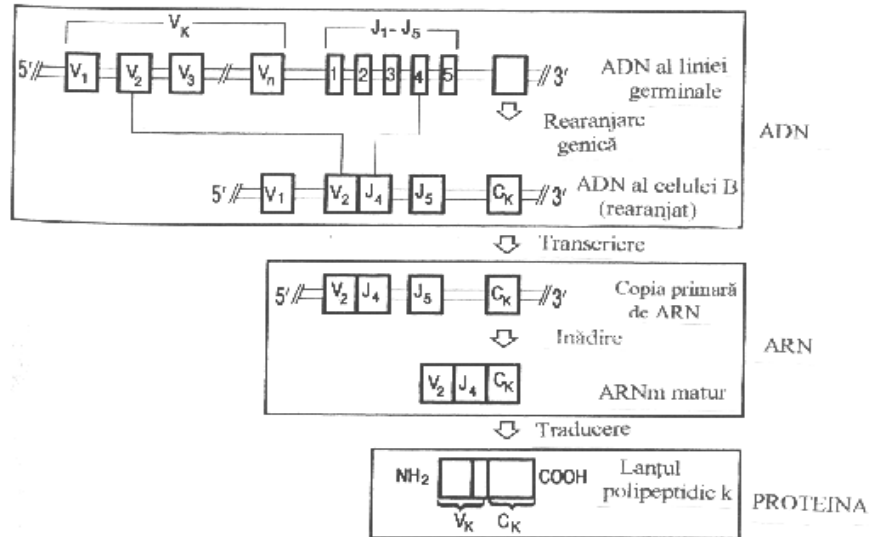


Fig. 30. Recombinarea genelor umane codificatoare ale catenei L_k a imunoglobulinelor. Gena funcțională în limfocitul B matur, rezultă prin recombinarea uneia din numeroasele gene V, cu una din cele 4 gene J funcționale și gena C_k. Recombinarea poate avea loc între oricare din genele V și J. Schema ilustrează rearanjarea genică între V₂ - J₄ - 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 C_H, care codifică clasa și subclasa catenei H.

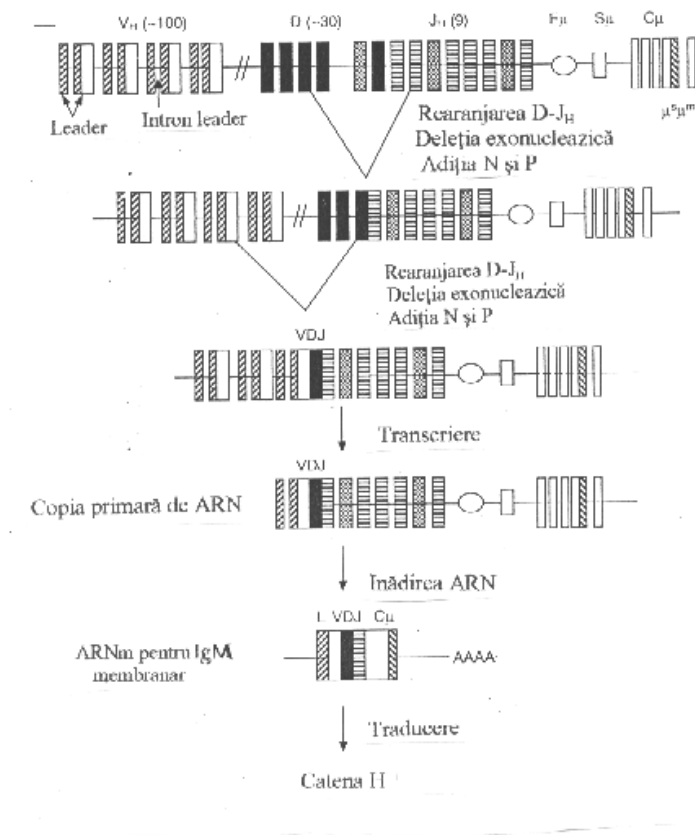


Fig. 31. Modelul organizării genei umane codificatoare a catenei H. Genele regiunii V_H sunt multiple (50-300), fiecare cu secvența leader. Reunirea segmentului genic D cu gena J_H precede legarea genei V de perechea DJ_H . Intronul genei leader (L) este îndepărtat prin clivarea și reunirea exonilor ARN. Reunirea alternativă poate genera imunoglobulina de membrană (m) sau secretată (s). Cifrele indică numărul aproximativ de gene de segmente genice. E_H = regiune activatoare; S_H = 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 V_H - D - J_H : circa 250 segmente V_H , 12

segmente D și 4 segmente JH ($250 \times 12 \times 4 = 12000$).

2) *Flexibilitatea jonctionala a segmentelor genice*. În momentul asamblării complexelor VH – D – JH sau VL – JL se produc deleții, aditii, substitutii de baze, care modifică circa 3 aminoacizi la fiecare jonctiune. Numarul variantelor biochimice ale moleculelor de imunoglobulina crește de 3 ori pentru lantul 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 combinatoriala* prin împerecherea întâmplătoare a catenelor H și L. Dacă oricare lant L poate fi împerecheat cu oricare lant H, vor rezulta peste 10^8 variante de imunoglobuline ($100000 \text{ H} \times 3000 \text{ L}$).

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-transferaza* (TdT), activă în celulele limfoide imature, capabilă să adăuge nucleotide la capatul 3' al catenei de ADN în curs de sinteză, fără să necesite matrită. Activitatea TdT este minimă la fat și la noul-născut, dar este stimulată postnatal. Enzima acționează preponderent pe genele catenei H, dar regiunile N s-au identificat și la jonctiunile V-J ale catenei L.

5) *Mutațiile somatice*. Un număr de ordinul milioane de variante ale regiunii V pot să apară prin substitutii 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

diversitatii anticorpilor. La om, hipermutatia somatica se produce în prezenta antigenului si are loc în centrul germinativ din tesutul limfoid periferic.

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

Rearanjarea genelor se desfasoara continuu în limfocitele B din maduva osoasa hematogena. Limfocitele care nu genereaza o rearanjare genica productiva sunt eliminate, nefiind utile sistemului imunitar. Probabil ca pentru o rearanjare productiva sunt necesare, statistic, multe altele neproductive, ceea ce presupune ca pentru fiecare limfocit functional se pierde un numar mare de celule. Teleonomic însa, risipa este justificata de importanta esentiala a functiei imunitare pentru organism.

Mecanismele de recombinare genica permit ca în contextul existentei a mai putin de 1000 de gene în linia germinala, organismul sa produca o mare diversitate de anticorpi (câteva miliarde), ceea ce constituie *repertoriul imunoglobulinelor*.

Descoperirea mecanismelor genetice de transpozitie, generatoare a uriasii diversitati a specificitatii de combinare a anticorpilor, a deschis o noua cale a înțelegerii asupra modului în care informatia genetica poate sa fie diversificata.

Mecanismele de transpozitie sunt active în limfocitele B, dar si în celulele liniei T, în care codifica o diversitate asemanatoare a receptorului de antigen al acestor celule, dar nu au fost identificate pentru alte gene.

Mecanismele genetice ale generarii diversitatii RCTi

Mecanismele genetice generatoare ale diversitatii specificitatii de legare a RCTi sunt asemanatoare cu cele care genereaza diversitatea imunoglobulinelor. Calculele teoretice sugereaza ca exista posibilitatea a cel puțin 10^{14} combinatii TCR 2.

Genele codificatoare pentru T_i s-au studiat dupa clonarea ADNc, obtinut prin metoda *hibridarii substructive**. S-a studiat distributia genelor atât în celulele T embrionare, cât si în limfocitele T mature. Se cunosc mai bine genele care codifica lantul β . Ele sunt plasate în 4 regiuni distincte, care corespund segmentelor V, D, J, C. Nu se cunoaste numarul genelor în fiecare regiune.

Prima treapta 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 rearanjarile sunt mai versatile decât ale genelor codificatoare pentru moleculele de imunoglobuline și rezultă mai multe variante: Vb - Jb ; Db - Db; Db - Jb; Vb - Db - 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 - D- J. Ele sunt mai diversificate decât ale genelor pentru imunoglobuline, fiind posibile rearanjări D - D și V - J;
- diversitatea joncțională prin deleție sau aditie de baze, la legarea segmentelor V, D, J.

Rearanjarile genice pentru RCTi se produc în timocitele imature, în zona corticală a timusului, înainte de a ajunge în zona medulară.

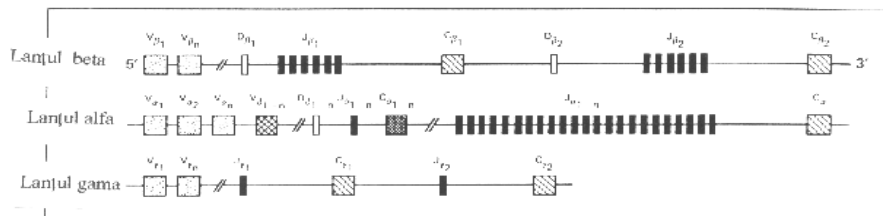


Fig. 32. Genele codificatoare ale receptorului limfocitar de antigen. Catenele α , β și γ , δ sunt codificate de gene V (ale regiunii variabile), gene D, J și o regiune genică constantă (C).

Rearanjarea genelor V β pe unul din cromosomi, supresează rearanjarea genelor pe cromosomul pereche (excludere alelică), astfel ca fiecare celulă exprimă un singur tip de catenă RCT β . Rearanjarea genelor alele α nu este supusă fenomenului excluderii alelice și de

aceea fiecare celula are doua tipuri de receptori de antigen (RCT), fiecare având propriul sau lant α , dar lantul β este comun. Surprinzator, celulele CD8 din epiteliul intestinal, care sunt generate extratimic, au RCT format din homodimeri $\alpha - \alpha$.

DEZVOLTAREA ONTOGENETICA A SISTEMULUI IMUNOCITAR

Limfocitele T si B se diferentiaza dintr-o *celula stem* (celula mama, tulpina, de origine), care nu a fost identificata, fiind doar ipotetica, deoarece nu are caractere structurale distinctiv.

Celula stem este de origine mezenhimala. La pasari si mamifere, celula stem apare în *mezenhimul paraaortic* al embrionului, având un potential foarte înalt de multiplicare si diferentiere.

Celula stem este pluripotenta, chiar totipotenta, deoarece prin multiplicare si diferentiere, genereaza toate categoriile de celule sanguine: granulocite, monocite, limfocite, mastocite, megacariocite, eritrocite. Diferentierea initiala a celulei stem este pe linie eritrocitara si mieloida, iar diferentierea pe linie *limfoida* este ulterioara si simultana cu procesul de maturare.

Maturarea limfocitelor semnifica dobândirea *imunocompetentei*, adica a capacitatii de a recunoaste specific antigenul si de a se activa.

Din mezenhimul paraaortic, celula stem migreaza în *sacul vitelin*, unde, pentru un interval de timp se desfasoara *hematopoeza*.

Sacul vitelin este sediul esential al diferentierii celulelor stem pe cale limfoida, la pasari si mamifere, înainte de migrarea lor în *ficat si splina*. Dupa cultivarea embrionului total de soarece, fara sacul vitelin, înainte de migrarea si colonizarea sa cu celule stem limfoide, nu s-a evidentiat diferentiere celulara pe cale limfoida. Ulterior în viata embrionara, functia hematopoetica este preluata de ficat si splina. In aceste organe, celulele stem se divid cu o rata înalta si se diferentiaza pe linie eritrocitara, mieloida (granulocitara), monocitara, limfoida.

În ultima parte a vietii embrionare, functia hematopoetica este preluata de *maduva osoasa*, chiar daca ficatul si splina pastreaza o activitate hematopoetica foarte limitata si un scurt interval dupa nastere.

Celulele limfoide diferentiate în *maduva osoasa*, la pasari,

migreaza initial în splina si ficat, iar de aici migreaza în organele limfoide centrale (timus si bursa lui Fabricius).

La mamifere, din *maduva osoasa*, limfocitele migreaza în *ficat si splina*. Unele își dobândesc competenta imunitara chiar în *maduva osoasa*, în ficat sau în splina, organe care îndeplinesc functiile bursei la pasari, iar altele migreaza în *timus*. Acesta este *circuitul primar* al limfocitelor, în care se produce *diferentierea independenta de antigen*, în cursul careia limfocitele devin *imunocompetente*. Aceasta etapa se desfasoara în organele limfoide primare (timus, bursa lui Fabricius si echivalentii bursali ai mamiferelor). In cursul ei, limfocitele dobândesc receptori specifici de antigen.

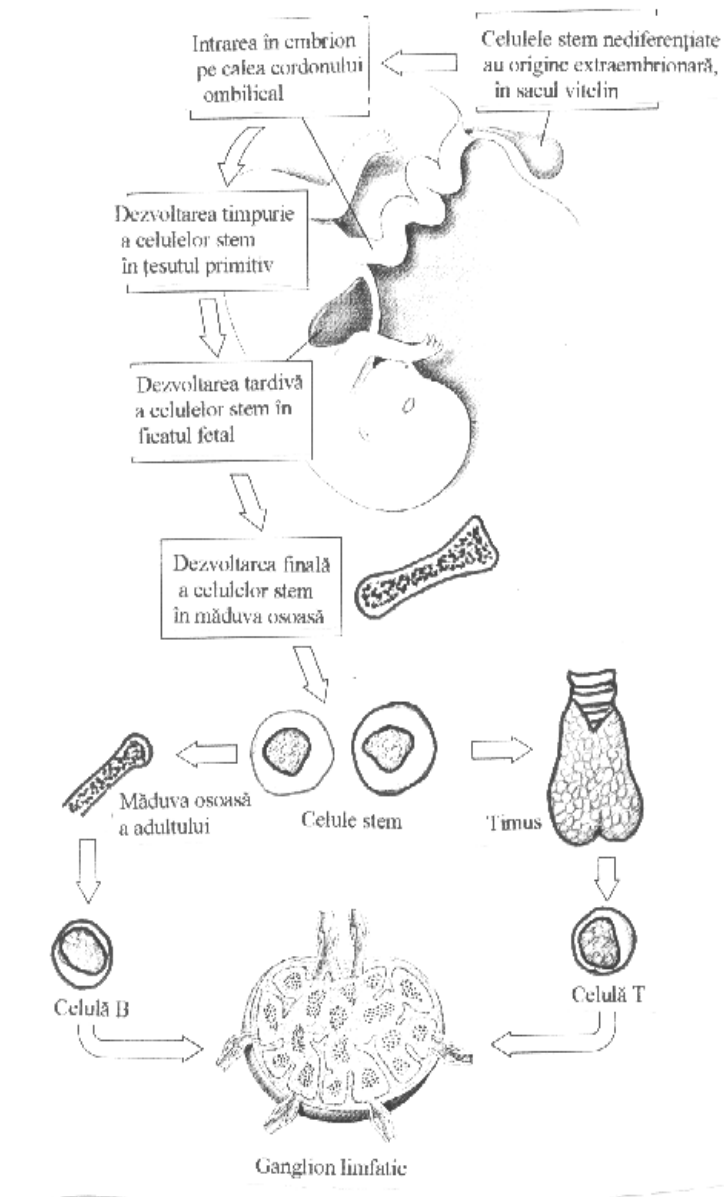


Fig. 33. Diferențierea celulelor stem în limfocite T și B are loc în timus și respectiv, în măduva osoasă. Limfocitele mature migrează în țesuturile limfoide (după Black, 1996).

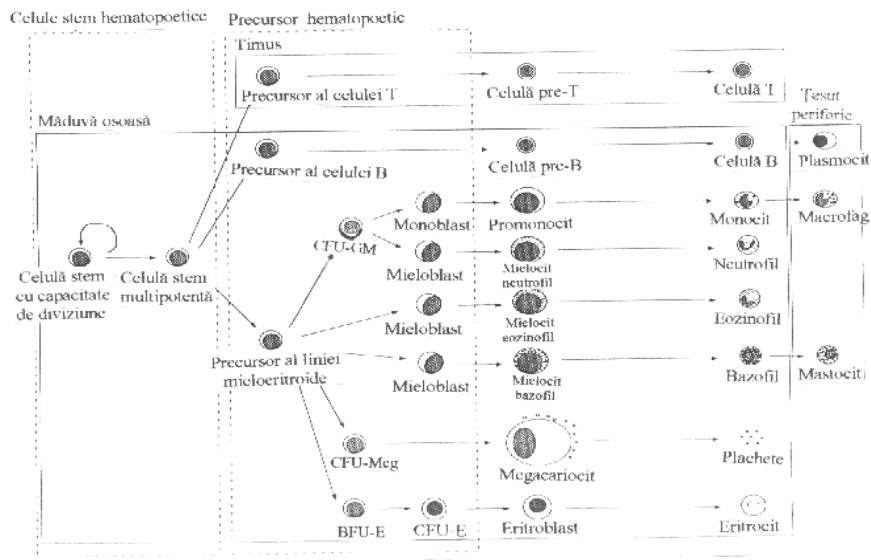


Fig. 34. Un model al cailor de *diferențiere a celulelor sanguine* din celulele stem hematopoietice, în raport cu condițiile de mediu. Celulele stem și cele imature sunt delimitate de linii întrerupte (dupa Ikuta, 1992).

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*.

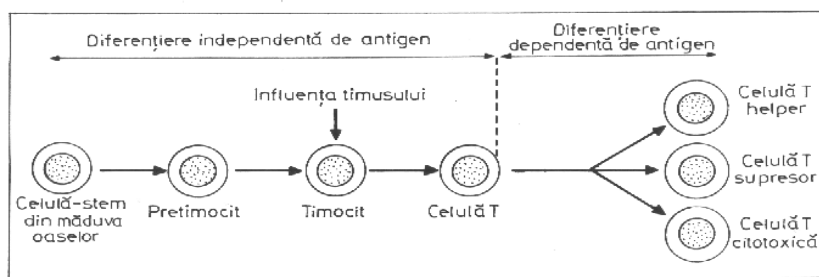


Fig. 35. *Diferențierea limfocitelor* are loc în două etape: 1) diferențierea independentă de antigen în măduva osoasă și în organele limfoide primare; 2) diferențierea

dependenta de antigen în organele limfoide secundare.

Mecanismele moleculare care conditioneaza migrarea limfocitelor din splina si ficat, în organele limfoide primare, nu se cunosc. Este un proces aleatoriu sau este programat de receptori celulari, eventual dobânditi în aceste organe. Daca este un proces conditionat, înseamna ca în ficat, celulele limfoide sunt deja pre-B (prebursocite) si vor migra în bursa lui Fabricius si respectiv pre-T (prelimocite), care vor migra în timus.

Rolul bursei lui Fabricius în diferentierea limfocitelor B

Bursa lui Fabricius este un organ *limfoepitelial* si se dezvoltă ca un diverticul dorsal al intestinului terminal, situat lângă cloaca. Primordiul bursal se observa la embrionul de 4 zile de incubatie, ca un mugure epitelial în regiunea cloacala. Pe masura ce creste, mugurele se vacuolizeaza si vacuolele prin coalescenta, formeaza lumenul bursal. Pe suprafata interna a cavitatii bursale, epiteliul formeaza pliuri longitudinale, prolifereaza si constituie aglomerari celulare (muguri epiteliali) în lamina propria. Formarea mugurilor epiteliali este dependenta de interactiunea celulelor epiteliale cu tesutul mezenhimal. Celulele stem limfoide din sacul vitelin colonizeaza mugurele epitelial în zilele 8-11 de dezvoltare embrionara. Fiecare mugure epitelial este colonizat de 1-3 celule stem limfoide prebursale. Celulele limfoide prolifereaza intens si formeaza medula foliculilor bursali.

Atât celulele epiteliale ale bursei cât si celulele stem ale liniei limfoide prolifereaza intens în cursul vietii embrionare, dar si 2-4 saptamâni dupa ecloziune. La 4 saptamâni dupa ecloziune, bursa contine circa 10 000 de foliculi, fiecare având circa 10^5 limfocite.

Celulele stem limfoide prebursale sunt originare în *mezenhimul* embrionar. Înainte de a ajunge în bursa, 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 exprima IgM membranar, iar la ecloziune, circa 90% din celulele bursale au IgM pe suprafata lor si sub 1% exprima IgG sau IgA.

Celulele epiteliale din zona medulara formeaza o retea laxa, având o structura interna de tip secretor. In zona medulara, pe lângă celulele epiteliale se gasesc limfocite, plasmocite, fagocite. Regiunea medulara si cea corticala sunt separate prin membrana bazala. La suprafata lumenului bursal, celulele epiteliale se diferentiaza în epiteliul asociat foliculului, cu functia de a fagocita si de a transporta materialul antigenic, din lumenul bursal, în regiunea medulara. Celulele epiteliale

din epiteliul asociat foliculilor si cele din medula bursala sunt diferite în privinta capacitatii de a fagocita si a activitatii enzimatic.

La ecloziune, bursa are 30-40 mg, atinge dezvoltarea maxima (3-4 g) la 2-4 luni si se mentine pâna la 4-6 luni, când începe sa involueze si se atrofiaza la maturitatea sexuala, când dispar complet structurile limfoide si epiteliale.

Bursectomia la ecloziune nu împiedica migrarea limfocitelor B la periferie, pentru ca procesul începe timpuriu în dezvoltarea embrionara. Îndepartarea chirurgicala a primordiului sau ablatia chimica a epiteliului bursal prin tratament cu testosteron, se poate face la 2-5 zile de incubare, înainte ca foliculii bursali sa fie populati de celulele stem limfoide. La pasarea adulta timectomizata, numarul de limfocite B în organele limfoide periferice nu este influentat. Se gasesc plasmocite si anticorpi, dar cu un repertoriu foarte limitat al specificitatii de legare, ceea ce denota o maturare extrabursala foarte limitata a limfocitelor B. Concluzia este ca bursa lui Fabricius nu este strict necesara pentru asamblarea genelor codificatoare ale sintezei imunoglobulinelor si nici pentru diferentierea limfocitelor B, dar are un rol esential pentru *diversificarea clonala* a limfocitelor B, adica pentru diversificarea repertoriului lor antigenic.

Bursa lui Fabricius este un organ limfoid specializat în care se produce diversificarea somatica extensiva a genelor rearanjate pentru sinteza anticorpilor, cât si expansiunea clonala a limfocitelor.

Spre deosebire de mamifere, la care generarea diversitatii celor circa 10^9 specificitati de legare a anticorpilor se face prin legarea combinatoriala a segmentelor genice V-D-J (pentru catena H) si a segmentelor genice V-J (pentru catena L), linia aviana de evolutie a vertebratelor a exploatat o alta strategie pentru generarea diversitatii specificitatii de legare a moleculelor de anticorpi. În timpul dezvoltarii embrionare a puiului de gaina, potentialul generarii diversitatii genetice prin procese de recombinare genica este limitat, deoarece regiunea variabila a catenei H si a catenei L este codificata de secvente genice functionale unice V si J. Conversia genica are loc cu o rata mare între *singura gena functionala* V (VH_1 sau VL_1) si *un grup de pseudogene* V. De aceea, rearanjarea genelor în celulele embrionare ale liniei limfoide, înainte de migrarea în bursa, va produce o diversitate foarte limitata a specificitatii de legare a anticorpilor. Micromediul bursal selecteaza si favorizeaza diferentierea celulelor stem bursale care sufera o conversie genica productiva, iar celelalte (circa 90%), probabil cu conversie nereproductiva, mor prin *apoptoza* în interiorul bursei.

Între celulele epiteliale ale bursei si 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 eritrocitare 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 străbatând 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 (asa 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 maduva osoasă, nu exprimă markeri imunoglobulinici de suprafață. Ele își dobândesc competența imunitară în *maduva*, *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 λ . 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 recombinația genelor în cromosomul pereche, sugerând o explicație pentru fenomenul excluderii alelice.

Prima imunoglobulină de suprafață a limfocitelor B este IgM, ca proteina integrată, cu o densitate de peste 200 000 de molecule/celula. Limfocitele B care exprimă pe suprafața lor numai molecule IgM sunt considerate imature. Alături de IgM pot să coexiste IgA sau IgG. Pe măsura 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

functionala a genelor pentru sinteza catenelor H si L, sunt eliminate într-un stadiu timpuriu al diferentierii lor.

Dupa stimularea antigenica, limfocitele B mature secreta IgM, IgG (una din subclase), IgA sau IgE. Nu se diferentiaza o linie celulara care sa sintetizeze izotipul IgD.

Timusul la mamifere si rolul lui în diferentierea limfocitelor T

Timusul este un organ limfoid voluminos, asezat în partea superioara a mediastinului anterior. Are origine epiteliala dubla: deriva din *ectodermul* perechii a III-a de pungi branhiale si din *endodermul* celei de III-a pungi faringiene. Primordiile epiteliale fuzioneaza si formeaza primordiul timic epitelial, care pierde legatura cu faringele si lumenul dispare.

Timusul este primul organ limfoid care apare la pasari si mamifere. Primordiul timic este strapuns de *celulele stem limfoide* (la soarece, în ziua a 11-a de dezvoltare embrionara), cu originea în sacul vitelin. Ulterior în cursul dezvoltarii fetale, celulele limfoide vin din ficat, iar dupa nastere, din maduva osoasa. La fatul uman, la 20 de saptamâni de sarcina, timusul este dezvoltat complet.

Arhitectura timusului

Timusul este alcatuit din doi *lobi*. Fiecare lob este împartit incomplet, prin septuri conjunctive, în *lobuli*. Lobulii contin o retea de *celule epiteliale*, printre care sunt diseminate numeroase *celule limfoide* (timocite).

Epiteliul timic este diferentiat zonal: zona *corticala* si zona *medulara*.

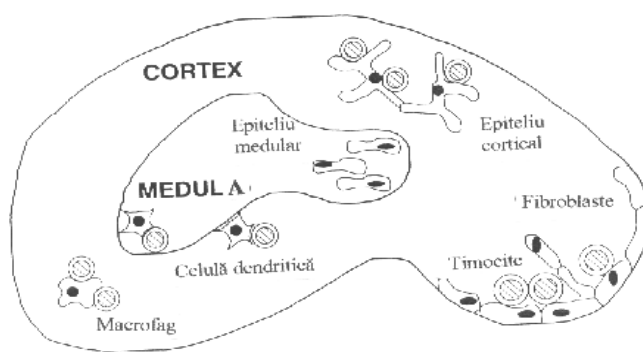


Fig. 36. Componentele *stromale* ale micromediului timic.

La animalele tinere, zona *corticala* formeaza 80% din tesutul timic. Celulele *epiteliale* sunt de forma stelata, cu numeroase prelungiri fine care se interconecteaza, formând un *citoreticulum*. Numarul limfocitelor este mai mare decât al celulelor epiteliale. Limfocitele sunt mici si pe sectiunile colorate cu hematoxilina, zona corticala este întunecata, datorita raportului nucleo-citoplasmatic înalt al limfocitelor imature. Majoritatea limfocitelor(80-85%) sunt imature, *dublu pozitive* (exprima nivele înalte ale moleculelor CD₄ si CD₈) si au un nivel scazut de molecule RCT. Ele stau în ochiurile unei retele de celule epiteliale si celule dendritice care exprima molecule CMH. Moleculele CMH au rol esential în selectia pozitiva a limfocitelor, adica maturarea lor în celule T mature. O mica proportie a limfocitelor sunt blaste.

Zona *medulara* este formata dintr-o retea densa de celule epiteliale mai mari, de forma ovoida, cu prelungiri citoplasmaticе scurte, bogate în organite secretoare. În ochiurile retelei se gaseste un amestec de limfocite cu un singur marker, CD₄⁺ sau CD₈⁺, dar exprima RCT α - β , cu o densitate net superioara. Raportul celulelor CD₄⁺/CD₈⁺ este 2/1. Limfocitele sunt situate printre *celulele prezentatoare de antigen* (celule dendritice, interdigitate si macrofage). Un numar mic (sub 1%) de limfocite timice exprima RCT γ - δ , diseminate în cortex si medula.

În zona medulara apar doua tipuri de structuri, derivate din celule epiteliale: *corpusculii Hassal* formati din celule epiteliale dispuse concentric, cu aspect general de degenerescenta si *cavitatile chistice*, captusite de celule epiteliale columnare prevazute cu microvili.

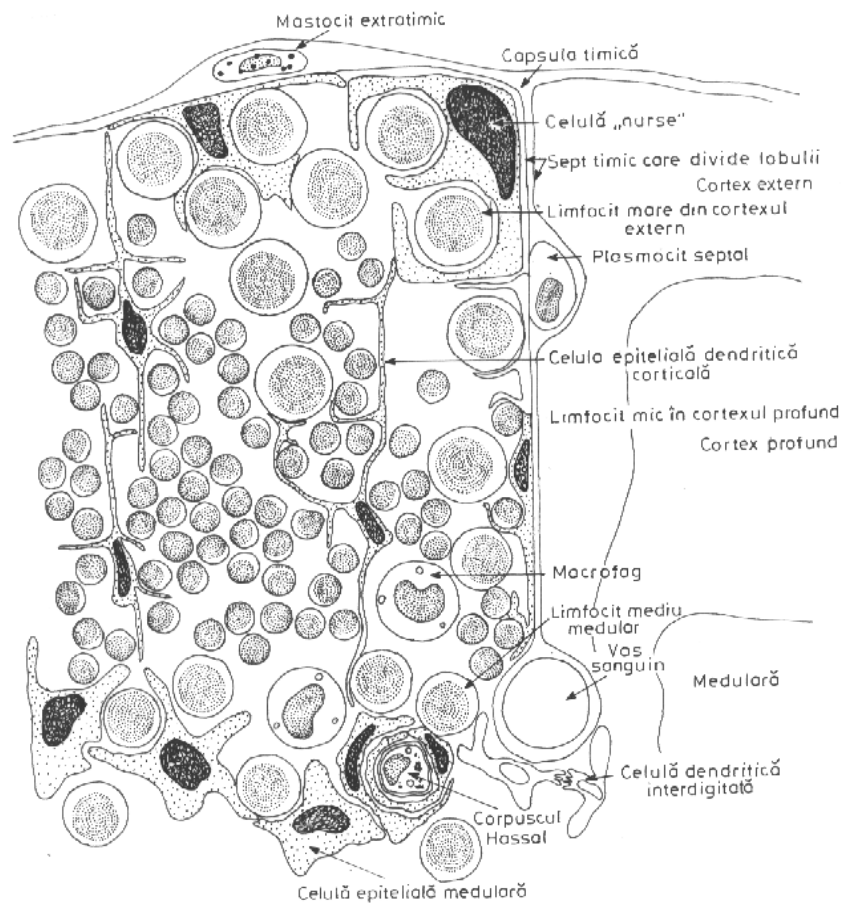


Fig. 37. Reprezentare schematică a *arhitecturii* generale a *timusului*. Subregiunile timusului sunt prezentate în dreapta figurii, iar constituenții lor celulari, în stânga (după Hood și colab., 1984).

Timusul este bogat înervat, cu fibre adrenergice și colinergice, iar neurotransmitorii oxitocina, vasopresina și neurofizina sunt sintetizați endogen de celulele perivasculare medulare și de celulele „nurse” (celulele 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 rata înalta;
- *jonctiunea cortico-medulara*, formata dintr-un cordon de macrofage "santinela", cu rolul unei site celulare;
- *regiunea medulara*, cu relativ putine limfocite, care poarta markerii de suprafata proprii limfocitelor mature.

Timusul evolueaza, atingând adeseori o dezvoltare maxima odata cu maturitatea sexuala, dupa care începe involutia, asociata cu sensibilitatea sa la hormonii steroizi. La soarece, involutia începe la 6 saptamâni. La om, involutia timica începe dupa pubertate, tesutul reducându-se cu circa 3% pe an, pâna la 35-40 de ani si cu 1% pe an dupa aceea. Dimensiunile nu se reduc, deoarece tesutul timic este înlocuit de tesut gras.

Atrofia glandei timice poate fi accelerata de *corticosteroizi*. Producerea unor cantitati crescute de corticosteroizi sau terapia cu corticosteroizi accelereaza atrofia timica. Fenomenul se numeste *involutie de stress*, pentru ca nivelul de corticosteroizi creste în starile de stress si în cele clinice. Steroizii au actiune citolitica asupra timocitelor corticale. Limfocitele medulare sunt relativ rezistente, datorita enzimei 20 α -hidroxil steroid-dehidrogenazei.

Maturarea limfocitelor T în timus

Dezvoltarea repertoriului limfocitelor T, este un proces complex de evenimente de selectie pozitiva si negativa, ce implica interactiunea moleculelor de suprafata si necesita influenta micromediului timic. Limfocitele T au raporturi spatiale strânse cu celulele stromale epiteliale. Acestea furnizeaza "semnale educationale" care orienteaza maturarea limfocitelor în doua directii:

- dobândirea RCT si a capacitatii de a recunoaste antigenele exogene;
- dobândirea tolerantei fata de self;
- eliminarea celulelor T self-reactive, precum si a celor care nu genereaza combinatia genica a unui receptor functional.

Celulele pre-T se diferentiaza în ficatul fetal si în maduva osoasa. Ele contin o enzima specifica - *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 dispăre 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 "învată" 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 jonctiunea 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 maduva 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.

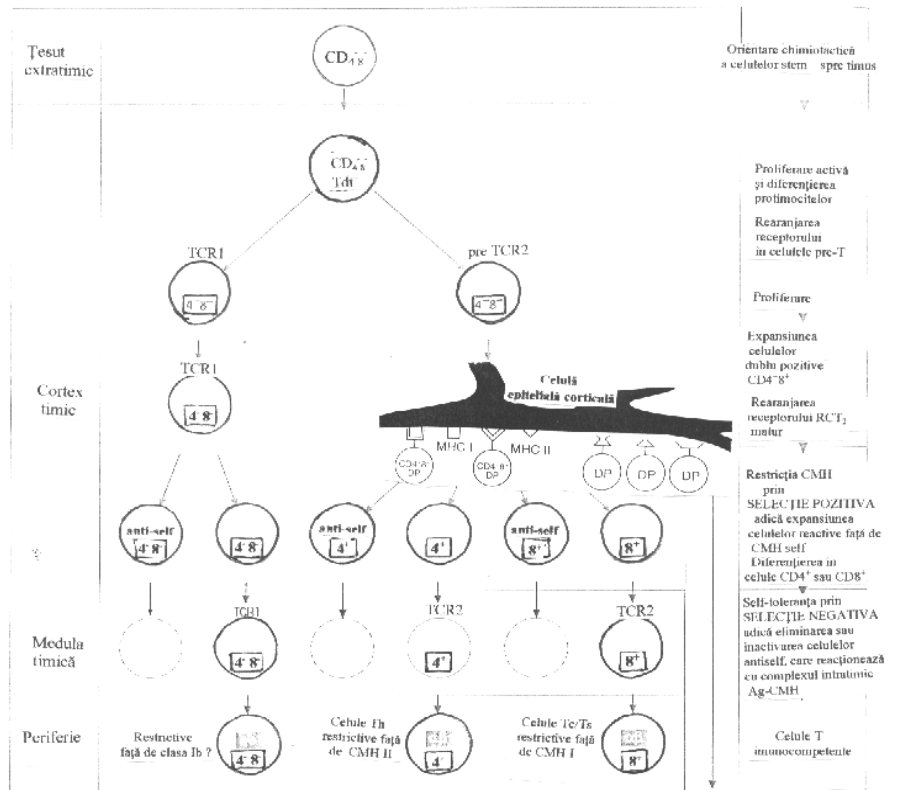


Fig. 38. Diferențierea celulelor T în timus. Celulele autoreactive cu specificitate pentru antigenele self neexprimate în timus, pot să devină tolerante prin contactul extratimic cu antigenele. TCR₁ = receptor γ, δ; pre-TCR₂ = receptor pre-T α, β; TCR₂ = receptor matur α, β; TdT = terminal deoxinucleotid transferaza (după Roitt, 1997, modificată).

Prin *selectie 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.

Selectia *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

înalta și joasă afinitate. De aceea, toleranța față de albumina nu va fi niciodată întreruptă și nu se cunosc maladii autoimune cu reactivitate limfocitară față de albumina. Alte molecule patrund 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 considera 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 stohastic.

Rezultatul final al diferențierii limfocitelor T în timus, constă în generarea receptorilor celulelor T, cu capacitatea de a tolera *self*, 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. Constanta 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, măduva 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 pasări.

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 pre-timocitelor 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 epitelului 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 epitelului 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 epitelului 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 soarecele 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 epitelului 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, soarecii-femele timectomizate la naștere, își recapătă competența imunitară în timpul sarcinii, sub influența hormonilor timici fetalii, 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 într-un totu 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 timectomie și reapăr după grefa de timus. Existența factorilor serici de origine timică argumentează în favoarea ipotezei că imunocompetența se dobândește atât în faza timică al limfocitelor, cât și la distanță, după ce limfocitele au parasit timusul.

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

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

Timozinele (evidentiate de Goldstein) din cea de 5-a fracție proteică de extract timic de vitel, reprezintă un grup de polipeptide cu greutatea moleculară cuprinsă între 1000 și 15 000 D, stabile la 80 °C. 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 timectomizate 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 vitel, 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 timopoetina, 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 vitel. 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 soarecelui nud, iar la animalele convenționale, dispare după timectomie, dar re apare după grefta 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 greutății timusului. Timulina are activitate biologică numai când este cuplata equimolar cu Zn. Echilibrul Zn este alterat la vârstnici.

Se pare că hormonii timici acționează asupra limfocitelor T, după ce acestea au parasitat 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 precursorilor ale liniei T și B, ceea ce explică păstrarea funcției imunitare după timectomizarea animalelor mature.

Organele limfoide secundare (periferice)

Sistemul limfatic, alcătuit din vasele limfatice, limfa și organele limfoide secundare, este parte integrantă a sistemului vascular sanguin al vertebratelor, 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 interstitial, care rezultă prin extravazarea continuă la nivelul capilarelor sanguine și de a-l readuce în sistemul vascular sanguin, menținând astfel constantă volumului plasmii 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. Invelisul muscular al vaselor limfatice manifestă contractii ritmice intrinsece, care generează o presiune de câțiva mm Hg, favorizând circulația limfei.

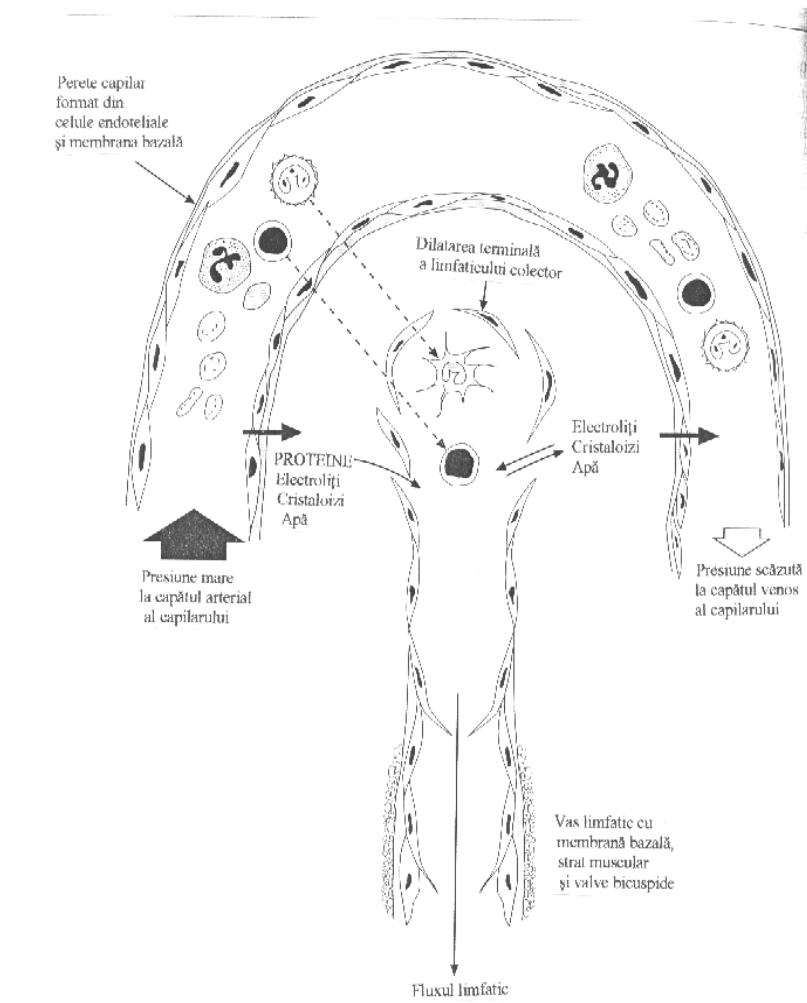


Fig. 39. Principiul formării limfei. Presiunea hidrostatică la capatul arterial al capilarului determină ieșirea fluidului proteic prin peretele capilar. La capatul venos, presiunea hidrostatică este mică și presiunea coloid-osmotică a proteinelor plasmatiche determină reîntrarea apei, electroliților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

Confluenta capilarelor limfatice formeaza vase mai mari, prevazute cu numeroase valve bicuspide ce împiedica curgerea gravitationala a limfei.

Limfa mamiferelor poate fi compartimentata în limfa *periferica*, *intermediara* si *centrala*.

Limfa periferica (cea care nu a trecut printr-un ganglion limfatic) are un continut scazut de celule albe (sub $1000/\text{mm}^3$), de dimensiuni mici, din care circa 85% sunt celule T si circa 10% sunt celule cu voal.

Limfa intermediara (din segmentul vascular în care se gasesc ganglionii limfatici) contine un numar mare de limfocite mici ($20\ 000/\text{mm}^3$), dintre care 75% sunt limfocite T care au extravazat la nivelul venulelor postcapilare din ganglioni.

Limfa centrala se gaseste 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 transporta limfa de la periferie spre marile vene de la baza gâtului, se gasesc *ganglionii limfatici*.

Sistemul limfoid este alcatuit din *limfocite*, ca element celular esential si din *organele limfoide primare si secundare*.

Organele limfoide secundare reprezinta suportul anatomic al raspunsului imun si sunt reprezentate de urmatoarele tipuri de structuri:

– ganglionii limfatici, splina, tesuturi limfoide organizate asociate cu suprafetele mucoase (tonsile, placi Peyer, tesutul limfoid asociat mucoasei gastrointestinale(GALT), respiratorii (BALT);

– altele sunt formatiuni limfoide difuze, reprezentate de aglomerari de diferite categorii de celule în care predomina limfocitele, asociate cu tractul gastrointestinal, respirator si urogenital.

Tesuturile limfoide au localizari strategice, la portile de intrare a antigenelor în organism: tegumentul sau mucoasele. Aici se gasesc aglomerari de limfocite si celule care transporta si prezinta antigenele. Ele interactioneaza functional, pentru a capta si neutraliza materialele nonself.

Organele limfoide secundare au urmatoarele particularitati functionale:

– sunt populate tardiv cu limfocite care si-au dobândit competenta functionala în organele limfoide primare;

– la nivelul lor, limfopoeza este diminuata sau inexistentă;

– la nivelul capilarelor care le iriga, limfocitele parasesc fluxul sanguin;

– extirparea lor totala este imposibila, datorita caracterului difuz;

distincte: *aria celulelor T* contine un numar mic de limfocite B, dar are un numar mare de celule dendritice, cu rolul de a prezenta antigenele pentru activarea limfocitelor T si B; *aria celulelor B* contine în principal *foliculi primari*, ce reprezinta situsurile în care limfocitele B activate, prolifereaza si formeaza *centrii germinali*, înainte de a se diferentia în celule producatoare de anticorpi si celule de memorie;

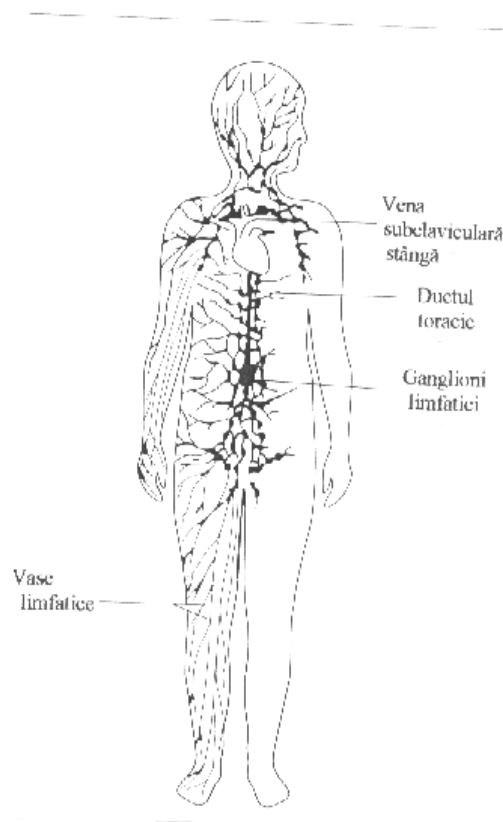


Fig. 40. Reteaua ganglionilor limfatici.

Aglomerarea celulelor cu functie imuna în tesuturi limfoide secundare maresc eficienta reactivitatii imunitare prin distributia limfocitelor T si B în arii ce favorizeaza interactiunea lor cu celulele care prezinta antigenul si prin caracterul de retea, care permite circulatia limfocitelor în ariile în care antigenele sunt concentrate.

Ganglionii limfatici

Ganglionii limfatici sunt organe limfoide secundare, situate în grupuri pe traseul vaselor limfatice care drenează ariile superficiale ale pielii sau viscerele, cu dimensiuni de la câțiva mm până la 1 cm. Suprafața lor este acoperită cu o *capsula 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 vascularizare 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 zonală. Se disting zona *corticală* și cea *medulară*.

Zona corticală este divizată în două subzone:

- *corticală externă* foarte bogată în limfocite B;
- *corticală profundă* (paracorticală), populată de limfocite T (la soarelele nuda – atimic- corticală 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-dependenta, limfocitele T în repaus si activate fiind majoritare. Intern fata de paracortex sunt *cordoanele medulare*, populate cu macrofage si plasmocite, care duc spre *sinsul medular*. Unitatea functionala a paracortexului este *cordorul paracortical*, care se întinde de la baza foliculului, pâna la cordonul medular subiacent. Cordonul paracortical are un diametru de 100-1000 µm si este spatiul în care celulele dendritice prezinta antigenul, rarelor clone de limfocite T specifice si favorizeaza activarea lor.

Zona *medulara* contine tesut limfoid dens, sub forma unor *cordoane* asezate printre sinusurile medulare. In cordoane predomina limfocitele B producatoare de anticorpi (plasmablaste si plasmocite mature), asociate cu macrofage, celule T. Sinusurile limfatice sunt captusite cu celule, a caror suprafata apicala prezinta denivelari care încetinesc percolarea limfei prin ganglion.

Antigenele care au penetrat barierele protectoare de suprafata ajung în ganglionii limfatici prin vasele limfatice aferente. Macrofagele care captusesc sinusurile limfatice, preiau antigenele si le transfera zonelor T-dependenta si T-independenta, unde sunt recunoscute de limfocitele care au receptori specifici. Stimularea limfocitelor din foliculii primari, de catre antigenele T-independente, induce dezvoltarea *foliculilor secundari*, cu formarea centrilor germinali în care se gasesc si sunt retinute limfocitele B de memorie. Celulele B activate de antigen, migreaza în cordoanele medulare si se diferentiaza în plasmocite producatoare de anticorpi. Anticorpulii parasesc ganglionul limfatic prin vasul limfatic eferent.

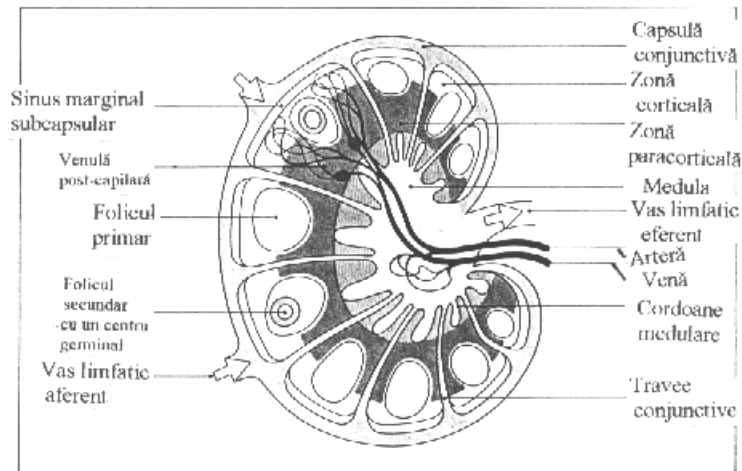


Fig. 41. Structura unui ganglion limfatic. Sub capsula conjunctivă se găsește sinusul subcapsular, tapetat cu celule fagocitare. Limfocitele și antigenele patrund în ganglion prin vase limfatice aferente. Cortexul conține aglomerări de limfocite B (*foliculi limfoizi*). Majoritatea foliculilor posedă un focar de celule proliferante, denumit *centru germinativ*. Zona paracorticală conține, în esență, limfocite T, majoritatea fiind în contact cu *celulele 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 parasces 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* patrunde 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 parasces circulația sanguină prin celulele endoteliale și se distribuie în zonele caracteristice: limfocitele B – în cortexul extern, iar limfocitele T – 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 parasces ganglionul prin vasele limfatice eferente.

Circulația lentă a sângelui în vasele din ganglionul limfatic, permite

unui numar mare de limfocite sa treaca din sânge în limfa, unde pot întâlni antigenul corespunzator. Se maresta astfel sansa ca un numar mic de limfocite imunocompetente sa întâlneasca antigenul specific si sa reactioneze proliferativ.

Organizarea ganglionului limfatic trebuie sa favorizeze interactiunile dintre antigene si limfocite. Ganglionii contin numeroase celule capabile sa prelucreze si sa prezinte antigenele: macrofage, celule dendritice, celule interdigitate si celule cu voal. In ganglioni, populatia celulara se reînnoieste continuu, prin traficul celulelor limfoide si al celulelor accesorii

Funcțiile ganglionului limfatic sunt urmatoarele:

- filtrarea limfei si epurarea componentelor nonsel (celule bacteriene, toxine etc.) de catre fagocitele ganglionare;
- este suportul material al proliferarii limfocitelor si al sintezei anticorpilor, dupa stimularea antigenica. Limfa eferenta este filtrata si îmbogătită în anticorpi si în limfocite.

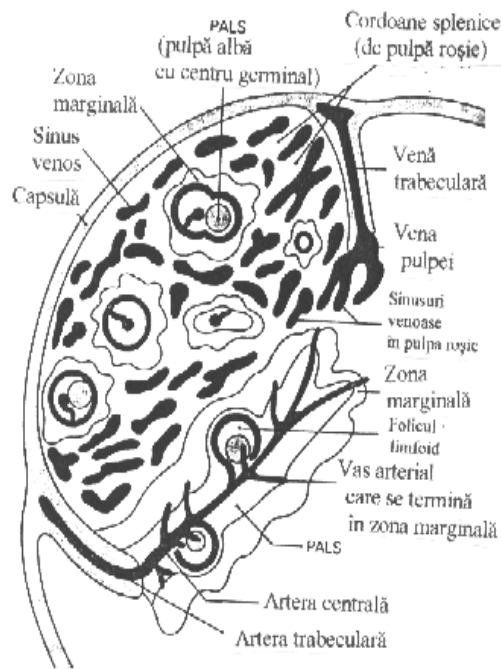


Fig. 42. Structura splinei. Splina este alcătuită din pulpa roșie și pulpa albă. Pulpa roșie înconjură ariile pulpei albe. Pulpa albă conține foliculi primari și centrii germinativi, ca și în ganglionul limfatic.

Dupa stimularea antigenica inductoare a raspunsului imun mediat humoral, în subzona corticala externa (a celulelor B) se produc ample modificari citologice, iar dupa administrarea unui antigen timodependent, modificarile citologice apar si în subzona corticala profunda (a celulelor T).

Splina

Splina este cel mai mare organ limfoid, cu rol important în functia imunitara. Splina este acoperita de o capsula conjunctiva, cu putine fibre musculare si incapabila de contractii ample, de la care porneste o retea de trabecule conjunctive, ce împart tesutul splenic în com-partimente comunicante. În fiecare compartiment se gasesc *pulpa alba* si *pulpa rosie*, sprijinita pe tesutul conjunctiv reticular .

În trabeculele conjunctive se gasesc arterele trabeculare (ramificatii ale arterei splenice). Când ating diametrul de circa 200 μm , arterele parasesc trabeculele conjunctive si patrund în parenchimul splenic. Ele dau ramificatii laterale (arteriole), fiecare arteriola fiind acoperita de un *manson* dens de tesut limfoid. In jurul arteriolei se gasesc limfocite, distribuite într-o stroma conjunctiva, ce formeaza *teci limfoide periarteriolare* (PALS = periarteriolar lymphoid sheats) sau *mansoane coaxiale de limfocite*, în jurul arteriolelor. Arteriola are o pozitie centrala în *mansonul limfoid*.

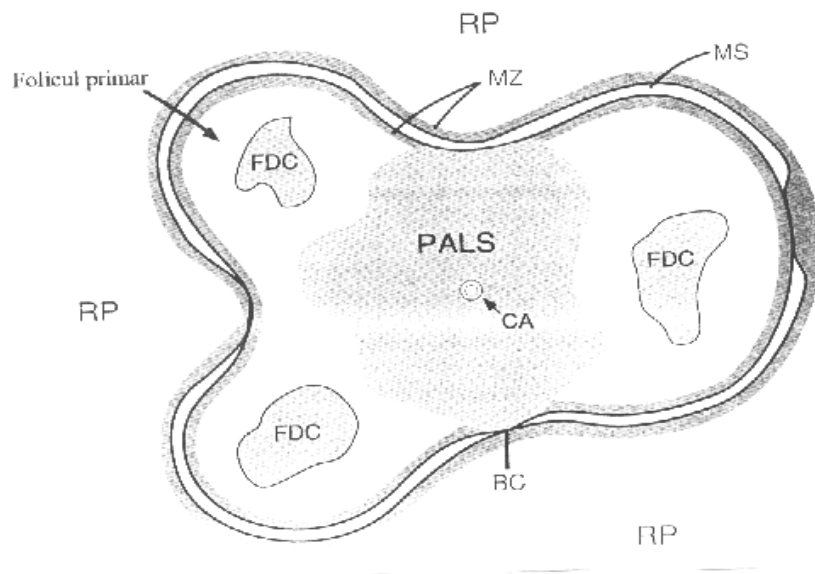


Fig. 43. Structura pulpei albe a splinei. Pulpa alba este împartita într-o zona centrala bogata în celule T – teaca limfoida periarteriolara (PALS) – înconjurata de foliculi primari care contin celule B. In fiecare folicul primar se gaseste o aglomerare de celule foliculare dendritice (FDC). Pulpa alba este separata de pulpa rosie (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 ca au rol important în reglarea traficului în spatiile pulpei rosii si albe. Canalele colapsate (CC) par a fi ariile prin care limfocitele intra si ies din pulpa alba.

CA = arteriola centrala.

Totalitatea tecilor periarteriolare (mansoane limfoide coaxiale) formeaza *pulpa alba a splinei*. Mansoanele au o zona interna, bogata în limfocite T si o zona externa bogata în limfocite B, grupate în aglomerari denumite *foliculi*. Limfocitele pulpei albe se vad pe sectiunea tesutului ca zone alb-cenusii, înconjurata de pulpa rosie.

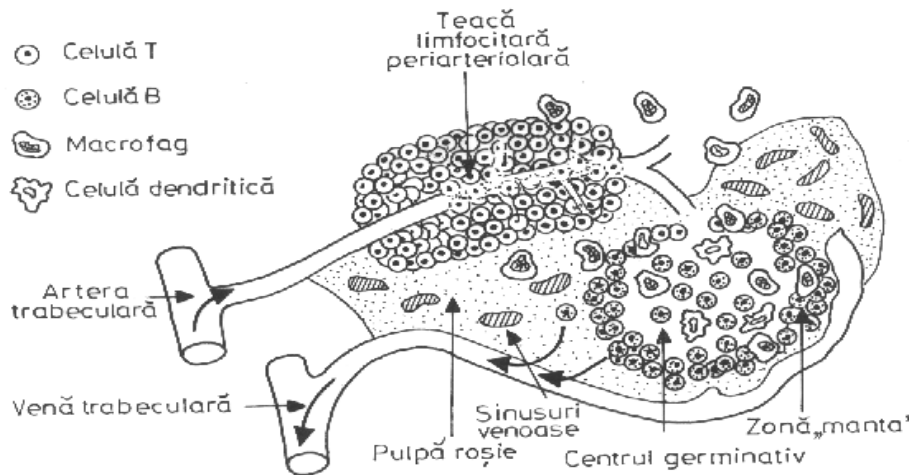


Fig. 44. Topografia regiunilor timo-dependente (TD) și timo-independente (TI) în splină. Teaca limfocitară periarteriolară constituie regiunea TD, în timp ce foliculii limfoizi și țesutul limfoid adiacent reprezintă zona TI.

Unele arteriole, după ieșirea din mansonul limfoid (pulpă albă) dau numeroase ramificații „în perie”, denumite *arteriole penicilate*, care patrund în *pulpă roșie*.

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

Cordoanele Bilioth 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 Bilioth comunică cu sistemul venos al splinei.

Splina este un filtru al sângelui, legat pe o derivație a marii circulații.

La nivelul cordoanelor Bilioth, circulația are caracter „deschis”, deoarece sângele vine în contact direct cu celulele splenice. În ochiurile cordoanelor Bilioth se găsesc *sinusurile*. Ele sunt capilare cu diametrul

fagocita antigenele particulare. In sinusuri se deschide o parte din arteriolele penicilate (circulatie închisa).

Macrofagele din peretele sinusurilor si din cordoanele de tesut splenic retin si capteaza hematiile îmbatrânite si plachetele. Macrofagele exprima receptori pentru Fc al IgG, astfel ca elementele figurate tapetate cu IgG (autoanticorpi) sunt fagocitate. Prin îmbatrânire, eritrocitele își pierd *acidul sialic* de pe suprafata, expunând manoză si galactoză, care sunt recunoscute de celulele splenice.

Alte arteriole, dupa iesirea din mansonul limfoid se termina în *sinusul zonei marginale*, care se deschide într-un sinus venos al pulpei rosii. Zona marginala consta dintr-o retea fina de fibre reticulare, în ochiurile careia se gasesc limfocite B. Sinusul marginal este adiacent foliculilor limfatici si consta din spatii vasculare aplatizate, ce se continua cu sinusurile pulpei rosii. Peretele sau este foarte permeabil si permite trecerea limfocitelor din sânge în pulpa alba (în teaca periarteriolara). Sinusul zonei marginale formeaza granita dintre pulpa alba si pulpa rosie si reprezinta *zona de schimb celular* dintre cele doua compartimente. Din pulpa alba, limfocitele trec în sinusurile marginale, apoi în sinusurile pulpei rosii si de aici în sistemul venos al splinei.

În pulpa alba se gasesc *foliculii limfoizi primari*. Ei sunt localizati la periferia tecii limfoide periarteriolare sau în imediata ei vecinatate. In mansoanele limfoide periarteriolare, limfocitele au o distributie selectiva: celulele T segrega predominant în tecile periarteriolare, iar celulele B, în foliculii limfoizi.

Antigenele din sânge sunt preluate de macrofagele zonei marginale si ajung în pulpa alba. Sinteza anticorpilor fata de antigenele circulante este una din functiile majore ale splinei. Celulele B activate în pulpa alba, migreaza în pulpa rosie, unde se gaseste majoritatea plasmocitelor. In zona marginala se gaseste majoritatea celulelor NK.

Splina nu are circulatie limfatica. La nivelul splinei, limfocitele ies din sânge prin peretele capilarelor zonei marginale, care este foarte permeabil si se distribuie în pulpa alba, iar de aici strabat drumul invers si ajung în pulpa rosie, în sinusurile venoase. Acestea comunica atât cu capilarele zonei marginale, cât si cu sistemul venos al splinei.

Limfocitele parasesc splina prin vena splenica.

Sistemul imunitar al mucoaselor

Mucoasele (digestiva, respiratorie, genituala, urinara), din punctul de vedere al contactului cu antigenele, constituie structurile cele mai vulnerabile ale organismului uman si animal. In special la nivelul intestinului, contactul permanent cu microorganismele creeaza conditiile patrunderii acestora în mediul intern. Mucoasele reprezinta nu numai o entitate anatomica, ci si una functionala imunologic. Particularitatile lor

structurale si functionale tind sa le delimiteze tot mai mult de aparatul imunitar sistemic.

Sistemul imunitar al mucoaselor, la mamifere, este o retea integrata de tesuturi, formate din celule specifice, celule limfoide si molecule cu functie imunitara, protectoare fata de infectiile pe calea membranelor mucoase. La nivelul structurilor de contact cu antigenele, sistemul imunitar al mucoaselor este divizat anatomic si functional: structurile BALT(*bronchus associated lymphoid tissue*) si GALT(*gut associated lymphoid tissue*). La rozatoare, structurile BALT sunt bine dezvoltate, având rolul de a raspunde la antigenele inhalate. La om, structurile BALT propriu-zise nu se dezvolta, iar tesuturile limfoide majore echivalente sunt *tonsilele palatine* si formatiunile *adenoide* (tonsilele nazofaringiene). Impreuna, ele formeaza o bariera fizica de tesuturi limfoide, care constituie *inelul Waldeyer*. Tonsilele si adenoidale 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 anatomic distincte: foliculi limfoizi, placile Peyer, amigdalele.

Amigdalele (tonsilele palatine) sunt asezate în unghiurile mandibulare. Dimensiunile unei amigdale masoara 2,5 cm lungime, 1,5 cm latime si 1 cm grosime. Tonsilele si adenoidale sunt singurele structuri limfoide asociate tractului digestiv, acoperite de o capsula care adera intim de tesutul limfoid subiacent. Pe fata interna (care priveste spre vestibulul faringian) se gasesc deschiderile *criptelor tonsilare*. Criptele patrund adânc în masa limfoida a tonsilei, usurând contactul celulelor reactive (macrofage si limfocite), cu antigenele care patrund pe calea digestiva si respiratorie. Circa 50% dintre celulele tonsilare sunt limfocite B, constituite în foliculi care contin centrii germinali. Majoritatea limfocitelor B au ca receptor de antigen IgG, iar restul sunt IgM⁺ si IgA⁺. Circa 40% din celulele tonsilare sunt limfocite T.

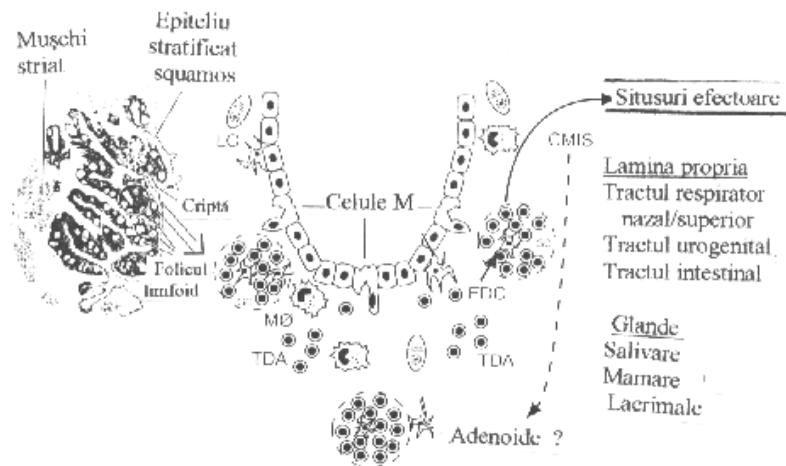


Fig. 45. Rolul potential al NALT pentru dezvoltarea *imunitatii mucoaselor*. Tonsila palatina prezinta cripte adanci. Schema ilustreaza categoriile majore de celule prezentatoare de antigen, (LC = celule Langerhans, Mf = macrofage; FDC = celule foliculare dendritice), centrul germinativ al celulelor B si ariile parafoliculare cu celule T (TDA). Limfocitele efectoare si cele de memorie recircula pe calea sistemului imunitar comun al mucoaselor (dupa McGhee, 1998).

Apendicele este o structura limfoida asociata intestinului, prezenta numai la iepure, maimute antropoide si la om. Prezinta structuri limfoide cu organizare similara placilor Peyer, cu un dom bine definit, aglomerari de celule B organizate in foliculi si arii interfoliculare bogate in celule T. Epiteliul domului este permeabil, permitand trecerea libera a antigenelor solubile si a celor particulare, ca si a bacteriilor.

Foliculii limfoizi sunt structuri asociate, caracteristice mucoasei intestinale, care se gasesc fie ca *foliculi solitari* de 0,5-2,0 mm, foarte numerosi in partea terminala a ileonului, fie ca *foliculi agregati* ce formeaza *placile Peyer*. Foliculii (solitari sau agregati) sunt localizati in corionul mucoasei, dar patrund si in submucoasa.

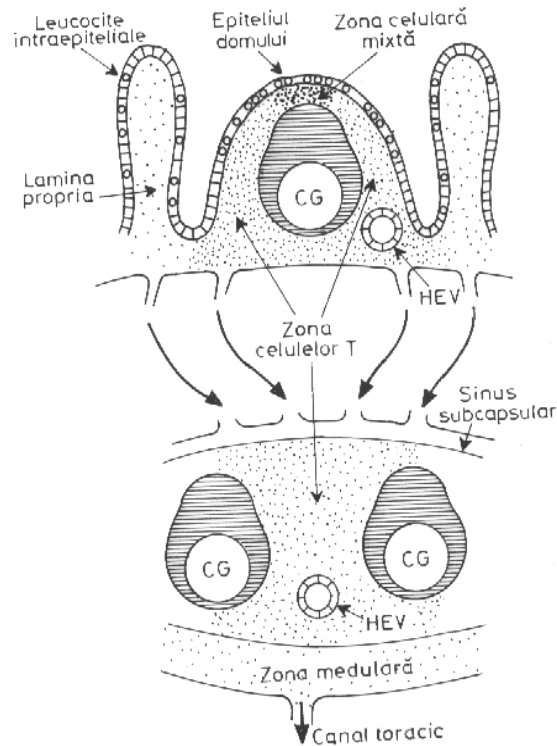


Fig. 46. Structura schematică a unei plăci Peyer și a unui ganglion mezenteric. HEV = venule cu endoteliu înalt; CG = centru germinativ.

O placă Peyer conține 20-30 de foliculi agregați. Are forma 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 0,8-1 cm. Placile Peyer ocupă marginea liberă a intestinului (niciodată marginea mezenterică). Ele se formează în cursul dezvoltării fetale, ating numărul 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 prezinta putine celule mucoase si putini microvili, dar exista în schimb, o categorie de celule specializate functional, denumite *celule M* (membraneous), atasate de enterocite prin complexe jonctionale. Prezenta vimentinei si cheratinei în celulele M este dovada originii lor epiteliale. La nivel microscopic, celulele M se recunosc prin asocierea lor strânsa cu limfocitele intraepiteliale. Ele au pliuri membranare mari, bazolaterale, în care stau limfocitele intraepiteliale. Celulele M formeaza o “umbrela” deasupra unui spatiu în care se gasesc limfocite intraepiteliale, macrofage, celule dendritice.

Celulele M au rolul de a pinocita antigenele solubile din lumenul intestinal, dar preiau si antigene particulare (virusuri, bacterii, protozoare). Inglobarea antigenului nu este urmata de degradare lizosomală, ci antigenul intact este transportat în vezicule spre membrana laterobazala. Prin fuziune, antigenul este eliberat în spatiul laterobazal, unde este transferat celulelor subjacente, unele specializate în prelucrarea si prezentarea antigenelor, fenomen denumit *translocatie*. Antigenele sunt prelucrate în celulele dendritice si în macrofagele subepiteliale si sunt prezentate limfocitelor locale sau sunt transferate celulelor interdigitate si prezentate celulelor T interfoliculare. Celulele interdigitate care prezinta antigenul, deriva din celulele dendritice care au înglobat antigenul.

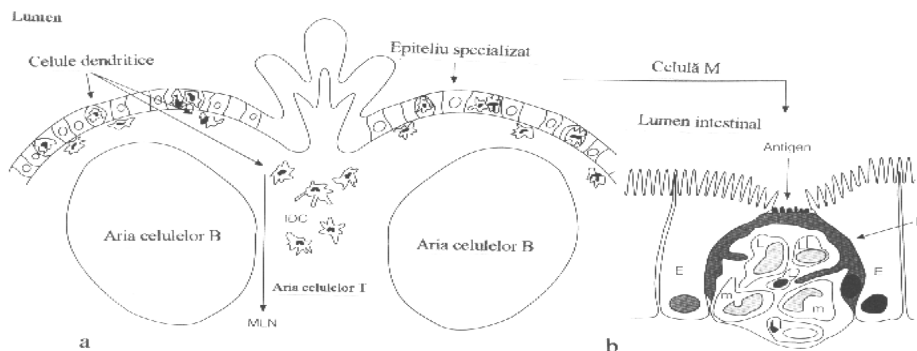


Fig. 47. a. O placa Peyer. **b.** Reprezentarea schematica a mecanismului functional al placii Peyer. Detaliu al celulei M. Dupa înglobarea si transportul de catre celula M, antigenul este prelucrat de macrofage sau de celulele dendritice, care se transforma în celule interdigitate (IDC) si apoi este prezentat limfocitelor în ariile celulelor T ale placii Peyer si ale ganglionilor limfatici mezenterici (MLN). E = enterocit; L= limfocit; m= macrofag/celula dendritica (dupa Sminia, 1998).

O placa Peyer are 3 regiuni structurale: domul, foliculii cu centrul germinali (zona celulelor B) și aria parafoliculară (populată de celulele T, în special celule Th). Placile Peyer sunt populate inițial de limfocite T. Dezvoltarea centrilor germinali (ai limfocitelor B) este dependentă de antigenele microbiotei intestinale, pentru că la animalele germ-free, placile Peyer sunt slab dezvoltate și lipsesc centrul germinali. La organismele timectomizate neonatal și la cele congenital atimice, ariile interfoliculare sunt sărace în limfocite T. Pentru completă dezvoltare a placilor Peyer, sunt necesare atât influențele stimulatoare 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 interstitial 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 proprie și în stratul epitelial al mucoasei, printre enterocite. Este o populație heterogenă de limfocite: cele din lamina proprie 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 (placile Peyer) sunt neangajate. Ele au rolul de a iniția răspunsul imun, după interacțiunea cu antigenele care traversează celulele M. Limfocitele difuze din lamina proprie sunt în mare parte activate, având funcția de a produce IgA.

Funcțiile MALT. Sistemul imunitar al mucoaselor are o

functionalitate precisa: sa excluda antigenele exogene, înainte ca ele sa patrunda în mediul intern si sa evite sau sa minimalizeze expunerea aparatului imunitar sistemic, la antigenele moleculare sau celulare care tind sa patrunda în mediul intern. In acelasi timp, tesutul limfoid asociat mucoaselor trebuie sa ramâna insensibil la microbiota normala a mucoaselor. MALT are calitatea de "zona de control" a organismului, la contactul cu antigenele, dar are si rol reglator asupra functionalitatii aparatului imunitar sistemic. Asa se explica faptul ca administrarea orala a unui antigen la om sau animale, în esenta, nu produce un raspuns imun sistemic, ci de obicei, un raspuns imun al mucoasei. Mecanismul nu este cunoscut, dar sistemul imunitar al mucoaselor împiedica raspunsul imun amplu al aparatului imunitar sistemic, la un numar foarte mare de antigene intestinale, în special de origine alimentara. Antigenele complexe bacteriene sau virale pot initia un raspuns imun complex, prin intermediul aparatului imunitar al mucoaselor. Deficientele functionale ale MALT expun organismul si aparatul imunitar sistemic, unei permanente stari de activare, care depaseste limitele fiziologice, consecinta fiind instalarea maladiilor autoimune.

Prin epiteliul folicular, microorganismele dobândesc acces la structurile limfoide ale foliculului. Consecinta este benefica, deoarece, astfel se initiaza raspunsul imun protector fata de microorganismele luminala. Din acest punct de vedere, celulele M formeaza un sistem de avertizare timpurie. Patrunderea microorganismelor la nivelul epiteliului folicular are si consecinte nefavorabile, deoarece acesta poate fi o cale de acces a microorganismelor patogene (*S.typhi*), la structurile submucoase.

Limfocitele B din foliculii limfoizi ai placilor Peyer se gasesc într-o stare de proliferare activa. Totusi, numarul plasmocitelor este mic, ceea ce reflecta posibilitatea ca limfocitele B din structurile GALT, sa migreze în alte mucoase, înainte de a se diferentia în plasmocite.

Tabel comparativ privind principalele caracteristici ale organelor limfoide primare si secundare

Caracteristici	Organe limfoide primare	Organe limfoide secundare
Originea	La zona de trecere între ectoderm si endoderm. Contin celule derivate din ectoderm din mezoderm (limfocite).	In mezoderm
M o m e n t u l dezvoltarii sau dupa nastere	Foarte timpuriu în viata embrionara	Tardiva în cursul vietii fetale
Rolul	Sunt populate timpuriu cu celule precursora ale limfocitelor si au	Sunt populate tardiv numai de limfocite

	rol în dobândirea competenței imunitare a acestora.	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 imunității diminuează, dar totdeauna rămân celulele 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.

Recircularea limfocitelor

Fig. 48. Reprezentarea schematică a *circuitului global al limfocitelor*. (1) Limfoblastele din maduva oaselor ajung pe cale sanguină în splină și timus. După maturare, limfocitele sunt eliberate în sânge. (2) Limfocitele mature intra în splină și o parascesc. (3) Limfocitele mature pot intra în structurile MALT și în tesuturile periferice. (4) Limfocitele parascesc MALT și tesutul periferic pe calea limfatică. (5) Limfocitele intra în ganglionul limfatic, trecând prin celulele specializate care captusec venulele postcapilare. (6) Limfocitele parascesc ganglionul limfatic pe cale limfatică și reintra în sânge prin ductul toracic.

Organele limfoide *primare* (maduva oaselor, timusul, bursa lui Fabricius) au rolul de a produce limfocite mature neangajate (“virgine”). După ce parascesc 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.

Tesuturile nelimfoide ale *compartimentului terțiar* sunt reprezentate de restul tesuturilor organismului. În mod obișnuit, ele contin puține celule limfoide, dar în focarele de inflamație se acumulează populații limfocitare numeroase, în special limfocite de

memorie.

Tesutul 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: *parasesc* 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-tesuturi 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 patruns 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 tesuturi limfoide a fost denumită *ecotaxis* sau *homing*.

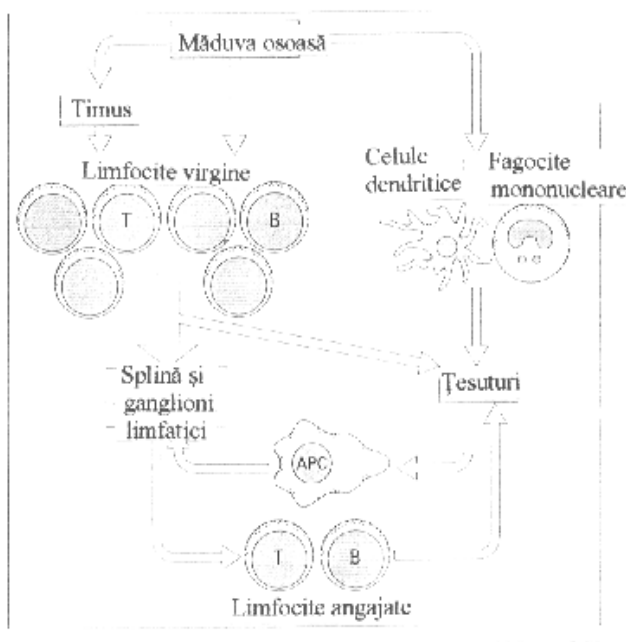


Fig. 49. Recircularea limfocitelor și a celulelor prezentatoare de antigen. Limfocitele neangajate parasesc timusul și migrează în organele limfoide secundare (splina, ganglioni limfatici). Celulele prezentatoare de antigen (celulele dendritice și fagocitele

mononucleare), după ce părăsesc maduva, trec în sânge, apoi intra în tesuturi, înglobează antigenul și îl transporta în tesuturile limfoide pentru a fi prezentat celulelor T și B. Limfocitele activate migrează din tesuturile 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 tesuturilor în raport cu prezenta antigenelor.

Soluția naturală pentru această funcție a fost *compartimentarea* sistemului limfoid în organe individualizate și tesuturi 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 patrund la nivelul mucoaselor (digestivă, respiratorie, genito-urinară) ajung la structurile limfoide MALT (GALT și BALT).

Limfocitele care recunosc antigenul la nivelul tesuturilor limfoide secundare, se activează și inițiază răspunsul imun, iar cele care nu au întâlnit antigenul specific, trec prin tesuturile 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 proporție mică din totalul limfocitelor.

Din totalul limfocitelor, numai o proporție foarte mică, (2%) recircula în unitatea de timp, pe traseul sânge – ganglioni limfatici – limfa – canal toracic – sânge, iar restul rămân în organele limfoide secundare.

Limfocitele cu cea mai înaltă rată a recirculării sunt celulele T de memorie. Limfocitele T și B neangajate (naive), recircula 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 *retinute 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 raspunsului imun si *celule de memorie*. Aceste categorii au proprietati de migrare (homing) net diferite fata de limfocitele neangajate.

Limfocitele efectoare si cele de memorie dobândesc capacitatea de a migra în compartimentul tertiar (adica în organele nelimfoide). Pe de alta parte, ele manifesta o selectivitate pronuntata a compartimentului de homing, adica dupa activare, recircula preferential în formatiuni limfoide de aceiasi categorie cu cele care au fost activate la contactul primar cu antigenul.

Limfocitele T γ/δ recircula preferential în tesuturile epiteliale neinflamate.

Importanta fenomenului de homing. Fenomenul de homing este foarte important în procesul genezei embrionare a organelor limfoide primare, deoarece asigura migrarea în timus, respectiv în bursa lui Fabricius si echivalentii ei, a precursorilor limfocitelor T si B (pre-T si pre-B). Procesul recircularii permite ca limfocitele mature neangajate sa dobândeasca acces la structurile care concentreaza antigenele ce au patruns pe cale tegumentara sau pe calea mucoaselor si sa întâlneasca epitopul specific. Limfocitele T activate, prolifereaza si se diferentiaza. Atât cele activate, cât si cele de memorie manifesta *selectivitate de organ*, adica recircula în acelasi tip de organ limfoid secundar. Migrarea cu specificitate de organ, a celulelor T de memorie, mareste eficienta raspunsului imun, deoarece reîntâlnesc antigene asemanatoare celor care le-au indus activarea primara. Mecanismul migrarii selective este putin înteles. Probabil implica mecanisme de trafic selectiv, controlat de molecule membranare. La organismul adult, limfocitele recoltate din ductul toracic migreaza preferential în MALT, iar cele din ganglionii limfatici se reîntorc în ganglioni, în ariile timo-dependente. Limfocitele T si B recoltate din splina, dupa transferul în organismul receptor, se distribuie în compartimentele T si B ale organelor limfoide secundare. Majoritatea limfocitelor din maduva osoasa, migreaza în ariile timo-independente.

Ariile *timo-independente* (populate de limfocite B) ale organelor limfoide secundare sunt: *foliculii cortexului extern din ganglionii limfatici, foliculii din placile Peyer si foliculii zonei periferice din pulpa alba a splinei*.

Ariile *timo-dependente* (populate de limfocite T) sunt: *cortexul profund al ganglionilor (paracortex), mansorul limfoid periarteriolear al pulpei albe a splinei si zonele interfoliculare ale placilor Peyer*.

Bazele moleculare ale fenomenului de homing

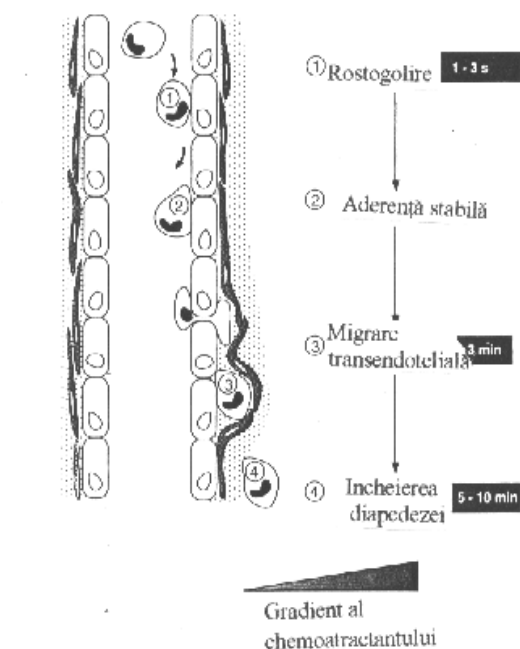


Fig. 50. Secvența de evenimente ce reglează migrarea limfocitelor din sânge prin peretii venulelor cu endoteliu înalt (HEV), în organele limfoide. Mișcarea de rostogolire a limfocitelor pe suprafața celulelor endoteliale este convertită repede în aderență stabilă dependentă de integrine, în 1-3 s. Migrarea transendotelială a limfocitului aderent este reglată de un "stimul de migrare" exprimat de celulele endoteliale înalte. Bazele moleculare ale stadiului final al migrării prin membrana bazală nu se cunosc, dar probabil este reglată de chimioatractanții 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 endoteliu, trecerea lor în spațiul extravascular necesită aderență 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 aderență strânsă de celulele endoteliale, urmată de migrarea transendotelială.

Fenomenul migrării preferențiale a limfocitelor din sânge, în țesuturile limfoide specifice (homing), este explicat prin existența

moleculilor 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 migrației 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 placile Peyer, iar limfocitele T aderă preferențial de HEV din ganglionii limfatici.

După legarea specifică a receptorilor limfocitari de antireceptori 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 circula în ductul toracic și au tendința de a se reîntoarce în aceleași structuri limfoide.

Limfocitele recircula în sânge și reintra în tesutul 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 descarcate în sânge, extravazează rapid în lamina proprie 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 recircula spre alte situsuri mucoase (plămân, glande mamare, tractul urogenital) s-a propus conceptul de "sistem imunitar comun al mucoaselor". Chiar dacă proporția limfocitelor care recircula 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 placile 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 placile Peyer, practic nu există celule producătoare de anticorpi. Acest fapt denotă că placile Peyer sunt structuri limfoide specializate în medierea contactului dintre limfocite și antigenele tractului digestiv, dar celulele B după stimulare migrează din placile Peyer înainte de a se diferenția în plasmocite. Blastele rezultate din celulele B stimulate, părăsesc placile Peyer pe cale limfatică și ajung în ganglionii limfatici mezenterici. De aici, blastele migrează selectiv în mucoasa digestivă și respiratorie și constituie tesutul 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

restrictiva, în sensul ca 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*: epitelii tegumentară și mucoasele tractului gastrointestinal, urogenital și respirator. Aceste structuri se caracterizează prin prezența a două componente limfoide distincte. Prima, evidențiată la soarece, populează epitelii 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.

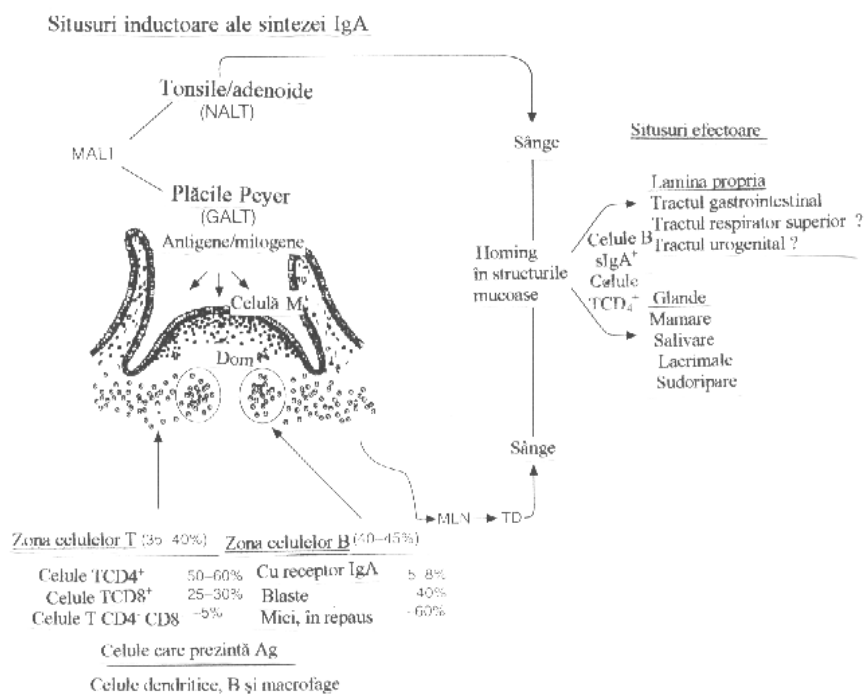


Fig. 51. Rolul MALT în *inducerea sintezei IgA* în mucoase. Inglobarea antigenului de către celulele M, declanșează răspunsul imun local. Limfocitele B IgA⁺ și Th CD4⁺, pe calea limfaticilor eferente, migrează în ganglionii limfatici mezenterici și apoi în ductul toracic, pentru a ajunge în sânge. Aceste 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 epiteliiilor, 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*

aparare. 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 expusi 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^+ , β^- sau sunt negative pentru ambii coreceptori (CD4 $^-$ CD8 α^- , β^-). Se pare că epiteliale favorizează dezvoltarea extratimică a IEL, care vin direct din măduva osoasă.

Limfocitele asociate epitelialelor recircula 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 țesuturale. Dacă este detectată prezența antigenelor nonself (virale, tumorale sau induse chimic), limfocitele T inițiază răspunsul imun citotoxic.

Capitolul 4

ANTIGENELE COMPLEXULUI MAJOR DE HISTOCOMPATIBILITATE (C M H)

Existenta antigenelor de histocompatibilitate a fost dedusa din faptul ca alogrefele tegumentare sau de organe, nu sunt viabile în organismul receptor. Dupa 7-10 zile, tesutul transplantat se inflameaza si curând dupa aceea, grefa este respinsa.

Respingerea grefei este de natura imunitara: sistemul imunitar al receptorului de grefa recunoaste ca nonself, anumite molecule ale celulelor grefei si se activeaza. Moleculele de suprafata ale celulelor grefate, recunoscute ca nonself, sunt denumite *antigene de histocompatibilitate*. Ele confera individualitate biochimica fiecarui individ.

Antigenele de histocompatibilitate se definesc ca molecule ale suprafetei celulare si care, datorita diferentelor biochimice individuale sunt recunoscute de sistemul imunitar al unui organism cu un alotip diferit (cu o alta combinatie de gene alele la situsul codicator).

Diversitatea biochimica la nivel individual a acestor molecule, sta la baza unicitatii biochimice a fiecarui individ uman si este determinata de o diversitate genetica corespunzatoare.

Deoarece se comporta ca antigene majore în organismul receptor de grefa, antigenele CMH se numesc si *antigene de transplantare*.

În functie de capacitatea lor de a stimula raspunsul imun de respingere a grefei, antigenele CMH sunt *tari* si *slabe*.

Antigenele CMH tari reprezinta principala bariera în calea transplantului de tesuturi si organe. La soarece, moleculele CMH tari apartin sistemului H-2. Grefele de tesuturi si organe între organisme care difera prin antigenele complexului H-2 ale suprafetei celulare sunt invariabil respinse în 10-14 zile. Antigenele tari apartin claselor I si II.

Antigenele slabe (usoare) sunt codificate de *sistemul minor de histo-compatibilitate* si determina respingerea lenta a grefei de piele, în circa 200 de zile.

La om, corespondentul sistemului molecular antigenic H-2 de la soarece este complexul antigenic al *sistemului HLA* (*Human Leucocyte Antigen*). Denumirea semnifica faptul ca moleculele sistemului au fost detectate initial (J. Dausset, 1958), pe suprafata leucocitelor.

Antigenele complexelor H-2 si HLA au o varietate antigenica

individuala și de aceea natura lor chimică se poate studia numai în populații genetic pure (inbred) de soarece, obținute prin împerecheri multiple între indivizii aceleiași descendente.

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 N-terminala 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;

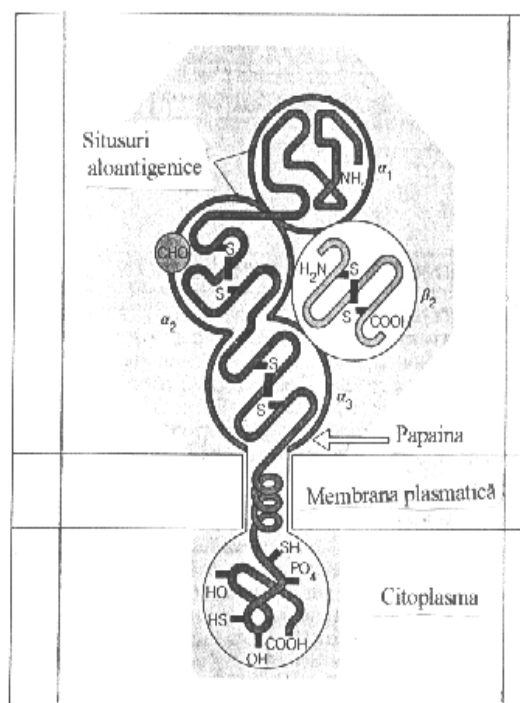


Fig. 52. Reprezentare schematică a structurii moleculelor CMH clasa I, ancorate în

membrana citoplasmatica. Catena codificata de gena CMH prezinta 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 structura terciara asemanatoare unui domeniu al Ig, stabilizat printr-o punte S-S.

– *domeniul transmembrantar* contine 25 resturi de aminoacizi hidrofobi, care traverseaza membrana. Imediat deasupra acestui domeniu se gasesc 5 aminoacizi bazici (Arg, Leu), tipici pentru proteinele legate de membrana, cu rolul de a ancora lantul polipeptidic în membrana;

– *domeniul hidofil cito-plasmatic* (30 de aminoacizi la om, 40 la soarece), contine în special serina, unele resturi fiind fosforilate, este implicat în transmiterea semnalului de la domeniile extracelulare, la mediatorii citoplasmatici. Acest domeniu contine resturi de cisteina cu rol în legarea prin intermediul puntilor S-S, de alte catene H sau de proteine citoplasmatiche.

Componenta *glucidica* este alcatuita din doua grupari, fiecare fiind formata din 12-15 resturi de zaharuri, atasate de domeniile α -1 si α -2. Sunt oligozaharide care contin manoză, de care se leaga catene laterale de glucozamina si acid sialic.

Catena H are o regiune variabila în jumătatea N-terminala, cu doua subzone hipervariabile, care difera prin mai mult de 60% din aminoacizi, de la un organism la altul, localizate în domeniile α -1 si α -2. Studiile prin difracție cu raze X ale domeniilor extracelulare, cristalizate după clivarea cu papaina arata ca domeniile α -1 si α -2 sunt foarte asemanatoare ca secventa de amino-acizi si prin pliere formeaza împreună o *cavitate moleculara*, presupusa a fi situsul de legare stabila a epitopului antigenic. Cavitatea, sustinuta de secvente β -pliate ale acelorasi domenii α -1 si α -2, este ocupata de o molecula lineara, care este un *peptid* ce cristalizeaza concomitent cu catena H. Situsul cavitatar, după ce leaga antigenul, formeaza un complex recunoscut de limfocitele TCD₈. Restul catenei H corespunde regiunii constante.

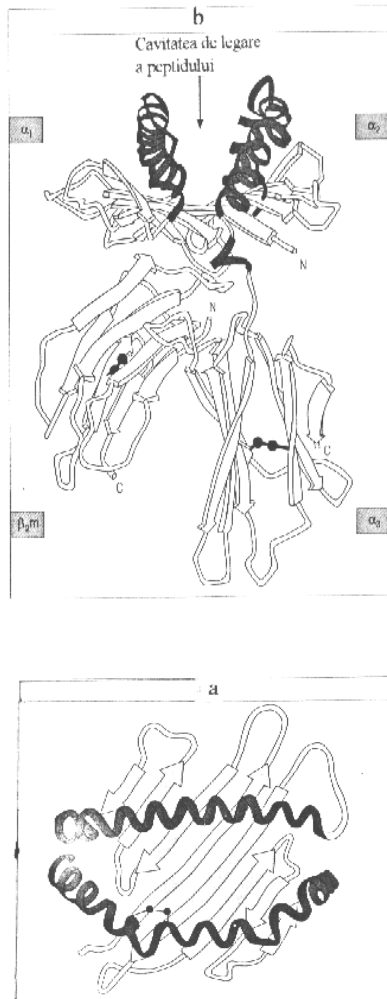


Fig. 53. a. Reprezentarea schematica în "ochi de pasare" a suprafeței superioare a moleculei CMH clasa I umane, bazată pe structura obținută în cristalografie cu raze x. Secvențele β -pliate care formează baza cavității sunt marcate prin săgeți groase, orientate în direcția amino-carboxil. Secvențele 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 pliarea 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 globulina mică, ce migrează la

electroforeza în regiunea β -2) a fost descoperita în 1968, în urina pacienților cu disfuncție renală provocată de intoxicația cronică cu cadmiu. Este sintetizată de majoritatea celulelor din organism. Contine 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 membrana. 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 greșirea țesuturilor și organelor care poartă molecule incompatibile;
- după ce se asociază cu antigenele virale, tumorale sau cu cele induse de agenți chimici;
- după modificarea biochimică printr-un proces mutațional.

Structura moleculara a antigenelor CMH clasa II

Antigenele CMH clasa II-a sunt glicoproteine heterodimere de membrana, formate din doua catene diferite, notate cu α si β .

Prin solubilizare cu detergent, aceste molecule se elibereaza întregi. Lantul α are 30-34 kD, iar lantul β are 26-29 kD.

Fiecare catena este formata din 4 domenii:

- doua extracelulare, alcatuite 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).

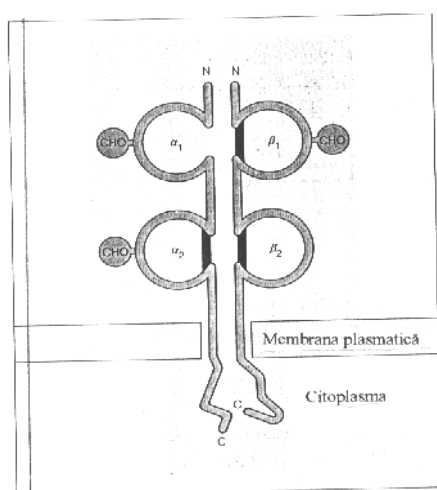


Fig. 54. Reprezentarea schematica a moleculelor CMH clasa II-a. Molecula este formata din 2 catene diferite (α si β), legate necovalent, a caror extremitate C-terminala se insera în citoplasma. Cele doua catene au câte doua domenii globulare, asemanatoare cu domeniile Ig. Cu exceptia domeniului α -1, toate celelalte sunt stabilizate printr-o punte S-S intracatenara. Cele doua catene sunt glicozilate (dupa Roitt, 1997).

Domeniile α -1 si β -1 au o variabilitate accentuata a secventei de aminoacizi. Ele se asociaza pentru a forma o structura ce delimiteaza o *cavitate în care este legat peptidul antigenic*.

Domeniile α -2 si β -2 prezinta omologie a secventei de aminoacizi, cu domeniile moleculei de Ig.

Domeniile α -2, β -1 si β -2 sunt stabilizate prin legaturi S-S, iar domeniile α -1, α -2 si β -2 sunt glicozilate. Gruparea glucidica contine

manoza, galactoza, fucoza, glu-cozamina. Diferentele greutatii mo-leculare a celor doua catene se dato-reaza nivelului diferit de glicozilare.

Determinismul genetic al moleculelor CMH

Moleculele CMH sunt codificate de genele complexului major de histocompatibilitate. Calificativul "complex" este justificat de numarul mare de gene componente, iar cel de "major" semnifica importanta deosebita a moleculelor codificate de aceste gene, în realizarea unor functii imunitare importante:

- elaborarea raspunsului imun
- respingerea grefelor de tesuturi si organe.

În raport cu tipul de proteine pe care le codifica, genele CMH apartin clasei I si clasei a II-a.

La soarece, 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. In acest complex se gasesc 3 tipuri de gene descoperite independent:

- *primul grup de gene* (descoperit în anii '40) codifica antigenele "tari" de transplantare, care induc respingerea rapida a grefelor de tegument si de organe, între indivizi neidentici genetic (apartin unor alotipuri diferite). Acestea sunt genele CMH clasa I, care codifica moleculele CMH clasa I;

- al II-lea grup, denumite *genele raspunsului imun* (IR) codifica sinteza unor molecule care conditioneaza *intensitatea raspunsului imun* al organismului, slab sau puternic, fata de un antigen. Genele IR codifica proteinele clasei a II-a de molecule CMH, denumite si molecule *la* (I associated);

- al III-lea set de gene ale complexului CMH codifica sinteza unor componente ale *complementului*.

La soarece, moleculele CMH I sunt codificate de gene situate la extremitatile complexului genic H-2, notate K si D. Gena K are circa 55 de variante alelice. Fiecare varianta codifica proteine distincte.

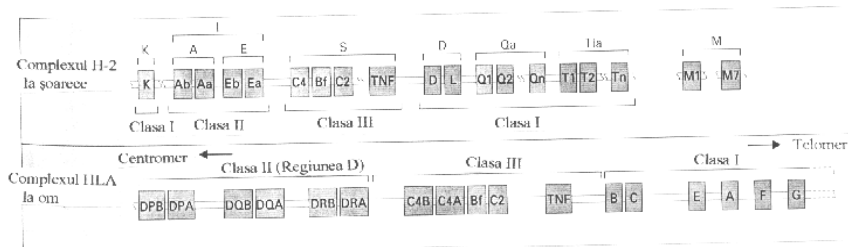


Fig. 55. Reprezentare diagramatică a localizării subregiunilor genice CMH la soarece și la om și poziția genelor majore în aceste subregiuni. La om, locusurile genice clasei II-a sunt localizate între centromer și locusurile clasei I, ca și la alte specii de mamifere.

Complexul H-2 la soarece (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 acelorasi proteine plasmatică (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.

Numarul alelelor este în continua crestere pe masura ce se identifica noi variante. Polimorfismul genic este consecinta existentei a cel puțin doua alele pentru un locus. Pe fiecare din cei doi cromosomi pereche, un individ prezinta 3 gene CMH diferite (HLA-A, HLA-B, HLA-C). Celulele umane prezinta 6 variante diferite de gene clasa I, câte trei de la fiecare parinte. Genele CMH I sunt *codominante*, astfel ca pe suprafata fiecarei celule se exprima produsele de sinteza ale ambelor alele parentale. Se sintetizeaza astfel 6 variante biochimice de molecule CMH I.

Într-o populatie umana, moleculele CMH I si CMH II sunt foarte diferite din punct de vedere biochimic, ca o expresie a polimorfismului genic al indivizilor umani.

Antigenele HLA-A, B si C sunt antigenele majore recunoscute de sistemul imunitar al gazdei, în reactia de respingere a grefei. Cantitativ, moleculele HLA-C sunt inferioare fata de HLA-A si HLA-B. Toate sunt capabile sa prezinte antigenul. Moleculele CMH neclasice (E, F, G) nu prezinta antigenul.

Polimorfismul biochimic al moleculelor CMH I este limitat la domeniile $\alpha 1$ si $\alpha 2$, la nivelul secventelor ce formeaza cavitatea moleculara

Genele CMH II sunt localizate în regiunea HLA-D. Regiunea genica HLA-D controleaza raspunsul limfocitelor în amestec. Specificitatile alelice ale genelor CMH II au fost definite prin tipizare *limfocitara* si apartin locusurilor Dw si HLA-DP sau prin tipizare *serologica* si apartin locusurilor HLA-DP, DQ, DR.

Regiunea D este divizata în trei subregiuni functionale majore, care codifica moleculele DR, DQ si DP. In subregiunile DQ si DP se gaseste o pereche de gene functionale DQA₁ si DQB₁, respectiv DPA₁ si DPB₁, care codifica cele doua catene (α si β) ale moleculei CMH II.

Subregiunea DR este mai complexa. Ea contine o singura gena pentru sinteza catenei α , DRA₁ si una sau doua gene pentru sinteza catenei β (DRB₁, DRB₃, DRB₄ sau DRB₅).

Numarul alelelor:

DRA ₁	2
DRB ₁	184
DRB ₃	11

DRB ₄	8
DRB ₅	12
DQA ₁	18
DQB ₁	31
DPA ₁	10
DPB ₁	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 10^{90} , 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 neînruđiti 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 ale moleculelor CMH I și II.

Evaluarea diferentelor antigenice ale moleculelor CMH

Fiecare organism are o specificitate antigenică proprie conferită de moleculele CMH clasă 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.

Anticorpul anti-HLA se găsește 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 politransfuzati*. 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 *reactia 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 grea de a se activa față de antigenele donorului și pentru a induce un răspuns unidirecțional, populația de limfocite a donorului este tratată cu mitomicina C (un inhibitor al sintezei ADN) sau este iradiată. Tratatamentul 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).

Distributia tisulara a moleculelor CMH I si II si semnificatia lor evolutiva

Moleculele CMH I se gasesc pe suprafata majoritatii tesuturilor, pe celulele endoteliale ale capilarelor, iar leucocitele exprima cea mai înalta densitate a moleculelor CMH I: 1% din moleculele de suprafata ale membranei leucocitare sunt molecule HLA.

Moleculele CMH I au o densitate mai mica pe suprafata celulelor hepatice, din plamân, rinichi si sunt foarte diluate pe suprafata celulelor musculare si a celor mai multe glande endocrine (cu exceptia suprarenalelor).

Moleculele CMH II sunt exprimate predominant, pe suprafata limfocitelor B si pe celulele specializate pentru prelucrarea si prezentarea antigenelor: celulele seriei monocit-macrofag, celulele endoteliale ale capilarelor sanguine si limfatice, celulele Kupffer, celulele dendritice, eozinofile, microglia SNC.

Moleculele CMH lipsesc pe eritrocite, pe celulele endoteliului corneean, pe componenta exocrina a pancreasului, pe celulele acinare ale glandelor parotide, pe neuronii SNC, pe celulele endoteliale ale capilarelor SNC, pe tesutul placentar.

În conditii normale, o forma solubila de molecule HLA se gaseste în plasma. Nivelul ei creste marcat în timpul infectiei virale, probabil datorita cresterii ratei sintezei moleculelor HLA, stimulata de interferon si de alte citochine.

Intensitatea exprimarii moleculelor CMH II este variabila, fiind controlata de diferiti factori: interferonul γ si IL-2, sintetizati de limfocitele T, amplifica nivelul de exprimare a moleculelor CMH II, iar PGE₂, glucocorticoizii, α -fetoproteina, LPS din bacteriile Gram negative, diminueaza densitatea acestor molecule, având astfel rol imunosupresor.

Limfocitele B si celulele tumorale secreta molecule CMH II.

Privita în perspectiva evolutiei, existenta moleculelor CMH nu semnifica respingerea grefelor de tesuturi si organe, deoarece acestea nu se realizeaza în mod natural, ci au fost introduse în practica medicala a ultimelor decenii. In sens evolutiv, existenta moleculelor CMH ar putea fi atribuita necesitatii organismelor de a semnaliza rapid, celulele care prezinta molecule antigenice pe suprafata lor: celulele infectate cu virusuri sau cele transformate malign. In acest context, moleculele CMH au o semnificatie deosebita: pentru supravietuirea organismului, liza celulelor purtatoare de molecule nonself trebuie sa fie rapida, înainte ca virusul sa se multiplice si respectiv, înainte ca celula maligna sa se divida si sa formeze o microtumora.

Pentru ca interventia limfocitelor Tc sa fie eficienta, este necesar ca moleculele CMH sa fie prezente pe oricare celula ce poate fi infectata de un virus sau poate sa fie transformata malign. Pe de alta parte, moleculele CMH, al caror rol esential este acela de a prezenta epitopii nonsel, trebuie sa permita actiunea eficienta si rapida a limfocitelor Tc.

Moleculele CMH îndeplinesc si functii *neimune*. Moleculele CMH I sunt componente ale receptorilor de hormoni. De exemplu, linia celulara stabilizata Daudi nu exprima moleculele CMH I si nu are nici receptor pentru insulina, deoarece nu sintetizeaza β 2-microglobulina.

Capitolul 5

RASPUNSUL IMUN

Organismul, ca sistem functional este echilibrat atâta timp cât informatia antigenica pe care o primeste, este identica cu cea proprie. Fata de moleculele straine, care se abat de la modelul informational propriu, sistemul imunitar raspunde prin activarea mecanismelor de recunoastere pentru a îndeparta moleculele nonsel.

Ansamblul fenomenelor complexe în cascada, declansate de interactiunea specifica a sistemului imunitar cu antigenul, în cursul carora celulele imunocompetente se activeaza, prolifereaza si se diferentiaza în celule efectoare si celule de memorie, constituie raspunsul imun.

Functionalitatea sistemului imunitar se suprapune partial, modelului general al *arcului reflex*, deoarece presupune existenta unui flux informational care corespunde unui *excitant specific* (Ag) fata de un *receptor* (limfocitele), o *cale aferenta* (celulele care înglobeaza si prelucreaza Ag), un *organ central* (celulele limfoide dintr-un organ limfoid secundar) si *efectorii* raspunsului imun (anticorpi, celule efectoare).

Asemanarile dintre sistemul imunitar si sistemul nervos se extind si asupra altor particularitati:

– sistemul imunitar este dotat, ca si sistemul nervos, cu “inteligenta” (capacitatea de a receptiona un numar mare de stimuli (adica de a recunoaste un numar mare de determinanti antigenici diferiti) si de a prelucra informatie chimica. Sistemul nervos prelucreaza informatie *senzoriala*, iar sistemul imunitar recunoaste si prelucreaza informatie *moleculara*. “Inteligenta” sistemului imunitar se manifesta discontinuu, în functie de agresiunile antigenice asupra organismului;

– “educatia” sistemului imunitar (adica stocarea informatiei antigenice primita prin stimulari repetate), ca si în cazul sistemului nervos, începe dupa nastere;

– ambele sisteme “învata” prin experienta, pentru ca ambele sunt dotate cu *memorie*, care poate fi consolidata prin repetarea stimulului. Memoria ambelor sisteme este înscrisa în modificari moleculare persistente ale retelei, dar nu poate fi transmisa la descendenti;

– ambele sisteme sunt organizate dupa modelul unei *complexe retele celulare si 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 imunitar față de o substanță nonself este un proces fiziologic care se caracterizează printr-o mare eficiență și suplete și are următoarele particularități generale:

– funcția imunitară are *caracter adaptativ*, care decurge din orientarea specifică a reacțiilor sale față de o substanță nonself. Caracterul adaptativ al răspunsului imunitar 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 imunitar se selectează 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 cai;

a) *proliferația masivă* (circa 8 generații celulare) a celulelor selectate sub acțiunea stimulatoră 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 imunitar, conectate prin mediatori moleculari (interleuchine) și care condiționează eficiența răspunsului imunitar;

– 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 (înnașcuți) ai rezistenței (fagocitele, proteinele sistemului complement, molecule bactericide sau bacteriolitice din plasmă);

– raspunsul imun adaptativ necesita o *perioada de timp* pentru activarea si proliferarea limfocitelor care au recunoscut antigenul, în timp ce reactiile neadaptative sunt prompte;

– raspunsul imun adaptativ asigura *protectia* organismului si a descendentilor sai, prin transferul placentar al anticorpilor si prin secretia lactata;

– raspunsul imun adaptativ are o proprietate fundamentala unica - *memoria imuna* - consecinta a experientei antigenice individuale, netransmisibila la descendenti.

Raspunsul imun este rezultatul cooperarii unui numar restrâns de tipuri celulare si moleculare.

În functie de predominanta componentei celulare sau moleculare în compartimentul efector al raspunsului imun, se disting doua tipuri de reactivitate imunitara.

1. *Raspunsul imun mediat humoral* (RIMH), care se caracterizeaza în esenta, prin sinteza anticorpilor ca molecule efectoare. Efectele RIMH sunt urmatoarele:

- neutralizarea toxinelor si a infectiozitatii particulelor virale
- opsonizarea antigenelor celulare (bacterii, celule eucariote)
- legarea antigenelor moleculare în complexe Ag-Ac si eliminarea lor.

Imunitatea mediata humoral este transferabila de la un organism la altul prin intermediul serului. RIMH este protector fata de infectiile bacteriene (în special piogene), fata de reinfectiile virale si fata de antigenele moleculare pe care le neutralizeaza.

2. *Raspunsul imun mediat celular* (RIMC) se caracterizeaza prin aceea ca, dupa patrunderea antigenului, de regula celular, sistemul imunitar mobilizeaza celule specializate, care ataca antigenul tinta. Atacul se realizeaza fie prin contact celular direct între limfocitele T efectoare si celula tinta, fie prin mediatori moleculari.

Raspunsul imun mediat celular este declansat de antigene care se exprima pe suprafata celulelor:

- *antigene virale* exprimate pe suprafata celulelor infectate, în special dupa infectia virala primara;

- *antigene fungice*;

- antigene exprimate pe suprafata celulelor infectate de bacteriile cu localizare *intracelulara obligata* (*Rickettsia*, *Coxiella*, *Chlamydia*) sau *facultativ intracelulara* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, *Brucella sp.*, *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*), în special în macrofage;

- antigenele *tumorale*;

- antigenele *celulare* din grefele de tesuturi si organe alogenice.

Existenta celor doua compartimente ale raspunsului imun este

argumentata de rezultatele experimentale, dar si de observatiile clinice, adevarate "experiente ale naturii", asupra unor indivizi cu afectiuni determinate de incapacitatea RIMH sau RIMC.

Sindromul Di George se caracterizeaza prin aplazia congenitala a timusului si paratiroidelor. Bolnavilor le lipseste reactivitatea fata de antigenele care mobilizeaza IMC si de aceea sunt sensibili la infectiile virale, fungice si la cele produse de bacterii cu localizare intracelulara. Sinteza si titrul Ig serice sunt normale.

Hipo- si agamaglobulinemia congenitala de tip Bruton este o afectiune congenitala determinata de gena tirozin-kinazei, situata pe cromosomul X, care afecteaza diferentierea celulelor limfoide B si produce imunodeficienta X lincata (Xid). Celulele B în sânge sunt rare, desi numarul limfocitelor pre-B în maduva osoasa nu este semnificativ redus, ceea ce sugereaza o moarte celulara crescuta la tranzitia pre-B-B. Deficienta clinica consta în incapacitatea de a sintetiza anticorpi si din aceasta cauza, copiii, dupa 3-6 luni de viata, fac infectii repetate si recurente cu bacterii Gram pozitive si prezinta manifestari ale maladiilor autoimune. Reactivitatea IMC ramâne nemodificata, pentru ca organismul își pastreaza rezistenta fata de infectiile virale si fata de bacteriile Gram negative. Separarea celor doua compartimente ale raspunsului imun, humoral si celular, este artificiala, deoarece între ele este o conditionare reciproca si profunda: anticorpii au functie opsonizanta, favorizând astfel IMC, iar pe de alta parte, IMC este mediata de numerosi factori solubili. Cele doua compartimente interactioneaza sinergic pentru producerea unui raspuns imun eficient. Totusi, separarea este mentinuta deoarece reflecta diferentele fundamentale ale mecanismelor de actiune ale celor doua populatii de limfocite: limfocitele B pentru RIMH si limfocitele T pentru RIMC.

Nici un antigen nu induce un raspuns imun pur, humoral sau celular. Totdeauna raspunsul imun este mixt, cu predominanta unuia sau a celuilalt dintre compartimente.

ETAPELE RASPUNSULUI IMUN

Raspunsul imun este rezultatul succesiunii urmatoarelor etape:

- patrunderea antigenului în organism si înglobarea lui de catre celulele accesorii;
- prelucrarea antigenului si prezentarea epitopilor pe suprafata celulelor accesorii;
- recunoasterea specifica a componentelor nonself si activarea celulelor efectoare;

– producerea efectorilor raspunsului imun.

Patrunderea antigenului în organism se realizeaza pe diferite cai:

– pe cale cutanata

– pe calea circulatiei sanguine

– pe calea mucoaselor(respiratorie, gastro-intestinala si urogenitala).

Epiteliul tegumentar si mucoasele reprezinta o suprafata foarte mare, expusa la o mare diversitate de substante antigenice. Tegumentul este o bariera mecanica fata de cele mai multe antigene, iar mucoasele sunt protejate, în primul rând, de IgA din secretii. Epiteliul tegumentar si epitelile mucoaselor au rol în fenomenul “excluderii antigenice”. Schimbul liber între mediul extern si cel intern are loc numai în situatii patologice.

Elaborarea raspunsului imun este, în esenta, rezultatul cooperarii a doua categorii de celule: *celulele accesorii* ale raspunsului imun si *celulele limfoide*.

Antigenul este recunoscut de celule specializate functional si înglobat, cel mai adesea prin actiunea unor mecanisme nespecifice, de *celulele accesorii, cu rolul de a prelucra si de a prezenta antigenul*.

Celulele prezentatoare de antigen (CPA)

Celulele accesorii au rol esential în elaborarea raspunsului imun, datorita capacitatii lor de a îngloba substantele straine, de a le prelucra si de a le prezenta limfocitelor, de a fagocita celulele opsonizate si de a sintetiza substante imunomodulatoare. Prezentarea antigenului este treapta obligatorie care precede recunoasterea antigenelor proteice de catre celulele T.

Orice celula care poarta pe suprafata ei molecule CMH poate sa participe la elaborarea raspunsului imun. Celulele prezentatoare de antigen au urmatoarele proprietati: preiau antigenele, le internalizeaza si le prelucreaza; exprima moleculele CMH I si II; exprima moleculele de aderenta care favorizeaza interactiunea cu limfocitele; produc molecule stimulatorie ale cresterii si diferentierii limfocitelor T; elibereaza citochine.

Cele mai importante celule accesorii pentru elaborarea raspunsului imun sunt *macrofagele*. *In vivo*, macrofagul participa decisiv la procesul de imunogeneza. Indiferent de calea de patrundere 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 declansa raspunsul imun, în primul rând de celulele Kupffer,

localizate pe fata luminala a capilarelor sinusoide din ficat. La nivelul ficatului se elimina circa 90% din totalul antigenelor circulante (bacteriile care strabat bariera mucoasei digestive, endotoxinele absorbite la nivelul colonului, antigenele de origine alimentara).

Alte celule specializate, cu rol major în prezentarea antigenului sunt *celulele dendritice si limfocitele B*.

Celulele dendritice fac parte dintr-o familie care cuprinde urmatoarele tipuri de celule:

– *celulele Langerhans*, localizate în epiderm, dar si 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 si din sânge

– *celulele interdigitate*, din aria paracorticală a ganglionilor limfatici.

Originea acestor celule nu este certă, dar se admite urmatoarea filiație: *monocitul sanguin*, *celula Langerhans* din epiderm, *celula cu voal* din limfa aferentă ganglionului limfatic, *celula dendritica* din derm, din organele limfoide si din sânge.

Celulele dendritice s-au izolat din organele limfoide si din sânge, pe baza capacității lor de a adera de suport (ceea ce permite eliminarea limfocitelor din amestec) si de a-si pierde aderența după 24 de ore de cultivare. Rolul lor în prezentarea antigenului este argumentat de faptul ca stimuleaza intens reactia limfocitara mixta.

Celulele dendritice au rol foarte important pentru initierea raspunsului imun. Sunt larg distribuite în tesuturile limfoide si nelimfoide la toate speciile de mamifere studiate. Precursorii celulelor dendritice si ai macrofagelor sunt localizati în maduva osoasă, iar *monocitul* este un stadiu comun, înainte de diferentierea pe cele doua linii. *Monocitul* trece în sânge, de unde se disemineaza în tesuturile nelimfoide (epiderm, epiteliul tractului respirator, gastrointestinal, urogenital) si se diferentiaza în *celula dendritica*. În tegument, *celulele dendritice si celulele Langerhans* formeaza o retea ramificata în tot epidermul. Ele au capacitati optime de captare si prelucrare a antigenelor, care patrund pe cale tegumentara. După maturare, favorizata de citochinele produse local, migreaza din tesuturile nelimfoide, în tesuturile limfoide secundare. Migrarea din epiteliu are loc pe cale limfatica, până în ganglionii limfatici regionali, iar cele din spatiile interstițiale migreaza pe cale sanguina în splina. În timus, celulele dendritice prezinta complexe CMH-peptide, timocitelor care își dobândesc competența imunitara, pentru inducerea toleranței imune.

Celulele acestei familii nu au receptori pentru Fc si nici pentru C3, dar exprima la un nivel ridicat, moleculele CMH I si II.

Celulele Langerhans reprezinta 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 parasească stratul bazal și să migreze pe cale limfatică, până în ganglionii regionali. În timpul migrației, 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 secreta. 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 particulate. 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 plasmactice.

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

preluata de alte CPA.

Principalul mecanism degradativ care are loc în CPA este *proteoliza lizosomală*. Concluzia a fost dedusa 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 fagocitate *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 enzima-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-alanina) 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 pastrează, dar cea mai mare parte a antigenului este complet degradată.

Complexitatea antigenului condiționează numărul de peptide cu rol de epitopi, care deriva 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 proteoliză (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 cloroquina.

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 forma nativă, de unele subpopulații de limfocite T, în timp ce altele recunosc formele prelucrate ale aceluiași antigen.

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 forma 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.

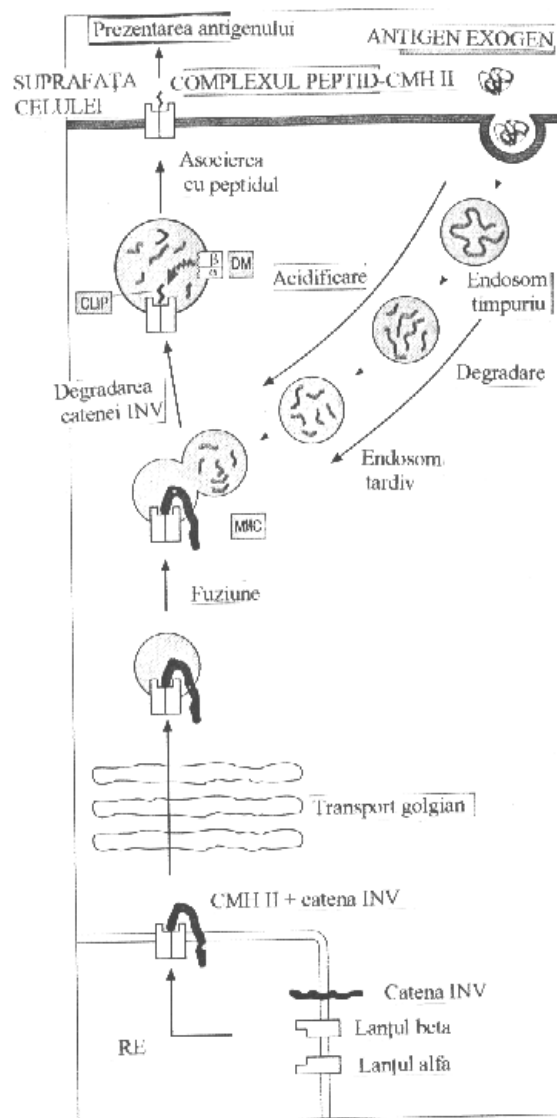


Fig. 56. Prelucrarea și prezentarea antigenului exogen, în asociere cu moleculele CMH II. Moleculele CMH II, cu catena invariantă, sunt asamblate în reticulul endoplasmic (RE) și transportate prin rețeaua Golgi, de unde sunt orientate spre vezicula endosomală, care conține proteina degradată parțial, 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.

Moleculile 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 *dominanti*, care se asociază cu mare probabilitate de moleculele CMH, epitopi *subdominanti*, 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 asociere cu moleculele CMH II.

Moleculile 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). Moleculile 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. Moleculile 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.

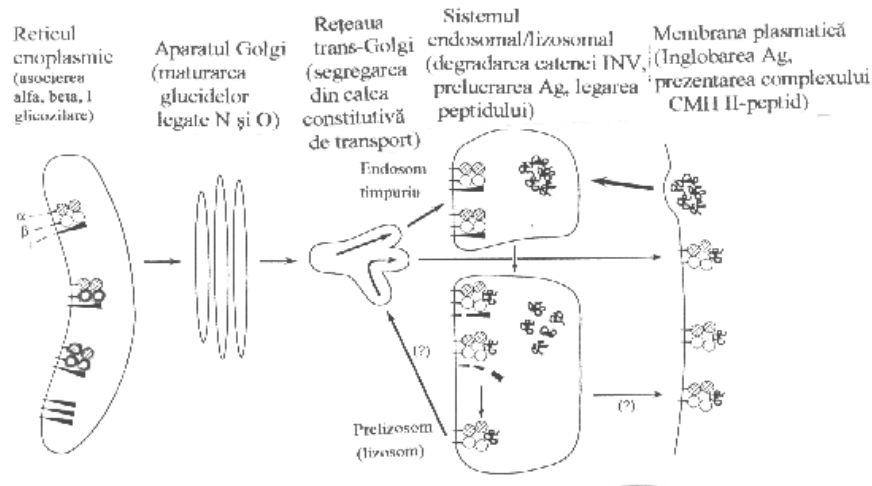


Fig. 57. Reprezentarea schematica a asocierii moleculelor CMH II cu peptidul antigenic (dupa Cresswell, 1994).

Moleculele CMH II au functia fundamentala de a stimula elaborarea raspunsului imun specific fata de antigenele exogene, prin intermediul limfocitelor TCD₄. Limfocitele TCD₄ secreta IL-2, IL-4, IL-5, IFN γ , cu efect stimulator fata de limfocitele Tc si B.

Asocierea unui peptid nonselb cu moleculele CMH II semnifica "cererea de ajutor" pentru eliminarea antigenului, materializat în activarea limfocitelor TCD₄ si secretia de limfochine stimuloare ale raspunsului imun.

Moleculele CMH II au rol esential pentru stimularea raspunsului imun, dar si pentru reglarea intensitatii sale. Interactiunea moleculelor CMH II cu epitopii antigenici nu este specifica.

Deoarece moleculele CMH sunt polimorfe, exista diferente, uneori importante, între organismele outbred ale unei specii de a raspunde la un antigen. Astfel se explica diferentele individuale de sensibilitate fata de un agent infectios. Un raspuns imun mai amplu, este generat de un organism care expune mai multi epitopi antigenici diferiti, asociati cu diferitele variante de molecule CMH II, comparativ cu un organism care expune mai putine fragmente antigenice asociate cu 1 sau 2 tipuri de molecule CMH II.

Antigenele endogene sunt prezentate în asociatie cu moleculele CMH I

Rolul moleculelor CMH în procesul recunoasterii antigenelor care se sintetizeaza în interiorul celulei (proteine *endogene*), a fost demonstrat de Zinckernagel si Doherty (1974), pentru antigenele virale, în experiente de genul urmator:

– soarecii liniei inbred D au fost inoculati cu virusul coriomeningitei limfocitare (cu specificitate antigenica A), pentru a stimula proliferarea limfocitelor Tc fata de celulele infectate cu acest virus;

– culturile de fibroblaste de la embrionii liniei D se infecteaza cu varianta antigenica A si respectiv B, iar fibroblastele liniei K se infecteaza cu varianta antigenica A;

– limfocitele Tc ale organismelor liniei D, stimulate cu virusul A, recunosc si lizeaza, *in vitro*, fibroblastele liniei D, infectate cu varianta antigenica A, dar nu recunosc si nu lizeaza fibroblastele liniei D infectate cu varianta antigenica B si nici fibroblastele liniei K, infectate cu varianta antigenica A.

Concluzia a fost ca nucleoproteinele citosolice virale, sintetizate în celula, pot deveni tinta celulelor Tc, dupa ce sunt expuse ca un peptid prelucrat, în asociatie cu moleculele CMH I ale celulei infectate. Pe baza acestei concluzii s-a stabilit principiul general ca proteinele intracelulare (care nu sunt destinate membranei citoplasmatică), pot sa-si semnaleze prezenta în raport cu celulele T, prin expunerea asociata cu moleculele CMH I. Rezultatele au fost extrapolate si pentru categoria larga a antigenelor exogene.

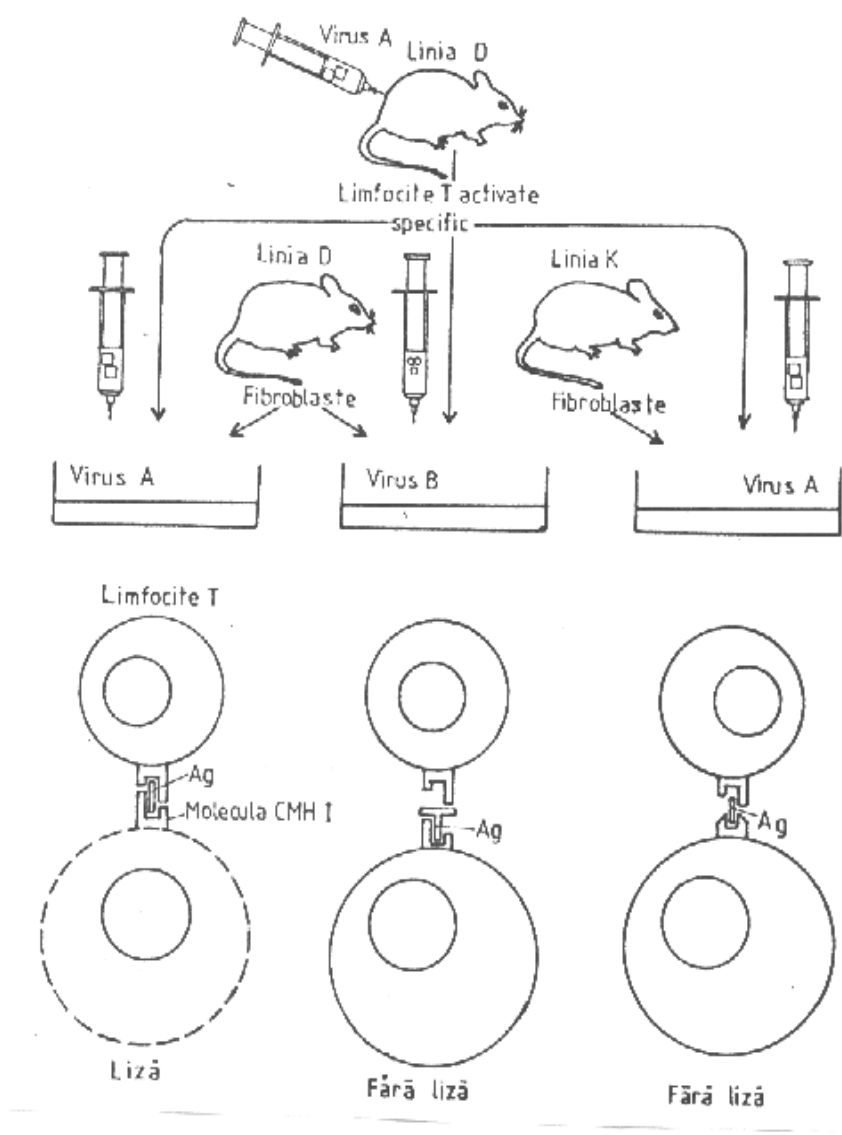


Fig. 58. Actiunea limfocitelor Tc este restrictiva în raport cu moleculele CMH I, deoarece celula Tc recunoaste atât antigenul specific, cât și molecula CMH I. Amanunte în text.

Recunoasterea 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 nonself,

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 poartă 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 parazitilor 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 citoplasma)
- 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, cloroquina), dar este sensibilă la derivații peptidici (di- sau tripeptide aldehidice) care inhibă *proteasomul*. Proteasomul este un complex proteic multicatalitic, compus din mai multe subunități înelare suprapuse, asamblate într-o structură cilindrică, în care se produce proteoliza moleculelor proteice citosolice conjugate cu ubiquitină. Proteasomul este o structură care controlează turn-overul proteinelor citosolice, inclusiv al factorilor de transcriere și al ciclinelor. Ubiquitină este un polipeptid mic, care este asociat pe cale enzimatică dependentă de ATP, de lizina proteinelor citosolice. Legarea ubiquitinei produce depierea proteinei țintă și asigură recunoașterea de către elementele complexului proteasomic citosolic. Proteinele celulare modificate după cuplarea cu ubiquitină, devin sensibile la proteoliză. Proteoliza are loc în

mediul apos al structurii cilindrice si este independenta de ATP. Astfel sunt protejati constituintii celulari de degradarea necontrolata. Peptidele rezultate în proteasom sunt foarte rapid degradate în citoplasma. De aceea s-a presupus ca ele se asociaza cu proteinele *chaperone*, cu rol protector si de orientare a peptidelor în lumenul reticulului endoplasmic.

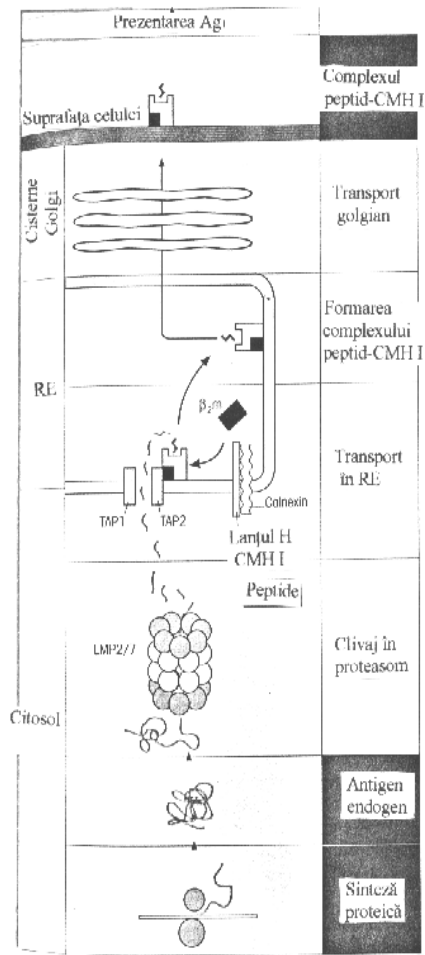


Fig. 59. Prelucrarea si prezentarea antigenului endogen, de catre moleculele CMH I. Proteinele citosolice sunt degradate de complexul proteosomic, în peptide care sunt transportate în reticulul endoplasmic (RE). La acest nivel, β -2 m induce disocierea catenei H de proteina chaperone (calnexina). Se assembleaza molecula CMH I si se asociaza cu peptidul antigenic. Complexul peptid-CMH I se elibereaza din asocierea cu transportorul TAP, traverseaza cisternele Golgi si se exprima pe suprafata celulei, gata sa fie recunoscut de RCT. Celulele deficiente în TAP1/2 nu elibereaza peptidele pentru

a se asocia cu moleculele clasa I si nu pot exercita efectul citotoxic asupra tinte (dupa Roitt, 1997).

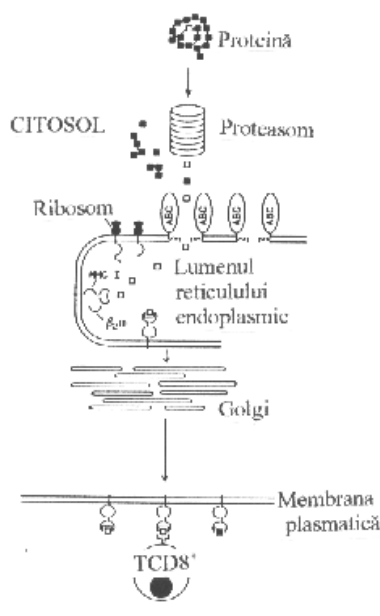


Fig. 60. Formarea complexului CMH I-peptid în cisternele RE.

Peptidele rezultate din prelucrarea antigenelor endogene sunt transportate în reticulul endoplasmic, de o categorie de proteine transportoare, denumite TAP (pro-teine 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 si 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 membrana și expus la suprafața celulei. Moleculile CMH I leagă peptide mici, de 8-10 aminoacizi. Specificitatea de legare este largă. Moleculi CMH I identice

leaga peptide diferite.

Liniile celulare care nu sintetizeaza β -2 m, nu exprima molecule CMH I pe suprafata lor. Acesta este un exemplu al functiei de "control de calitate" pe care îl are RE. Moleculele CMH pliate incorect nu sunt transportate la nivelul membranei, ci ramân în cisternele RE si sunt degradate. Absenta β -2 m determina plierea gresita si degradarea catenei mari. Controlul de calitate este mediat de un set de proteine *chaperone*, care se asociaza reversibil cu proteinele pliate incorect si astfel permit "corectarea" greselii de pliere.

La nivel membranar, complexul molecular este recunoscut de limfocitele Tc si rezultatul interactiunii este *liza celulei tinta*.

Moleculele CMH I nu disting între peptidele self si nonself. Peptidele asociate cu moleculele CMH I au fost izolate, fractionate prin HPLC (high-performance liquid chromatography) si secventiate. Fiecare celula expune pe suprafata, sute de peptide, cele mai multe fiind proteine citosolice autologe.

Asocierea moleculei CMH I cu un peptid nonself pe suprafata celulei, semnifica necesitatea *distrugerii* celulei tinta. Dovada în favoarea acestei ipoteze este adusa de faptul ca, *in vivo*, situsul de legare al moleculelor CMH I este ocupat de peptide self, adica fragmente ale proteinelor proprii, pe care celulele le capteaza din spatiul interstitial sau le produc în proteasom si le prezinta ca si pe cele nonself.

Dupa disocierea peptidului, molecula CMH I "goala" expusa la suprafata celulei, este instabila.

Faptul ca situsul de legare al moleculelor CMH I este ocupat de peptide self, este în acord cu teoria *supravegherii imune*, conform careia, celulele killer si limfocitele Tc controleaza permanent suprafata celulelor organismului, pentru a detecta eventuala aparitie a antigenelor tumorale sau virale. Celulele care exprima pe suprafata lor molecule nonself, sunt eliminate prompt.

Deoarece celulele prelucreaza si prezinta continuu molecule proprii, celulele sistemului imunitar sunt *stimulate permanent*. Limfocitele controleaza calitatea moleculelor CMH I si detecteaza celulele ce prezinta molecule alterate sau molecule nonself.

Indivizii umani deficienti ai moleculelor CMH I, nu par a avea o incidenta crescuta a infectiilor virale severe, ceea ce sugereaza existenta si a altor mecanisme de recunoastere a moleculelor nonself, neasociate cu moleculele CMH I.

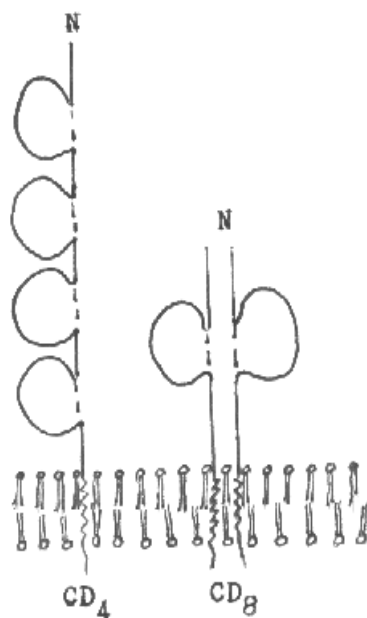


Fig. 61. Reprezentarea schematica a moleculelor CD₄ si CD₈.

Modelul recunoasterii antigenului de catre limfocitele T

Recunoasterea antigenului de catre limfocitele T este mediata în primul rând, de receptorul de antigen (RCT). Secventele hipervariabile ale lanturilor α si β formeaza regiunile determinante de complementaritate (RDC 1 si RDC 2). Buclele RDC 1 si RDC 2 ale regiunilor variabile (V) α si β ale RCT, interactioneaza cu regiunea α helicala a moleculei CMH, iar cele doua secvente RDC 3, interactioneaza cu peptidul antigenic.

Interactiunea limfocitului cu celula prezentatoare de antigen este mediata si de alte molecule.

Limfocitele Tc prezinta pe suprafata lor, markerul CD 8 si recunosc antigenele asociate cu moleculele CMH I, iar limfocitele Th prezinta markerul CD₄ si recunosc antigenele asociate cu moleculele CMH II. Moleculele CD₄ si CD₈ sunt proteine membranare, monomorfe, participante la recunoasterea complexelor CMH-peptide, de pe suprafata celulelor tinta. Domeniile lor extracelulare, prin secventa aminoacizilor, se aseamana 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 coziile 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.

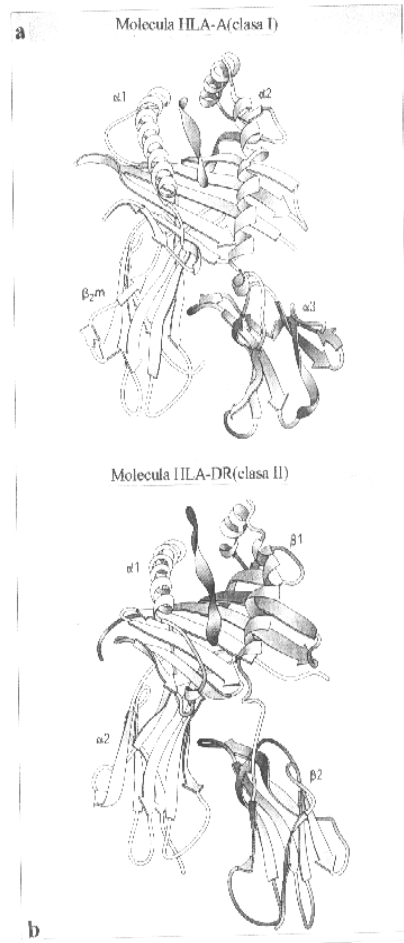


Fig. 62. Diagrama domeniilor extracelulare ale *moleculelor CMH clasa I* (sus) si *clasa II* (jos). Siturile de legare ale celor doua clase de molecule au configuratii tridimensionale asemanatoare si sunt ocupate de peptidul rezident self sau nonself (dupa Roitt, 1993).

Deoarece moleculele CMH I si II leaga peptide scurte, epitopii celulelor T sunt alcatuiti din secvente peptidice lineare, adica configuratia epitopilor nu este dependenta de conformatia proteinei native. Deoarece epitopii recunoscuti de limfocitele T sunt peptide scurte, rezulta ca prelucrarea proteolitica a antigenelor este o etapa obligatorie, care precede interactiunea lor cu limfocitele T.

Prezentarea antigenelor aso-ciate cu moleculele CD₁

Antigenele nepeptidice sunt prezentate celulelor T, prin alte mecanisme. Moleculele CD₁ se aseamana structural cu moleculele CMH I. Ele prezinta antigenele în asociatie cu domeniile hidrofobe, care formeaza cavitati, capabile sa lege antigenele lipidice si glico-peptidice. În aceasta asociatie, antigenele sunt recunoscute de limfocitele T. Se cunosc 4 izo-forme distincte de molecule CD₁ (CD_{1a}, -b, -c, -d), codificate de 5 gene situate pe cromosomul 1. Prezentarea antigenelor lipidice în asociatie cu moleculele CD₁ este sensibila la agentii de acidificare a endosomului (cloroquina, concana-micina A). Probabil, asocierea antigenelor lipidice cu cu CD₁ se produce în compartimentul endo-somal acid.

Moleculele CD₁ sunt impor-tante pentru reactiile de aparare anti-infectioasa, pentru ca ele prezinta antigenele de micobacterii (acidul micolic, lipoarabinomananul), celulelor T.

Calea CD₁ de prezentare a antigenelor se aseamana cu caile de prezentare a antigenelor peptidice în asociatie cu moleculele CMH I si II. CD₁ este asemanatoare din punct de vedere structural, cu moleculele CMH I, dar asocierea cu antigenul are loc în endosomul lipidic. Prezentarea antigenelor în asociatie cu moleculele CD₁ este considerata ca o cale distincta.

Activarea limfocitelor T

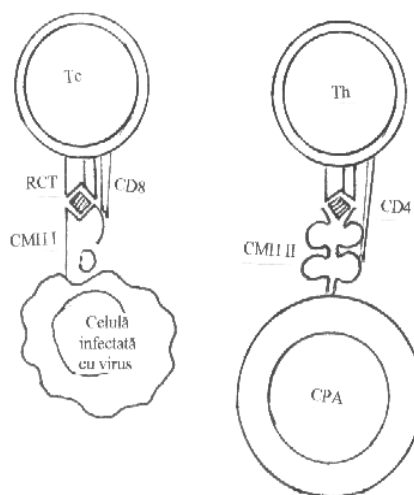


Fig. 63. Moleculile CMH regleaza raspunsul imun. a. O celula T citotoxica (CD8) recunoaste peptidul în asociatie cu o molecula CMH clasa I, pe suprafata unei celule infectate cu un virus.

b. O celula T helper (CD₄) recunoaste peptidul antigenic asociat cu o molecula CMH clasa II, pe suprafata unei celule prezentatoare de antigen (CPA). Epitopii antigenici sunt recunoscuti de RCT, dar la procesul recunoasterii participa si moleculele CD8 si respectiv CD₄. CD8 recunoaste domeniul α -3 al moleculei CMH I, iar CD₄ se leaga 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 eficienta a semnalului activator al celulei T, fiecare fiind asociata cu o activitate enzimatica relevanta:

- RCT α - β si complexul CD₃ (γ - δ - ϵ). Partea invarianta a RCT este asociata cu tirozin-chinaza p59^{fyn};
- coreceptorii CD₄ sau CD₈, asociati cu tirozin-chinaza p56^{lck};
- CD₄₅, cu activitate fosfatazica tirozin-specifica.

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. Aceasta specificitate a condus la sugestia ca molecula CD₄ poate sa lege molecula CMH II, iar molecula CD₈ leaga molecula CMH I, ambele având rol de *coreceptori* de antigen.

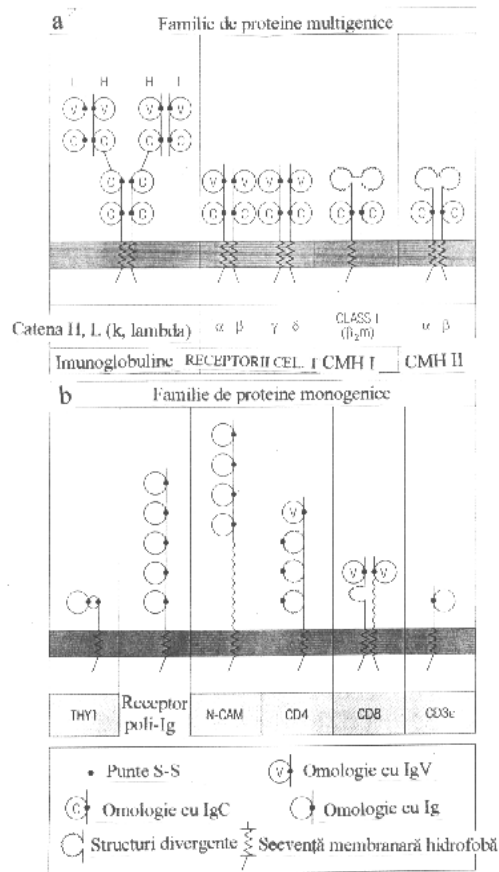


Fig. 64. a. Suprafamilia genelor care codifica imunoglobulinele si diferite alte molecule cu rol în recunoasterea intercelulara. Toate aceste molecule au o structura asemanatoare. Familia moleculelor multigenice, cu rol în recunoasterea antigenului cuprinde imunoglobulinele, RCT, moleculele CMH I si II.

b. Familia moleculelor monogenice cuprinde *molecula Thy* (exprimata pe celulele T si pe neuroni), *receptorii de poli-Ig* (transporta IgA prin epiteliul mucoaselor), *N-CAM* (o molecula de aderenta a neuronilor), *CD4*, *CD8*, precum si alte proteine (o proteina plasmatica umana, o proteina neurocitoplasmatica) (dupa Roitt, 1997).

Coreceptorii CD_4 si CD_8 sunt glicoproteine trans-membranare. Fiecare este aso-ciata cu o molecula de tirozin-kinaza specifica celulei T, $p56^{lck}$. In procesul activarii celulei T de catre antigen, coreceptorul trebuie sa se lege de aceiasi molecula CMH ca si RCT, pentru transducerea optima a semnalului. Inter-actiunea faciliteaza

transmi-terea semnalului activator cu o eficienta de pâna la 300 de ori mai mare.

CD4 si CD8 sunt mem-bre ale suprafamiliei imuno-globulinelor. Desi ambele au rol de coreceptori si se asociaza cu aceiasi tirozin-kinaza (p56^{lck}), nu au omologie structurala.

Studiile de cristalografie cu raze X au aratat ca domeniul extern al moleculei CD4 for-meaza o protru-zie pe fata laterala a moleculei, implicata în legarea moleculei CMH II.

Molecula CD8 este formata din doua catene diferite (α si β) si are un singur domeniu de omologie cu molecula de Ig, la capatul amino. Acesta este urmat de o secventa cu configuratie nedefinita si cuprinde resturile de cisteina care permit legarea moleculelor în dimeri functionali. Molecula CD8 are rol de coreceptor, participând la recunoasterea antigenului, prin asocierea cu domeniul α -3 al moleculei CMH I.

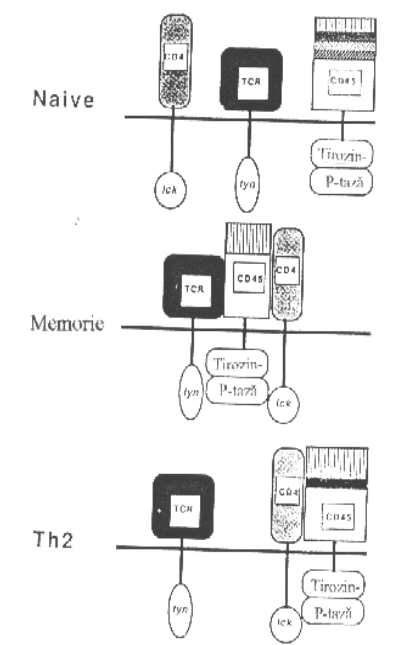


Fig. 65. Diferite aranjamente ale RCT si ale co-receptorilor sai sunt determinate de izoformele lui CD45 exprimate pe celula T. Pe celulele neangajate, CD4, CD45 si RCT migreaza independent pe suprafata celulei. Pe celulele T de memorie, cele trei molecule sunt asociate. Pe celulele Th2 clonate, o izoforma de CD45 cu gr. mol mica, se leaga de CD4, dar acest complex nu se asociaza cu RCT. Activarea optima a celulei are loc în cazul în care cele trei molecule sunt asociate strâns pe suprafata limfocitului (dupa 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:

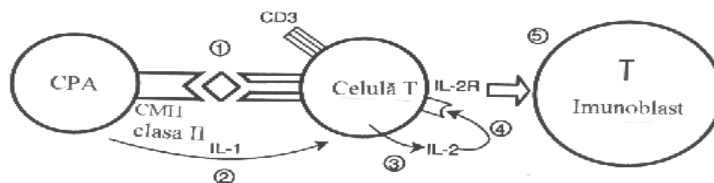


Fig. 66. Mecanismul activării celulei T.

- după legarea limfocitului TCD₄ de CPA, ultima produce IL-1;
- 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 secreta, au efecte activatoare asupra compartimentului imunitatii celulare sau stimuleaza activarea si proliferarea limfocitelor B specifice, în functie de natura antigenului.

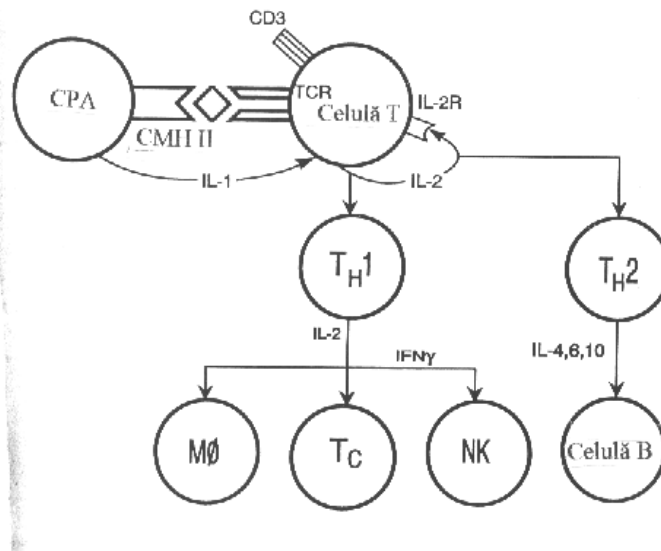


Fig. 67. Amplificarea raspunsului imun.

Pentru ca epitopii sa fie recunoscuti, moleculele CMH trebuie sa expuna simultan pe suprafata celulei, un numar mare de peptide nonself, pentru un interval suficient, astfel încât sa permita limfocitelor T sa controleze calitatea moleculelor CMH ale fiecărei celule.

Timpul de generatie al unei celule T, dupa stimularea antigenica poate fi de 4,5 ore, adica într-o saptamâna, dintr-o singura celula T pot sa rezulte 10^{12} celule, ceea ce ar însemna dublarea numarului de limfocite T în organism. O proteina de dimensiuni medii, cu 2-10 epitopi, poate fi recunoscuta de 10-1000 celule neangajate, în functie de capacitatea moleculelor CMH de a prezenta epitopii peptidici. Consecutiv unei infectii virale, numarul celulelor CD8 cu specificitate fata de antigenele virale, la soarece poate sa creasca de 10 ori.

Durata de viata a limfocitelor T este greu de evaluat, dar moartea lor prin apoptoza este declansata de IL-2 si de antigen. Dupa stimularea ciclului celular sub actiunea antigenului, limfocitele T devin foarte sensibile la apoptoza. Proliferarea celulelor T este stimulata dupa ce IL-2 se fixeaza pe receptorul specific. Dupa unul sau câteva cicluri,

limfocitele T în faza G₁ sau S, devin foarte sensibile la apoptoza. Așa se explică moartea hibridoamelor T ca răspuns la legarea încrucișată a RCT.

Apoptoza celulelor T este declanșată în două situații: sub acțiunea stimulatoră 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 *proliferație*.

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 proliferație a limfocitelor T este inițiată de fixarea IL-2 pe receptorul său. După ce celulele T au parcurs unul sau câteva cicluri celulare și intra în faza G₁ sau S, devin foarte sensibile la apoptoza. 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 apoptoza. 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 apoptoza, 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.

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 imunologica si genereaza plasmocite.

În splina, în absenta cooperarii cu limfocitele Th, consecinta este lipsa de raspuns imun (anergia). Daca are loc cooperarea T-B, se formeaza focare proliferative oligoclonale. Din focare, unele limfocite B migreaza în centrul germinativ si dobândesc memoria imunitara.

Limfocitele B recunosc direct antigenele timo-independente si se activeaza fara sa necesite cooperarea limfocitelor T.

Dupa activare într-un centru germinativ, de catre un antigen T-independent sau dupa interactiuni cu celule Th, celulele B mici în repaus sunt convertite la limfoblaste mari si ulterior acestea evolueaza fie spre plasmocite producatoare de anticorpi, fie se diferentiaza în celule mici de memorie. Procesul de activare în centrul germinativ este însoțit de generarea mutatiilor în regiunea V si comutarea de la IgM, la IgG, IgA sau IgE. Mutatiile maresc diversitatea situsurilor de legare a antigenului. Daca mutatia produce un situs nefunctional, celula activeaza programul mortii genetice (apoptoza). Aceste modalitati de diferentiere sunt influentate de semnale co-stimulatoare si de citochine (IL-2, 4, 6, 10, TGFB).

Limfocitul B leaga specific antigenul în configuratia nativa, prin intermediul receptorului imunoglobulinic de membrana si probabil îl încorporeaza sub forma complexului antigen-anticorp. Asa se explica faptul ca anticorpii specifici fata de proteinele native recunosc *epitopi conformationali discontinui*, alcatuiti din aminoacizi, care în secventa primara sunt localizati la distanta, dar în molecula pliata ajung în proximitate. De aceea, limfocitele B sunt foarte eficiente în procesul captarii, prelucrarii si prezentarii unui antigen injectat în doza foarte mica (de 1 000 de ori mai mica decât doza necesara prezentarii aceluiasi antigen de catre macrofage sau de catre celulele dendritice). Antigenele care stimuleaza receptorii celulelor B sunt diverse: proteine, polizaharide, lipide, molecule mici(arsenat, trinitrofenol).

Importanta limfocitelor B ca prezentatoare de antigen este redusa în cursul raspunsului imun primar, dar devin foarte importante în cursul raspunsului imun secundar, în special în cazul în care doza stimulanta de antigen este foarte mica.

În cursul stimulării antigenice secundare, limfocitele B de memorie, a caror populatie este numeroasa, înglobeaza specific antigenul prin intermediul receptorilor imunoglobulinici (endocitoza mediata de receptori sau prin pinocitoza nespecifica).

Soarta antigenului recunoscut specific de limfocitele B nu este cunoscuta. Antigenul ar ramâne în compartimentul vezicular si 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 constatat 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 anticorpii specifici (sau cu antigenul bivalent specific), moleculele imunoglobulinice membranare se grupează în zone discontinuie ("petice") și ulterior confluează într-o zonă delimitată a membranei, denumită "boneta". 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 sa activeze limfocitul B, prin acelasi mecanism. Ele au epitopi repetitivi care leaga simultan mai multi receptori de antigen ai membranei limfocitului B. Punctile moleculare între receptorii de antigen, declanseaza semnalul activator al limfocitului, materializat în proliferarea si diferentierea sa.

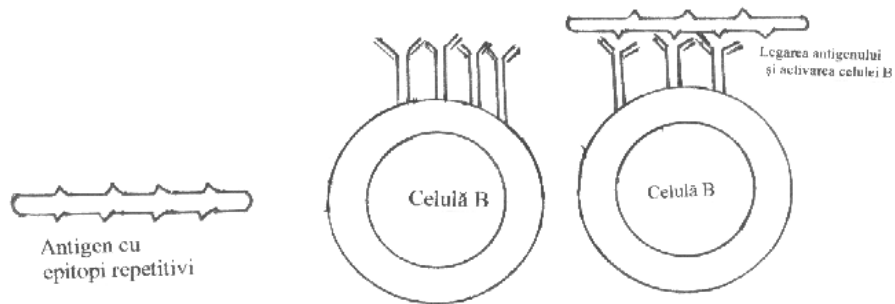


Fig. 68. Activarea limfocitului B, după legarea unui antigen cu epitopi repetitivi.

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 *lectinele** din semintele 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 ubicvită, lectinele îndeplinesc funcții biologice importante, fiind molecule de recunoaștere în diferite procese biologice:

- eliminarea glicoproteinelor din circulație
- aderența agenților infecțioși de celulele gazda 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, galactoză, N-acetilglucozamina, L-fucoză 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 peplousului viral este lectina specifică pentru a c i d u l N-acetil neuraminic, iar lectinele suprafeței bacteriene mediază legarea celor patologice 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-adezive a infecțiilor bacteriene.

Unele lectine ale suprafeței celulei bacteriene mediază legarea specifică de fagocitele (PMN, macrofage) umane și de soarece, în absența opsoninelor, rezultatul fiind fagocitoză, 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 membrana cu diferite specificități și pare a avea rol în clearance-ul glicoproteinelor și chiar al celulelor (eritrocite îmbatrânite, bacterii) din circulație.

Interacțiunile adezive mediate de glucidele de suprafață și de

selective, controleaza traficul leucocitelor spre situsurile inflamatorii si migrarea (homing) a limfocitelor în organele limfoide specifice.

Raspunsul limfocitelor B la lectine este *policlonal*, deoarece sunt activate limfocitele cu specificitati multiple de legare a antigenului. *In vitro*, la concentratii mari, unele mitogene activeaza toate clonele de limfocite B, inclusiv pe cele de memorie, independent de specificitatea lor antigenica. La concentratii mici, mitogenele pot produce chiar activarea specifica a limfocitelor B. Receptorii de mitogene nu se cunosc, dar sunt diferiti de receptorii imunoglobulinici pentru antigene.

Limfocitele T sunt stimulate policlonal de PHA, Con A, iar PWM (pokeweed mitogen) stimuleaza celulele T si B.

Alti activatori policlonali ai limfocitelor B si ai diferentierii lor la plasmocite sunt virusul Epstein-Barr, concentratiile mari de endotoxine ale bacteriilor Gram negative, polizaharidul de *Str. pneumoniae*, ficolul, polimerii D-aminoacizilor, polivinil-pirolidona. Toate aceste antigene persista îndelung în organism, pe suprafata macrofagelor din sinusul subcapsular al ganglionilor limfatici si în zona splenica marginala. Ele leaga încrucisat receptorii imunoglobulinici ai limfocitelor B.

Celulele B ale noilor nascuti nu raspund bine la antigenele timo-independente, ceea ce are consecinte importante pentru eficienta vaccinurilor polizaharidice la copiii mici.

Semnificatia fiziologica a activarii policlonale nu este clara. Dupa activarea nespecifica policlonală, se sintetizeaza anticorpi a caror specificitate nu este totdeauna complementara antigenului inductor. De exemplu, limfocitele B stimulate de virusul Epstein-Barr sintetizeaza anticorpi care se combina cu fosforil-colina, o molecula absenta în structura virionilor, dar prezenta în peretele celular de *Str. pneumoniae*. Activarea policlonală a limfocitelor B este importanta în fazele timpurii ale infectiei, dar are si posibile consecinte negative ce constau în inducerea variatelor fenomene autoimune.

Cooperari celulare în elaborarea raspunsului imun

De cele mai multe ori, sinteza anticorpilor dupa stimularea antigenica, este rezultatul interactiunilor stimulative ale limfocitelor B conventionale (B₂), cu limfocitele Th. Un antigen macromolecular poate fi considerat ca un complex format din carrier si determinanti haptenici (epitopi), recunoscuti de limfocitele Th si B.

Antigenele care pentru stimularea raspunsului imun necesita cooperarea celor doua populatii de limfocite, apartin grupului larg al *antigenelor timo-dependente*. Ele sunt reprezentate de proteinele heterologe, de polipeptidele sintetice, de hematiile heterologe, de

flagelina monomera etc. Cele mai multe antigene moleculare, în special de natura proteica sunt timo-dependente.

Cooperari celulare T-B-macrofag. Pentru declansarea raspunsului imun, antigenele timo-dependente necesita cooperarea limfocitelor Th, cooperare supusa restrictiei moleculelor CMH. Aceste antigene se comporta ca univalente, în raport cu specificitatea antigenica a fiecarui determinant si de aceea, în absenta cooperarii celulare, ele sunt ineficiente în stimularea raspunsului imun. Pe de alta parte, antigenele timo-dependente pot fi prea repede degradate de celulele fagocitare. Nu au activitate mitogenica, iar daca se leaga de receptorii limfocitelor B, aceste antigene se comporta ca haptene si nu declanseaza diferentierea celulelor B.

De cele mai multe ori, limfocitele cooperante Th si B recunosc epitopi diferiti ai aceleiasi molecule de antigen solubil nativ, neprelucrat, dar expus pe suprafata limfocitului B. Limfocitele B recunosc epitopi *conformationali* ai antigenelor proteice mici, iar limfocitele Th recunosc epitopi *secventiali*, de 10-20 aminoacizi. Cele doua celule cooperante adera una de alta. Dupa ce recunoaste antigenul, celula Th activata secreta IL-2 în spatiul intercelular îngust, cu rol declansator al stimulării limfocitului B. Clona de limfocite B, cu receptori specifici pentru epitopul antigenic, prolifereaza. Astfel, se produce fenomenul *expansiunii clonale*.

Limfocitele Th si B coopereaza si în cazul în care recunosc epitopi diferiti ai unui antigen, asociati cu moleculele CMH II, pe suprafata unei CPA.

Majoritatea antigenelor solubile si toate antigenele corpusculare sunt captate si prelucrate de macrofage si de celulele dendritice si sunt prezentate în asociatie cu moleculele CMH II. Epitopii acestor antigene, de cele mai multe ori cu specificitate diferita, sunt recunoscuti de limfocitele B si Th. Limfocitele Th se activeaza si elibereaza IL-2 cu efect stimulator asupra limfocitului B, care prolifereaza si se diferentiaza pâna la celula cap de serie – plasmocitul – ce sintetizeaza si secreta anticorpi specifici fata de epitopul stimulator al limfocitului B.

Activarea limfocitelor B, indusa de antigenele timo-independente

Antigenele timo-independente se numesc astfel, deoarece declanseaza raspunsul imun prin activarea directa a limfocitelor B, fara sa necesite cooperarea limfocitelor Th. Antigenele timo-independente sunt molecule mari, neproteice: polizaharidul capsular de *Streptococcus*, ficolul (polimer de sucroza), dextran-sulfatul, LPS ale bacteriilor Gram negative, levanii (polimeri de fructoza),

polivinil-pirolidona.

Antigenele timo-independente au trei proprietati comune:

– au *secvente repetitive* în structura lor chimica. Aceasta conditie nu este suficienta si nici definitorie pentru calitatea de antigen timo-independednt, deoarece polimerii sintetici ai L-aminoacizilor, au secvente repetitive, dar sunt antigene timo-dependente;

– au o *structura tridimensionala* care favorizeaza interactiunea directa cu receptorii de antigen ai limfocitelor B;

– sunt *molecule rezistente* la actiunea enzimelor degradative si persista îndelung în organism.

Limfocitele T nu coopereaza la elaborarea raspunsului imun indus de antigenele polizaharidice, deoarece acestea sunt rezistente la procesele degradative si nu furnizeaza oligozaharide care sa se poata asocia cu moleculele CMH II. Fragmentele moleculare eventual rezultate din procese degradative, se leaga cu afinitate mica de proteine si nu se asociaza cu moleculele CMH II.

Cele doua categorii functionale de antigene nu sunt strict delimitate în ceea ce priveste mecanismul activarii raspunsului imun. Dupa degradarea structurilor repetitive, antigenele timo-independente devin timo-dependente. De exemplu, glucagonul(antigen timo-dependent), dupa clivare cu tripsina, elibereaza doi determinanti antigenici: unul corespunzator capatului N-terminal, timo-independent si cel corespunzator capatului C-terminal, timo-dependent(stimulator al limfocitelor Th).

Activarea limfocitelor B₁

Limfocitele B₁ par sa fie stimulate si sa produca anticorpi dupa un mecanism independent de celulele T. Aceste celule au nivele înalte de IgM pe suprafata lor, apar timpuriu în ontogenie si migreaza predominant în *cavitatele peritoneala si pleurala*, au capacitate de reînnoire si manifesta diferite specificitati de legare a epitopilor antigenici. Celulele B₁ recunosc antigenele bacteriene comune (fosforil-colina), Ig, ADN, proteinele membranare eritrocitare.

Spectrul reactivitatii nu este limitat la molecule nonself, ci se manifesta si fata de molecule proprii: hormoni (insulina, tiroglobulina), constituinti celulari (ADN, miozina, tubulina, fosfolipide, fragmentul Fc al IgG autolog). Sinteza auto-anticorpilor de catre celulele B₁ este argumentata de faptul ca expansiunea neoplazica a acestor celule (ca în leucemia limfocitara cronica) este adeseori asociata cu simptomele autoimune.

Celulele B₁ au un rol important în imunitatea înscută, deoarece secreta 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, deriva 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 (placi Peyer și centri germinali).

Un alt situs strategic de apărare antimicrobiană este *zona marginală a splinei*, localizată la jonctiunea 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 parasesc epiderma prin vasele limfatice eferente, devin celule cu vial 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 *centrii germinativi*.

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 intensifica traficul limfocitar spre ganglionii regionali. Concomitent se produce obturarea cailor de iesire a limfocitelor din ganglion, dar rata curgerii limfei nu se modifica. Sub actiunea unor factori locali (prostaglandine, factori de aderenta) se maresc gradul de aderenta limfocitelor si astfel în ganglioni se formeaza un "dop" limfocitar.

2) Dupa 1-2 zile se intensifica iesirea limfocitelor ganglionare în fluxul limfatic eferent. În ganglion sunt retinute limfocitele care au recunoscut specific antigenul.

3) În cea de a III-a si a IV-a zi dupa stimularea antigenica se intensifica proliferarea limfocitelor activate si în limfa eferenta apar limfoblaste. Acestea au proprietati specifice de homing: vor migra în alti ganglioni si în noile sedii se diferentiaza în celule care sintetizeaza anticorpi (plasmocite).

4) Dupa cea de a IV-a zi diminueaza generarea blastelor. Din celulele stimulate rezulta celule de memorie care trec în sânge si devin circulante.

Stimularea cu antigene timo-dependente este însoțita de formarea *centrilor germinativi*. În centrul germinativ, limfocitele B proliferante se gasesc în asociatie cu limfocitele Th.

Dinamica raspunsului imun mediat humoral

În serul normal, cantitatea totala de imunoglobuline este de 10 mg/ml (circa 5×10^{16} molecule).

Înainte de imunizare, anticorpii serici specifici fata de un antigen dat, sunt sub nivelul detectabil prin metodele clasice.

Raspusul imun generat dupa contactul primar al organismului cu antigenul constituie raspusul imun primar, în a carui dinamica se disting trei faze:

- faza de latentă
- faza de crestere a titrului anticorpilor
- faza de scadere a titrului anticorpilor serici.

Faza de latentă este intervalul cuprins între momentul stimulării antigenice si începutul creșterii titrului anticorpilor serici. Durata sa este foarte variabila în functie de *natura antigenului* (de exemplu, 2-3 zile pentru hematiile de berbec si 20 de zile pentru toxina difterica), *de doza* de antigen administrata, *de calea* de administrare (subcutana, intramusculara, intravenoasa), *de modul* de administrare (cu sau fara adjuvant).

Latenta este mai scurta pentru antigenelor corpusculare. Perioada de latenta este necesara expansiunii clonale. La contactul primar al sistemului imunitar cu antigenul, în organism se gaseste o populatie numeric restrânsa de limfocite care recunosc specific antigenul. In perioada de latenta, clona de limfocite activata specific, prolifereaza intens (cu o succesiune de circa 8 generatii celulare) si va produce o populatie de celule, corespunzatoare numeric reactiei de aparare a organismului.

Faza de crestere a titrului anticorpilor serici începe la sfârșitul perioadei de latenta. Titrul anticorpilor creste cu o rata exponentiala. Durata sa este foarte variabila: fata de hematiile de berbec, titrul maxim al anticorpilor este atins la 4-5 zile, iar al anticorpilor anti-toxina difterica, la circa 90 de zile. Titrul ramâne maxim (în platou), câteva zile, dupa care începe sa scada.

Faza de scadere a titrului anticorpilor începe curând dupa atingerea valorii maxime. Rata scaderii depinde de rata sintezei, de rata degradarii anticorpilor, dar si de cantitatea de antigen disponibil, care leaga anticorpii în complexe, determinând scaderea 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 crestere si de scadere a titrului, anticorpii sunt detectabili prin reactii secundare *in vitro*, de aglutinare si de precipitare.

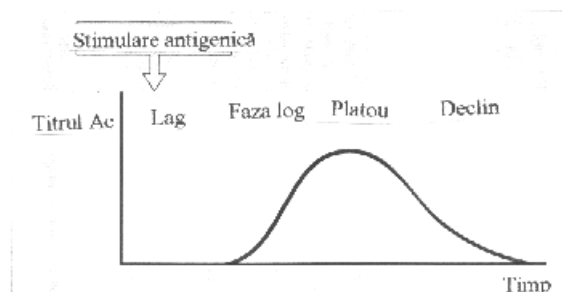


Fig. 69. Cele 4 faze caracteristice ale răspunsului: faza de lag, faza creșterii logaritmice a titrului anticorpilor, faza de platou și faza de declin, în timpul careia anticorpii sunt catabolizati. Dinamica răspunsului imunitar depinde de natura antigenului și de specia gazda.

În perioada de debut a răspunsului imunitar primar se sintetizeaza IgM. După câteva zile se detecteaza IgG, care atinge un titru maxim mai înalt decât IgM. Titrul IgM începe sa scada, înainte ca titrul IgG sa atinga valoarea maxima. La nivelul maxim al titrului anticorpilor, IgG este de circa 10 ori mai concentrat decât IgM, ceea ce denota ca după

activare, desi majoritatea limfocitelor B (circa 90%) au ca receptor de antigen molecula de IgM, dupa activare *comuta* sinteza de la izotipul IgM la izotipul IgG.

Unele limfocite ale clonelor în expansiune, nu se diferentiaza în plasmocite, ci sintetizeaza molecule de imunoglobulina care ramân asociate membranei citoplasmatică. În tehnica hemolizei localizate în gel, aceste celule nu produc plaje de liza. Ele constituie substratul celular al *memoriei imunitare*.

Raspunsul imun are caracter adaptativ si se caracterizeaza prin trei trasaturi esentiale (care lipsesc reactiilor de aparare nespecifice, înnascute):

- *specificitatea* (anticorpii se combina cu antigenul inductor)
- *diversitatea izotipica* si a situsului de combinare
- *memoria* (pastrarea memoriei experientei contactului cu antigenul).

Diversitatea. Moleculele de anticorpi sunt foarte heterogene în ceea ce priveste izotipul (IgG, A, M, E). IgM dispare relativ repede, dar IgG si IgA persista la titruri scazute, nedectabile prin metodele obisnuite, pentru perioade variabile (saptamâni, ani). Anticorpii sunt heterogeni din punctul de vedere al specificitatii de legare cu diferiti epitopi ai antigenului inductor.

Anticorpii raspunsului imun primar (IgM si IgG), în general, au *afinitate* scazuta, dar *aviditatea* lor este mare.

Afinitatea anticorpilor masoara forta de legare dintre un epitop si situsul de combinare al anticorpului specific. Afinitatea este rezultanta fortelor de atractie (legaturi de H, forte electrostatice, forte van der Waals, legaturi hidrofobe), dintre cele doua grupari reactante.

Aviditatea masoara forta rezultanta a afinitatii dintre epitopii multipli si paratopii complementari si este consecinta faptului ca cele mai multe antigene sunt mozaicuri de epitopi. Complexele antigen-anticorp cu IgM au aviditate mare, deoarece anticorpul este decavalent.

RASPUNSUL IMUN HUMORAL SECUNDAR

Raspunsul imun secundar este expresia *memoriei imunitare*. Memoria defineste capacitatea unui organism de a elabora un raspuns imun mai eficient, adica mai rapid, dar în special mai intens, dupa contactul secundar cu antigenul.

Raspunsul imun secundar fata de antigenele *timo-independente* este comparabil cu raspunsul 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. *Maduva 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.

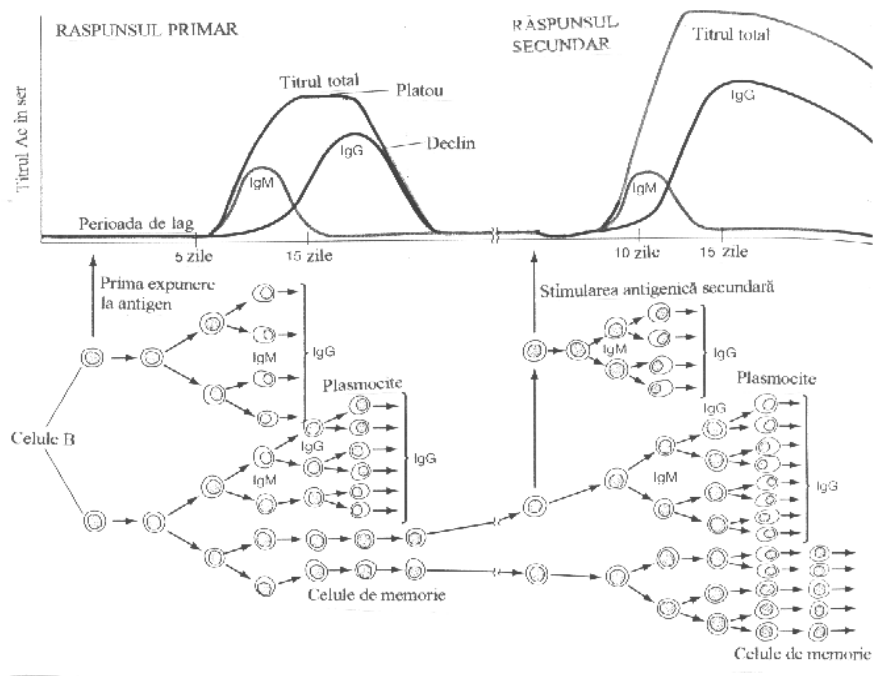


Fig. 70. Răspunsul imun primar și secundar față de un antigen macromolecular. Este ilustrată corelarea titrului anticorpilor cu activitatea celulelor B. Citochinele reglează comutarea sintezei de la IgM la IgG.

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 *mutatii 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 *centrii germinative*, 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

apoptoza.

Mutatiile sunt mai ales *punctiforme*, cu foarte rare deletii sau insertii a nucleotidelor unice.

Sinteza anticorpilor cu afinitate înalta are doua consecinte practice importante:

– complexe antigen-anticorp sunt greu dissociabile si se elimina mai rapid din mediul intern;

– anticorpii dau reactii încrucisate cu antigenele înrudite.

Reactiile încrucisate ale anticorpilor cu afinitate crescuta au o importanta practica deosebita, pentru ca imunizarile cu antigene înrudite, pot avea efecte neasteptate. De exemplu, indivizii adulti vaccinati cu virusul influenza, pot sa produca, surprinzator, anticorpi cu un titru mai mic fata de antigenul folosit în vaccinare, decât titrul anticorpilor fata de o tulpina de virus care a produs o infectie la vârsta copilăriei. Acesta este fenomenul "amintirii pacatului originar" si sta la baza studiilor epidemiologice retrospective, pentru precizarea serotipului unui agent infectios care a declansat epidemii trecute. Explicatia consta în faptul ca imunizarea primara genereaza celule cu memorie fata de mai multe antigene înrudite. La reîntâlnirea cu unul din antigenele înrudite, este stimulata o populatie de celule care recunoaste determinanti antigenici comuni. Se sintetizeaza anticorpi care se combina cu ambele variante antigenice, desi, uneori, anticorpii specifici fata de epitopii celui de al II-lea antigen pot sa lipseasca.

Comutarea izotipului consta în trecerea de la sinteza IgM în cursul raspunsului imun primar, la sinteza altor izotipuri, în special IgG, în raspunsul imun secundar.

La nivel molecular, comutarea izotipului este rezultatul deplasarii complexului genic VDJ, de la pozitia sa originala, adiacenta capatului 5' al genei C_{μ} , într-o pozitie noua, adiacenta capatului 5' al altei gene C, de exemplu C_{γ} . Dupa aceasta aranjare genica, toata secventa genica dintre pozitia initiala a complexului VDJ si localizarea finala, este eliminata prin deletie. Procesul rearanjării genelor se numeste *recombinare prin comutare* (switch recombination).

Exceptia de la acest mecanism este sinteza simultana a receptorilor de membrana IgM si IgD (mIgM si mIgD), de catre celulele B mature. Sinteza catenei δ nu implica recombinarea prin comutare, ci este rezultatul înădirii alternative a exonilor unei copii de ARN premesager care contine genele VDJ, cu secventa genei C_{μ} sau a genei Cd.

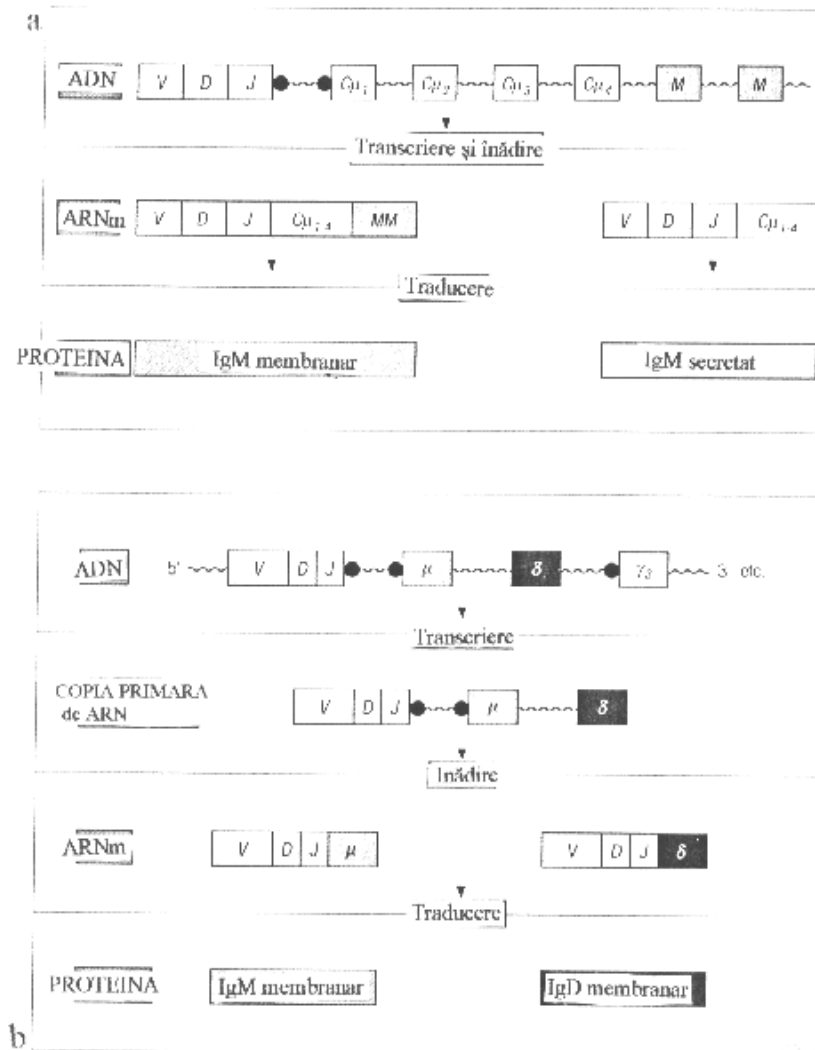


Fig. 71. **a.** Mecanismul *înădirii genice* pentru comutarea de la IgM membranar, la IgM secretat. Pentru forma secretată, secvența hidrofobă codificată de exonii M-M care ancorează IgM receptor de membrana este eliminată. **b.** IgM și IgD cu funcția de receptori de antigen, coexistă pe aceeași celulă, 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 recombinate 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 10^6 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 *doza*, 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 persistentă 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 înalta afinitate fata de antigenul stimulant, în timp ce dozele mari ale aceluiași antigen stimulează clonele de limfocite de înalta și de mica 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 injecție, 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 injecția 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 injecția unei cantități prea mari de antigen ușor metabolizabil, cât și după injecția 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 stimulantă 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, injecțiile 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 adjuvantii 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 soarece, 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 alți 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 oricarui proces de imunizare, dar au specificitate față de antigene cunoscute. De exemplu, în serul de soarece se găsesc anticorpi anti-hematie de berbec. Denumirea de anticorpi "naturali" sau "spontani" s-a folosit pentru a-i distinge de anticorpii sintetizați după imunizare. Anticorpii naturali se sintetizează ca urmare a stimulării imunitare continue, sub acțiunea antigenelor microbiotei intestinale. Funcțiile anticorpilor naturali sunt controversate.

Anticorpii naturali sunt *polireactivi*, adică dau numeroase reacții încrucișate, cu o diversitate de antigene (polizaharide, proteine, acizi nucleici), de diferite origini: virale, bacteriene, fungice sau ale parazitilor multicelulari.

O importanță deosebită au anticorpii naturali ce se leagă cu **d e t e r m i n a n t u l** 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 B_1 .

Sinteza anticorpilor naturali se datorează faptului că, postnatal, organismele sunt supuse stimulărilor antigenice multiple, cu antigene de diferite origini (virale, bacteriene, fungice, alimentare), care patrund 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.

Anticorpii naturali aparțin izotipului IgM. Din aceeași categorie fac parte *aglutininele sanguine* α și β . Sinteza lor are loc înainte de naștere, în afara oricărei stimulări antigenice.

Anticorpii naturali, datorită spectrului larg de legare cu antigene majore comune diferitelor agenți patogeni, au rolul de *molecule de recunoaștere ale imunității înnascute*.

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 bolile 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, atașate 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 precipitați *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 (secvență leader), care este clivată în timpul transferului în lumenul cisternei de reticul

endoplasmic. Cele doua tipuri de catene se sintetizeaza ca unitati de sine statatoare si ulterior se asambleaza pentru a forma o structura tetracatenara. Moleculele de imunoglobulina sintetizate, se acumuleaza în cisternele reticulului endoplasmic granular si ulterior sunt transferate în cisternele Golgi. La acest nivel se formeaza legaturile S-S si se ataseaza grupurile glucidice. Compozitia componentei glucidice este variabila, dar ca structura de baza este reprezentata de N-acetil-glucozamina, manoză, galactoză, fucoză, acid sialic. Legarea primelor doua monozaharide începe în momentul în care catena H este atasata de polisom. Catena polizaharidica se alungeste progresiv, pe masura ce proteina se deplaseaza în cisternele Golgi. Moleculele de anticorpi parasesc aparatul Golgi, în vezicule secretorii, care fuzioneaza cu membrana citoplasmatica si elibereaza continutul la exterior.

Glicozilarea este o conditie obligatorie pentru secretia moleculelor de imunoglobulina.

Moleculele de IgA si IgM prezinta forme polimerizate. Asocierea polimerilor este catalizata de lantul J. Polimerizarea are loc concomitent cu secretia. In citoplasma plasmocitului nu se gasesc molecule polimerizate.

În celulele care sintetizeaza imunoglobuline destinate secretiei, catenele L se gasesc în mic exces fata de catenele H. Pentru fiecare din cele doua tipuri de catene, exista un numar egal de molecule de ARN, dar catena L se sintetizeaza de doua ori mai repede decât catena H, având dimensiuni de doua ori mai mici.

Catabolismul imunoglobulinelor

Catabolismul imunoglobulinelor s-a studiat utilizând moleculele marcate cu ^{125}I sau ^{131}I . Primul are timpul de înjumătățire de 57 de zile, iar al II-lea, de 8 zile. Iodul radioactiv se cupleaza cu nucleul aromatic al tirozinei, sub actiunea blânda a unor agenti oxidanti (H_2O_2 , cloramina T), care maresc sansa ca molecula de imunoglobulina marcata sa ramâna nemodificata din punct de vedere structural si functional. Rata scaderii radioactivitatii, reflecta rata catabolizarii proteinei native. Catabolizarea imunoglobulinei este o reactie de ordinul 1, adica din molecula nativa rezulta produși finali de catabolism.

Cantitatea de imunoglobulina catabolizata(dlg) într-un interval de timp (dt) este direct proportionala cu concentratia moleculelor în sânge si este constanta, conform relatiei: $d \text{Ig}/dt = k \text{Ig}$ (k reprezinta rata catabolizarii imunoglobulinelor, adica fractia de molecule din cantitatea totala, ce se catabolizeaza în unitatea de timp, de obicei în 24 de ore).

Rata de catabolizare este o reflectare directa 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 acceptiunea ipotezei, *moleculele fixate pe receptorii celulelor, sunt protejate de procesele degradative și parasesc 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 imunoglobulină 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 imunoglobulină, 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 imunoglobulină au suferit o modificare conformatională 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 leaga moleculele native de imunoglobulina.

Utilizari ale serurilor imune

Cea mai larga utilizare (în perioada 1920-'40) a serurilor imune a constituit-o domeniul *seroterapiei* (terapia de urgenta a unor infectii septicemice, a infectiei difterice, scarlatinoase, tetanice, rabice). Dezavantajul major este ca serurile imune contin nu numai anticorpii specifici, ci si toate celelalte proteine serice, care sunt imunogene pentru organismul receptor si induc raspunsul imun, adeseori cu manifestari patologice (boala serului).

Anticorpii se folosesc în tehnici si metodologii de *diagnostic imunologic*. Utilizarea lor depinde de posibilitatea de a-i produce pe iepure, capra, berbec sau cal. Principalele directii de utilizare a anticorpilor sunt urmatoarele:

- în determinarile fine ale unor cantitati mici de antigene (tehnicele ELISA, RIA);
- pentru purificarea proteinelor în cromatografia de afinitate;
- pentru identificarea unor medicamente în ser si urina;
- pentru detoxifierea organismului de droguri (eliminarea digoxinei dupa intoxicare prin administrarea îndelungata la pacientii cu insuficienta cardiaca);
- pentru identificarea unui agent infectios, prin reactiile serologice care utilizeaza seruri imune cu specificitate cunoscuta (serotipizare).

IMUNITATEA MEDIATA CELULAR

Raspunsul imun mediat celular s-a evidentiat înainte de descoperirea diferentelor functionale dintre limfocitele T si B, odata cu observatia ca unele antigene induc reactii inflamatorii a caror intensitate nu este corelata cu titrul anticorpilor serici. La indivizii la care anticorpii serici nu sunt detectabili, pot fi produse reactii de hipersensibilitate întârziata, ca manifestari directe ale raspunsului imun mediat celular.

În organism, imunitatea mediata celular îndeplineste urmatoarele functii:

- protectia fata de infectiile bacteriene cu localizare intracelulara, fata de infectiile fungice, virale si cele produse de protozoare;
- rezistenta fata de multe tipuri de celule tumorale;
- mediator al proceselor inflamatorii asociate cu diferite procese

infecțioase;

– respingerea alogrefelor.

În toate aceste cazuri, reacția imună mediata 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.

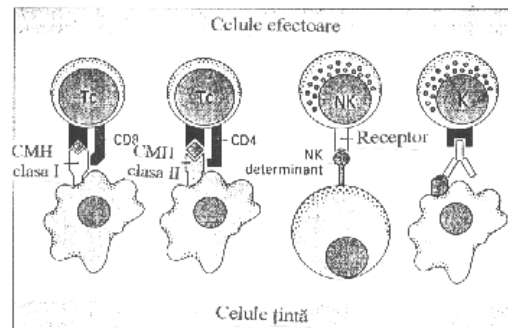


Fig. 72. Citotoxicitatea mediata celular. Celulele T (CD8 și unele celule CD4) recunosc antigenul asociat cu moleculele CMH. Celulele NK detectează absența moleculelor CMH I autologe pe celula țintă și a unor liganzi puțin cunoscuți pe celulele tumorale. Celulele K recunosc regiunea Fc a IgG legat pe antigenele de suprafața 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 liza
- dezintegrarea celulei țintă.

Limfocitul Tc recunoaște antigenul de pe suprafața celulei țintă,

prin intermediul receptorului de antigen.

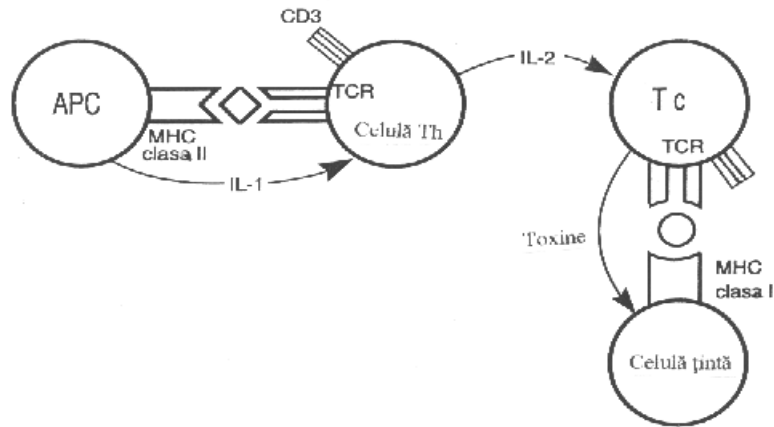


Fig. 73. Interactiuni celulare în procesul litic al celulei tinta.

La contactul cu celula tinta, mobilitatea limfocitului Tc se accentueaza si întreaga suprafata a celulei tinta este explorata în câteva minute. Stadiul de recunoastere dureaza circa un minut si necesita obligatoriu prezenta cationilor bivalenti (Ca^{2+}).

Programarea pentru liza consta în eliberarea moleculelor cu efect citotoxic. În spatiul îngust al jonctiunii cu celula tinta, limfocitul Tc elibereaza o proteina citolitica (o limfotoxina) de 70 kD denumita *perforina* si *granzimele* (enzime asociate granulelor): *serin-proteaza* (denumita *granzima B*), o *cistein-aspartic proteaza* (*caspaza*). Caspazele sunt proteaze din categoria cistein-proteazelor, care necesita pentru actiunea lor, intermediari covalenti cisteinil-aspartat. Ele cliveaza substraturi celulare specifice care produc modificari ale citoscheletului si cromatinei ce declanseaza moartea apoptotica a celulei tinta. Specificitatea stricta a actiunii lor este neobisnuita la proteaze.

Perforina si granzimele sunt principalele molecule ale granulelor celulelor TCD₈ si NK. Actiunea lor este sinergica.

Proteazele determina liza rapida a celulei tinta, iar celelalte proteine cu efect citotoxic actioneaza lent. Perforina se polimerizeaza si formeaza pori transmembranari, cu diametrul de 10 nm. Din acest punct de vedere, modul sau de actiune se aseamana cu C₉.

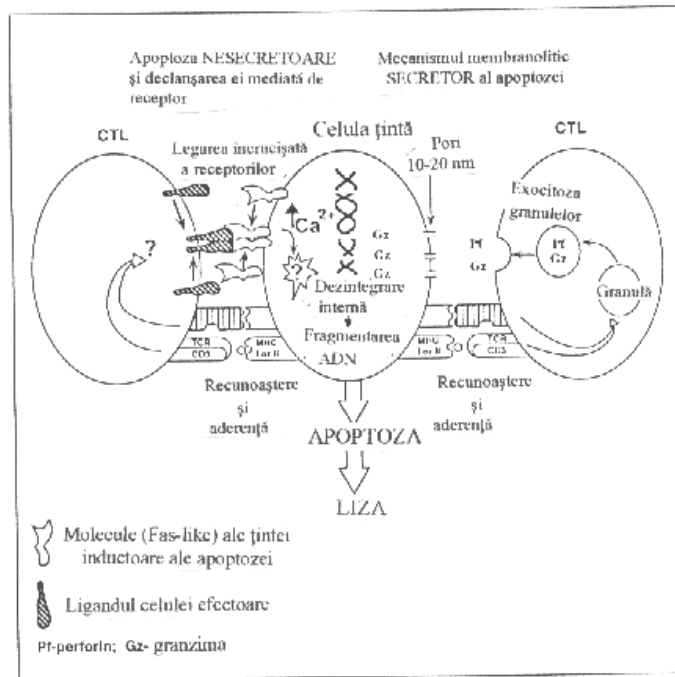


Fig. 74. Ilustrarea schematica a celor doua mecanisme ale citotoxicitatii: exocitoza granulelor de perforina/granzima si citotoxicitatea mediata prin interactiunea FasL/Fas, produsa de limfocitele Tc CD8⁺ si CD4⁺.

Dezintegrarea celulei tinta se caracterizeaza prin aparitia leziunilor membranare si dureaza circa 100 minute. Este un proces dependent de temperatura si nu necesita prezenta limfocitului Tc, desi în prezenta sa procesul este accelerat.

Dupa contactul cu o celula tinta, limfocitul Tc se deplaseaza pentru a explora alte celule. Procesul de recunoastere a antigenului este limitat (restrictiv) de identitatea moleculelor CMH I.

Limfocitul Tc este rezistent la actiunea litica a proteinelor proprii, deoarece granzimele sunt sintetizate ca prepropeptide. Dupa clivajul peptidilor leader, moleculele sunt transportate prin cisternele golgiene pâna la granulele omologe lizosomilor. Pentru liza unei celule tinta, limfocitul Tc elibereaza 10% din continutul sau toxic.

Al II-lea mecanism al citolizei, independent de Ca²⁺ si de perforina (descries în 1993) este mediat de interactiunea receptorului Fas cu ligandul Fas (FasL). Receptorul Fas (CD95) este exprimat pe celula

tinta, iar ligandul Fas (Fas L = CD95L) este exprimat pe limfocitele T citotoxice.

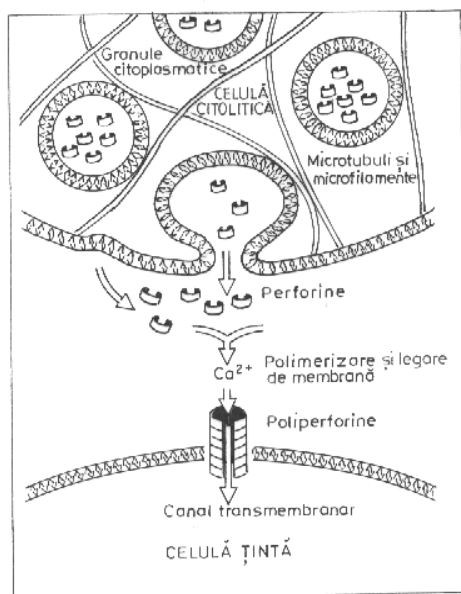


Fig. 75. Reprezentare schematică a rolului *perforinelor citolitice* asupra celulei tinta (dupa Male si colab., 1987).

În concluzie, limfocitele T citotoxice pot media liza celulei tinta, fie prin exocitoza granulelor citolitice, care contin complexul perforina-granzima, fie prin interactiuni între receptorul *Fas* si ligandul *Fas*.

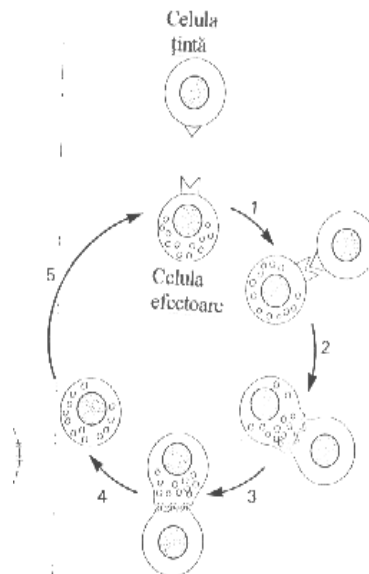


Fig. 76. După eliberarea conținutului enzimatic, *celula efectora* rămâne viabilă și funcțională față de alte celule țintă.

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 mitomicina C sau prin iradiere X. După tratament, proprietățile antigenice rămân nemodificate, dar limfocitele devin neproliferante. În 4-5 zile, limfocitele populației viabile sunt stimulate, proliferază 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 exocitoză și în activarea perforinei.

Limfocitele granulare mari (LGL, Large granular lymphocytes) sunt celule non-T, non-B, efectora ale citotoxicității mediate celular și au receptori pentru regiunea Fc a imunoglobulinelor. Raportul nucleocitoplasmatic este mic, cu multe granule azurofile în citoplasma. Datorită dimensiunilor mai mari și densității mai mici, LGL pot fi ușor

separate de limfocitele mici, prin centrifugare. Efectul lor citotoxic s-a evidentiat *in vitro*, pentru celulele umane si de soarece. Ele reprezinta 5-10% din totalul limfocitelor circulante si recunosc celulele purtatoare de antigene prin mecanisme distincte.

a) *Celulele NK* (Natural killer) se identifica, datorita capacitatii lor de a adera la suportul de plastic, dupa 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 si separate de limfocitele T, a caror activare si exprimare a moleculelor membranare de aderenta, necesita o perioada mai lunga de timp. *In vitro*, celulele NK lizeaza spontan o varietate de celule maligne, celule infectate cu virusuri sau celule alogenice, într-o interactiune nespecifica ce nu este restrictiva în raport cu identitatea moleculelor CMH. Imunizarea prealabila a organismului cu celule sensibile, nu ridica nivelul citotoxicitatii nerestrictive în raport cu moleculele CMH si de aceea se numesc "ucigase naturale".

Nu se cunoaste receptorul prin care celula NK interactioneaza cu celula tinta si nici structura membrana a celulei tinta recunoscuta de celula NK. Moleculele CMH I de pe suprafata celulei tinta, cel putin uneori, inhiba liza mediata de celulele NK, asa cum arata studiile *in vitro*. Aceste observatii au condus la ipoteza ca celulele NK sunt specializate sa recunoasca si sa lizeze celulele cu nivele scazute ale moleculelor CMH I. Activitatea lor citotoxica este stimulata de interferon.

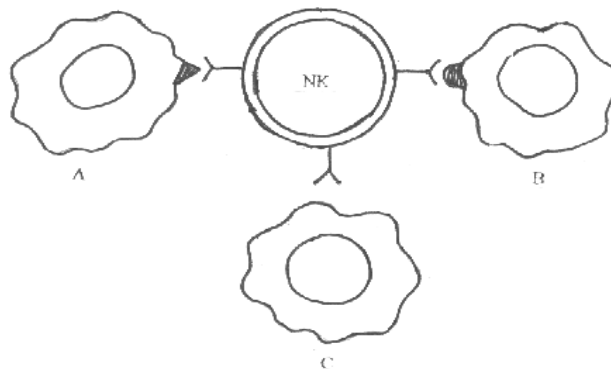


Fig. 77. Celulele NK nu lizeaza celulele self normale (A), dar lizeaza celule alogenice (B) sau celulele self care nu exprima molecule CMH clasa I (C). Celula NK exprima cel putin un receptor specific cu rol inhibitor al interactiunii cu moleculele autologe CMH clasa I. Dupa infectia virala sau ca o consecinta a transformarii maligne, celulele autologe pierd o proportie importanta a moleculelor CMH I, fiind înlocuite de peptidele

anormale. În ambele cazuri, aceste celule devin sensibile la liza mediata de celulele NK. Celulele alogene care exprima 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 contin 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, mediata de receptorii pentru regiunea Fc, este cunoscută sub denumirea de *citotoxicitate mediata 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*).

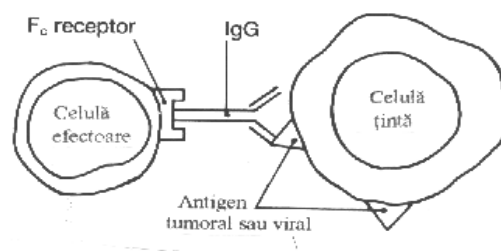


Fig. 78. Ilustrarea schematică a mecanismului *citotoxicității mediate de anticorpi*

(ADCC).

Dupa activarea cu stimuli exogeni (de exemplu, IL-2), unele limfocite T si celulele NK se activeaza: cresc ca dimensiuni, creste numarul granulelor si dobândesc capacitatea de a lega si 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 mediaza citotoxicitatea nerestrictiva în raport cu moleculele CMH, fata de o varietate de tinte, dupa activarea *in vivo* sau *in vitro* numai cu IL-2 sau în amestec cu alte citochine. Celulele LAK nu reprezinta o categorie speciala de limfocite, ci deriva preponderent din celulele NK, dar si din limfocitele T. Mai putin de 1% din totalul celulelor T, care mediaza citotoxicitatea nerestrictiva în raport cu moleculele CMH, sunt pre-cursorii celulelor LAK. Ce-lulele LAK secreta citochine: TNF- α si interferon.

Celulele purtatoare de molecule nonself (malig-nizate sau infectate cu virusuri) sunt recunoscute de monocite si chiar de PMN eozinofile, care au activitate litica asupra celulelor tinta.

Macrofagele si monocitele activate sunt mai mari decât celulele în repaus, exprima mai intens moleculele CMH II si au continut lizosomal mai bogat.

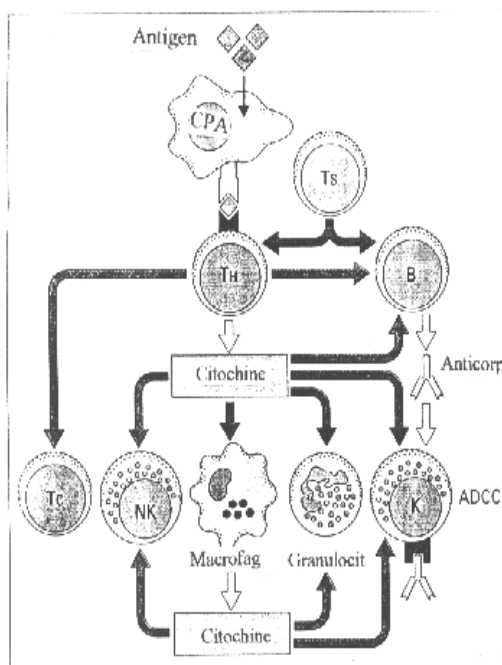


Fig. 79. Celulele Th au rol esential în IMC. Celulele accesorii prelucreaza antigenul si îl prezinta limfocitelor Th. Prin intermediul IL pe care le secreta, limfocitele Th selecteaza si activeaza mecanismele efectoare adecvate. Ele pot stimula celulele B sa se diferentieze în celule producatoare de anticorpi, sa stimuleze sau sa inhibe alte categorii de celule efectoare: Tc, NK, macrofage, granulocite si celule K mediatore ale citotoxicitatii mediate de anticorpi (dupa Roitt, 1993).

Macrofagele se activeaza sub actiunea IFN γ , a endotoxinelor bac-teriene, dupa infectia cu bacterii intracelulare (*Mycobacterium*, *Listeria*). Activarea consta în amplificarea ratei metabolice. Macrofagul activat devine citotoxic pentru celula tinta. Interactiunea macrofagului cu celula tinta nu este mediata de structuri specifice, dar macrofagul activat face discriminare între celulele modificate (malignizate sau infectate cu virusuri) si cele normale. Macrofagele activate fagociteaza intens si realizeaza efectul ADCC. Ele produc IFN α cu efect activator asupra celulelor NK, secreta oxid nitric (NO), toxic pentru celula tinta, H₂O₂, produși de oxidare a glucozei cu efect toxic asupra tinteii, secreta IL-1, TNF (*tumour necrosis factor*), colagenaza.

TNF este o pro-teina citotoxica cu efect lent (48-72 de ore) asupra celulei sensibile, foarte asemanatoare limfotoxicinei produsa de limfocitele Tc activate. Ambele sunt proteine hidrofobe si se leaga cu mare afinitate de aceiasi receptori ai celulei tinta.

Eozinofilele au rol important în apararea fata de viermii paraziti, prin efecte de citotoxi-citate de tip ADCC. Fo-carele de parazitoza sunt asociate cu eozinofilie.

Oricare ar fi celu-lele efectoare ale citotoxicitatii mediate celular, limfocitele Th (subsetul Th1) au rol esential în stimularea reactivitatii imunitare mediate celular, prin intermediul cito-chinelor, în special IL-2 si IFN.

MEDIATORII MOLECULARI AI REACTIVITATII IMUNITARE

Raspunsul imun este controlat atât prin interactiuni directe ale diferitelor tipuri de celule cooperante, cât si prin produsele de sinteza pe care acestea le secreta.

Factorii moleculari cu rol în reglarea raspunsului imun, initial, au fost denumiti *citochine*. Citochinele cunoscute sunt împartite în urmatoarele grupe functionale: CSF (Colony Stimulating Factors), IL (Interleuchine), IFN (Interferoni) si TNF (Tumor necrosis factor), *factori de crestere* si *chemochine*.

Citochinele sunt proteine inductibile, care pot fi secretate de orice celula din organism, cu posibila exceptie a eritrocitelor.

Citochinele sunt molecule cu activitate biologica, în concentratii

foarte mici (femto-molar = 10^{-15}), care induc un raspuns specific al celulelor sensibile. Acestea posedea receptori de mare afinitate pentru diferite citochine si raspund prin modificarea ratei sintezei ARN si a proteinelor. Citochinele sunt parte integranta a conceptului lui C. Bernard, privind homeostazia mediului intern.

Activitatea citochinelor se manifesta *in vivo* si *in vitro*, la concentratii foarte scazute si din aceasta cauza au fost denumite *imunohormoni* sau hormoni reglatori ai raspunsului imun. Spre deosebire de hormoni, care actioneaza la distanta, citochinele actioneaza la nivel local, iar mecanismul actiunii lor este similar cu acela al hormonilor peptidici.

Spectrul de actiune al citochinelor este foarte larg, fiind implicate în toate aspectele patologice. Citochinele nu au activitate enzimatica, dar produc efectele numai dupa ce se leaga de receptorii specifici de mare afinitate, ai celulelor sensibile. Cele mai multe celule au un numar mic de receptori (sute, pâna la câteva mii). Pentru a produce un raspuns maxim, numai un procent al receptorilor trebuie sa lege citochina specifica. Se activeaza caile de semnalizare intracelulara si eventual se produce comutarea unui set de gene, care codifica diferite proteine: molecule de aderenta intercelulara, proteaze, proteine de faza acuta, enzime ale catabolismului lipidic, NO-sintaza si citochine, inclusiv cea care a produs stimularea initiala a celulei.

În functie de efectele pe care le produc, IL se grupeaza astfel:

- IL care stimuleaza mobilitatea orientata a celulelor (chemochine)
- IL care modifica rata (stimulare sau inhibitie) diviziunii celulelor si diferentierea lor
- IL stimulative sau inhibitoare ale functiilor specifice ale unor celule
- IL care modifica viabilitatea celulelor (induc apoptoza).

Caracteristicile generale ale citochinelor sunt urmatoarele:

- majoritatea citochinelor sunt polipeptide sau glicoproteine cu gr. mol. între 5- 30 kD;
- multe formeaza homodimeri sau homotrimeri (IL-12 este un heterotrimer);
- sinteza lor constitutiva este minima sau absenta;
- actiunea lor este limitata, *autocrina*, *paracrina* sau *chiar intracrina*, dar nu endocrina, desi unele se gasesc în sânge în timpul infectiilor generalizate. Actiunea lor este mediata de receptori de mare afinitate. Unele citochine au spectru larg de actiune, dar cel putin unele efecte ale lor se manifesta asupra celulelor hematopoetice. Citochinele actioneaza adeseori prin stimularea sintezei sau inhibitei altei citochine (cascada de citochine) sau prin modularea exprimarii receptorilor

pentru alte citochine. Uneori, citochine cu structuri moleculare diferite au acțiuni asemănătoare (redundanta). 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.

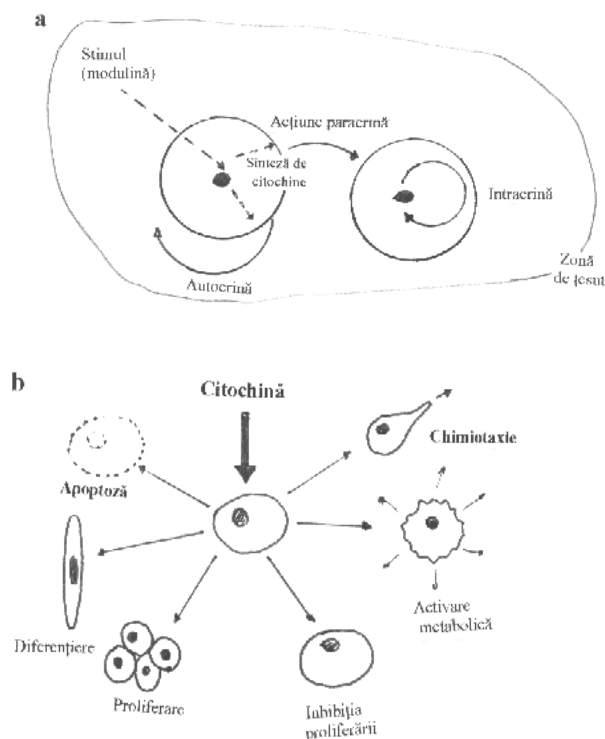


Fig. 80. a. Acțiunea citochinelor este, în general, locală. Rareori, ele se găsesc în cantități semnificative în sânge. Acțiunea locală a citochinelor este *intracrina* (în interiorul celulei), *autocrina* (autostimularea celulei producătoare) și *paracrina* (acțiunea asupra celulelor din proximitatea 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 (ciclooxigenaza, enzime proteolitice, NO-sintaza), diferiți receptori de aderență. Citochinele pot să modifice ciclul celulei sensibile, producând stimularea diviziunii, inhibiția ei sau apoptoză. Chemochinele sunt o clasă de citochine mici, care determină migrarea orientată a leucocitelor.

INTERLEUCHINE (IL)

Denumirea veche de *limfochine* sugerează ca 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 soarece, 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 caror creștere *in vitro* este dependentă de IL. Aceste linii celulare se folosesc pentru testarea prezentei IL într-un lichid biologic;

– unele clone de limfocite, după stimularea *in vitro* cu lectine, produc cantități mari de IL, utilizabile pentru analiză 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

matura poate sa 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 indusa de actiunea 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 urati).

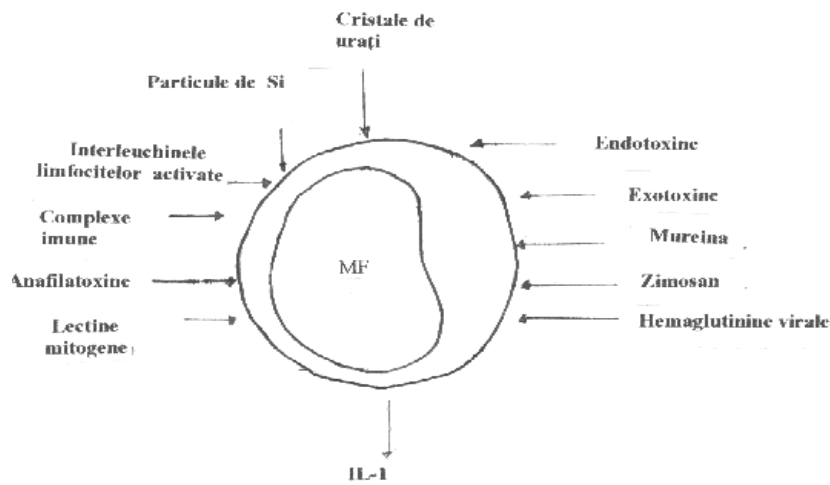


Fig. 81. Agentii declansatori ai sintezei IL-1.

Sunt doua variante moleculare (IL-1 α si IL-1 β), codificate de gene distincte. S-a identificat a III-a varianta moleculara, IL-1ra (receptor antagonist), care se fixeaza pe receptorii pentru IL-1 α si IL-1 β , inhibând efectele lor. IL-1 α si IL-1 β se sintetizeaza ca precursori de 31kD (271 si respectiv 269 aminoacizi), care sunt clivati proteolitic si rezulta molecule de 17 kD. IL-1 este activa atât în varianta nativa, cât si forma rezultata dupa clivare. IL-1 β este clivata de o cistein-proteaza intracelulara (ICE = interleukin converting enzyme).

Efecte. Dupa ce este produsa local de celulele stimulate, IL-1

actioneaza *autocrin* sau *paracrin*, stimulând raspunsul inflamator si raspunsul imun specific, fiind un mesager cu spectru larg de actiune. IL-1 este un mediator pleiotropic (cu efecte multiple) al raspunsului gazdei la infectii sau la leziuni:

– stimuleaza producerea altor citochine (G-CSF, TNF- α , IL-6, IL-8,

IL-11, PDGF);

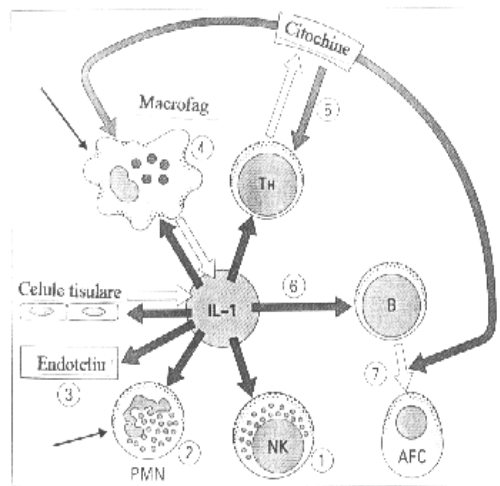


Fig. 82. IL-1 este produsa de multe tipuri celulare ca raspuns la leziuni, infectie sau dupa stimularea antigenica si influenteaza multe categorii de celule si procese; stimuleaza activitatea citocida a celulelor NK; activeaza metabolismul PMN si chimiotaxia spre situsul producerii IL-1; induce expresia moleculelor de aderenta în endoteliu si maresta permeabilitatea; stimuleaza chimiotaxia si functia citocida a macrofagelor; stimuleaza proliferarea celulelor Th, exprimarea receptorului pentru IL-2 si pro-ducerea de citochine; stimuleaza proliferarea si dife-rentierea limfocitelor B în celule producatoare de anticorpi.

– stimuleaza prolife-rarea celulelor T, crescând sinteza de IL-2 si exprimarea receptorilor pentru IL-2 pe celulele T;

– induce exprimarea moleculelor CMH II pe CPA;

– stimuleaza dife-ren-tierea limfocitelor pre-B si maturarea lor în celule B;

– stimuleaza monocitele sa produca IL-1 (bucla autocrina);

– este chemoatractant pentru leucocite la situsul inflamatiei, prin inducerea sintezei moleculelor de aderenta pe endoteliul vascular;

– induce sinteza pro-teinelor de faza acuta (CRP) în ficat;

– este reglatoare a hema-topoezei, contracarând efectele mielosupresoare ale radioterapiei și chimioterapiei prin inducerea sintezei SOD (enzima cu Mn) în mitocondrii;

– stimulează producerea de CRH din hipotalamus, cu eliberarea ACTH din hipofiza. IL-1 poate stimula direct eliberarea ACTH. Stimularea axei hipotalamo-corticosuprarenalei 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 boală autoimună, IL-1 activează condroclastele și osteoclastele și de aici derivă denumirea ei de *catabolina*;

– 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 (PG^{*}), active asupra centrului hipotalamic al termogenezei, producând febră;

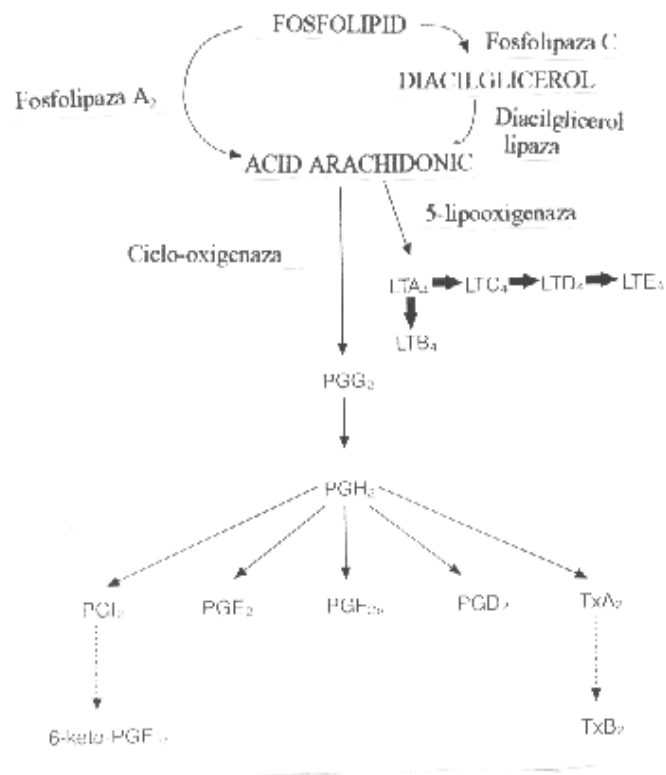


Fig. 83. Caile producerii *compusilor icozanoidici* din fosfolipidele membranare. Liniile groase reprezinta conversia enzimatica, iar cele intrerupte, transformari neenzimatice. PG = prostaglandina; Tx = tromboxan; Lt = leucotriena.

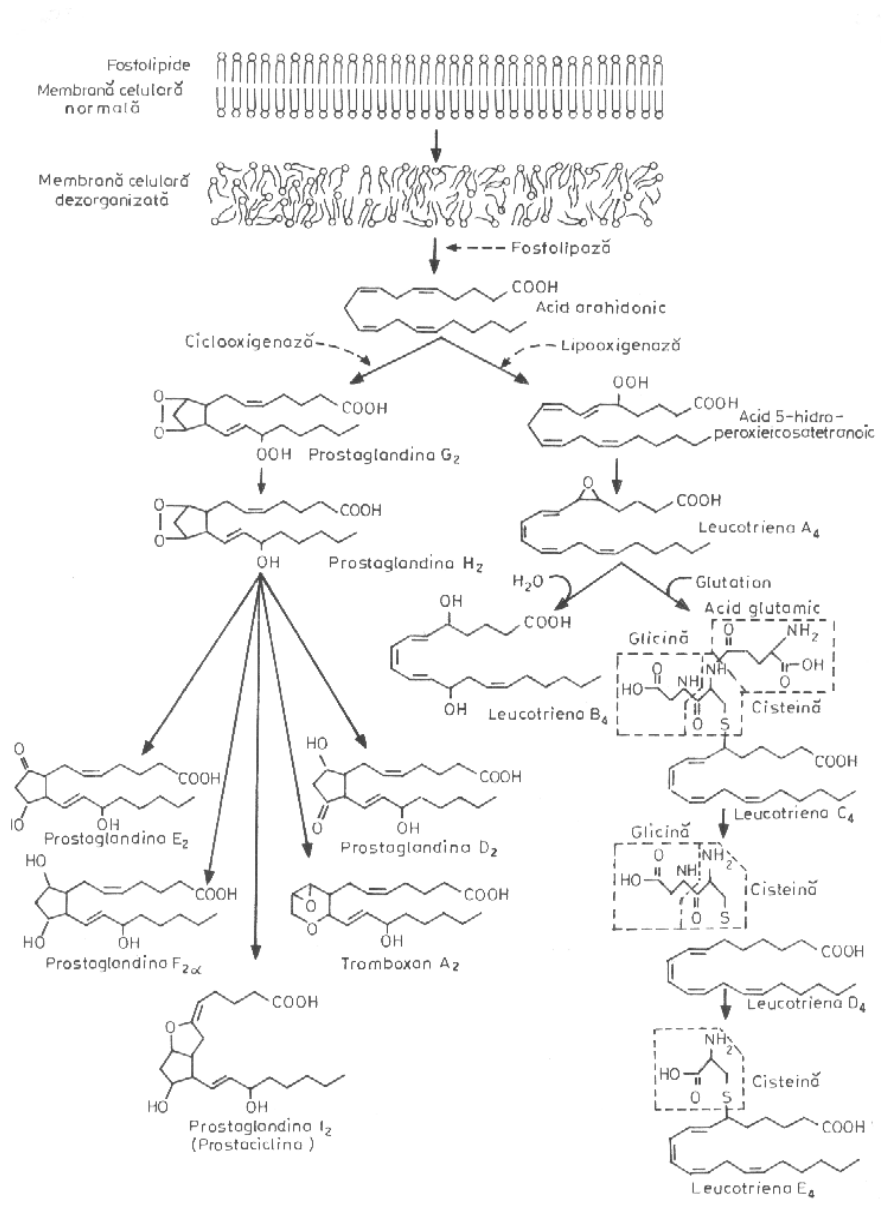


Fig. 84. Reprezentare schematică a "cascadelor" enzimatice ce duc la formarea PG și LT, mediatori ai efectelor endotoxice și ai reacțiilor inflamatorii.

- 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 (colagenaza), usurând mobilitatea lor în substanța fundamentală;

- activează limfocitele T și B;
- produce hipozincemie^{**} și hipofeemie 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.

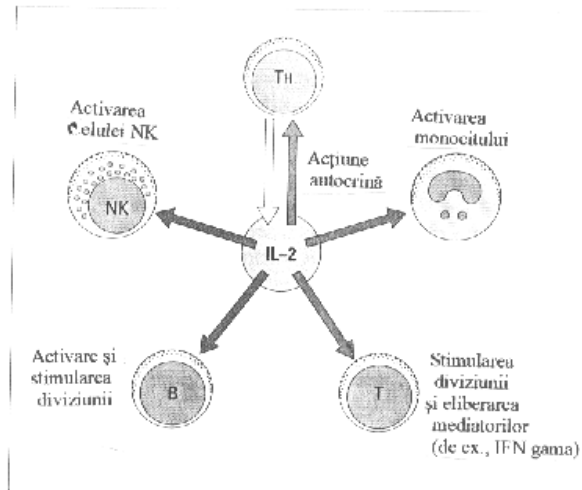


Fig. 85. IL-2 este sintetizată de limfocitele Th. Rolul său esențial este stimularea celulelor T și eliberarea mediatorilor (IFN γ), dar stimulează și creșterea limfocitelor B. Activarea monocitelor și a celulelor NK este importantă pentru amplificarea răspunsului imun. La pacienții cu carcinom renal, 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 secreta 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 intracelulare. Macrofagul stimulat produce H_2O_2 , NO, PGE_2 și $TNF-\alpha$. Activitatea antifungică a granulocitelor crește mult după stimularea cu IL-2. Probabil se intensifică producerea de lactoferină și $TNF-\alpha$.

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 specifica, deoarece determina numai expansiunea clonelor care au recunoscut determinantii antigenici.

Gena codificatoare a IL-2 a fost clonata, ceea ce a permis obtinerea unei cantitati suficiente de IL-2 în stare cristalizata. Este o glicoproteina de 15,4 kD si contine resturi de sialil si 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) si catena γ , al carei rol ramâne incert. Catena γ este componenta a receptorilor celulari pentru alte citochine: IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 si de aceea a fost notata cu γ c (comuna). 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 si β ;
- receptorul de mica afinitate, format numai din catena α .

Limfocitele nestimulate antigenic au numai receptorul de mica afinitate. Dupa stimularea antigenica primara, se exprima receptorul de afinitate intermediara, iar dupa stimularea secundara se exprima, cu o densitate mare, receptorul de afinitate înalta. Aceasta sugereaza ca intensitatea raspunsului imun este conditionata de disponibilitatea receptorilor de IL-2.

Receptorul de IL-2 functioneaza ca un întrerupator start-stop (on-off). IL-2 interactioneaza initial, cu catena de 55 kD si ulterior, cu cea de 75 kD. Interactiunea este ferma si de aceea, disocierea este lenta. Dupa disocierea IL-2 de receptor, semnalul de activare a limfocitelor dispare.

IL-3 este un polipeptid de 140 aminoacizi la soarece si 133 la om. Este produsa de limfocitele T si de celulele NK, iar mastocitele si eozinofilele stimulate produc cantitati mici de IL-3. In reactiile alergice, IL-3 modifica functiile mastocitelor, eozinofilelor si macrofagelor. Efectele ei se exercita asupra celulelor din imediata vecinatate a celor care au produs-o, dar când se produce o activare masiva a limfocitelor (de exemplu, în infectia gripala), IL-3 apare si în circulatie si efectele ei sunt sistemice. IL-3 stimuleaza activarea celulelor accesorii (granulocite, fagocite, plachete), cu functii de aparare si reparare într-un focar inflamator. Stimuleaza diferentierea celulelor stem în maduva hematopoetica, efectul fiind recuperarea functionala a maduvei osoase consecutiva chimioterapiei citotoxice.

IL-4 este produsa de câteva seturi de limfocite si are efecte multiple asupra celulelor limfoide. Sursa majora de IL-4 sunt limfocitele

patogeni extracelulari. IL-4 actioneaza autocrin si determina stimularea celulelor producatoare. Stimuleaza exprimarea moleculelor CMH II pe celulele B si secretia IgE si IgG₁. De aceea s-a numit factorul stimulator al limfocitelor B. Induce diferentierea celulelor TCD₄ spre celule Th₂, care la rândul lor secreta IL (IL-5, IL-10) stimulative ale RIMH. Este o citochina anti-inflamatorie, producând inhibitia citochinelor inflamatorii (IL-1, TNF) si a PG.

IL-5 este secretata de limfocitele Th₂ si stimuleaza proliferarea si diferentierea limfocitelor B în raspunsul imun. Stimuleaza diferentierea celulelor stem medulare, în monocite si eozinofile. Sinteza crescuta a IL-5 determina eozinofilie.

IL-6 este o citochina multifunctionala, secretata de macrofage, de limfocitele T, de celulele endoteliale. Stimuleaza sinteza IgA în structurile limfoide asociate mucoaselor. Efectele IL-6 sunt sinergice cu ale IL-1. IL-6 este un mediator al raspunsului de faza acuta. Raspunsul de faza acuta este o reactie sistemica anti-inflamatorie, consecutiva infectiei sau leziunii tisulare si se caracterizeaza prin febra, leucocitoza, cresterea permeabilitatii vasculare, scaderea nivelului metalelor (Zn, Fe) si a steroizilor plasmatici, dar creste nivelul proteinelor de faza acuta. Proteinele de faza acuta sunt sintetizate de hepatocite sub actiunea stimulative a unui factor specific, iar IL-6 are actiune similara cu aceea a factorului stimulator al hepatocitelor.

IL-7 este produsa de fibroblaste. La soarece, rolul esential al acestei citochine este de a stimula diferentierea celulelor limfoide imature, în limfocite T si B, în special intrarea si mentinerea lor în faza S. Siturile actiunii sale sunt maduva osoasa si timusul.

IL-8 este produsa de macrofage, fibroblaste, celule endoteliale. Face parte din categoria chemochinelor. Actiunea sa principala este cea chemotactica fata de neutrofile, eozinofile, limfocite T, în focarul inflamator. Sinteza ei rapida este indusa de LPS, de infectia virala, în celulele mononucleare din sânge, în fibroblaste, în cheratinocite. IL-8 stimuleaza activarea neutrofilelor (migrare transendoteliala, eliberarea enzimelor lizosomale, intensificarea metabolismului oxidativ, generarea anionului superoxid în focarul inflamator). Are efecte asupra celulelor nelimfoide: este haptotactica (induce migrarea celulelor epiteliale spre suprafata).

IL-9 este sintetizata de limfocitele T si determina efecte multiple asupra celulelor stem hematopoetice, limfopoetice si neuronale.

Actiunea sa este sinergica cu IL-4. In absenta IL-4, IL-9 stimuleaza activarea limfocitelor B si sinteza IgE si IgG.

IL-10 are rol reglator important asupra sintezei diferitelor citochine. Este produsa de limfocitele T activate, de monocite, de celulele B, de cheratinocite(dar si de celulele carcinomului de colon, de melanoame). Celulele Th₂ constituie sursa principala de IL-10, dar este produsa de clone Th₁ dupa stimularea cu antigenul specific. Efectele sale multiple se exercita asupra limfocitelor, monocitelor, celulelor NK, celulelor dendritice. Inhiba activarea macrofagelor si exprimarea moleculelor CMH II pe suprafata lor. Inhiba sinteza citochinelor proinflamatorii.

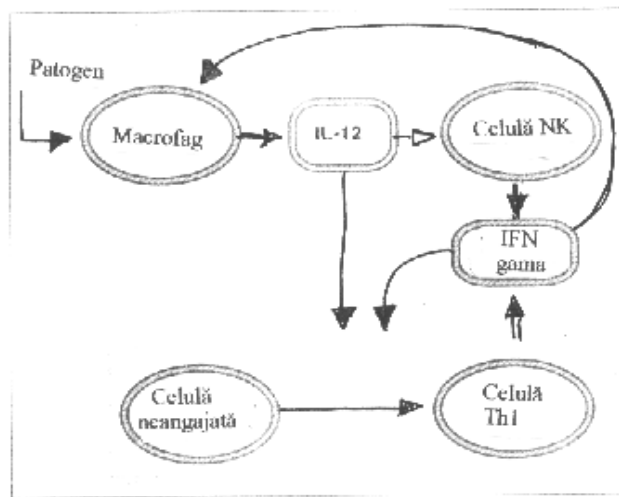


Fig. 86. IL-12 este produsa de macrofage si are rol central în raspunsul imun. IL-12 stimuleaza celulele NK si T sa elibereze interferon γ , iar celulele T neangajate sunt stimulate sa se diferentieze spre fenotipul Th1.

IL-11 are ase-manari functionale cu IL-6, dar are un spectru mai restrâns de actiune. Efectele sale se exercita asupra sistemului hema-topoetic, limfopoetic, hepatic, adipos si neuronal. Este proin-flamatorie si induce sinteza proteinelor de faza acuta.

IL-12 s-a iden-tificat în superna-tantul liniilor celulare B transformate, însa celulele B normale (de om si soarece) nu sintetizeaza cantitati semnificative de IL-12. Sursele principale sunt macrofagele si celulele dendritice. Macrofagele - primele celule care recunosc antigenul, încep sa produca IL-12. Celulele tinta ale IL-12 sunt limfocitele T (CD₄, CD₈) si NK. *In vivo*, IL-12 induce diferentierea limfocitelor TCD₄, în celule Th₁ care sintetizeaza interferon γ , inductor al anemiei, neutropeniei si limfopeniei. Este o citochina de *initiere* a

raspunsului imun, fiind puntea de unire între reactiile de aparare nespecifica si raspunsul imun specific. Stimuleaza diferentierea celulelor Th neangajate, în celule Th₁, mediatoare ale RIMC.

IL-13 este produsa de celulele Th₂, dar si de alte seturi de celule Th, de celulele TCD₈, de alte celule activate (mastocite, eozinofile, bazofile). Induce proliferarea limfocitelor B care sintetizeaza IgE si IgG₄, sugerând rolul sau în patogeneza starilor alergice. Inhiba activarea macrofagelor si sinteza citochinelor proinflamatorii, având astfel proprietati anti-inflamatorii.

IL-15 are multe activitati biologice comune cu ale IL-2. Catenele β si γ ale receptorului pentru IL-15 sunt comune si pentru receptorul de IL-2, iar catena α este specifica. IL-15 are o distributie tisulara mai larga decât IL-2. Este factor de crestere pentru celulele T (umane si de soarece), pentru celulele B si NK. Are actiune sinergica cu IL-12. IL-15 se gaseste în lichidul sinovial la pacientii cu artrita reumatoida, unde recruteaza limfocitele T si le stimuleaza pentru a produce IFN γ , TNF- α si GM-CSF. Rolul reglator al IL-2 nu este compensat de IL-15 si nici de alte citochine.

Alte citochine

Celulele limfoide si macrofagele sintetizeaza factori proteici, denumiti *limfotoxine*, cu efect litic asupra celulelor sensibile. Limfotoxina s-a evidentiat initial, ca un factor citotoxic în supernatantul limfocitelor activate.

Limfotoxinele sunt produse de limfocitele TCD₈, de celulele NK si de macrofagele stimulate. Denumirea de "limfotoxine" deriva de la efectul lor citotoxic sau citostatic, fata de celulele malignizate sau fata de cele infectate cu virusuri.

Limfotoxina produsa de limfocitele Tc se numeste *perforina* si are rol major în liza celulei tinta.

Limfotoxina poate fi produsa ca proteina solubila sau ca proteina asociata membranei citoplasmaticice a unor celule. Forma solubila a limfotoxinei este alcatuita din trei monomeri de limfotoxina α (LT α) si este produsa de celulele Tc (CD₈) si de subsetul Th-1 al limfocitelor CD₄.

Limfotoxina se exprima si pe suprafata celulelor T, într-o alta varianta biochimica: o subunitate proteica a LT- α , asociata cu doua molecule de LT- β .

Macrofagele stimulate cu endotoxine, sintetizeaza o monokina de

17 kD, denumita TNF- α sau *casectina*.

TNF- α este o glicoproteina de 156 aminoacizi, trimerica, produsa în primul rând de macrofage dar si 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 numerosi: celulele alogene si bacteriene, peptidoglicanul, complexe imune, LPS, intermediarii reactivi ai reducerii O₂, celule malignizate, infectia virala, zimosanul din peretele levurilor, ionii de Zn etc.

Efecte. TNF- α inhiba ciclul de replicare virala si stimuleaza diferite activitati biologice: diferentierea monocitelor în macrofage, activitatea ADCC, sinteza moleculelor CMH I si II, activitatea fagocitara, cresterea si proliferarea fibroblastelor, este un factor pirogen, hipotensiv, favorizeaza regenerarea ficatului, induce sinteza proteinelor de faza acuta si apoptoza celulelor tinta, activeaza celulele endoteliale, stimuleaza distrugerea cartilajului, activeaza limfocitele T si B, stimuleaza sinteza Ig. Local, TNF- α mareste aderența limfocitelor TCD₈ la endoteliul vascular si le stimuleaza citotoxicitatea. Este o citochina proinflamatorie.

TNF- α este implicat direct în distrugerea celulelor B insulare, în diabetus melitus insulino-dependent.

Denumirea de *casectina* pentru TNF- α deriva de la efectul ei stimulator asupra catabolismului, ceea ce explica aparitia si manifestarea *sindromului de epuizare* (casexia), caracterizat prin pierderea în greutate, la pacientii neoplazici sau cu infectii cronice. Casectina inhiba transcrierea genelor care codifica sinteza enzimelor lipogene.

Receptorii de casectina se gasesc pe hepatocite, pe celulele musculare si adipoase si raspund prin intensificarea catabolismului. Ca urmare, trigliceridele sunt mobilizate din depozite si creste concentratia plasmatice a lipoproteinelor cu densitate foarte mica.

Factorul inhibitor al migrării macrofagelor (MIF) este prima limfochina ale carei efecte au fost descrise. Inhibitia migrării macrofagelor este produsa de o varietate de factori: citochine, mitogene, toxine. Sub denumirea de MIF a fost caracterizata o proteina de 12,5 kD din umoarea apoasa a camerei anterioare a globului ocular, care produce supresia rapida a citotoxicitatii mediata de celulele NK, fata de endoteliul corneean. Camera anterioara a globului ocular este considerata ca situs privilegiat din punct de vedere imunologic. Tesuturile sale (endoteliul corneean si cristaloida) nu exprima molecule CMH I si astfel devin tinta atacului litic al celulelelor NK infiltrate. Activitatea inhibitorie a MIF a fost anulata de anticorpai specifici anti-MIF.

INTERFERONII SI MECANISMELE ACTIUNII LOR

Interferonii sunt o categorie speciala de *citochine*, a caror sinteza este indusa de diferiti agenti chimici sau biologici. Functiile lor se caracterizeaza printr-un spectru larg de activitati nespecifice, cea mai importanta fiind *inductia starii antivirale*.

Interferonul a fost descoperit de Isaacs si Lindenmann (1957). Ei au observat ca injectarea membranei corioalantoice a embrionului de gaina, cu virus influenza inactivat (denumit virus *inductor* sau *interferent*), blocheaza replicarea ulterioara a virusului influenza infectios (virus *revelator* al interferentei). Autorii au aratat ca inhibitia replicarii virale (interferenta) se datoreaza unui factor inhibitor, pe care l-au denumit *interferon (IFN)*.

Elucidarea naturii chimice si a modului de actiune a interferonilor a constituit o problema de interes major a biologiei moleculare si a virologiei în ultimele decenii.

Inducerea starii antivirale este cea mai importanta functie a interferonilor, dar ei au si alte activitati biologice majore:

- inhibitia multiplicarii celulelor normale si tumorale
- reglarea proceselor de diferentiere celulara
- reglarea functiei imunitare.

Natura interferonilor. Diferitele variante moleculare de interferoni au fost grupate în doua tipuri: interferoni de tip I si de tip II. Interferonul de tip I cuprinde variantele α , β si τ . Interferonul de tip II include varianta moleculara γ . Interferonul α este produs de leucocite si este reprezentat de o varietate larga de molecule, codificate de un numar mare de gene. Interferonul β este sintetizat de variate celule nehematopoetice (de exemplu, fibroblaste), dupa infectia cu virus sau dupa ce sunt stimulate cu ARN dublu catenar. Sinteza sa este codificata de o singura gena. Interferonul τ , s-a identificat la bovine si la ovine si este sintetizat în cantitati mari în epiteliul uterin, în perioada care precede implantarea embrionului si de aceea s-a denumit interferon *trofoblastic*. Interferonul γ este produs de limfocitele activate sub actiunea antigenului specific sau a substantelor mitogene si reprezinta interferonul de tip II. Deoarece, *in vivo*, este sintetizat de limfocitele T activate, de limfoblastele seriei B si de limfocitele granulare mari (celulele NK), interferonul γ este considerat a fi *de tip imun*.

Distributia interferonilor în cele doua tipuri si subtipuri se bazeaza

pe proprietatile lor antigenice individuale. Antiserul specific fata de moleculele de interferon ale unui tip nu precipita si nu neutralizeaza actiunea interferonilor celuilalt tip.

În general, moleculele de interferoni sunt glicoproteine. Interferonii β si γ au resturi glucidice legate la asparagina 80 si respectiv 25 si 97. Majoritatea interferonilor α nu sunt glicozilati. Glicozilarea nu este esentiala pentru exprimarea activitatilor biologice, ceea ce explica faptul ca interferonii sintetizati în celulele bacteriene, de genele codificatoare clonate, au activitate biologica.

Interferonii α si β sunt stabili chiar la pH 2 si își pastreaza activitatea în prezenta SDS, ultima fiind o proprietate foarte importanta pentru purificare.

Sinteza interferonilor. În mod obisnuit, celulele normale nu sintetizeaza cantitati detectabile de interferoni. Genele codificatoare ale sintezei lor nu sunt transcrise. Sinteza interferonilor este indusa de diferiti agenti: virusuri infectioase sau inactivate, moleculele de ARN dublu catenare helicale, endotoxinele bacteriilor Gram negative (*Brucella* sp., *Listeria monocytogenes*), infectia cu micoplasme, cu rickettsii si chlamidii, polimerii sintetici, mananii (polizaharide), diferiti activatori metabolici etc. LPS este un bun inductor al IFN α si β .

Pentru virusurile cu genom ARN dublu catenar, inductorul sintezei de interferon este chiar genomul viral. Virusurile cu genom ADN, cu exceptia celor din grupul pox, sunt slab inductoare, iar cele cu genom ARN monocatenar sunt inductoare ale sintezei interferonilor, deoarece ARN se replica printr-un intermediar dublu catenar.

ARN monocatenar, ADN mono- sau dublu catenar, ca si hibrizii ADN-ARN nu sunt inductori ai sintezei interferonilor.

Virusurile inactivate (din vaccinuri), ca si cele ce infecteaza un substrat nepermisiv sunt inductoare ale sintezei interferonilor. În leucocitele mononucleare, sinteza IFN este indusa de glicoproteinele învelisului viral.

In vitro, la 37⁰, sinteza începe la 4 ore dupa infectia virala si atinge rata maxima concomitent cu sinteza proteinelor virale.

Informatia genetica codificatoare a sintezei interferonilor este distribuita în trei familii de gene. Sinteza interferonului α este codificata de 14 gene si 7 pseudogene, localizate pe bratul scurt al cromosomilor perechii a 9-a. Interferonul β este codificat de o gena (sau câteva), cu aceiasi localizare, iar interferonul γ este codificat de o singura gena localizata pe perechea a 12-a de cromosomi. Ca o caracteristica, nici una din gene nu contine introni.

Cel mai bun inductor al sintezei de interferon este ARN dublu

catenar natural sau sintetic. Mecanismul inductiei nu este cunoscut. Probabil, ARN dublu catenar induce sinteza unui factor, care, la rândul sau neutralizeaza represorul specific al transcrierii acestor gene. Factorul determinant al inductiei este însasi natura bicatenara a moleculei de ARN si nu informatia genetica înscrisa în ea. Nu se cunoaste nici mecanismul inductiei sintezei interferonului γ (de tip imun), în limfocitele activate de antigenul specific sau stimulate de mitogene.

Inductia sintezei interferonilor necesita sinteza ARNm si traducerea sa în catena polipeptidica. Inhibitorii sintezei proteinelor (actinomocina D), administrati simultan cu inductorul, inhiba sinteza interferonilor.

Interferonii secretati de diferite specii de organisme sau de diferite categorii de celule ale unui organism, prezinta deosebiri legate de secventa aminoacizilor, de continutul glucidic, care au stat la baza gruparii lor în cele trei clase.

Toti interferonii se sintetizeaza ca precursori de 166 aminoacizi, cu secvente semnal N-terminale de 20-23 aminoacizi, necesare secretiei. Dimensiunile reale ale catenei polipeptidice sunt de 143, 145 si respectiv de 146 resturi de aminoacizi.

Molecula de interferon are doua domenii cu secvente de aminoacizi relativ constante: unul în jumătatea N-terminala, care formeaza situsul de legare pe receptorul celular, iar celalalt, în jumătatea C-terminala, pare sa moduleze legarea de receptor si probabil mediaza functiile biologice.

Studiul biochimic al moleculei de interferon a fost înlesnit de obtinerea anticorpilor monoclonali specifici fata de diferite tipuri de interferon.

Interferonii se sintetizeaza, probabil, la toate clasele de vertebrate.

Activitati biologice efectoare ale interferonilor

Activitatea biologica principala a interferonilor este cea *antivirala* si a fost demonstrata experimental. Infectiile virale sunt mult mai severe la animalele de experienta, carora, odata cu virusul infectios li s-a injectat ser imun specific anti-interferon.

Interferonii formeaza *prima linie de aparare umorala fata de infectiile virale*, înainte de mobilizarea raspunsului imun. Interferonii protejeaza celulele de efectele citopatice virale, dar nu elimina complet infectia. Starea de protectie antivirala, indusa de interferoni dureaza câteva zile si apoi dispare. Dupa câteva zile de absenta, starea de protectie poate fi indusa din nou.

Interferonii nu au actiune antivirala directa, ci *induc o stare*

antivirala.

Interferonii au specificitate de specie, adica activitatile biologice si în special efectul protector antiviral se manifesta fata de orice virus, în raport cu celulele speciei care a produs interferonul. Baza specificitatii de actiune, rezida în interactiunea dintre interferon si receptorul celular. Activitatea biologica a interferonilor este direct proportionala cu afinitatea lor de legare cu substratul celular. Interferonul de soarece are, *in vitro*, efect protector fata de celulele de soarece, indiferent de virusul infectant. Acelasi interferon are un efect protector minim (5%) pentru celulele de sobolan, iar pentru celulele umane, efectul protector este nul.

Protectia antivirala este dependenta de concentratia interferonilor. Dozele mari, administrate în sisteme experimentale, *in vitro*, sunt protectoare fata de nivelul scazut al multiplicatii de infectie, asemanator celui natural. Multiplicitatea înalta de infectie (cea experimentală), depaseste efectul protector al interferonilor.

Descoperirea interferonilor a condus la revizuirea conceptului imunitatii celulare si a rolului sau în limitarea infectiilor virale. Sistemul interferonului este primul care își exercita efectul protector, dintre toate sistemele de aparare cunoscute. El este operativ în decurs de câteva ore de la infectie.

Cele mai multe virusuri sunt inductoare ale sintezei interferonului si sunt sensibile, în diferite grade, la actiunea lui.

Interferonul este produs de celulele infectate, concomitent cu desfasurarea ciclului multiplicarii virale. Este eliberat din celule imediat dupa sinteza si difuzeaza spre celulele învecinate, carora le induce starea antivirala. Astfel, virusul, în ciclul sau replicativ, întâlnește o bariera intracelulara. Nivelul activitatii antivirale, probabil, este dependent de concentratia extracelulara a interferonului, astfel ca celulele învecinate celor producatoare de interferon devin cele mai rezistente la infectia cu virus. Celulele mai îndepartate sunt mai puțin protejate.

Eficienta relativa a diferitelor mecanisme de aparare, inclusiv a celui mediat de interferon depinde de ruta pe care se raspândește virusul. De la poarta de intrare, virusul se disemineaza spre organele tinta, pe calea fluidelor organismului (sânge, limfa), prin leucocitele infectate sau pe cale axonala. Diseminarea pe cale sanguina si limfatica este limitata de macrofagele asociate capilarelor sanguine si limfatice. Viremia diminueaza si odata cu ea diminueaza severitatea infectiei. Experientele cu administrare de interferon evidentiaza ca interferonul circulant reduce viremia si protejeaza organele tinta. Interferonul este mai puțin eficient fata de virusurile care se disemineaza pe cale

axonala.

La pacientii hipogamaglobulinemici, limitarea si eliminarea infectiei virale este rezultatul actiunii interferonului, a reactiei febrile a organismului, a raspunsului inflamator si a imunitatii mediate celular.

Bazele moleculare ale activitatii interferonilor

Interferonii nu au activitate biologica în celulele care îi sintetizeaza. Principala lor activitate –cea *antivirala*- nu este directa, deoarece interferonii nu sunt molecule efectoare, ci *inductori ai starii antivirale*. Interferonii actioneaza asupra celulelor neinfectate si le induc starea de rezistenta fata de infectie, influentând multiplicarea virusurilor în diferite etape ale ciclului (de exemplu, transcrierea ARNm, traducerea etc.), în functie de sistemul celular.

Dupa secretia din celulele în care a fost sintetizat, interferonul se leaga de receptorul membranal al altor celule, unde functioneaza ca o citochina paracrina si activeaza un set de gene specifice. Corespunzator celor doua tipuri de interferoni, se cunosc doua tipuri de receptori. Ambele sunt glicoproteine de membrana.

Complexele interferon-receptor sunt endocitate. Internalizarea lor declanseaza evenimentele nucleare, al caror rezultat este starea antivirala si aparitia unor modificari ale metabolismului celular.

Interferonii induc sinteza unor proteine, care mediaza efectele lor multiple. Starea antivirala este produsa pe mai multe cai. Pot fi inhibitate diferite etape ale ciclului de replicare virala: penetrarea si dezvelirea, transcrierea ARNm viral, traducerea ARNm viral, replicarea genomului, asamblarea si eliberarea virusului progen. Decisiva este natura virusului, dar tipul celular poate avea un rol important. Starea antivirala este, în primul rând, consecinta sintezei în celula, a unei *proteine inhibitoare a transcrierii si/sau a traducerii mesajului genetic viral (PIT)*, care interfereaza fie cu sinteza ARNm viral, fie cu traducerea sa, fie cu ambele procese. O a II-a cale majora a inducerii starii antivirale este degradarea ARNm viral prin actiunea *2'-5' oligo-adenilat-sintetazei si a riboendonucleazei*.

În cele mai multe sisteme virus-celula, inhibitia multiplicarii virale este rezultatul interferentei cu etapa *traducerii* ARNm viral. În celulele liniei sensibile L (originara din fibroblaste de embrion de soarece), infectate cu virus vaccinal, se produce dezagregarea polisomilor celulari. ARNm viral se asociaza cu ribosomii eliberati si formeaza polisomi ce sintetizeaza proteine specific virale. În celulele tratate cu interferon, înainte de infectia virala, ARNm viral nu se asociaza cu ribosomii si nu se sintetizeaza proteine specifice. În absenta proteinelor virale, infectia este abortiva. Efectul este acelasi dupa infectia 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 *proteîn-chinaza dependentă de ARN dublu catenar (PKR)*, denumită și *chinaza factorului de inițiere a sintezei proteinelor la eucariote (eIF-2)*.

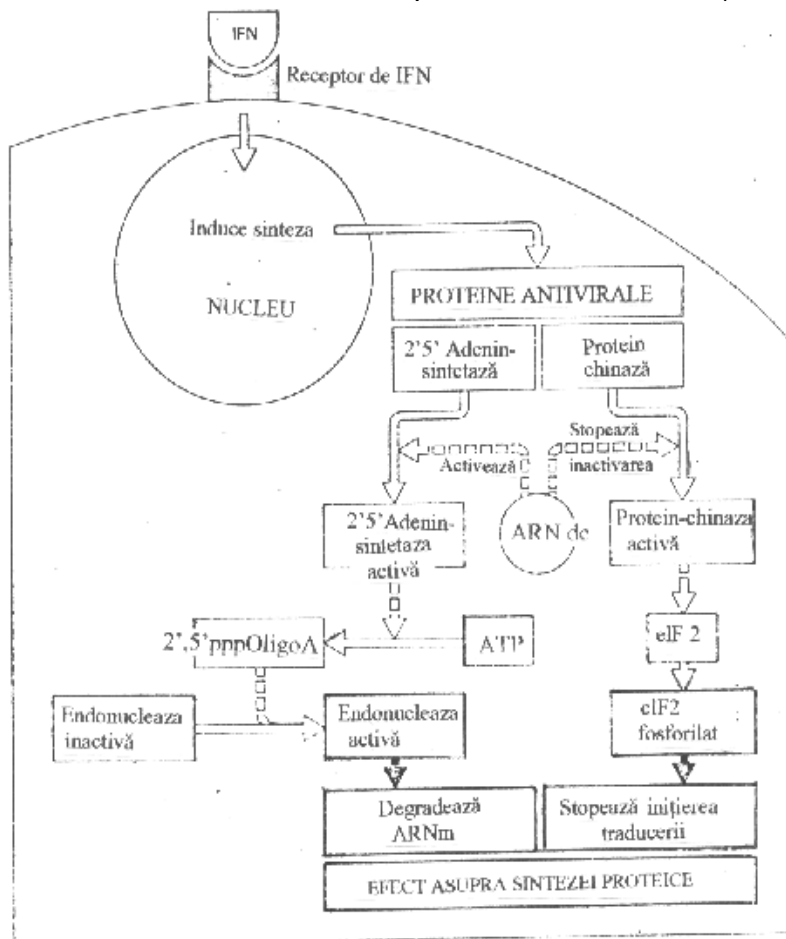


Fig. 87. Acțiunile antivirale ale *interferonilor* (IFN). Interferonii se leagă specific de receptorii de IFN și produc numeroase efecte, două dintre ele fiind ilustrate în schema. IFN induce sinteza proteinelor antivirale – 2',5' adenzin-sintetaza și o proteîn-chinaza. Ambele sunt activate de ARN dublu catenar, intermediarul replicării virale. Sintetaza induce formarea 2',5' ppp-oligo A, care activează o endonuclează capabilă să producă degradarea ARNm. Proteîn-chinaza fosforilează factorul de inițiere al traducerii proteinelor, eIF₂, pe care îl inactivează (după Male, 1987).

PKR este o chinaza serina/treonina, prezenta în celule si în mod normal se sintetizeaza cu o rata foarte scazuta. Enzima, în proportie de 20% se gaseste în nucleu (mai ales în nucleol) si 80% are sediul citoplasmatic. In cea mai mare parte, protein-chinaza citoplasmatica este legata de ribosomi si este mai fosforilata decât cea nucleara. Protein-chinaza este inactiva (latenta), dar poate fi activata de ARN dublu catenar. În celulele tratate cu interferon, nivelul protein-chinazei (o proteina de 67 kD) creste de peste 20 de ori.

PKR se activeaza în prezenta ARN dublu catenar, rezultatul fiind autofosforilarea câtorva resturi de serina si treonina. Autofosforilarea este cel mai probabil, intermoleculara si se produce între doua molecule de PKR asociate cu aceiasi molecula de ARN dublu catenar. In consecinta, concentratiile mari de ARN-dublu catenar inhiba procesul autofosforilarii. Heparina (un polianion) activeaza aceasta enzima. Substratul fiziologic unic al PKR fosforilate este subunitatea α a factorului de traducere eIF-2. eIF-2 fosforilat nu poate fi reciclat pentru initierea traducerii si produce inhibitia sintezei proteinelor celulare.

În celula infectata cu un virus, protein-chinaza, se asociaza cu ARN-dublu catenar, se activeaza si se fosforileaza. Protein-chinaza activata, poate fosforila un numar de substraturi celulare, inclusiv factorul 2α , de initiere a sintezei proteinelor la eucariote (eIF-2 α), la restul de serina 51 (Kumar, 1998). eIF-2 α fosforilat, blocheaza initierea sintezei catenei polipeptidice.

Alta cale activata de ARN dublu catenar si de interferon este calea 2',5'-oligo-adenilat- sintetazei/RN-aza. Interferonii induc sinteza unei familii de enzime denumite 2-5(A)sintetaze, care polimerizeaza ATP în oligo-adenilati de diferite lungimi, legati 2'-5'. Aceste enzime sunt inactiva, dar se activeaza datorita unei schimbari conformationale care se produce consecutiv legarii sale cu ARN dublu catenar. 2',5'-AS activata este capabila sa polimerizeze ATP si alte nucleotide în legaturi 2'-5'. In molecula de 2',5'-oligoadenozina, resturile de riboza sunt legate prin puncti fosfo-diesterice 2'-5'. Acestea sunt legaturi unice, deoarece toate polinucleotidele naturale contin legaturi 3'-5'.

2',5'-oligoadenozina activeaza RN-aza L. RN-aza L este detectabila în toate celulele animale. Majoritatea celulelor contin o fosfodiesteraza ce poate hidroliza 2-5(A). RN-aza L poate cliva ARN celular si viral monocatenar la secvente specifice UpA, UpG si UpU. RN-aza L poate manifesta efecte antivirale prin inductia apoptozei. Aceasta cale este activa în inhibitia replicarii picornavirusurilor în celulele tratate cu IFN

Cei mai buni interferoni stimuleaza 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, măbind 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 mediata de moleculele CMH I, a căror expresie este stimulată de interferoni. Interferonii sunt stimulatori ai enzimei nitric-oxid-sintetaza, 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).

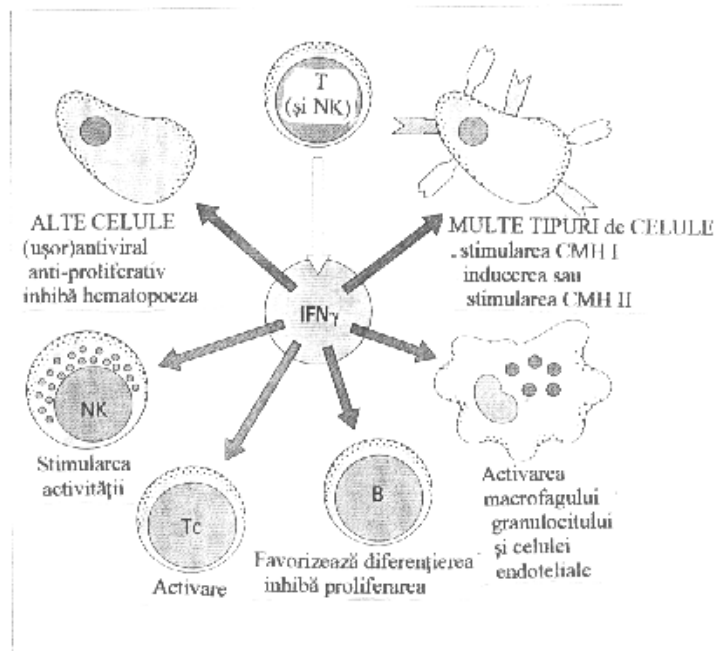


Fig. 88. Funcțiile $IFN \gamma$ sunt multiple: activitatea antivirală și antiproliferativă sunt mai puțin intense decât ale $IFN \alpha$ și β , dar este cel mai puternic inductor al activării macrofagelor și al exprimării moleculelor CMH clasa II pe celulele tisulare, fiind sinergic cu $TNF \alpha$ și $TNF \beta$.

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 asemanări, 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 asemanări, s-a propus ca interferonii să facă parte din grupul hormonilor "neclasici", 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: febra, hipotensiune, mialgie, bradicardie

Bazele celulare si moleculare ale memoriei imunitare

Raspunsul imun are trei particularitati generale: 1) *specificitatea*; 2) *diversitatea* (heterogenitatea anticorpilor); 3) *memoria*.

Memoria imunitara este caracterizata printr-un raspuns imun mai rapid si mai extins în timp. Argumentul direct este chiar timpul de latentă mai scurt al raspunsului imun secundar, explicabil prin faptul ca dupa prima expunere la antigen, rezulta o populatie mai numeroasa de celule cu receptori specifici fata de epitopii imunostimulatori. Aceste celule au parcurs deja câteva trepte ale diferentierii spre celulele producatoare de anticorpi.

Anticorpii raspunsului imun secundar au o afinitate mai mare de legare cu antigenul specific. In raspunsul imun secundar (de memorie), initial se secreta IgM, dar si alte izotipuri, în special IgG.

Memoria imunitara implica tipuri functionale specializate de limfocite T si 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 si IgD. Pe suprafata altor celule de memorie s-au identificat si alti receptori: IgM si IgG, IgM si IgA, IgM si IgE. Acesti markeri asigura generarea izotipurilor corespunzatoare de imunoglobuline în raspunsul imun secundar. Limfocitele B de memorie au localizari specifice si receptorii lor de antigen prefigureaza izotipul anticorpilor secretati: limfocitele care au ca receptor de antigen molecule de IgA si IgE sunt localizate în structurile limfoide asociate mucoaselor (digestiva, respiratorie). De aceea, calea de administrare a antigenului influenteaza profund izotipul anticorpilor care se sintetizeaza, fiecare izotip având o eficienta optima ca mediatori ai functiilor efectoare particulare: IgA inhiba aderența microorganismelor la suprafata mucoaselor; IgG si IgM sunt efectorii raspunsului imun humoral, iar IgE activeaza mastocitele.

Receptorii de antigen ai limfocitelor B de memorie au *afinitate* mai mare de legare a antigenelor si de aceea sunt mai eficienti în captarea cantitatilor mici de antigene si în prezentarea mai rapida a acestora.

Mecanismul generarii limfocitelor B de memorie este ipotetic. Una din teorii considera ca atât plasmocitele (producatoare de anticorpi) cât si celulele B de memorie deriva din *acelasi limfocit B precursor*. Celulele rezultate din diviziunile succesive declansate de stimularea antigenica evolueaza diferit: unele se diferentiaza în plasmocite, iar altele ramân limfocite mici care se reîntorc la starea G₀ si devin limfocite de memorie. Descendentii clonei stimulate evolueaza spre plasmocit sau

spre celula de memorie, în raport cu influentele pe care le primește de la diferite limfocine, de la celulele accesorii sau de la celulele Th.

Dupa alta teorie, celulele de memorie si plasmocitele provin din *celule B diferite*. Limfocitele B par fi preprogramate sa devina plasmocite sau limfocite de memorie, înainte de expunerea la antigen.

Raspunsul imun secundar se caracterizeaza prin cresterea afinitatii anticorpilor.

Afinitatea receptorilor si a anticorpilor fata de antigene este conferita de regiunea variabila a moleculei. Cresterea afinitatii este explicabila prin doua mecanisme:

– *stimularea selectiva a limfocitelor* care au receptor VH/VL de mare afinitate, exprimat pe suprafata limfocitelor B neangajate. Altfel spus, pe masura ce cantitatea de antigen scade, continua sa se activeze numai celulele cu receptori de mare afinitate si sa domine raspunsul imun;

– dupa stimularea antigenica, în centrul germinativ al organelor limfoide secundare are loc procesul *hipermutatiei somatice*, printr-un mecanism necunoscut ce introduce mutatii punctiforme în regiunile V.

Mecanismul memoriei imunologice pentru *perioade lungi de timp* (luni, ani sau tot restul vietii) nu este cunoscut. Populatia celulelor de memorie trebuie, prin definitie, sa aiba viata lunga si aceasta, teoretic, se poate realiza fie prin generarea celulelor care nu se divid si nu mor sau prin generarea unei populatii care se reînnoieste prin diviziuni care înlocuiesc celulele moarte. Primul model are avantajul ca nu necesita un component reglator, iar al II-lea impune actiunea unui mecanism reglator al ratei de reînnoire.

Existenta unor limfocite cu viata lunga, dupa unii autori, este cu totul improbabila, dar rezultatele analizei limfocitelor la om, dupa expunerea severa la radiatii, sugereaza ca celulele individuale pot sa persiste fara sa se divida, un interval de ordinul câtorva decade. Dupa alte opinii, supravietuirea limfocitelor T si B este dependenta de prezenta antigenului. Experientele de transfer adoptiv al celulelor de memorie (T si B) au aratat o scadere a raspunsului de memorie, în 30-40 de zile, ceea ce sugereaza ca memoria imunitara nu este rezultatul diferentierii limfocitelor de memorie cu viata lunga. Pastrarea antigenului în organism pare sa aiba rol esential în mentinerea tuturor categoriilor de celule de memorie.

Antigenul se depoziteaza si se pastreaza în organism pentru perioade de ordinul lunilor sau chiar un an, în asociatie cu *celulele foliculare dendritice, sub forma complexelor imune*. Ele realizeaza stimularea continua a limfocitelor B, la un nivel scazut. Celulele foliculare dendritice sunt esentiale pentru memoria imunitara a celulelor

B, a caror 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.

Reteaua 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-dependență.

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. Raspunsul imun mediat celular fata de antigenele de transplantare si fata de antigenele celulare în general, are la baza aceleasi caracteristici ale reactivitatii imunitare: instalarea memoriei imunitare dupa stimulul primar si o reactivitate intensa si rapida dupa reexpunerea la antigen. Reactivitatea imuna secundara mediata celular se evidentiaza în dinamica respingerii alo- si xenogrefelor: organismele liniei genetice A resping alogrefa primara de la linia inbred B dupa dinamica raspunsului imun primar (10-14 zile). A II-a grefa de tesut de aceiasi provenienta este respinsa dupa dinamica raspunsului imun secundar (5-6 zile), iar a II-a grefa de la un organism al liniei inbred C este respinsa de organismele liniei A dupa dinamica raspunsului imun primar.

Celulele T CD₈ de memorie produc o gama larga de citochine, iar cele neangajate produc IFN γ .

Raspunsul imun secundar (de memorie) este rezultatul cooperarii variatelor tipuri de celule de memorie. De exemplu, celulele Th de memorie produc IL-2, cu efect stimulator asupra celulelor T_c si B de memorie. Cooperarea celulara mareste eficienta raspunsului imun. O cooperare de tip special este aceea a limfocitelor B de memorie, care au capacitatea de a capta foarte eficient cantitatile foarte mici de antigene specifice si de a le prezenta limfocitelor Th. Captarea antigenului prin intermediul receptorului imunoglobulinic specific de antigen este de circa 1000 de ori mai eficienta decât prin pinocitoza nespecifica.

Pe suprafata limfocitelor T de memorie nu apar molecule noi, dar se exprima la un nivel superior, cele implicate în aderenta la epiteliul venulelor. Moleculele de suprafata sunt implicate în recircularea limfocitelor la situsuri preferentiale (homing). Celulele T de memorie recircula în primul rând în tesuturile nelimfoide, ajung în tesuturile limfoide prin limfaticele aferente si se reîntorc în sânge prin limfa eferenta. Dovada este adusa de faptul ca *in vivo*, celulele care intra cu limfa în ganglionii limfatici, sunt exclusiv celule de memorie. Nu se stie daca aceste celule recircula sau raspund la o stimulare antigenica.

În concluzie, cele mai ample diferente între celulele neangajate si cele de memorie sunt de ordin functional si constau în primul rând în capacitatea celulelor de memorie de a secreta o gama foarte larga de citochine. Populatia celulelor de memorie are viata lunga, dar se pot divide cu o rata controlata de mecanisme homeostatice. Conditiiile pentru generarea si mentinerea memoriei nu sunt clare. Reexpunerea la antigenul specific nu pare a fi necesara pentru pastrarea memoriei.

REGLAREA RASPUNSULUI IMUN

Pentru eficienta actiunii nu este suficient sa posezi efectori foarte buni, ci performantele efectorilor trebuie monitorizate...(N. Wiener, 1961).

Teoria selectiei clonale considera ca organismul animal sau uman, în mod obisnuit raspunde la stimularea cu orice substanta antigenica naturala sau artificiala, deoarece sistemul imunitar este alcatuit dintr-un numar imens de populatii de celule limfoide, fiecare având receptori specifici pentru un epitop antigenic.

Sistemul imunitar manifesta o stare de toleranta perfecta fata de constituintii proprii organismului, dar exista situatii de exceptie, în care anumite molecule self pot deveni imunogene.

Interactiunile reciproce ale retelei idiotipice, ca mecanism esential al reglarii raspunsului imun, se bazeaza pe rationamentul ca dupa stimularea antigenica, raspunsul imun evolueaza pe doua directii esentiale:

– sinteza anticorpilor complementari fata de antigenul inductor, efectul fiind legarea si neutralizarea antigenului;

– sinteza unor molecule care se combina specific cu moleculele de imunoglobuline libere, dar si cu receptorii limfocitelor T si B si îi blocheaza, inhibând functia lor si stopând raspunsul imun. Aceste molecule au rol esential în reglarea raspunsului imun.

Sinteza moleculelor cu actiune specifica fata de receptorii limfocitari se datoreaza faptului ca moleculele de imunoglobuline, libere sau legate de celule, au determinanti antigenici proprii care se comporta ca imunogene chiar pentru organismul în care s-au sintetizat.

Determinanti antigenici izotipici. Molecula de imunoglobulina poarta în structura sa mai multe categorii de determinanti antigenici, evidentiati prin injectarea imunoglobulinei asociata cu adjuvantul Freund, la animalele de laborator. Anticorpul se comporta ca *antigene* fata de organismele altor specii si se sintetizeaza anticorpi fata de determinanti antigenici care definesc variantele izotipice, caracteristici diferitelor clase de imunoglobuline. Determinanti antigenici izotipici se gasesc pe catena H (γ , μ , α , δ , ϵ) sau pe catena L (κ sau λ) si sunt invariati pe toate moleculele de imunoglobuline ale unei clase, la toti indivizii unei specii.

Determinantii alotipici se gasesc pe moleculele de imunoglobuline ale organismelor unei specii, care au acelasi alotip, adica aceiasi combinatie de gene alele codificatoare ale anticorpilor. Determinantii alotipici sunt localizati în regiunile constante ale catenelor H si L si semnificatia lor este analoga celei a antigenelor de grup sanguin.

Determinantii idiotipici sunt localizati în regiunile variabile ale moleculei de imunoglobulina si reflecta particularitatile biochimice ale acestei regiuni. Aici se gasesc determinantii antigenici cu caracter individual ai moleculei de imunoglobulina, denumiti *idiotopi*, consecinta a hipervariabilitatii aminoacizilor.

Fiecare determinant antigenic se numeste *idiotop*, iar ansamblul lor formeaza *idiotipul*. Idiotopii sunt asociati cu secventele hipervariabile ale moleculei: trei secvente ale catenei L si trei din cele patru secvente hipervariabile ale catenei H (secventa a 3-a nu intra în alcatuirea paratopului).

Fenomenul idiotipiei semnifica existenta unor determinanti proprii fiecarui organism, localizati pe moleculele de anticorpi. Prezenta idiotopilor nu este limitata la moleculele libere de imunoglobuline, ci se gasesc si în structura receptorilor limfocitari de antigen, în special în structura moleculelor de imunoglobuline cu rol de receptor de antigen de pe suprafata limfocitelor B.

Teoria retelei idiotipice considera ca idiotopii sunt imunogeni chiar pentru organismul în care s-au sintetizat si induc sinteza anticorpilor specifici cu care se combina. Acestia se numesc anticorpi *anti-idiotipici*. La rândul lor, anticorpii anti-idiotipici induc sinteza anticorpilor *anti-anti-idiotipici*. Astfel, reseaua idiotipica nu este numai o retea de interactiuni moleculare între imunoglobulinele libere, ci este o retea mixta de *interactiuni celulare si moleculare*.

În contextul teoriei, distinctia dintre idiotip si anti-idiotip este numai operationala. Orice idiotip de pe suprafata unui receptor de antigen(molecula libera sau ancorata în membrana limfocitelor T si B) poate functiona simultan, ca *imunogen*(epitop) stimulator al raspunsului imun, dar functioneaza si ca *paratop*, capabil sa se lege cu idiotipul complementar.

Repertoriul idiotipurilor este egal cu acela al specificitatilor de legare.

Teoria retelei idiotipice a lui Jerne se bazeaza pe faptul ca într-un organism, fiecare molecula de anticorp este recunoscuta de situsurile de combinare ale altor molecule de anticorpi cu configuratie spatiala complementara. Astfel, idiotopii proprii anticorpilor sintetizati în faza initiala a raspunsului imun, se comporta ca determinanti antigenici si declanseaza un raspuns imun de faza II-a, în care se sintetizeaza anticorpi anti-anticorpi din faza I-a a raspunsului imun. Anticorpii din faza a II-a se numesc *anticorpi anti-idiotip*. La rândul lor, acestia au un set propriu de idiotopi, care se comporta ca epitopi antigenici si induc sinteza anticorpilor de faza a III-a s.a.m.d. Ca într-o sala a oglinzilor, acest proces se poate repeta continuu. Anticorpii sintetizati într-o astfel de cascada a raspunsului imun, sunt legati într-o retea de interactiuni specifice, care poate sa implice întregul sistem imunitar.

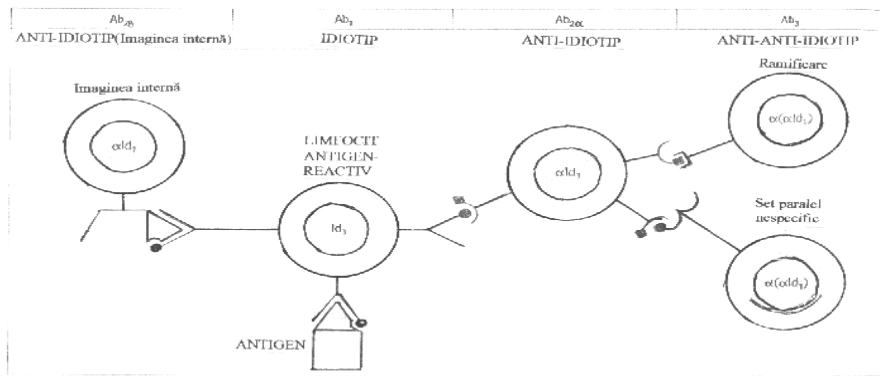


Fig. 89. Elementele rețelei idiotipice, în care receptorii de antigen ai unui limfocit recunosc reciproc un idiotip pe receptorii altui limfocit. Limfocitele Th, Ts și B interacționează prin reacții idiotip-antiidiotip, producând stimularea sau supresia. Interacțiunile T-T pot avea loc prin recunoașterea 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, $Ab_{2\beta}$ 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 ca anti-(anti- Id_1) nu se leagă în mod necesar de antigenul original (α = anti; Id = Idiotip; $Ab_1 = Id$; $Ab_{2\alpha}$ = anti-Idiotip ce nu implică paratopul; $Ab_{2\beta}$ = anticorpi anti-Idiotip imaginea internă care implică paratopul; Ab_3 = anti(anti- Id)).

Anticorpii anti-idiotipici constituie forța reglatoare a sistemului imunitar.

În mod asemănător, rețeaua de interacțiuni specifice se creează între idiotipii 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 imunitar.

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 imunitar, 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

cantitati de anticorpi. Astfel, sistemul imunitar este concentrat asupra componentelor proprii si produce anticorpi-antiidiotipici fata de propriul sau repertoriu de receptori. Toate componentele rețelei imunitare (celule, molecule) sunt într-o stare de comunicare permanenta si în stare de *echilibru reciproc*. Consecinta interactiunilor reciproce inductoare idiotip-antiidiotip este starea normala (echilibrata), represata, a sistemului imunitar.

Patrunderea unui antigen exogen în organism, stimuleaza câteva clone de limfocite si astfel sistemul imunitar iese din starea de represie obisnuita. Se sintetizeaza Ac_1 , care au idiotipul 1 (I_1).

Ca raspuns la determinanti idiotipici ai idiotipului 1, limfocitele B sintetizeaza anticorpi de faza a II-a (anticorpi anti-idiotip I_1). Efectele declansate de un antigen se propaga în tot sistemul imunitar, asa cum pe suprafata unei ape, sub impactul unui soc mecanic se induce unde succesive tot mai mici, pâna se ajunge la starea de echilibru.

Teoria rețelei idiotipice introduce un concept nou – al imaginii *interne a antigenului*, foarte important din punct de vedere teoretic si practic. În acord cu aceasta concepie, anticorpii (Ac_1) fata de un epitop poarta imaginea sa negativa. Idiotipii acestor molecule, asociati situsului de combinare, induce sinteza anticorpilor anti-idiotipici (Ac_2). Acestia poarta imaginea negativa a anticorpilor 1 si vor reproduce imaginea interna a epitopului initial. Anticorpii 2, care sunt imaginea interna a antigenului, pot fi stimulatori ai raspunsului imun fata de antigenul initial.

Numarul imaginilor interne creste odata cu sinteza unui nou idiotip, pe masura ce influenta antigenului se propaga în rețeaua sistemului imunitar.

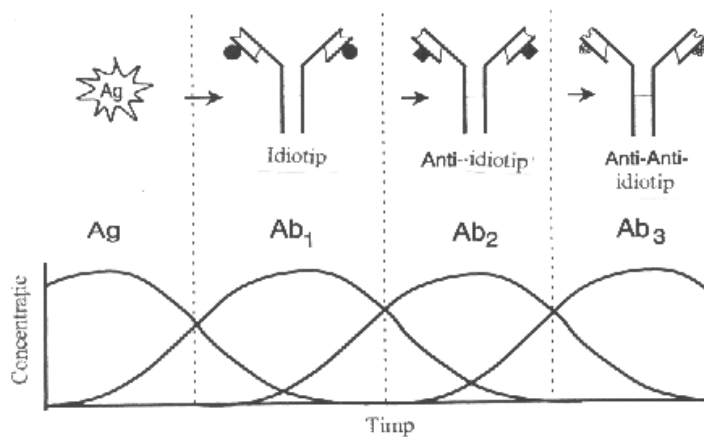


Fig. 90. Ilustrarea grafica a rețelei idiotipice. Anticorpii generati ca raspuns fata de un antigen constituie primul val al raspunsului. Al II-lea val este initiat de idiotipul anticorpilor din primul val si se numesc anticorpi anti-idiotipici. Ei exprima idiotipul care genereaza al III-lea val al raspunsului anticorpilor (anticorpi anti-anti-idiotipici). Teoria considera ca raspunsul idiotip-anti-idiotip continua indefinit, însa circuitul se încheie când unul din idiotipurile anticorpilor se aseamana cu unul din idiotipurile sintetizate într-un val anterior.

Conceptia actuala a functionalitatii sistemului imunitar presupune ca acesta este format dintr-un numar mare de *clone de limfocite*, care poarta receptori preformati fata de antigene. In acord cu rețeaua idiotipica, imaginile interne ale diferitelor epitopi ai clonelor de limfocite, sunt prezente în rețea, asa încât nici un epitop din mediul extern nu este cu adevarat strain pentru sistemul imunitar, deoarece toti epitopii capabili sa induca un raspuns imun, sunt reprezentati în sistemul imunitar de receptori limfocitari, prin imaginea lor interna.

Unii idiotopi ai rețelei sunt chiar imaginea interna a moleculelor antigenice din propriul organism. In acord cu aceasta conceptie, maladiile autoimune sunt consecinta perturbarii rețelei idiotipice.

Reteaua idiotipica se stimuleaza si sintetizeaza anticorpi anti-idiotipici, numai când idiotopii ating o concentratie limita.

Jerne compara cascada activarii idiotip-antiidiotip a sistemului imunitar, cu o sala a oglinzilor, în care initial se formeaza imaginea negativa a structurii nonself (anti-nonself), apoi anti-anti-nonself, care la rândul lor reflecta universul antigenelor exogene.

Teoria rețelei idiotipice permite înțelegerea sistemului imunitar ca un sistem global de *interactiuni reciproce*, în contradictie cu teoria clasica a clonelor de limfocite care asteapta pasiv întâlnirea cu antigenul.

Elementul fundamental al teoriei este ca sistemul imunitar formeaza o rețea functionala de interactiuni între molecule de anticorpi si receptorii limfocitari, continuu echilibrata înainte de patrunderea antigenului exogen.

Interactiunile idiotipice sugereaza o legatura functionala permanenta între limfocite, precum si între limfocite si alte categorii de celule din organism, stimulând pe unele, represând pe altele, printr-un ansamblu de semnale interne

Toleranta imunitara

Toleranta este o stare fiziologica, caracterizata prin absenta raspunsului imun fata de un antigen si prin pastrarea capacitatii de raspuns imun fata de alte antigene.

Sistemul imunitar este tolerant, în primul rând fata de componentele self, pe care a învățat sa le recunoasca în timpul dezvoltarii embrionare.

Starea de toleranta este specifica pentru un antigen dat si pentru cele înrudite din punct de vedere chimic, dar este asociata cu pastrarea reactivitatii imunitare fata de toate antigenele care nu dau reactie încrucisata cu antigenul tolerat.

Toleranta imunitara si reactivitatea imunitara prezinta urmatoarele caracteristici comune:

- sunt specifice fata de un antigen dat
- se manifesta dupa contactul cu antigenul inductor
- sunt mediate de limfocite.

Toleranta se deosebeste de starea de *imunosupresie*, ultima fiind consecinta unei incapacitati congenitale sau dobândite de a raspunde la o varietate de antigene.

Importanta fenomenului de toleranta fata de componentele proprii organismului a fost recunoscuta de Ehrlich si Morgenroth (1900), care au formulat conceptul "horror autotoxicus", o consecinta esentiala a functiei normale a sistemului imunitar, ce semnifica faptul ca în mod normal, organismul își asigura protectia propriilor sale componente fata de autodistrugerea prin reactivitatea imunitara.

Starea de toleranta poate fi indusa natural sau experimental.

Dupa 1920 s-a evidentiat ca toleranta poate fi indusa experimental, fata de unele antigene administrate în doze mari: toxina difterica, polizaharidul de streptococ (la soarece), γ globulina de cal (la iepure). Aceleasi antigene, în doze mici sunt stimulative ale raspunsului imun.

În 1938, Traub a indus toleranta specifica, prin inocularea soarecilor *in utero*, cu virusul coriomeningitei limfocitare (LCMV).

În 1945, Owen a evidentiat ca gemenii dizigoti de bovine (apartinând unor alotipuri diferite) își tolereaza reciproc antigenele tisulare, daca în cursul vietii embrionare, un proces de fuziune placentara a permis un schimb reciproc de elemente figurate. Cei doi gemeni resping gretele de tesut de origine parentala sau de la organisme cu aceiasi ascendenta. Acesti gemeni au elemente figurate

sanguine proprii, dar si celule sanguine ale gemenului cu un alotip diferit si se numesc *himere hematopoetice*.

Concluzia a fost ca, prin contactul timpuriu, în cursul vietii embrionare, al limfocitelor cu antigenele, se creeaza o stare de toleranta specifica fata de nonsel si ulterior, antigenele inductoare ale tolerantei vor fi recunoscute ca self si tolerate.

Himerele hematopoetice pot fi obtinute artificial, la organismele adulte, prin iradiere sau prin imunosupresie severa medicamentoasa, urmata de injectarea celulelor de maduva osoasa straina. In clinica, pentru tratamentul unor malignitati ale sângelui se realizeaza eliminarea totala a maduvei hematopoetice prin iradiere si imunosupresie, urmata de transplantul de maduva osoasa umana.

În sens mai larg, *himera biologica* este un organism dotat în mod artificial cu componente celulare, cu tesuturi sau organe, care provin de la alt organism.

În 1953, Billingham, Brent si Medawar au descoperit faptul ca maturarea limfocitelor parcurge un stadiu, în cursul caruia contactul cu antigenul, perturba acest proces, consecinta fiind pierderea functiei imunitare, adica limfocitele devin tolerate fata de antigenul respectiv.

Starea de toleranta se induce experimental, la soarecii nou-nascuti, fata de toate tipurile de antigene. Revelatoare în acest sens sunt starile de toleranta, induse la animalele nou-nascute, fata de celulele provenite de la organisme genetic diferite. Animalele injectate la nastere cu celule alogenice, la vârsta adulta vor accepta grefele tisulare de la organismele donoare de celule.

Inducerea starii de toleranta, prin contactul timpuriu cu antigenul, înainte de nastere sau imediat dupa aceea, se datoreaza faptului ca, în stadiul embrionar si o perioada postnatala de durata variabila în functie de specie, sistemul imunitar este imatur si în consecinta, foarte sensibil la inducerea starii de toleranta imunitara.

Starea de toleranta este *specifica* fata de determinantul antigenic. Toleranta poate fi încrucisata, adica se manifesta concomitent fata de mai multe antigene diferite, înrudite chimic, daca au cel puțin un determinant antigenic comun.

Limfocitele B imature sunt foarte sensibile la inducerea starii de toleranta, datorita faptului ca uneori, ele preiau informatia antigenica prin contactul direct cu epitopii specifici ai antigenului, dar dupa maturare devin rezistente la acest proces. Sensibilitatea limfocitelor T fata de inducerea tolerantei variaza în limite mai restrânse în cursul ontogeniei lor.

Mecanismele celulare si moleculare ale tolerantei sunt ipotetice, dar probabil sunt dependente de momentul inducerii tolerantei, în cursul ontogeniei lor.

Toleranta indusa în cursul vietii fetale este rezultatul contactului limfocitelor antigen-reactive, cu antigenul. Capacitatea de raspuns imun la stimulul antigenic specific este pierduta definitiv si ireversibil (de exemplu, toleranta soarecelui fata de LCMV dupa inocularea *in utero*).

În cursul vietii fetale, toleranta se instaleaza dupa acelasi mecanism al tolerantei fata de componentele self, care este putin cunoscut.

Starea de toleranta a limfocitelor B mature este mai greu inductibila. Mecanismul tolerantei este ipotetic.

În cursul vietii adulte, dupa stimularea repetata cu un Ag timo-dependent, toleranta se instaleaza ca rezultat al *epuizarii limfocitelor B antigen-reactive*. Toate limfocitele B mature, capabile sa reactioneze specific fata de un antigen, sunt stimulate si se diferentiaza în celule producatoare de Ac, astfel încât o stimulare ulterioara cu acelasi antigen ramâne fara raspuns.

Toleranta imunitara poate fi mediata de *celulele Ts*. Acest mecanism a fost demonstrat experimental la soarece, dupa injectarea unei cantitati mari de hematii de berbec. Starea de toleranta este transferabila la organisme izogenice, prin intermediul limfocitelor splenice Ts.

Toleranta poate fi indusa de *factori blocanti din plasma*, a caror natura nu este totdeauna cunoscuta, dar uneori s-au identificat a fi anticorpi, care îndeplinesc functia de specificitate, dar nu si functiile biologice efectoare.

Uneori, starea de toleranta indusa de antigenele greu degradabile este *aparenta*, deoarece se sintetizeaza anticorpi specifici fata de antigenul injectat. Se formeaza complexe imune cu antigenul care persista în organism si de aceea, în ser nu se detecteaza anticorpi liberi prin metodele obisnuite.

Factorii care conditioneaza inducerea starii de toleranta

Inducerea starii de toleranta este dependenta de doza de antigen, de modul de administrare, de starea fizica a antigenului, de calea de administrare, de rata de catabolizare a antigenului, de vârsta, de factori genetici.

Dozele inductoare ale raspunsului imun si ale tolerantei variaza mult de la un organism la altul, dar adeseori, dozele foarte mici si foarte

mari induc starea de toleranta, iar dozele medii sunt inductoare ale raspunsului imun. De exemplu, albumina serica bovina, în doze mici (1 mg/kg corp, de 3 ori pe saptamâna, timp de câteva saptamâni) sau în doza mare (100 mg/kg corp) induce starea de toleranta.

Administrarea antigenelor fara adjuvant favorizeaza instalarea tolerantei imunitare.

Administrarea intravenoasa si chiar orala favorizeaza inducerea tolerantei, iar injectarea subcutana, intradermica sau intramusculara stimuleaza raspusul imun.

Starea fizica a antigenului influenteaza reactivitatea imunitara. Antigenele proteice în stare agregata sunt imunogene, iar forma monomerică (solubila) a acelorasi antigene este, în functie de doza, imunogena sau tolerogena. Dozele mari de antigene solubile favorizeaza toleranta, dar în asociatie cu adjuvantii sunt imunogene.

Pentru inducerea si mentinerea starii de toleranta este necesara persistenta antigenului în organism. Antigenele care se catabolizeaza greu induc starea de toleranta.

Cea mai cunoscuta stare de toleranta experimentală este cea indusa de dozele mari de polizaharide (antigene timo-independente, greu degradabile). Ele produc paralizia limfocitelor B, dupa legarea în exces de receptorii lor. Corespondentul clinic al acestei situatii experimentale este starea de toleranta indusa de microorganismele capsulate, care produc infectii pulmonare la persoanele vârstnice. Pe fondul reactivitatii imunitare scazute, tesutul pulmonar este inundat cu polizaharide capsulare si sfârșitul este letal.

Durata starii de toleranta este variabila, în functie de mecanismul celular care a mediat instalarea ei.

Toleranta indusa în timpul vietii embrionare, probabil ca rezultat al anularii reactivitatii clonei de limfocite specifice, este *irreversibila*. Toleranta indusa dupa maturarea limfocitelor este o stare reversibila si revenirea la starea imunoreactiva normala este dependenta de timpul necesar regenerarii limfocitelor mature imunoreactive.

Durata tolerantei indusa prin fenomenul "inundatiei" antigenice este dependenta de rata catabolizarii Ag.

Toleranta fatului

Pentru organismul matern, fatul este o alogrefa, deoarece jumătate din zestrea sa genetica este de origine paterna.

Din punct de vedere imunologic, organismul matern nu este

tolerant fata de antigenele fetale. Ca dovada, grefa de tesut fetal este respinsa.

Pe toata durata sarcinii, organismul matern își pastreaza reactivitatea imunitara normala, dar prin intermediul placentei, fatul dispune de un sistem eficient de protectie.

Placenta, anexa de origine embrionara, este o bariera care neutralizeaza efectorii imunitari ai organismului matern. Trofoblastul este învelisul celular al placentei si al al membranelor extraembrionare ce acopera fatul si reprezinta tesutul fetal de interfata cu sângele matern si cu tesutul endometrului. La om, stratul trofoblastic extern al vilozitatilor corionului placentar este *sincitiotrofoblastul*, un strat celular continuu fara jonctiuni intercelulare. Prin sincitiotrofoblast, fatul se hraneste, respira si supravietuieste.

Pe fata interna (spre embrion), placenta nu exprima antigenele majore de histompatibilitate, iar pe fata externa predomina antigenele minore. Moleculele CMH de origine fetala au o densitate mica. Organismul matern recunoaste antigenele fetale ale placentei si reactioneaza prin mecanisme imunitare. Asa se explica faptul ca în circulatia materna se detecteaza anticorpi antifetali la circa 15% dintre gravide. Diferentele antigenice dintre mama si fat par a fi chiar benefice pentru dezvoltarea fatului. Asa se explica vigoarea hibrizilor, în contrast cu dificultatile de propagare a liniilor inbred. Greutatea placentei si a embrionului este mai mare la femelele alogenice, fata de cele singenice în raport cu fatul lor.

Pe fondul unei reactivitati imunitare normale a organismului matern fata de stimulii antigenici, la nivelul placentei, ca zona de interfata feto-materna, se produce o modelare a reactivitatii imunitare, care favorizeaza toleranta fata de antigenele fetale.

Toleranta fata de antigenele fetale se realizeaza prin urmatoarele mecanisme:

- în placenta se secreta si se concentreaza substante cu actiune imunosupresoare strict localizata, care inhiba activarea limfocitelor Tc si NK;

- placenta secreta factori care neutralizeaza local Ac antiplacenta si îi transforma în anticorpi blocanti, care la rândul lor au efect protector;

- în placenta s-au detectat limfocite cu efect imunosupresor (Ts), iar numarul lor creste semnificativ în a II-a jumătate a sarcinii;

- placenta are o rezistenta deosebita. Celulele sale rezista efectului litic al celulelor Tc si NK;

- placenta are o capacitate proprie de regenerare. Eventualele sale leziuni provocate de efectorii IMC si IMH sunt compensate prin

proliferarea celulelor rezistente. Placenta supusa atacului efectorilor imunitari este mai groasa decât în mod obisnuit;

–placenta are rolul de a minimaliza recunoasterea antigenelor fetale de catre efectorii imunitari de origine materna, având rolul unui "burete" imunitar. Sincitiotrofoblastul uman, dar si al altor specii, prezinta receptori pentru regiunea Fc γ , prin intermediul carora IgG matern este transportat selectiv în circulatia fetala si confera imunitate pasiva tranzitorie postnatala într-un mediu ostil din punct de vedere antigenic. Transferul maxim are loc în saptamânile 20-22 de sarcina. Concomitent pot fi transferati anticorpi materni specifici fata de antigenele fetale (în special anticorpi anti-HLA, care s-au sintetizat într-o sarcina anterioara) si care ar avea efect defavorabil asupra dezvoltarii fetale, daca ar penetra bariera placentara. Exista mecanisme care protejeaza fatul de IgG matern. Alo-anticorpii materni specifici anti-HLA fetale sunt legati pe celulele netrofoblastice (fibroblaste, endoteliale etc.) din mezenchimul intravilar al tesutului placentar si nu ajung în circulatia fetala. IgG matern cu potential lezional (IgG anti D sau anti-plachetari), care scapa efectului neutralizant al placentei întâlnesc tinte antigenice foarte extinse (pe eritrocite, pe plachete);

–sub aspect imunitar, placenta este "o zona neutra", datorita nivelului scazut al moleculelor CMH;

Daca toate aceste bariere de aparare sunt depasite, se produce avortul imunitar.

Capitolul 6

SURSE DE GAMAGLOBULINE OMOGENE

Moleculele de anticorpi ale unui ser imun sunt foarte heterogene din punctul de vedere al specificitatii 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 uriasă a specificității de combinare a anticorpilor (evaluată la 10^8 - 10^9) 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.

Proteinele 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 plasmatiche.

Tumorile de mielom apar spontan cu o frecventa mica la om, câine, cal, sobolan, soarece sau se induc experimental la soarecii liniilor inbred NZB si BALB/c. Tumora este transplantabila în serie.

Uneori, proteinele M au aceiasi secventa de aminoacizi ca si imunoglobulinele normale, dar adeseori, sinteza catenelor patologice este incompleta: lipsesc diferite secvente de aminoacizi, de diferite lungimi.

Rareori, proteinele de mielom își pastreaza chiar proprietatea de a lega specific determinanti antigenici cunoscuti: de exemplu, 5% din proteinele M ale unei linii inbred de soarece, leaga determinanti antigenici ai suprafetei celulelor bacteriene enterice, ceea ce sugereaza ca tumora își are originea în descendenti limfocitelor B, care prolifereaza ca raspuns la stimularea specifica cu antigene ale microbiotei enterice.

Tumorile de mielom, de cele mai multe ori, secreta molecule incomplete sau fragmente de molecule imunoglobulinice.

În celulele tumorilor de mielom, rata sintezei catenelor H si L este dezechilibrata. De exemplu, *mielomul Bence-Jones*, sintetizeaza catenele L în mare exces. Proteinele Bence-Jones sunt dimeri de lanturi L (κ sau λ). Una din cele doua catene L are rolul catenei H si participa la formarea situsului de legare. Molecula patologica are activitate de anticorp fata de unele componente tisulare sau fata de antigene mici.

Mielomul lanturilor grele sintetizeaza numai catenele H ale izotipurilor α , γ sau μ , iar mielomul macroglobulinemiei Waldenstrom sintetizeaza molecule de IgM. Majoritatea mieloamelor produc proteine Bence-Jones.

În laboratorul clinic, diagnosticul de mielom se pune dupa detectarea în ser, prin electroforeza, a unei cantitati mari de molecule ale unui izotip de imunoglobulina (circa 50 mg/ml).

Proteinele de mielom precipita la 50-60^o, la pH 4-6, se redizolva prin încalzire la 80-90^o si reprecipita prin racire.

La pacientii cu mielom, în special la cei cu macroglobulinemie Waldenstrom, vâscozitatea sângelui creste mult, datorita cantitatii excesive de proteine produse de mielom. Eliminarea proteinelor patologice se face prin procedeul *plasmaferzei*. Plasmaferza este tehnica de recoltare a unor volume mari de sânge, urmata de reintroducerea în organism, a celulelor sanguine suspendate într-un înlocuitor de plasma.

Surse artificiale de anticorpi monoclonali. Tehnologia hibridomului

Metoda clasica de obtinere a anticorpilor necesari studiilor clinice si de diagnostic, consta în stimularea repetata, prin injectarea antigenului într-un organism cu reactivitate imunitara optima. Când titrul anticorpilor specifici este maxim, animalul este sângerat si se obtine serul imun (antiserul), care este folosit în stare nativa sau este utilizat pentru purificarea anticorpilor. Metoda are câteva dezavantaje:

- cantitatea si calitatea anticorpilor fata de un antigen variaza de la un organism la altul si chiar între sângerarile succesive ale aceluiasi animal;

- serul imun este un amestec foarte heterogen de molecule de anticorpi, chiar si în cazul în care imunizarea se face cu un antigen cu grad înalt de puritate;

- oricât de simplu ca structura moleculara, un antigen are mai multi epitopi care stimuleaza mai multe clone de limfocite, ce produc anticorpi cu specificitati si afinitati diferite;

- antigenele înalt purificate contin impuritati antigenice care induc sinteza anticorpilor specifici în cantitati disproportionat de mari;

- chiar dupa purificare – proces costisitor – antiserurile contin anticorpi cu afinitati diferite si cu reactivitate încrucisata.

Din aceste cauze, toate serurile imune sunt amestecuri de anticorpi *policlonali*, în cantitati variabile de la un organism la altul. Obtinerea unor cantitati mari de anticorpi cu specificitate de legare fata de un epitop unic, prin metoda clasica este imposibila.

Tehnologia moderna de obtinere a anticorpilor omogeni, denumita *hibridoma* (hibrid + mieloma) a fost propusa de Köhler si Milstein (1975), se bazeaza pe urmatoarele principii metodologice si teoretice:

- 1) Antigenul purificat se injecteaza animalelor de experienta.

- 2) La momentul adecvat, din splina sau din ganglionii limfatici, se separa limfocitele. Fiecare limfocit si plasmocitele derivate sintetizeaza molecule omogene de anticorpi, cu specificitate unica de combinatie pentru un singur epitop, denumiti *anticorpi monoclonali (AMC)*.

- 3) Limfocitele B traiesc putin în afara organismului, iar plasmocitele care sintetizeaza cea mai mare cantitate de anticorpi, nu supravietuiesc *in vitro* si de aceea cultivarea sau clonarea lor nu este posibila.

- 4) Celulele de mielom sunt *nemuritoare*, datorita capacitatii lor de

a se mentine un timp nelimitat în cultura. Fuziunea lor cu limfocitele B *in vitro*, le confera celor din urma proprietatea de “nemurire”, rezultând o celula hibrida(hibridom), care sintetizeaza si secreta anticorpi monoclonali (AMC). AMC sunt considerati ca varianta *in vitro* a proteinelor de mielom, pentru ca în ambele cazuri, o clona de limfocite prolifereaza si secreta anticorpi cu o anumita specificitate

5) Hibridomul producator de anticorpi mosteneste caracteristici atât de la limfocit – adica secreta anticorpi cu specificitate fata de un antigen, cât si de la celula de mielom, adica este *nemuritor*.

6) Celulele hibridoma pot fi clonate individual si fiecare clona produce anticorpi specifici fata de un singur determinant antigenic. Ele pot fi mentinute indefinit prin pasaje *in vivo* sau prin cultivare *in vitro*.

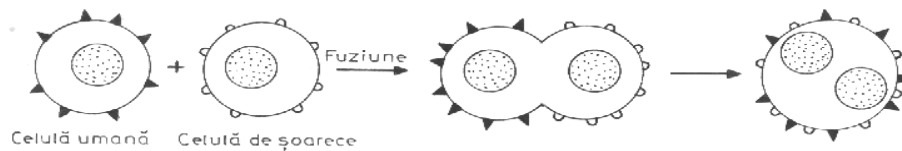


Fig. 91. Biotehnologia *hibridomului* de producere a anticorpilor monoclonali se bazeaza pe fuziunea limfocitului, cu celula tumorală de mielom de soarece. Antigenele membranare specifice ale celor doua celule, se distribuie în mozaic pe suprafata celulei fuzionate heterocarion.

Etapele obtinerii hibridomului

Metodologia obtinerii unei linii celulare hibride, nemuritoare, producatoare de AMC, parcurge mai multe etape.

1. *Obtinerea celulelor de mielom*. Baza tehnologiei hibridomului a fost obtinerea unei linii celulare mutante de mielom, care nu secreta anticorpi si este deficiente pentru hipoxantin-guanozin-fosfo-ribozil-transferaza (HGPRT).

Mielomul (plasmocitomul) este rezultatul diviziunilor necontrolate ale unui singur plasmablast sau ale unui precursor al sau din linia limfocitara B. Proliferarea necontrolata este însoțita de sinteza unor cantitati mari de molecule omogene de imunoglobulina, cu proprietati biochimice uniforme. Moleculele sintetizate de tumorile de mielom se deosebesc de imunoglobulinele normale, prin aceea ca nu prezinta 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 soarece (BALB/c si NZB), dupa

injectarea intraperitoneala a uleiurilor minerale, sau dupa implantarea materialelor plastice, care produc o reactie inflamatorie cronica. Tumorile apar dupa 120-130 de zile si se pot mentine prin pasaje seriate la soareci din aceiasi linie inbred sau prin cultivare *in vitro* si produc cantitati suficiente de imunoglobuline pentru analiza biochimica. Nu s-au obtinut mieoame care sa sintetizeze anticorpi cu specificitate de legare fata de un antigen.

Hibridoamele se obtin din linii speciale de mielom, care au doua particularitati mutationale:

- nu sintetizeaza propria molecula de imunoglobulina, astfel ca celula hibrida va produce exclusiv molecule de imunoglobulina caracteristice limfocitului B normal;

- sunt deficiente pentru sinteza enzimei HGPRT, necesara sintezei acizilor nucleici.

- Pentru hibridare sunt disponibile linii celulare de mielom de soarece, de sobolan, de om, dar cea mai folosita este linia P 3-X63-Ag8, izolata de la linia BALB/c, cu urmatoarele caracteristici:

- este HGPRT⁻;

- este tumorigena pentru soarece;

- are o frecventa relativ înalta ($1/10^5-10^6$) de fuziune cu limfocitele de soarece;

- nu sintetizeaza imunoglobulina proprie si nu represeaza genele pentru sinteza imunoglobulinei în hibridom;

- are o eficienta înalta de clonare *in vitro*.

Deoarece sunt deficiente pentru sinteza enzimei HGPRT, celulele sale nu detoxifica efectul aminopterinei, care se adauga în mediul de crestere. Aminopterina, un antagonist al reductazei acidului folic, blocheaza calea sintezei ADN prin inhibitia sintezei purinelor (A, G) si a timidinei. În mediul cu aminopterina, celulele cu HGPRT⁻ nu supravietuiesc.

2. *Imunizarea.* Obtinerea unei populatii mari de limfocite B, prin fenomenul expansiunii clonale, angajate în sinteza anticorpilor specifici fata de un anumit epitop, se realizeaza prin imunizare. Antigenul stimuleaza mai multe clone de limfocite. Fiecare clona de limfocite activate, sintetizeaza anticorpi specifici fata de unul din epitopii antigenului. Procedura de imunizare (cantitatea de antigen, tipul de adjuvant, calea de administrare) este selectata empiric.

Cea mai buna sursa de limfocite ramâne splina de soarece si de sobolan, dar în special soarecele BALB/c, pentru ca mielomul are aceiasi origine si prin hibridare se evita incompatibilitatea CMH. Hibridoamele de sobolan, obtinute prin fuziunea limfocitelor splenice cu

celule de mielom, sunt mai stabile si anticorpii pe care îi sintetizeaza fixeaza complementul.

Cantitatea de antigen necesara 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 creste dupa cuplarea cu hemocianina de *Limulus* (KLH) sau cu albumina. Cea mai buna imunizare se obtine prin injectare intravenoasa sau intraperitoneala repetata, timp de câteva saptamâni sau luni, a antigenului slab imunogen.

Splina se recolteaza înainte de atingerea titrului maxim al anticorpilor serici. Blastele fuzioneaza mai usor decât celulele în repaus.

O alternativa a imunizarii este stimularea limfocitelor *in vitro*, prin incubarea în prezenta antigenului.

3. *Fuziunea* se realizeaza în scopul "imortalizarii" celulelor producatoare de anticorpi si este esenta biotehnologiei hibridomului. Scopul "imortalizarii" este pastrarea capacitatii limfocitelor individuale de a secreta un singur tip de AMC, prin cresterea nelimitata în timp, fara senescenta, *in vivo* sau *in vitro*, ca o consecinta a transformarii, indusa cu celule de mielom.

Limfocitele sau imortalizat pe trei cai:

- prin fuziune cu celule tumorale de mielom
- prin infectie cu un virus transformant ADN
- prin transfecție cu ADN transformant din celulele maligne sau cu

ADN al unui oncodnavirus.

Cea mai utilizata metoda de "imortalizare" este aceea a fuziunii cu o celula de mielom. Fuziunea limfocitelor viabile din splina, obtinute prin dezagregare mecanica, cu celulele de mielom HGPRT - se realizeaza prin amestecul lor în proportie de 2-5 celule splenice/o celula de mielom.

Procesul fuziunii este stimulat pe mai multe cai, dar cel mai adesea se foloseste PEG cu gr. mol. de 4000 D. Amestecul de celule se mentine 3 minute în 0,20-0,50 ml PEG 40%, la 37⁰, pH 7,5-8,0. Frecventa fuziunii creste sub actiunea impulsurilor electrice scurte, de mare intensitate.

Numarul si varietatea hibridoamelor obtinute este mare, ceea ce impune selectia celor producatoare de anticorpi cu specificitatea dorita.

4. *Selectia celulelor de hibridom*. Amestecul de fuziune contine celule splenice si celule de mielom nefuzionate, celule splenice fuzionate între ele, celule de mielom fuzionate între ele si celule *hibridom*, rezultate prin fuziunea splenocitelor cu celule de mielom.

Selectia are ca scop, separarea celulelor de hibridom si eliminarea din amestec, a celorlalte tipuri celulare, nefuzionate sau fuzionate

neutilizabile. În acest scop, amestecul de celule se cultiva pe *mediul selectiv HAT* (hipoxantina-aminopterina-timidina), în care splenocitele nefuzionate și fuzionatii splenocit x splenocit mor în 1-2 săptămâni, coplesite fiind numeric de celulele de hibridom, care se divid la fiecare 17-24 de ore.

Mediul selectiv HAT permite supraviețuirea numai a *fuzionatilor mielom x splenocit* și este inhibitor pentru celulele de mielom, ca și pentru fuzionatii 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 timidina. Hipoxantina din mediul HAT poate fi convertită la inozin-monofosfat, de către enzima HGPRT și se formează adozin-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 fuzionatii 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 *clona 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.

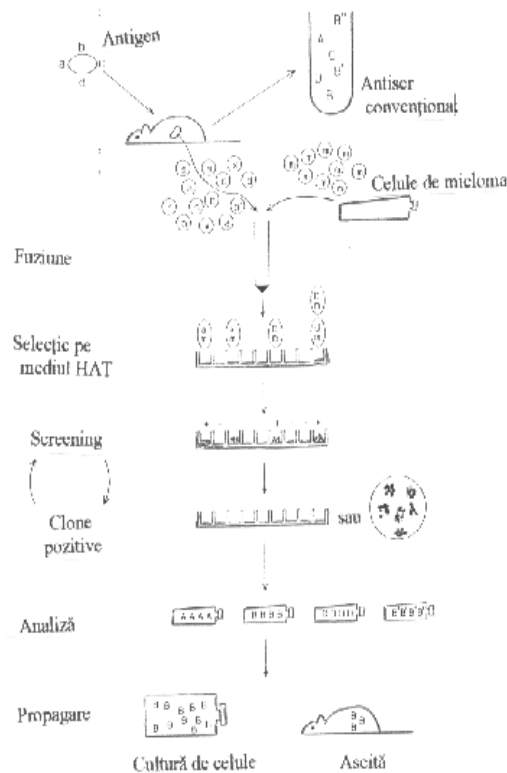


Fig. 92. Ilustrarea schematica a etapelor producerii anticorpilor monoclonali (AMC). Animalele, de obicei soareci, sunt imunizate cu un antigen (de exemplu, un microorganism care contine 4 antigene de suprafata - a, b, c, d). Fiecare antigen contine un numar de epitopi, de exemplu molecula b contine epitopii b, b', b''. Serul animalelor imunizate este policlonal si contine anticorpi A, B, B', B'', C, D. Prima treapta în producerea AMC este obtinerea suspensiilor de celule B si celule de mieloma. In etapa urmatoare, cele doua populatii de celule (**m** si **s**) sunt puse în amestec, în prezenta PEG, ca agent de fuziune. Suspensia se repartizeaza în godeurile unei placi pentru cultivarea celulelor, la o dilutie adecvata astfel încât, fiecare godeu sa nu contina mai mult decât o celula hibrida. Celulele se cultiva în mediu HAT pentru a inhiba cresterea celulelor de mieloma nefuzionate. Celulele splenice nefuzionate nu se divid si mor dupa câteva zile. In procesul de selectie mor si fuzionatii **s - s** si **m - m**. Supravietuiesc si prolifereaza fuzionatii **am**, **bm**, **b'm**, **dm** si **xm**. Clonarea se repeta. Hibridoamele se cultiva si se determina specificitatea anticorpilor sintetizati. Cele care sintetizeaza anticorpi cu specificitatea necesara se propaga în recipiente mai mari în care se obtin 1-10 $\mu\text{l/ml}$. Celulele pot fi injectate în cavitatea peritoneala de soarece, unde se multiplica sub forma ascitei si produc 1 mg/ml anticorpilor specifici.

Hibridoamele producatoare de anticorpi cu specificitatea dorita, se cultiva *in vitro*, în culturi cu perfuzie continua cu mediu proaspat sau în bioreactoare cu capacitate mare.

Cea mai simpla tehnica este a cultivarii *in vivo* si consta în inocularea intraperitoneala a circa 2×10^6 celule hibridoma, la organisme ale aceleasi linii genetice (pentru evitarea fenomenului de incompatibilitate CMH). Hibridomul se dezvoltă intraabdominal si lichidul de ascita care o însoteste, contine anticorpi în proportie 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 purifica prin fractionare cu sulfat de amoniu sau prin metoda cromatografiei cu schimb de ioni.

Avantajele biotehnologiei hibridomului

Producerea AMC prin tehnologia hibridomului are un avantaj net fata de metoda conventionala a obtinerii serului imun, deoarece se pot obtine anticorpi specifici produsii de câte un hibridom, pentru fiecare epitop al unui antigen natural. Clonarea individuala a fiecarui hibridom, creeaza conditii ca fiecare clona celulara sa secrete anticorpi cu specificitate unica fata de un singur epitop al unui antigen.

Celulele de hibridom proliferaza rapid, ceea ce scurteaza timpul necesar obtinerii AMC.

Hibridoamele produc cantitati foarte mari de anticorpi, ce depasesc de câteva ori concentratia anticorpilor din serul animalelor imunizate.

Clonele de hibridom se mentin indefinit prin cultivare *in vitro* sau *in vivo*.

Hibridomul ofera posibilitatea obtinerii AMC marcati, prin adaugarea precursorilor marcati radioactiv (marcare interna). Anticorpul marcat *in situ* (în timpul sintezei) ofera un avantaj net în raport cu anticorpul marcat dupa purificare (marcare externa). Marcarea externa cu 125 implica purificarea imunoglobulinelor din antiserul conventional, dar presupune modificarea chimica si denaturarea partiala, cu pierderea proportionala a specificitatii de legare.

Pentru marcarea interna se folosesc elemente radioactive cu perioada de înjumtatire mai lunga decât a 125 : C^{14} , S^{35} , H^3 . Marcajul radioactiv intern este net superior celui cu peroxidaza si feritina, utilizat în tehnicile conventionale.

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 soarece 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 fluoresceina 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.

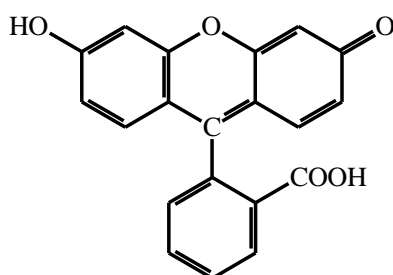


Fig. 93. Structura fluoresceinei.

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 gripal A.

AMC se folosesc pentru identificarea moleculelor

neurotransmitoare, a receptorilor sinaptici și a enzimelor de biosinteza. S-au obținut AMC față de receptorul de acetilcolina, dar dificultățile sunt mari pentru că neurotransmitorii 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 moleculă indicator (anticorpul marcat) și antigen. Imunocitochimie necesită producerea anticorpilor specifici și tratamentul adecvat al țesuturilor, adică fixarea și histoprepararea pentru a favoriza interacțiunea optimă între reactiv și moleculă țintă a hepatitelor virale B, C, D, a infecției cu HIV (prin determinarea prezentei antigenelor în ser) și a unor infecții bacteriene. Pentru diagnostic se folosesc anticorpi marcați cu fluoresceina 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 diferitelor hormoni sunt foarte asemănătoare, dar diferă în special prin catenele β . Există AMC specifici pentru ambele subunități și AMC care recunosc epitopii conformationali 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 pret de cost inferior în raport cu AMC.

AMC se folosesc în *controlul fertilității*: AMC anti-HCG și anti-zona pelucidă sunt folosiți pentru imunizarea pasivă a femeilor fertile.

Speranța utilizării AMC în tratamentul tumorilor s-a năruit. Una din

cauze este ca majoritatea tumorilor umane își au originea în celulele epiteliale ale colonului, sânului, plămânului și prostatei, iar oncogenele activate codifica 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 pret 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 oncogenele activate.

AMC se folosesc pentru *neutralizarea* nivelelor toxice ale unor medicamente (digoxina).

AMC se folosesc ca agenți *imunosupresori*. Receptorilor de grefa li se administrează AMC specifici față de complexul antigenic membranar CD₃, în cazurile în care imunosupresia chimică (cu ciclosporina) 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, abrina), 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 (imunosorbente), prin care este trecut amestecul de proteine. În coloana sunt reținute specific, moleculele care se leagă cu AMC. Astfel se purifică proteine care se găsesc în amestec, în concentrații foarte mici (IFN).

Capitolul 7

MECANISME DE APARARE ANTIINFECTIOASA

Sistemul imunitar a evoluat si s-a complexat structural si functional, în conditiile presiunii selective permanente pe care o exercita agentii infectiosi, ce tind sa invadeze, sa colonizeze si sa se multiplice în tesuturi. Structura sistemului imunitar este o reflectare directa a interactiunilor sale cu diversitatea agentilor infectiosi care-l stimuleaza. Cele doua forte opozante s-au modelat reciproc, într-un conflict constant. Gazdele care nu neutralizeaza agentul infectios sunt sortite mortii, iar cele care supravietuiesc sunt mai bine adaptate sa reziste infectiilor ulterioare.

Raspunsul imun fata de un microorganism sau fata de un virus este foarte complex, comparativ cu raspunsul imun fata de un antigen macromolecular, datorita complexitatii lor antigenice. Cele mai simple virusuri induc sinteza anticorpilor cu câteva specificitati distincte, iar parazitii pluricelulari au pe suprafata lor, un numar nedefinit de antigene diferite. Celulele bacteriene ocupa o pozitie intermediara, atât în privinta complexitatii structurale cât si a heterogenitatii antigenelor. Fiecare tip structural de molecula poate sa contina câteva epitopi diferiti sau repetitivi.

Problema heterogenitatii antigenice a virusurilor si bacteriilor patogene este importanta nu numai din punct de vedere teoretic, ci este esentiala pentru aspectul practic al *vaccinarii*, deoarece exista riscul stimulării raspunsului imun fara eficienta protectoare. Consecinta stimulării unui raspuns imun ineficient poate fi agravarea maladiei infectioase sau chiar activarea mecanismelor patogenitatii autoimune.

Evaluarea imunogenitatii moleculelor structurilor suprafetei virusurilor si bacteriilor este dificila, deoarece o molecula în solutie poate avea o alta configuratie a epitopilor decât în ansamblul structural nativ. Diferenta deriva din raporturile sale spatiale cu moleculele vecine, pe suprafata agentului infectios. Din aceasta cauza, raspunsul imun al organismului, la stimularea cu un agent patogen, ramâne un domeniu de studiu practic nelimitat. O alta complicatie este consecinta faptului ca specificitatea antigenica a unor molecule este, uneori, variabila de la o tulpina la alta, atât la virusuri cât si la bacterii. Raspunsul imun trebuie

sa contracareze nu numai diversitatea antigenelor la care este expus, ci trebuie sa gaseasca solutia de raspuns, pentru variatia biochimica a unei structuri, la diferite tulpini de microorganisme.

RASPUNSUL IMUN SPECIFIC ANTIINFECTIOS

Raspunsul imun antibacterian si antiviral are atât o componenta humorala cât si una celulara. Prevalenta unuia sau altuia dintre cele doua compartimente este diferita în functie de natura agentului infectios. De cele mai multe ori, predomina raspunsul imun mediat humoral, iar în cazuri mai rare (de exemplu, infectia cu *M. tuberculosis* sau cu *M. leprae*) este preponderent raspunsul imun mediat celular.

Raspunsul imun fata de diferite antigene ale agentilor patogeni are grade variate de protectie antiinfectioasa, în functie de natura agentului, de gradul sau de virulenta si de natura raspunsului imun pe care-l initiaza. Uneori, raspunsul imun antiinfectios este putin benefic pentru gazda sau este chiar detrimental, din diferite cauze:

– raspunsul imun este orientat fata de componente moleculare neesentiale ale agentului infectios. Stimularea antigenica activeaza un raspuns imun ineficient. Anticorpilor nu au efect neutralizant al infectiozitatii, pentru ca structurile de care se leaga specific nu constituie situsuri critice ale agentului patogen (de exemplu, anticorpilor antiflagelari, care *in vitro* determina aglutinarea, *in vivo* au o eficienta mai scazuta, limitata la imobilizarea celulelor bacteriene);

– raspunsul imun poate produce leziuni mai puternice si mai extinse decât însusi agentul infectios. Infectia propriu-zisa produce leziuni minime, dar activarea imunitatii mediate celular amplifica leziunile tisulare si grabeste evolutia procesului infectios (de exemplu, leziunile consecutive infectiei cu virusul corio-meningitei limfocitare la soarece si liza hepatocitelor infectate cu virusul hepatiei B umane).

Componentele structurale antigenice ale unui agent infectios, care stimuleaza un raspuns imun protector se numesc *situsuri critice* sau structuri *imunodominante*.

Un raspuns imun eficient (protector) trebuie sa aiba ca rezultat final, lezarea structurii peretelui bacterian, fungic sau a învelisului viral, prin actiunea combinata a anticorpilor si a proteinelor complementului.

Structura antigenica a celulei bacteriene

Multe molecule bacteriene moduleaza activitatea sistemului imunitar, având ori un efect stimulator (adjuvant), ori diminua reactivitatea imunitara. Ele modifica raspunsul celulelor imunitare

competente, prin mecanisme de semnalizare. De aceea se numesc molecule *imunomodulatoare*. Efectele lor realizeaza un echilibru complex între mecanismele de recunoastere si neutralizare a antigenelor si virulenta bacteriana. Imunomodulatorii pot avea efecte asupra limfocitelor T, B si asupra macrofagelor, similare cu cele produse de citochine.

Imunomodulatorii cu activitate mitogenica, induc *activarea polyclonala* a limfocitelor T si B, care se deosebeste de activarea specifica. Rezultatul este sinteza anticorpilor cu specificitati multiple, dintre care, o fractie sunt specifici fata de agentul infectios. Desi fara specificitate, sinteza rapida a anticorpilor poate fi suficienta pentru stoparea infectiei.

Moleculele imunomodulatoare modifica nu numai reactivitatea imunitara, ci si mobilitatea celulelor, în special a fagocitelor (de exemplu, pot inhiba migrarea macrofagelor din focarul inflamator). Daca moleculele imunomodulatoare persista în tesuturi, stimuleaza cronic sistemul imunitar, cu efecte patologice autoimune, cea mai cunoscuta fiind artrita de adjuvant.

Multe molecule imunomodulatoare de origine bacteriana au efecte mai generale, care se extind asupra altor sisteme: ele produc febra, influenteaza sistemul de coagulare sanguina, concentratia ionilor, a Fe etc.

Moleculele bacteriene cu rol imunomodulator sunt localizate pe suprafata celulei. Ele sunt polimeri ai învelisului, dar si molecule excretate, cu efect toxic. Pe de alta parte, eficienta raspunsului imun antibacterian, depinde de raportul dintre reactivitatea sistemului imunitar si mecanismele de autoprotectie ale bacteriei, menite sa devieze raspunsul imun.

Din punct de vedere antigenic, bacteriile interactioneaza cu gazda prin modalitati diverse. La o extremitate sunt cele lipsite de atributul invazivitatii, care produc cantitati mici de toxine, iar la cealalta, sunt bacteriile care cresc cu o rata înalta în tesuturi sau în sânge si produc *septicemii*. Unele bacterii prezinta determinanti antigenici asemanatori ca structura chimica, moleculelor self ale organismului gazda. Raspunsul imun specific va fi absent ori nesemnificativ, sau efectorii imunitari dau reactii încrucisate cu moleculele self. Alteori, suprafata bacteriana poseda determinanti antigenici de natura proteica sau polizaharidica, inductori ai raspunsului imun.

Cele mai semnificative structuri bacteriene din punct de vedere antigenic sunt cele parietale: peptidoglicanul din peretele Gram pozitiv si Gram negativ, peptidoglicolipidele din peretele complex al micobacteriilor si structurile parietale ale spirochetelor. Toate tipurile

structurale de perete contin mureina (peptidoglican), dar se deosebesc prin alte numeroase componente chimice cu semnificatie antigenica.

Unitatea minima a peptidoglicanului care pastreaza activitatea imunostimulatoare este N-acetil-muramil-L-alanina-D-izoglutamina (muramil *dipeptid*- MDP). Atât componenta glucidica cât si aminoacizii MDP au functie imunomodulatoare.

A II-a clasa de polimeri imunomodulatori sunt *acizii teichoici si lipoteichoici* ai bacteriilor Gram pozitive.

Proteinele de suprafata asociate peretelui celular au, uneori, semnificatie antigenica. Cea mai cunoscuta este *proteina M* de la *Str. pyogenes* (grup A), care confera specificitate de tip. S-au identificat peste 80 de variante antigenice, cu rol de factor de virulenta.

Componentele antigenice esentiale ale membranei externe a bacteriilor Gram negative sunt *lipopolizaharidele* (LPS), a caror specificitate este conferita de polizaharidul O, o structura imunodominanta care cuprinde pâna la 40 de unitati glucidice. Numeroasele variatii structurale ale catenei glucidice determina existenta unui numar corespunzator de variante antigenice bacteriene. LPS este componentul principal al bacteriilor Gram negative, activator al raspunsului imun înscut, prin componentul sau lipidic. Termenii "LPS" si "endotoxina" sunt frecvent utilizati cu acelasi sens. LPS trebuie sa desemneze moleculele purificate, iar termenul de "endotoxina" semnifica LPS si proteinele asociate din membrana externa, eliberate din suprafata celulei.

LPS sunt molecule *amfifile*, ceea ce conditioneaza interactiunea lor cu celulele organismului. Ele au o regiune *hidrofoba*, capabila sa stabileasca legaturi cu lipidele membranare si o parte *hidrofila*, care poate ramâne în faza apoasa. O prima modalitate de interactiune este cea *directa*, dintre molecula amfifila si suprafata celulei. Molecula LPS poate fi inserata în membrana celulei, prin jumatatea hidrofoba sau se leaga de receptorii membranari prin jumatatea hidrofila.

A II-a modalitate de interactiune a moleculei LPS cu celulele este *indirecta*, mediata de *proteina* care leaga (*binding*) LPS (LBP). Molecula de LPS este recunoscuta si legata de o glicoproteina plasmatica de 60 kD, din categoria *proteinelor de faza acuta*. Este sintetizata de hepatocite si are un situs de legare pentru lipidul A.

Polizaharidele capsulare ale unor bacterii patogene Gram pozitive si negative, libere în supernatant sau legate de perete, sunt foarte imunogene daca contin lipide sau proteine terminale. Variatia lor biochimica deriva nu numai din schimbarea ordinii unitatilor glucidice componente, ci, în primul rând, din posibilitatea legarii monozaharidelor

de oricare din cei 6 atomi ai hexozei adiacente. Diferentele de secventa a monozaharidelor genereaza determinanti antigenici care nu reactioneaza încrucisat cu anticorpii specifici fata de un alt determinant cu aceiasi compozitie.

Toxinele de natura proteica sunt imunogene si stimuleaza raspunsul imun cu efect protector.

Peretele celular al *micobacteriilor* este foarte rezistent la actiunea factorilor litici. In alcatuirea sa intra glicolipide, formate din resturi de *acid micolic*, legati covalent de resturile de arabino-galactan (*lipoarabinogalactan*) si arabinomanan (*lipoarabinomanan*). Complexul glicolipidic se leaga de peptidoglican, prin punti fosfat.

Membrana externa a spirochetelor este bogata în *lipide si lipopeptide*, stimulative ale raspunsului imun si ale reactiilor de hipersensibilitate.

Bacteriile toxigene, lipsite de invazivitate (*C. diphtheriae*, *C. tetani*, clostridiile enterice) stimuleaza raspunsul imun humoral antitoxic.

Bacteriile invazive determina infectii regionale sau generalizate (sistemice). Majoritatea se multiplica în spatiile extracelulare, unele au localizare facultativ intracelulara, iar altele sunt obligat intracelulare.

Bacterii cu localizare extracelulara Bacterii facultativ intracelulare Bacterii obligat intracelulare

<i>Streptococcus sp</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Rickettsia</i>
<i>Staphylococcus sp</i>	<i>M. leprae</i>	<i>Chlamydia</i>
<i>Neisseria sp</i>	<i>Brucella sp.</i>	
<i>Escherichia coli</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	
<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Yersinia sp.</i>	
<i>Proteus sp.</i>	<i>Salmonella typhi</i>	
<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>S. paratyphi</i>	
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Treponema pallidum</i>	
<i>Haemophilus influenzae</i>		
<i>Actinomyces sp.</i>		

Bacteriile cu localizare *extracelulara* induc un *raspuns imun mediat humoral*. Activarea limfocitelor B este rezultatul cooperarilor celulare macrofag-limfocit B-limfocit Th. In focarul de inflamatie, bacteriile cu localizare extracelulara determina formarea abcesului, în care predomina polimorfonuclearele

Bacteriile cu localizare intracelulara induc, preponderent, un *raspuns imun mediat celular*. Persistenta lor în celulele fagocitare are ca rezultat final, formarea *granulomului*. Cele mai tipice pentru natura lor imunitara sunt granuloamele care se formeaza în infectiile cu *M. tuberculosis* si cu *M. leprae*.

Mecanisme prin care microorganismele evita apararea gazdei.

Infectiozitatea microorganismelor patogene este dependenta de capacitatea lor de a coloniza tesuturile gazdei si de a contracara mecanismele de aparare ale gazdei. Capacitatea de variatie rapida a moleculelor de suprafata este o trasatura evolutiva comuna în tot spectrul patogenilor. Se cunosc exemple de bacterii patogene care au elaborat mecanisme ce permit *variatio antigenica* rapida si eficienta. Moleculele de suprafata prezinta regiuni bine conservate, ancorate în membrana, dar nu sunt niciodata expuse contactului cu sistemul imunitar al gazdei. Rata înalta de mutatie produce un numar mare de variante antigenice. Astfel, în patogeneza gonoreii si meningitei, cauzate de *Neisseria* sp, rolul fimbriilor este esential pentru atasarea de celulele epiteliale. Moleculele de fimbriina evidentiaza secvente constante, semivariabile si hipervariabile. Regiunile hipervariabile determina antigenitatea acestor structuri si tropismul fata de celulele epiteliale ale tractului urogenital uman. *N. meningitidis* este capsulata si numai fimbriile proemina dincolo de limitele stratului polizaharidic. De aceea, pierderea fimbriilor inhiba proprietatea de aderenta.

Polizaharidul capsular este *repellent* pentru fagocite, deoarece celulele fagocitare nu au receptori pentru polizaharidele capsulare. Uneori, acestea sunt asemanatoare oligozaharidelor din moleculele glicoproteice proprii organismului, ceea ce explica slaba lor imunogenitate. Tulpinile variate, necapsulate sunt mai putin virulente, dar au avantajul ca nu sunt recunoscute de anticorpii specifici fata de antigenele capsulare. Absenta capsulei, la *Haemophilus influenzae*, confera celulei o capacitate sporita de a se atasa si de a invada celulele epiteliale ale gazdei.

La *Str. pyogenes* s-au identificat peste 80 de serotipuri diferite, ce rezulta din mutatiile punctiforme ale genei ce codifica *proteina M*, componenta a peretelui celular.

LPS protejeaza fizic celula bacteriana de actiunea complementului si a fagocitelor, constituind un strat protector, iar diversitatea glucidelor din oligozaharidul terminal, confera o variatie antigenica extrem de larga. La *S. typhimurium* s-au identificat peste 2000 de variante antigenice, cu tot atâtea specificitati serologice.

La spirocheta *Borrelia hermsii* (agentul febrei recurente, caracterizata prin crize febrile, separate de intervale asimptomatice), episoadele febrile semnifica aparitia si multiplicarea unei noi variante antigenice. Antigenul variant este o *proteina* abundenta 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 scade, 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 paraziti, 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 sporozoitilor de la tântării infectați. Răspunsul imun față de antigenele parazitului este mediat de anticorpi (IgG). La pacienții cu SIDA (care exacerbează dramatic evoluția tuberculozei sau infecțiile oportuniste), malarie 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.

Moleculile 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 paraziti, cu diferite specificități de aderență, este

cauza infectiilor persistente caracterizate prin unde de parazitemie si manifestari clinice specifice malariei.

Diversitatea fenotipica corespunzatoare variatiei antigenice este o strategie foarte eficienta pentru adaptarea la presiunea selectiva pe care o exercita efectorii raspunsului imun si la diversitatea de particularitati structurale si functionale ale tesuturilor gazdei. Mecanismele de variatie sunt deosebit de importante pentru succesul diseminarii unei infectii în populatia gazda.

Raspunsul imun în infectiile virale

Infectiile virale constituie, înca, o cauza majora a morbiditatii si mortalitatii, desi vaccinarea a redus incidenta infectiilor severe (polio, oreion, rujeola, rubeola) si a eradicat variola. Cunoasterea mecanismelor raspunsului imun antiviral este importanta pentru evaluarea problemelor clinice de fond (de exemplu, dinamica raspunsului imun) si pentru cautarea unor noi metode de obtinere a vaccinurilor.

Interactiunea virusurilor cu organismele, este modulata de sistemele de aparare înascute si dobândite. Pentru a se perpetua într-o populatie, virusul trebuie sa fie virulent, dar suficient de flexibil în modularea virulentei, pentru a se pastra în populatia sensibila. In perspectiva evolutiva, interactiunea virusului cu organismul sensibil trebuie sa confere superioritate virusului. Daca este prea virulent si nu poate fi controlat de imunitatea gazdei, rezultatul poate fi moartea si în final disparitia gazdei. Daca este lipsit de virulenta, virusul va fi eliminat prea rapid de sistemul imunitar al gazdei si poate sa dispara prin incapacitatea de a se perpetua.

Adeseori, virulenta virala este diminuata prin *mutatie* si în acelasi timp se selecteaza gazde mai bine adaptate imunitar, rezultând un echilibru fluctuant, în care coexista atât gazda cât si virusul.

Proteinele virale, componente ale capsidului si peplosului, sunt imunogene si induc un raspuns imun intens în organismul infectat. Raspunsul imun antiviral este orientat atât fata de antigenele exprimate pe suprafata virionilor, cât si fata de antigenele prezentate pe suprafata celulei infectate.

Antigenele expuse pe suprafata celulei infectate, difera în functie de natura virusului (nud sau acoperit) si de mecanismul maturarii virionilor. Celulele infectate cu virusuri nude (adeno-, reo-, enterovirusuri) expun pe suprafata 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 tinta 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-celula (liza 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 gazda, 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,

altul, în funcție de sediul multiplicării, care la rândul său conditionează 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 sincitial, 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 mușcătura, înțepătura, 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 fază fluidă, este *neutralizarea*, adică pierderea infectiozității 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 infectiozitatea lor este anulată de legarea anticorpilor specifici la nivelul fibrelor cozii. Virionul gripal are situsuri critice multiple: anticorpii anti-HA sunt neutralizanti, cei specifici anti-NA au efect neutralizant minim, iar anticorpii anti-proteina M sunt total ineficienți.

La adenovirusuri, situsurile critice sunt *capsomerele hexonice și fibra pentonică*. Anticorpii specifici față de aceste structuri sunt neutralizanti, iar anticorpii anti-penton nu diminuează infectiozitatea. Pentru HIV, situsul critic este zona prin care virionul se atasează de moleculele CD₄ ale limfocitului Th. Anticorpii 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* înveliti.

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 infectiozității*, deoarece chiar în cazul unui mare exces al

moleculelor de anticorpi, unele particule virale din interiorul agregatului, rămân în afara contactului cu anticorpii neutralizanti și își pastrează infectiozitatea, denumită *infectiozitate reziduală* sau *persistenta*. 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.

Anticorpii 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 infectiozitate 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.

Anticorpii reduc încărcătura de virus și diminuează infectiozitatea virală, consecința fiind scăderea numărului de celule infectate, ușurând astfel sarcina celulelor Tc de a elimina celulele infectate.

În cursul infecției secundare, anticorpii se sintetizează rapid, la titru înalt.

Anticorpii se folosesc pentru profilaxia și terapia infecțiilor virale. Imunizarea pasivă cu ser imun, diminuează riscul infecției virale și se folosește în tratamentul infecțiilor stabilizate.

Protectia 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. Anticorpii sintetizați la nivelul mucoaselor au efect protector, în absența anticorpilor sistemici. Anticorpii din secrețiile mucoaselor îndeplinesc două funcții majore față de agenții patogeni virali: *excluderea imună și neutralizarea infectiozității 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 infectiozitatea 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 reinfectia 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, anticorpii serici (IgM) difuzează în mucoase. Nu se știe în ce măsură anticorpii din secreții sau din sânge protejează epiteliul tractului respirator inferior.

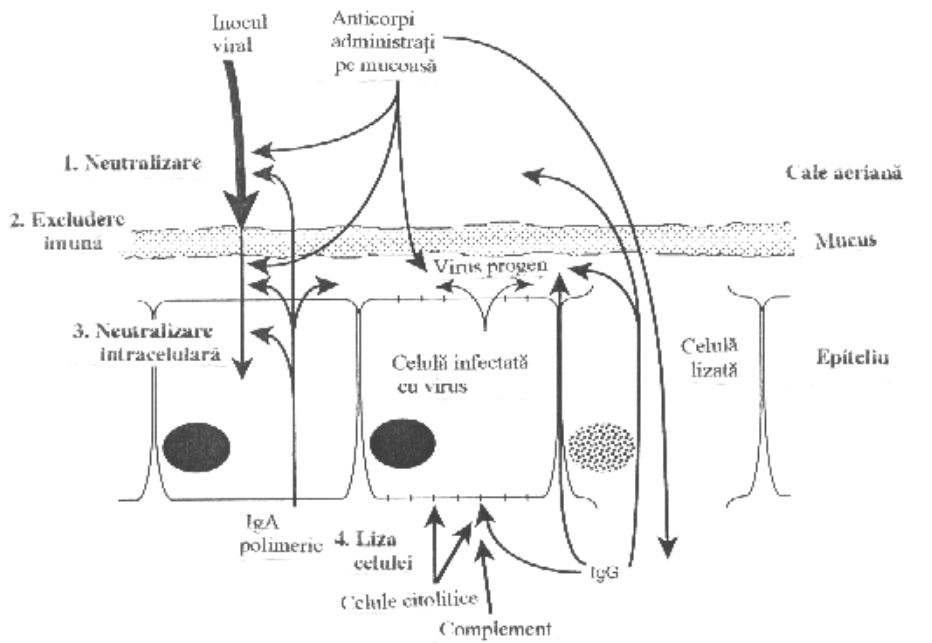


Fig. 94. Mecanismele protectoare ale mucoasei tractului respirator, fata de infectia virala. Dupa inoculare, particulele virale sunt *neutralizate* (1) de anticorpi, care ajung la suprafata mucoasei prin transport transepitelial (IgA polimeric), prin difuzie (IgG) sau prin administrare artificiala (picatura spray, aerosol). Alt mecanism este "*excluderea imuna*" (2) si se produce când particulele virale sunt legate de anticorpi, incluse în mucus si îndepartate prin activitate mucociliara. Anticorpii pot difuza prin mucus pentru a neutraliza virusul progen si particulele care trec prin stratul de mucus. Neutralizarea virala poate sa se produca *intracelular* (3), în timpul transportului intracelular al IgA polimeric. La suprafata bazolaterala a celulelor epiteliale infectate, IgG se poate fixa specific de proteinele membranare codificate de virus si mediaza *liza celulei* (4) dupa fixarea complementului sau prin fenomenul ADCC. Celulele infectate de virus pot fi lizate sub actiunea limfocitelor Tc specifice. Liza celulelor epiteliale usureaza trecerea efectorilor imunitari în ambele directii (dupa Weltzin, 1999).

În tractul respirator inferior, în secretia mucoasa, se gasesc concentratii mari de IgA si IgG. Anticorpii ajung în secretii, în mare parte, prin difuzia printre celule sau prin ruperi ale epitelului.

Desi vaccinurile gripale se administreaza parenteral, este clar ca anticorpii din secretii (sIgA) au rol major în protectia antiinfecioasa. sIgA confera o mai buna protectie încrucisata fata 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 anticorpii antivirali și complementul se leagă specific și pot să producă *citoliza*.

Complementul poate acoperi complexul Ag-Ac, blocând eventuale receptori disponibili. Complexele sunt fagocitate de celule care au receptori pentru C3.

Complementul poate liza virionii înveliti. 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 au 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. Anticorpii sunt mai eficienți față de infecțiile virale, când se administrează profilactic. Anticorpii administrați prin *imunizare pasivă*, în secrețiile tractului respirator, pot să prevină, să diminueze sau să vindece infecțiile virale. Imunizarile 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 secretorie (CS) îl protejează de acțiunea proteazelor.

În concluzie, imunitatea mediată humoral reprezintă modalitatea *tactică*, de neutralizare a virusurilor în faza extracelulară.

Anticorpii 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 înscuți de tip Bruton, nu au sensibilitate crescută față de infecțiile virale, cu excepția meningitei enterovirale, produsă de echovirusurile 9 sau 11. Anticorpii sunt activi față de antigenele virale din umorile organismului, dar nu penetrează în celulele infectate.

Imunitatea antivirală mediată celulară

În ciclul infecțios al multor virusuri, antigenele sunt expuse târziu pe suprafața celulei. În aceste cazuri, rolul protector al anticorpilor este secundar.

Imunitatea mediată celulară (IMC) constituie mecanismul major al apariției specifice antivirale. După infecția primară sau după administrarea vaccinului viral atenuat, se activează răspunsul celulelor Tc, care are activitate maximă la 7-10 zile și scade la 2-3 săptămâni

dupa infectie.

Pentru controlul infectiei virale, celulele Tc sunt esentiale. La pacientii cu sindrom Di George (cu aplazie timica congenitala), la pacientii SIDA, la cei leucemici sau la cei supusi terapiei imunosupresoare prelungite, frecventa si severitatea infectiilor virale cresc semnificativ.

Rolul IMC în protectia antivirala este elocvent în cazul infectiei cu virusul rujeolic. La copiii normali, infectia produce eruptia tegumentara caracteristica si ulterior virusul este eliminat. La copiii cu deficienta a celulelor T, boala este adeseori fatala. Manifestarile eruptive sunt mediate de celulele T si la copiii imunosupresati nu se produc. Aparitia eruptiei este indicatorul evolutiei favorabile. La copiii agamaglobulinemici, eruptia se produce si evolutia infectiei este nealterata de absenta anticorpilor. Se instaleaza imunitatea de memorie.

IMC precede sinteza anticorpilor în toate infectiile virale, dar în special în cazul infectiilor citolitice în care virusul se multiplica rapid. IMC are rol important în apararea fata de infectiile virale primare, deoarece se activeaza într-un timp scurt si raspunde nevoilor de aparare rapida fata de infectiile virale, înainte de edificarea raspunsului imun mediat humoral. In focarul inflamator indus de infectia virala se acumuleaza celule efectoare ale IMC, care ating valoarea maxima la doua zile de la începutul replicarii virale. IMC se activeaza dupa ce virusul a patruns în celula si aceasta expune pe suprafata ei, antigene virale. Efectul sau este liza celulelor infectate si are rolul de a limita diseminarea virusului în mediul extracelular. Liza celulelelor infectate cu virusuri citocide este protectoare numai daca se produce rapid, înainte de asamblarea virionilor progeni. Liza tardiva are efect opus, deoarece favorizeaza diseminarea virusului. Pentru virusurile care produc infectii persistente, citoliza timpurie sau tardiva are efect protector.

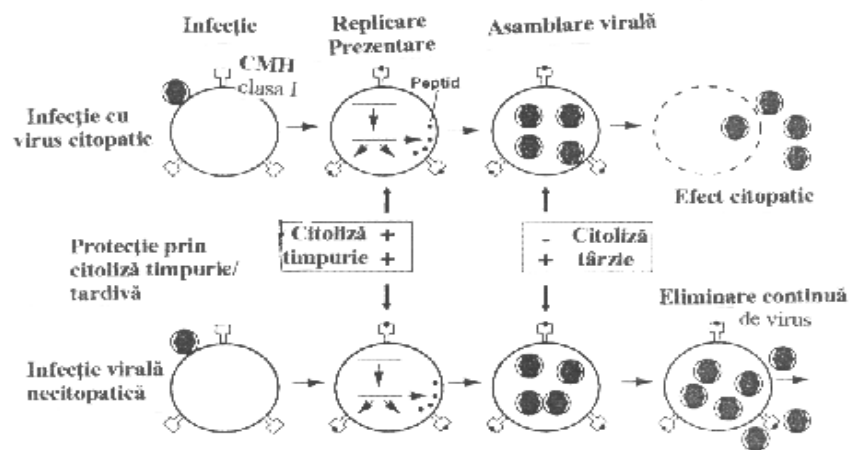


Fig. 95. Controlul *infectiilor virale citocice si necitocice* de catre celulele Tc. Liza celei infectate poate sa se produca în faza de eclipsa, înainte de asamblarea virionilor maturi sau în faza de mijloc, când numai o parte a virionilor s-a asamblat. In ambele cazuri, liza este protectoare fata de infectia cu virusuri citocice si necitocice. In contrast, liza relativ târzie în timpul ciclului de replicare virala este protectoare numai fata de virusurile necitocice. Daca celulele Tc nu produc liza, celulele infectate pot sa supravietuiasca si sa elibereze virioni infectiosi perioade lungi de timp. In cazul infectiei citocice, liza tardiva nu diminuea diseminarea virusului, deoarece asamblarea s-a încheiat si virionii vor fi eliberati prin citoliza produsa de efectorii imunitar (dupa Kagi, 1996).

IMC constituie modalitatea *strategica* de protectie antivirala, al carei efect este liza celei înainte de încheierea ciclului de replicare virala.

Efectorii imunitatii mediate celular detecteaza celulele a caror suprafata este modificata din punct de vedere antigenic (celule infectate cu virus, celule transformate malign, celule îmbatrânite sau celule nonself).

Orice proteina structurala a virionului sau existenta numai în celula infectata (proteina nestructurala) poate fi prelucrata de celulele infectate sau de celulele accesorii ale raspunsului imun. Moleculele nonself prelucrate sunt asociate cu moleculele CMH I (sau CMH II) si sunt expuse pe suprafata celei. Complexele moleculare devin tinte pentru actiunea limfocitelor Tc. Celula infectata este lizata sub actiunea factorilor litici eliberati de limfocitul Tc. Celulele Tc recunosc orice proteina virala, structurala sau nestructurala, asociata cu moleculele CMH.

Limfocitele Tc activate sunt specifice fata de virusul infectant. De exemplu, limfocitele Tc sensibilizate fata de virusul variolei, lizeaza numai celulele infectate cu acest virus. Nu lizeaza celulele normale si nici celule alogene infectate cu virusul variolei.

Zinckernagel si Doherty (1974) au demonstrat experimental specificitatea actiunii limfocitelor fata de antigenele virale, dar si fenomenul de limitare (restrictie) a interactiunilor celulei efectoare cu celula tinta, de identitatea moleculelor CMH. Celulele care prezinta antigenul si cele care îl recunosc trebuie sa fie histocompatibile, adica sa poarte pe suprafata lor, molecule CMH I si II identice.

În infectia secundara, raspunsul celulelor Tc este rapid, mediat de celulele Tc de memorie. Celulele de memorie pot sa persiste în absenta antigenului specific, probabil datorita stimulării sporadice nespecifice, de citochinele eliberate local în timpul reactiilor fata de antigenele neînrudite.

Celulele NK nu au specificitate fata de antigen si nu produc memorie imunitara. Celulele NK se activeaza rapid si la 2-3 zile dupa infectie ating activitatea maxima, dupa care diminueaza rapid. Deficientele pentru celulele NK sunt rare, dar sunt însoțite de infectii severe cu virusul varicela zoster, cu virusul citomegalic, herpes simplex virus 1.

Mecanismul interactiunii celulei NK cu celula infectata nu se cunoaste. Celulele NK lizeaza celulele care au pierdut moleculele CMH si astfel au devenit anormale. Activitatea celulelor NK este stimulata de interferon.

Celulele infectate cu virusuri pot fi lizate prin *fenomenul ADCC* (antibody dependent cell cytotoxicity), prin actiunea limfocitelor Tc sau NK. Ele lizeaza celulele tapetate cu anticorpi.

Fagocitele mononucleare (monocitul sanguin, macrofagul tisular, celula dendritica) au rol important pentru eliminarea virusului dintr-un proces infectios. Fagocitele mononucleare fagociteaza virionii inoculati prin întepatura. Macrofagele au si activitate ADCC.

Mecanisme prin care celulele infectate evita efectorii raspunsului imun

În mediul extern, virusurile sunt instabile, datorita sensibilitatii la factorii de mediu. De aceea, pentru a se perpetua într-o populatie de organisme sensibile, virusul trebuie sa ramâna cât mai mult în gazda infectata, ori sa se transmita cât mai eficient de la o gazda la alta. Pe de alta parte, efectorii raspunsului imun humoral si celular nu sunt totdeauna eficienti în recunoasterea si eliminarea celulelor infectate cu virus, iar virusul eliberat din celula, trebuie sa evite contactul cu efectorii

raspunsului imun.

În majoritatea *infectiilor persistente*, virusurile infectează celulele sistemului imunitar: virusul hepatitei B, papovavirus, herpes, virusul Epstein-Barr, virusul citomegalic, rușeola, rușeola, oreion, gripa, 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 rușeolei 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 *toleranta imunitară*.

Celulele infectate persistent manifestă fenomenul de *fluctuație cantitativă* a antigenului viral, expus pe suprafața lor. Celulele infectate cu virusul rușeolic trec succesiv prin cicluri de dispariție și reapariție a antigenelor virale, asociate membranei citoplasmice, în timp ce moleculele normale ale celulei nu au variații cantitative semnificative. Fenomenul se numește *modulație antigenică*.

Anticorpii necitolitici pot masca antigenele virale expuse la suprafața celulei, devenind astfel inaccesibile celulelor efectoare litice (limfocite T_c, NK).

Uneori, virusurile infectează *celule care nu exprimă molecule CMH I*. Neuronii exprimă puțin sau deloc moleculele CMH I și reprezintă un situs preferențial al persistenței virale. Herpesvirusurile infectează latent neuronii, iar virusul rușeolic, 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 gripa evită efectul neutralizant al anticorpilor specifici, prin rată 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 infectios, dar scapă detectării de anticorpii preexistenți. Fenomenul variației antigenice

limitate se numeste *drift antigenic*.

Shiftul antigenic corespunde unei noi variante genetice a virusului influenza si este rezultatul unei reasortari a genomului, care are loc cel mai probabil la pasari, unde se produce co-infecția cu un virus uman (ce infecteaza rareori pasarile) si cu o linie de virus aviar.

Virusurile contracareaza actiunea *citochinelor*. Virusurile sunt atât inductori ai sintezei interferonilor (IFN), cât si tinta principala a actiunii lor. Un virus care induce sinteza IFN si este foarte sensibil la actiunea sa inhibitorie nu se poate propaga. Evolutia a favorizat virusurile care contracareaza efectele inhibitorii ale IFN asupra ciclului de replicare virala. Virusurile cu virulenta înalta, inhiba sinteza ARN celular si sinteza proteinelor (efect de întrerupere), ceea ce interfereaza cu capacitatea celulei de a produce IFN si de a raspunde la actiunea lui.

Multe virusuri sunt rezistente la actiunea IFN. Unele dezoxiribovirusuri codifica proteine ce inhiba caile majore de transducere a semnalelor induse de IFN. De exemplu, proteina E₁ a adenovirusurilor inhiba semnalul indus de IFN α , β sau γ . Poxvirusurile codifica sinteza unor receptori solubili pentru citochine (pentru TNF si IL-1), denumiti *virochine*.

Tipurile de imunitate dobândita (adaptativa)

Homeostazia organismului uman si animal este asigurata de sisteme complexe de aparare, ale caror particularitati functionale au fost definite în primul rând, în raport cu modul de actiune fata de agentii infectiosi. Organismele dispun de doua categorii de mecanisme de aparare:

– mecanisme de aparare *specifica*, reprezentate de sistemul imunitar;

– mecanisme de aparare *nespecifica* sau *înascuta*, adica cele care asigura rezistenta sau imunitatea naturala.

Prin imunitate "naturala" sau *înascuta* se înțelege rezistenta unui organism fata de un agent infectios sau fata de un parazit, în absenta unui raspuns imun evident.

Cele doua sisteme de aparare, *specifica* si *nespecifica*, se conditioneaza reciproc. Nu se poate evalua gradul în care mecanismele de rezistenta naturala sunt influentate dupa expunerea la contactul cu agentii infectiosi, dar raspunsul imun detectabil sau chiar subliminal produce modificari ale starii de activitate a sistemului fagocitar

mononuclear si a celulelor killer.

Mecanismele de aparare antiinfectioasa sunt atât specifice (adaptative, dobândite) cât si nespecifice (înascute).

Imunitatea dobândita are un caracter specific si se defineste ca o stare de rezistenta antiinfectioasa, cu caracter individual, conditionata de contactul anterior al organismului, într-un proces infectios natural, cu agentul infectios virulent, cu toxinele sale native sau cu agentul atenuat si anatoxinele sale administrate ca *vaccin*. Imunitatea dobândita, denumita si *inductibila*, este relativa, în sensul ca, desi în general este foarte solida, poate fi învinsa prin agresiunea exercitata de o cantitate mare de agenti infectiosi sau de infectia cu o tulpina deosebit de virulenta.

În functie de originea si modul de instalare, imunitatea dobândita este de doua tipuri: dobândita pe cale *naturala* si pe cale *artificiala*. In ambele cazuri, imunitatea poate fi dobândita atât *activ*, prin raspunsul imun la stimulul antigenic, cât si *pasiv*, prin transferul de anticorpi exogeni.

Imunitatea dobândita natural activ se instaleaza dupa trecerea organismului printr-o stare de infectie aparenta (decelabila clinic) sau inaparenta. Durata starii de imunitate este variabila. Trecerea prin unele infectii asigura o protectie specifica pentru tot restul vietii (rujeola, variola, varicela, oreionul). Alte infectii (difteria, scarlatina, tusea convulsiva etc.) confera o protectie mai putin solida, astfel încât la o noua expunere(dupa câtiva ani), organismul poate face din nou boala într-o forma mai usoara decât prima îmbolnavire.

Imunitatea dobândita natural pasiv este rezultatul transferului transplacentar si prin secretia lactata, al anticorpilor de la mama la fat. Aceasta forma de imunitate este variabila din punct de vedere cantitativ si calitativ, în functie de complexitatea structurala a barierei placentare si diversitatea antigenelor la care a fost expus organismul matern. Trecerea imunoglobulinelor prin filtrul placentar depinde de structura placentei, adica de numarul de straturi celulare ce se interpun între circulatia materna si cea fetala. Tranzitul anticorpilor este restrictiv la speciile de bovine, cabaline, porcine, canine, care au placenta de tip *epiteliocorial*, cu 4 straturi tisulare: endoteliul capilar matern, epiteliul corionic, tesutul conjunctiv fetal, endoteliul capilar fetal. Nou-nascutul este protejat de imunoglobulinele din colostru. In primele 24 de ore, aparatul gastrointestinal este imatur din punct de vedere functional si digestia proteica nu are loc. Imunoglobulinele din colostru ramân intacte si sunt transportate în mediul intern prin celulele epiteliului intestinal. Transferul placentar al imunoglobulinelor este foarte intens la speciile cu placenta *hemocoriala* (om, maimute, rozatoare), la care stratul

endoteliului capilar matern lipseste si sângele matern scaldă tesutul placentar fetal. Nou-nascutul uman primește anticorpi materni si dupa nastere, prin colostrul bogat în imunoglobuline, provenite din circulatia materna.

Imunitatea dobândita natural si pasiv asigura noului nascut o stare de nereceptivitate fata de agentii infectiosi pentru care organismul matern este imun. Aceasta imunitate scade treptat dupa nastere, pe masura catabolismului anticorpilor de origine materna, astfel încât, dupa o perioada de 3-6 luni copilul devine sensibil fata de agentii infectiosi. Imunitatea transplacentara explica raritatea maladiilor infectioase la copii, în primele luni de viata.

Imunitatea dobândita artificial activ

Imunitatea dobândita artificial activ este consecutiva administrarii *vaccinurilor*. Denumirea de *vaccin* vine de la cuvântul latin *vaca* si semnifica originea primului preparat pe care E. Jenner (1798) l-a utilizat pentru controlul variolei.

Vaccinuri

Vaccinurile sunt produse biologice care contin bacterii vii cu virulenta atenuata, bacterii omorâte, toxine modificate (anatoxine), virusuri infectioase dar cu virulenta atenuata, respectiv virusuri inactivate si care, introduse pe o cale adecvata în organismul uman sau animal, stimuleaza reactivitatea imunitara, generând o stare de protectie temporara fata de agentul infectios din care au fost preparate.

Preparatul vaccinal trebuie sa fie *eficient*, adica sa induca un raspuns imun protector, a carui memorie sa se pastreze în timp si, pe de alta parte, sa prezinte un grad înalt de *siguranta*, adica sa nu determine efecte secundare defavorabile.

Administrarea unui vaccin se face pe baza unei strategii bine definita. Scopul vaccinarii poate fi *eradicarea*, *eliminarea* sau *limitarea* unui proces infectios.

Eradicarea semnifica disparitia agentului patogen, consecutiv actiunii de vaccinare.

Eliminarea corespunde disparitiei manifestarilor patologice, desi agentul patogen se pastreaza în populatia umana sau animala.

Limitarea semnifica posibilitatea controlului unei maladii infectioase pâna la un nivel la care nu mai reprezinta o problema de

sanatate publica.

În general, vaccinurile se administrează *înainte* de a se produce infecția cu tulpina salvatică 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 incubare 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 infectioși și sunt destinate imunizării întregii populații susceptibile.

Vaccinuri de origine bacteriana

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, patrundând 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 salvatice în condiții speciale: de exemplu, cultivarea la o temperatură superioară celei optime în cazul bacilului carbunos – *Bacillus anthracis*, sau prin acțiunea unor substanțe chimice și utilizarea unor medii de cultivare

care ofera conditii nefavorabile (vaccinul BCG).

Vaccinurile omorâte constau din suspensii bacteriene omorâte prin încălzire la temperaturi ridicate (60°), ori sub actiunea formolului sau a fenolului si care contin una din aceste substante ca prezervant. Din aceasta categorie fac parte vaccinul tifo-paratific A si B (TAB), vaccinul pertusis (din *Bordetella pertusis*), vaccinul stafilococic. Proprietatile imunogene ale vaccinurilor bacteriene omorâte se mentin intacte.

Anatoxinele (toxozii) sunt preparate biologice cu proprietati imunogene, derivate din toxine. Uneori, toxinele se transforma spontan în derivati lipsiti de toxicitate, dar pastreaza proprietatile de imunogenitate si specificitate ale toxinei native. Mecanismul molecular al inactivarii toxinelor nu este cunoscut. Inactivarea este un proces lent si progresiv, dependent de pH, temperatura, prezenta ionilor sau a proteinelor contaminante, de procesul învechirii preparatului. Un factor major al inactivarii pare a fi *proteoliza partiala* a moleculelor de toxina sub actiunea proteazelor contaminante, dar si schimbarea conformatiei moleculei, polimerizarea sau clivarea unui fragment molecular pot actiona în acelasi sens.

Inactivarea toxinelor si transformarea lor în produse atoxice are loc în conditii dirijate, sub actiunea formolului 4%_o, la 37° si rezulta *anatoxine*. Fenomenul a fost descoperit de Ramon (1925). *B e t a - p r o p i o l a c t o n a*, 2-4-dinitrofluorbenzenul si glutaraldehida au aceleasi efecte asupra toxinelor.

Pentru a fi utilizata ca vaccin, o anatoxina trebuie sa îndeplineasca urmatoarele conditii: a) sa fie imunogena si sa induca sinteza anticorpilor la un titru suficient pentru a neutraliza *in vivo*, toxina nativa; b) sa fie complet lipsita de toxicitate; c) sa nu aiba proprietati alergizante. Anatoxina ideala ar putea fi produsa de microorganisme manipulate genetic sau prin mutatii ale genei codificatoare a toxinei. Ea ar fi o proteina netoxica, dar cu aceleasi proprietati de imunogenitate cu ale toxinei native, capabila sa induca sinteza anticorpilor neutralizanti.

Conditiiile optime pentru obtinerea anatoxinelor sunt proprii fiecărei toxine si au fost optimizate empiric, dar mecanismele moleculare ale inactivarii nu se cunosc. În general, conditiile optime pentru obtinerea anatoxinelor sunt urmatoarele:

- concentratia proteica trebuie sa fie de 1 mg/ml, iar cea de formol, de 1,3 mg/ml;
- temperatura de detoxifiere este de $37-40^{\circ}$;
- pH-ul optim este de 7,8-8,2 pentru toxinele difterica si tetanica si 5,5 pentru cea botulinica;

– durata contactului cu formolul este de 3-5 săptămâni.

Detoxifierea începe simultan cu adaugarea 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 anatoxina are o structură stabilizată, prin formarea legăturilor noi între formol și resturile de aminoacid, 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, capra, 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 (infectios) atenuat;
 - 2) Vaccinuri cu virus inactivat (neinfectios).
- 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 infectioase, 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.

Anticorpilor fata de virusul rujeolei neutralizeaza virusul bolii Carré, dar nu si invers.

Calea de abordare a lui Jenner pentru obtinerea preparatelor virale utilizabile ca vaccinuri umane este folosita si astazi. Ea implica izolarea unor virusuri de la mamifere sau de la pasari, înrudite antigenic cu diferite virusuri umane. Pasajul lor în celulele diploide umane (CDU) *in vitro*, echivaleaza cu procesul atenuarii. Celulele diploide umane reprezinta un substrat semipermissiv pentru virusurile umane si mamaliene si adeseori, multiplicarea lor este lipsita de eficienta.

Genele virusurilor mamaliene si aviare, care determina spectrul de gazda au o mare diversitate a secventelor de nucleotide, fata de genele corespunzatoare ale virusurilor umane. Efortul de a realiza noi vaccinuri, pe calea clasica a lui Jenner, trebuie sa se sprijine pe tehnicile de genetica virala, biologie moleculara si imunologie.

2) *Inocularea virusului patogen* sau partial atenuat, pe o cale "nenaturala", adica alta decât cea prin care virusul patrunde în mod obisnuit în organism. Metoda este folosita pentru vaccinarea animalelor (de exemplu, virusul laringotraheitei pasarilor, se administreaza prin instilare în ochi). Pentru om, metoda nu se foloseste, deoarece riscul infectiei este mare.

3) *Pasajul virusului* de origine umana într-un substrat "nenatural", *in vivo* sau *in vitro*. Cele mai importante vaccinuri pentru om si animale s-au obtinut pe aceasta cale. Virusul se cultiva în mod repetat, prin inoculare la organisme sanatoase sau în culturi primare de celule: virusul febrei galbene s-a inoculat la soarece si apoi în embrionul de gaina; poliovirusul s-a inoculat în celulele de rinichi de maimuta; virusul rujeolei – în fibroblaste de embrion de gaina. Pasajul într-un substrat celular "nenatural", selectioneaza mutante printr-un cumul de evenimente mutationale întâmplatoare. In practica vaccinarii, se utilizeaza cele cu proprietati adecvate de atenuare si imunogenitate. Mutantele care dupa administrare ramân 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 maimuta, s-a selectat o linie lipsita de neurovirulenta, dupa inocularea intracerebrala sau intraspinala la maimuta. Vaccinul rubeolic s-a obtinut prin cultivarea virusului pe acelasi substrat, iar liniile folosite ca vaccin rujeolic si al febrei galbene s-au cultivat pe fibroblaste de embrion de gaina.

Vaccinarea cu un preparat viral atenuat echivaleaza cu o infectie usoara, asimptomatica.

Vaccinurile virale atenuate au avantajul important al stimulării ambelor compartimente ale raspunsului imun: celular si humoral, atât

sistemic cât și local. Acest fapt este deosebit de important pentru infecțiile virale în care imunitatea mediata 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 supraadaugați. 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 interfereze 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 larga varietate de enterovirusuri.

Vaccinurile inactivate contin virioni care, dupa tratamentul cu agentul chimic inactivant nu pot sa initieze ciclul de multiplicare în substratul permisiv.

Preparatul viral brut se obtine prin cultivarea virusului într-un substrat permisiv: în oul embrionat de gaina (virusul influenza), în culturi celulare de rinichi de maimuta (virusul polio), sau în fibroblastele umane de embrion de gaina (polio, rujeolic, rabic). Preparatul brut se inactiveaza cu formol, acetil-etilenimina sau cu beta-propiolactona.

Preparatele virale inactivate, utilizabile ca vaccin au avantajul riscului minim al infectiei. Rareori, preparatele inactivate contin virus infectios 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 anuleaza imunogenitatea unor proteine virale, astfel încât raspunsul imun fata de virusul inactivat nu este protector. De exemplu, inactivarea cu formol a virusului rujeolic anuleaza imunogenitatea proteinei de fuziune (F), iar vaccinul își pierde proprietatea protectoare.

Vaccinurile inactivate *nu stimuleaza imunitatea mediata celular* (mediata de limfocitele Tc), care au rol decisiv în eliminarea celulelor infectate cu virus si în rezistenta la infectiile cu o gama larga de virusuri.

Pretul de cost al vaccinurilor inactivate este mai mare.

Preparatele virale inactivate, folosite ca vaccinuri, se obtin din virusul rabic cultivat în CDU si în embrionul de rata, din virusul oreionului si din virusul influenza, cultivate în embrionul de gaina, din virusul polio, cultivat în celulele de rinichi de maimuta. Toate sunt inactivate cu beta-propiolactona sau cu formol.

Preparatul inactivat al virusului hepatitei B este o realizare recenta, dar este foarte costisitor pentru ca virusul nu se cultiva în sisteme celulare *in vitro*, iar tehnicile de purificare a virusului din serul pacientilor infectati cronic sunt foarte laborioase.

Vaccinuri subunitare

Initial, vaccinurile s-au obtinut din preparatele brute de virus, dupa multiplicarea lor într-un tesut (*in vivo*) sau în culturi celulare. Pe masura ce a fost posibila obtinerea unor titruri înalte de virus, în scopul diminuarii toxicitatii vaccinului, s-a trecut la purificarea virusului si a unor componente virale.

Vaccinurile subunitare contin *proteine virale* în care se gasesc localizate situsuri antigenice majore si care se pot substitui virionilor în

practica vaccinarii. De exemplu, pentru virusul influenza, vaccinul subunitar contine antigenele de suprafata HA si NA. Preparatul este mai putin toxic decât virusul integral inactivat, dar este mai putin eficient în stimularea raspunsului imun.

Celulele mamaliene reprezinta un sistem optim pentru producerea proteinelor virale, utilizabile ca vaccinuri subunitare. Celulele în cultura se infecteaza cu virus si din lizatele celulare se purifica antigene proteice. În lizate se gaseste o cantitate mare de proteine virale în exces, neîncorporate în virioni.

Obtinerea vaccinurilor subunitare proteice, în culturile de celule animale ridica probleme dificile de purificare a proteinelor virale, din amestecul cu proteinele celulare. Daca se folosesc linii celulare continue, trebuie îndepartat ADN celular, potential oncogen.

Tehnici moderne de obtinere a vaccinurilor subunitare

Dezvoltarea biologiei moleculare si cunoasterea mecanismelor raspunsului imun, a stimulat preocuparile privind obtinerea unor vaccinuri noi. Utilizarea anticorpilor monoclonali a facut posibila identificarea epitopiilor cu rol esential în stimularea raspunsului imun, iar genele codificatoare ale antigenelor, au fost clonate prin tehnicile de inginerie genica.

Genele codificatoare ale antigenelor protectoare, se pot izola dupa fragmentarea genomului sub actiunea catalitica a enzimelor de restrictie. Prin tehnologia ADN recombinant, genele se insera în celula procariota (*E. coli*, *B. subtilis*), sau în celulele eucariote (levuri, celule mamaliene).

Fragmentarea genomului cu endonucleaze de restrictie este posibila numai pentru dezoxiribovirusuri. Genomul ARN trebuie mai întâi transcris în ADNc si ulterior poate fi utilizat în tehnicile de ADN recombinant. Genomul ARN de polaritate pozitiva este adecvat scopului clonarii, dar nu a fost clonat ADNc al unei catene de ARN de polaritate negativa.

Celulele de mamifere reprezinta substratul optim pentru clonarea genelor si pentru producerea proteinelor virale, deoarece plierea, transportul celular si prelucrarea proteinelor sunt asemanatoare celor ce au loc în celula infectata de virusul natural. Celulele produc cantitati mari de antigen viral, codificate de gena clonata.

Tehnicile de clonare genica se folosesc pentru sinteza proteinelor unor virusuri, care nu se multiplica *in vitro*, în sistemele celulare uzuale. De exemplu, gena pentru sinteza antigenului HBs a fost inserata într-o plasmida si clonata de levuri. Proteina virala este neglicozilata, dar este imunogena pentru om si induce sinteza anticorpilor protectori fata

infecția naturală. S-au clonat genele codificatoare ale glicoproteinelor de HSV, VEB, HIV, VRS (virusul respirator sincitial).

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 genetică, 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 că 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

biologica.

Vaccinurile sintetice contin secvente polipeptidice sintetizate pe cale chimica. Ele includ determinanti antigenici esentiali pentru inducerea unui raspuns imun protector fata de agentii patogeni corespunzatori.

Conditia esentiala pentru obtinerea vaccinurilor sintetice este cunoasterea structurii chimice a determinantilor antigenici nativi ai virusului (sau ai microorganismelor patogene) si identificarea regiunilor imuno-dominante ale moleculei.

Tehnicile de cristalografie cu raze X, cromatografia în faza lichida, au permis identificarea situsurilor antigenice majore ale unor virusuri foarte importante pentru clinica. De exemplu, s-a determinat structura tridimensionala a hemaglutininei virusului gripal si s-au identificat *regiunile calde ale moleculei*, care, cu mare probabilitate, corespund determinantilor antigenici. S-a stabilit secventa aminoacizilor, care a fost reprodusa în proteinele sintetizate artificial.

Marea majoritate a peptidelor sintetice sunt secvente scurte, lineare de aminoacizi, care reproduc un fragment din structura primara a moleculei proteice. Dezavantajul major este ca secventele sintetice nu reproduc configuratia spatiala a determinantilor antigenici naturali, în special a celor discontinui. Acestia sunt alcatuiti din resturi de aminoacizi neadiacenti în structura primara a moleculei, dar pot fi juxtapusi în structura tridimensionala a proteinei pliate. Astfel se explica slaba imunogenitate a peptidelor sintetice. Ameliorarea calitatilor de imunogenitate ale peptidelor sintetice, utilizabile ca vaccinuri, depinde de gradul de asemanare a conformatiei lor, cu determinantul antigenic nativ.

Dimensiunile mici ale peptidelor sintetice impun cuplarea lor cu o molecula purtator, pentru cresterea gradului de imunogenitate. S-a folosit hemocianina de *Megathura* (KHL), cuplata prin intermediul glutaralhidei sau a unei grupari tiol a unui rest de cisteina, adaugat la o extremitate a secventei sintetice.

S-au sintetizat peptide care reproduc secvente de aminoacizi ale unor polipeptide ale virusului hepatitei B, cu diferite eficiente imunoprotectoare, precum si peptide care reproduc unele secvente ale hemaglutininei virusului gripal.

Polipeptidele sintetice utilizate ca vaccinuri, au avantajul ca nu contin alte componente care ar putea produce efecte secundare si stimuleaza raspunsul imun strict specific fata de epitopii antigenici critici ai agentului infectios. Sunt stabile indefinit si se produc la un pret de cost scazut. Au însa dezavantajul major de a nu stimula raspunsul imun mediat celular.

Vaccinurile care contin virioni inactivati si anatoxinele se administreaza, în general, pe cale *parenterala* (subcutan, intradermic, intramuscular), în mod obisnuit în trei injectii separate la intervale de 5, 7 si respectiv 21 de zile.

Vaccinurile bacteriene vii si cele virale atenuate se administreaza într-o singura doza, în general, pe cale *parenterala*. Vaccinul BCG, ca si vaccinul polio infectios atenuat, la nou nascuti se administreaza pe cale *orala*.

Imunitatea consecutiva vaccinarii se instaleaza relativ lent, la circa 15-20 de zile de la ultima injectie si are o durata variabila de la un vaccin la altul (în general, între 1 si 7 ani), scazând treptat pâna la disparitia completa. Vaccinarea primara, ca si infectia, confera organismului o stare speciala de reactivitate imunitara - *memoria imunitara* - gratie careia, orice contact ulterior cu agentul patogen respectiv, realizat pe cale naturala(infectie si boala) sau pe cale artificiala(prin vaccinare) declanseaza o "redesteptare" rapida a imunitatii, care se manifesta cu o intensitate mai mare decât aceea a raspunsului imun postvaccinal. Cea de a II-a administrare a vaccinului declanseaza o reactie anamnestică (de memorie), cu o crestere brusca si masiva a titrului anticorpilor.

Desi în general este solida, imunitatea postvaccinala este relativa, în sensul ca unele persoane vaccinate pot totusi sa faca boala într-o forma mai usoara, mai ales consecutiv unei infectii masive cu un agent patogen deosebit de virulent.

Datorita faptului ca se instaleaza lent, imunizarea prin vaccinare se foloseste în scop profilactic pentru a evita riscul infectiei cu un agent patogen.

Imunizarea dobândita artificial pasiv

Serurile imune sau terapeutice sunt produse biologice obtinute din serul sanguin al unui animal imunizat prin vaccinare sau din serul unui convalescent imunizat prin infectie naturala sau prin vaccinare. Serul imun contine anticorpi specifici, capabili sa neutralizeze actiunea antigenului corespunzator. Primele încercari de folosire a serurilor în terapeutică dateaza din 1888, când Richet si Héricourt au demonstrat ca inocularea organismelor animale cu agenti patogeni, determina aparitia în ser a anticorpilor, cu efect protector nu numai pentru organismul care i-a sintetizat, dar si pentru organismele carora li se injecteaza serul imun.

În general, serurile imune se prepara pe animale mari (cal), care sunt hiperimunizate, dupa principiile imunizarii active, cu doze repetate

crescând de celule, virioni, anatoxine sau toxine. Serul sanguin obținut prin sângerea animalelor imunizate este inactivat și tratat cu fenol (ca preservant), controlat pentru *sterilitate*, *inocuitate* (lipsa de nocivitate) și pentru *eficacitate* (titrul de anticorpi). Serul imun se administrează sub forma 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 cai. 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 infectioase 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 sigure în pericol de a se infecta și la care se urmărește prevenirea declanșării maladii în formă 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 hiperimunizati voluntar sau de la convalescenti (homologe).

În prezent se folosesc seruri imune concentrate si purificate, din care s-au eliminat circa 3/4 din proteinele serului sanguin, pastrându-se numai fractia globulinica specifica. Prin acest procedeu s-a redus foarte mult volumul serului injectat si se evita accidentele care ar putea rezulta din sensibilizarea organismului uman fata de proteinele nespecifice din serul heterolog.

Rezistenta antiinfectioasa înnascuta nespecifica

Prin imunitate sau *rezistenta naturala*, înnascuta sau congenitala se înțelege capacitatea unui organism de a fi rezistent fata de un agent infectios, în absenta unui raspuns imun detectabil. Aceasta proprietate este înnascuta pentru organismele unei specii si în mod obisnuit este *absoluta*, adica toti indivizii speciei respective sunt rezistenti fata de un anumit patogen, chiar în cazul inocularii cu doze mari ale agentului infectios. De exemplu, omul este rezistent la agentii patogeni care produc *zoonoze* (agentul pestei bovine, al pestei porcine, al holerei gainilor etc.), iar animalele sunt rezistente la gonoree, rujeola, oreion, dizenterie, gripa etc.

Starea de rezistenta naturala nu este conditionata de contactul anterior cu agentul patogen respectiv, ci este consecinta unei modalitati prompte de reactie a organismului. Starea diametral opusa este aceea de *receptivitate* sau de *sensibilitate* (susceptibilitate), caracteristica organismelor care, ca rezultat al agresiunii unui agent patogen, reactioneaza prin aparitia unui proces infectios. Starea de nereceptivitate este, uneori, relativa, în sensul ca exista deosebiri individuale de reactivitate în cadrul speciei, unii indivizi fiind total rezistenti, iar altii prezinta diferite grade de receptivitate. Raspunsul diferit al organismelor unei specii, la contactul cu un agent patogen, este rezultatul eficientei variabile a fortelor de aparare a organismului, care, izolate sau în asociatie, opun agentului patogen o bariera de nepatruns, determina inhibarea multiplicarii sau distrugerea lui în tesuturi sau umori, precum si neutralizarea si eliminarea substantelor toxice eliberate. Diferentele sunt, probabil, rezultatul actiunii unor factori genetici. De exemplu, oile din Alger sunt mult mai rezistente la infectia carbunoasa (produsa de *B. anthracis*), decât cele din Europa. La primele, macrofagele contin un numar mai mare de lizosomi si enzimele componente au activitate hidrolitica mult mai intensa. S-au evidentiat diferente de sensibilitate a raselor umane la tuberculoza: populatiile

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, intra în acțiune sistemul imunitar. Mecanismele de apărare antiinfecțioasă, specifice și nespecifice, sunt strâns integrate funcțional, astfel încât, acțiunea lor este totdeauna combinată. De exemplu, epitelul 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.

Barierile 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 descuamare, 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.

Suprafața *tegumentului* este acoperită cu o peliculă fină, formată din produsele de secreție ale glandelor sudoripare și sebacee, cu pH acid (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 fata de agentii infectiosi este îndeplinit de *mucinele* cu efect neutralizant, iar expulzarea lor este asigurata prin miscarea cililor celulelor epiteliale si prin reflexele de stranut si de tuse. Mucinele formeaza un strat mucos vâscos, ce tapeteaza mucoasele digestive si respirator. Ele capteaza microorganismele si antigenele, limitând penetrarea lor în tesuturi.

Histatinele(peptide bogate în histidina) formeaza o familie mica de peptide bazice de 3-5 kD, produse de celulele acinare salivare si pancreatice. Ele inhiba dezvoltarea celulelor de *C. albicans*, în forma infectioasa sau neinfectioasa.

Cistatinele sunt fosfoproteine ce contin cisteina, secretate de celulele acinare. Au efect inhibitor asupra cresterii microorganismelor.

Mucoasa gastrica este protejata de gelul mucos care o tapeteaza, ce formeaza un adevarat glicocalix si de aciditatea conferita de HCl, component al sucului gastric. Bacteriile Gram negative sunt foarte sensibile la actiunea mediului acid gastric. Dupa neutralizarea aciditatii gastrice cu substante alcaline, capacitatea sa protectoare diminueaza pâna la disparitie si infectiile se instaleaza rapid. Totusi, pe cale digestiva patrund agentii patogeni a numeroase maladii infectioase, evitând bariera aciditatii gastrice. Bolul alimentar este protector fata de aciditate si în interiorul sau exista conditii favorabile supravietuirii agentilor patogeni ingerati odata cu alimentele.

Secretiile mucoase, în compozitia carora intra *mucinele* (glicoproteine), au rol important în apararea antiinfectioasa. Mucinele adera la suprafata agentilor patogeni si a parazitilor, formând un strat molecular care împiedica interactiunea lor cu celulele epiteliale. Lor li se atribuie de asemenea, un rol neutralizant asupra toxinelor. În acelasi timp, secretiile formeaza o pelicula (film) protectoare, continua pe suprafata mucoasei, constituind o bariera greu de trecut pentru microorganismele în calea lor spre situsurile epiteliale de aderenta. Pelicula elimina bacteriile care nu se pot adapta conditiilor de sub pelicula, la granita mucus-epiteliu.

Un alt mecanism nespecific care controleaza cresterea microorganismelor la zona de contact cu mucoasa digestiva, este *peristaltismul* intestinal. Microorganismele adera la mucoasa epiteliala, prin intermediul unor molecule din categoria *lectinelor*, care realizeaza adevarate puncte de legatura între suprafata bacteriei si a celulei epiteliale. Peristaltismul intestinal împiedica realizarea acestor interactiuni stabile, creind un flux care deplaseaza microorganismele patogene, înainte ca ele sa colonizeze suprafata epiteliului. Numeroase infectii intestinale accelereaza peristaltismul. Anomaliile miscarilor peristaltice sunt factori favorizanti ai cresterii excesive a populatiilor

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 humoralii 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 radioimunodotare (RIA) a hormonilor, au condus la delimitarea unei noi discipline intermediare – *imunoendocrinologia*.

Afecțiunile de natură endocrină au un rasunet 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 influența 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 patrund 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 masticății sau al periajului dentar. După extracția dentară, există chiar o perioadă septicemică (cu multiplicare bacteriană). Datorită stării de bacteriemie temporară, animalele nu trebuie hranite 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 O_2 : 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 plagile 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 O_2 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 enzimatiche de digestie intracelulară.

Fenomenul fagocitozei (*phagocytosis* = a mânca) a fost descoperit de Iliia Metchnikoff (1882). El a dat denumirea generică de "fagocite", 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, constituenții lor chimici;

– la vertebrele superioare, fagocitele îndepartează celulele îmbatrânite, au rol în remodelarea țesutului în embriogeneză, în remanierea osoasă etc.

I. Metchnikoff a clasificat fagocitele în două categorii:

– *microfage* (PMN) – celule care fagocitează particule mici

– *macrofage* – 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 împartite 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 nonself particulare și solubile prin următoarele mecanisme: *pinocitoza, endocitoza mediata de receptori* (EMR) și *fagocitoza*.

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 *clatrina* și se produc independent de polimerizarea actinei.

Fagocitoza semnifică înglobarea particulelor mari (mai mari de 0,5 μm) și se produce printr-un mecanism activ, *dependent de actina*, dar independent de clatrina. 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 țesutului în cursul dezvoltării embrionare, răspunsul imun, procesul inflamator.

Sistemul fagocitar mononuclear (S F M)

Fagocitele mononucleare se găsesc în toate tesuturile, dar în condiții obișnuite, proliferarea lor are loc numai în maduva 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 maduva 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 *monocitare, 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*, adera de suport. Monoblastul se divide o singură dată în două *promonocite*.

Promonocitul, localizat ca și monoblastul în maduva 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 maduva 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 circula la contactul cu endoteliul capilar, migrează spre diferite tesuturi 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 tesutul interstital;
- în sinusoidalele ficatului, monocitul devine *celula 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 recircula prin limfa spre vasele sanguine. Probabil că mor în tesuturi sau migrează spre ganglionii limfatici. În cazul unei infecții locale sau unui proces inflamator, factorii chimiotactici și alți mediatori ai inflamației – citochine și molecule icozanoidice – stimulează monocitele să migreze spre situsul lezat, unde se diferențiază în macrofagele exudatului.

După migrarea în tesuturile și cavitățile organismului, macrofagele variază în privința caracteristicilor morfologice și funcționale și au denumiri diferite: celule Kupffer în ficat, macrofage pulmonare și

alveolare în plamân, celule microgliale în SNC.

Distributia celulelor S F M în cele trei compartimente este urmatoarea:

<i>Tipul de celula</i>	<i>Localizare</i>
- Celula stem	
- Promonocitul	Monoblastul În maduva osoasa
- Monocitul	
<hr/>	
- Monocitul circulant	În sânge
<hr/>	
Macrofagul tisular (rezident)	
-	Histiocit În tesutul conjunctiv din tegument În tesutul limfoid secundar(ganglioni, MALT) În maduva osoasa În plamân (macrofage alveolare si tisulare) In membrana sinoviala a cavitatilor articulare În membranele seroase ale cavitatilor peritoneala, pleurala, cardiaca
-	În glande Osteoclastul(rezultat prin fuziunea În tesutul osos monocitelor)
-	Microglia (pare a fi de origine În SN C monocitara deoarece nu se evidentiaza înainte de formarea vaselor sanguine)
Macrofagul intravascular	Celulele Kupffer
-	Macrofagul juxtavascular Histiocitul din pulpa rosie a splinei, din maduva osoasa, din sinusurile ganglionare.
Macrofagul din exudat	
-	Celulele epitelioides În focarul inflamator
-	Celulele gigante multinucleate (se formeaza prin fuziunea macrofagelor
<hr/>	
exudatului).	
<hr/>	

În SFM nu sunt cuprinse:

- celulele reticulare, de origine a limfocitelor, din maduva osoasa
- celulele reticulare ale sinusurilor venoase din splina si ganglioni
- celulele endoteliale ale vaselor sanguine si limfatice
- fibroblastele
- celulele Langerhans
- celulele interdigitate
- celulele dendritice din ganglionii limfatici.

Originea *celulelor dendritice* nu se cunoaste cu certitudine, dar pare a fi comuna cu a monocitului. Glucocorticoizii induc o scadere rapida a monuclearelor circulante, inclusiv a monocitelor, dar si o disparitie rapida a celulelor dendritice din tesuturi. Acesta este un argument care sprijina ipoteza ca celulele dendritice deriva din precursori din maduva osoasa. Desi ele endociteaza, prelucreaza antigenul si îl prezinta, nu pot fi considerate ca fagocite mononucleare, deoarece nu s-a stabilit cu fermitate originea lor monocitara.

Celulele Langerhans deriva din celule mononucleare circulante care migreaza în tegument. In tegument, celulele Langerhans ramân un interval scurt, înainte de a migra pe cale limfatica, sub forma celulelor cu voal, spre ganglionii limfatici unde devin celule *dendritice* si *interdigitate*.

Fagocitele mononucleare intravasculare si juxtavasculare sunt celule care vin în contact direct cu sângele (celule Kupffer, histiocitele din cordoanele pulpei rosii splenice) sau cu limfa (macrofagele intra- sau extrasinusoidale din ganglionii limfatici). Ele supravegheaza aceste fluide pentru a capta materialele nonself, pe care le prelucreaza si le prezinta limfocitelor. Celulele Kupffer sunt asezate în întregime în lumenul sinusoidelor hepatice si nu au nici o conexiune evidenta cu endoteliul sinusoidal. Datorita pozitiei, macrofagele splenice juxtavasculare, ca si cele din maduva osoasa, trebuie sa strabata endoteliul, înainte de a fagocita materialul nonself.

Macrofagele intra- si juxtavasculare sunt fixe.

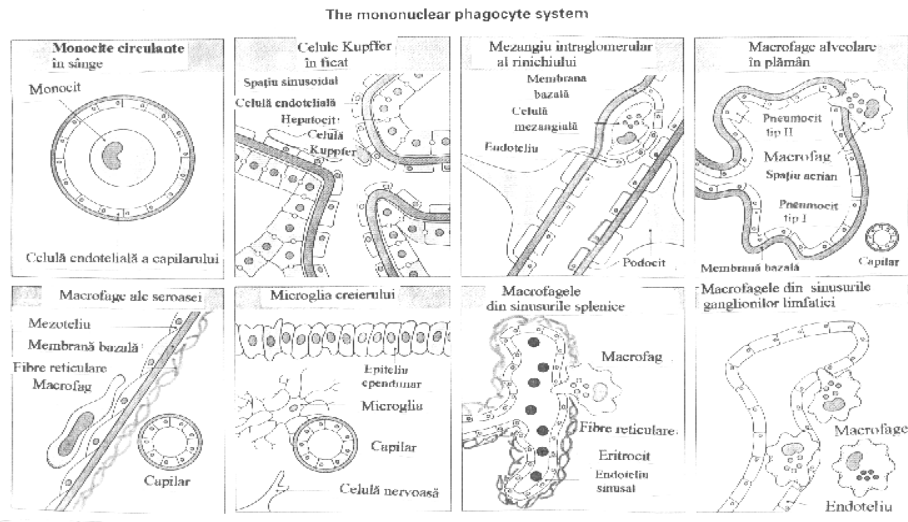


Fig. 97. Celulele sistemului fagocitar mononuclear.

Macrofagele tisulare si cele asociate vaselor formeaza o populatie de 17-20 miliarde, într-un organism de 70 de kg. Ele își au originea în monocitul sanguin sau rezulta prin proliferarea tisulara a monocitelor imigrate. Se pare ca predomina cele de origine monocitara.

Datorita localizarii lor diverse si a conditiilor fiziologice locale foarte diferite (conditii cvasi-anaerobe pentru cele peritoneale si o buna aerare pentru cele pulmonare), macrofagele sunt heterogene din punct de vedere morfologic, dar au caracteristici structurale si functionale comune:

- sunt bogate în lizosomi (pentru digestia enzimatice a substantelor nonself);

- membrana citoplasmatica formeaza prelungiri fine denumite *voaluri hialoplasmatiche*, cu dimensiuni de pâna la jumatate din diametrul macrofagului. In microscopia scanning, suprafata macrofagului se aseamana cu petalele unui trandafir.

Datorita mobilitatii membranei, macrofagul are doua proprietati importante:

- *adera* de suportul solid
- *endociteaza* (pinociteaza si fagociteaza).

Fagocitele sanguine au proprietatea de a migra din patul vascular, în tesuturi, unde devin macrofage rezidente, dar mobile în interiorul tesutului.

Deplasarea tisulară a macrofagului este întâmplătoare (neorientată de stimuli chimiotactici), și se numește *chimiochineza* sau este orientată și se numește *chimiotaxie*. Deplasarea orientată este ușurată de enzimele pe care macrofagul le secreta, 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.

Receptorii pentru regiunea Fc a tuturor izotipurilor de lant greu al Ig. Cei mai numeroși sunt receptorii pentru regiunea Fc a IgG monomera (IgG citofila), 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 secreta imunoglobuline.

Fc γ R I (CD₆₄) este receptorul de mare afinitate, leagă IgG monomera, iar exprimarea sa este stimulată de IFN. Acești receptori mediază ADCC.

Fc γ R II (CD₃₂) este receptorul de mică afinitate, leagă slab IgG monomera și are afinitate de 10 ori mai mică decât Fc γ RI, dar leagă ușor complexe imune.

Fc γ R III (CD₁₆) au afinitate scăzută pentru IgG monomera și se găsesc 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) leaga fragmentele C3b, C4b, primul fiind foarte eficient ca opsonina, dar mai puțin eficient ca mediator al ingestiei.

Receptorii pentru limfocchine leaga 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-glucozamina, sunt foarte importanți pentru recunoașterea celulelor străine, a hematiilor îmbatrânite, a fungilor, a bacteriilor.

Receptorul de manoză (MR) este o lectina 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 leaga 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 fibronectina sunt implicați în aderența monocitelor la zonele de discontinuitate ale endoteliului vascular și în ingestia particulelor opsonizate cu fibronectina.

Receptori pentru proteinele care conțin Fe, ceea ce explică rolul macrofagului în metabolismul Fe.

Receptori pentru hormoni (de exemplu, receptorul pentru insulina).

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 plasma, în fluidul interstitial 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 activeaza o catena proteica transmembranara.

Caracterizarea complexelor LPS-proteine plasmatice a fost esentiala pentru înțelegerea interacțiunii LPS-macrofag. Concluzia este ca macrofagul leaga LPS nativ cu o eficienta foarte scazuta, dar leaga foarte eficient complexele LPS-proteine plasmatice, pe calea receptorilor specifici.

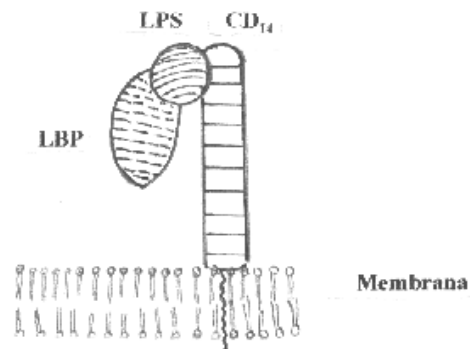


Fig. 98. LPS sunt recunoscute de un receptor (CD₁₄), dupa cuplarea lor cu o proteina plasmatica (LBP = LPS binding protein) si formarea complexului LBP-LPS.

Proteinele plasmatice care leaga LPS sunt anticorpilor specifici fata de antigenul somatic (O), complementul, lipoproteinele cu densitate înalta (HDL), albumina, proteina care leaga LPS (LBP) si septina. LBP este produsa de hepatocite si are valori normale medii de 7 $\mu\text{g/ml}$, iar în faza acuta, la om, de 220 $\mu\text{g/ml}$. Chiar daca este un reactant de faza acuta, LBP se gaseste în concentratii suficiente în plasma normala, pentru a avea rol de aparare în timpul infectiei.

Diferitii receptori fago-citari trimit semnale spre citoscheletul de actina si initiaza mecanismele de internalizare.

Activarea macrofagului

Activarea macrofagului are loc în conditiile stimulării antigenice si este un proces care decurge stadial:

- recrutarea monocitului imatur din sânge si diferentierea în celula capabila sa reactioneze în prezenta limfochinelor;
- dobândirea proprietatii de citotoxicitate sub actiunea unor semnale secundare (cantitati mari de limfochine, LPS etc.).

Limfocitele Th₁ sunt principalele celulele activatoare ale macrofagului, prin intermediul *interferonului* γ . Interacțiunea dintre limfocitul T și macrofag sta 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, vialurile 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 oricărui celule nonself, bacteriene, fungice sau tumorale.

Principala monocină mediatoră 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 intracelulare.

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.

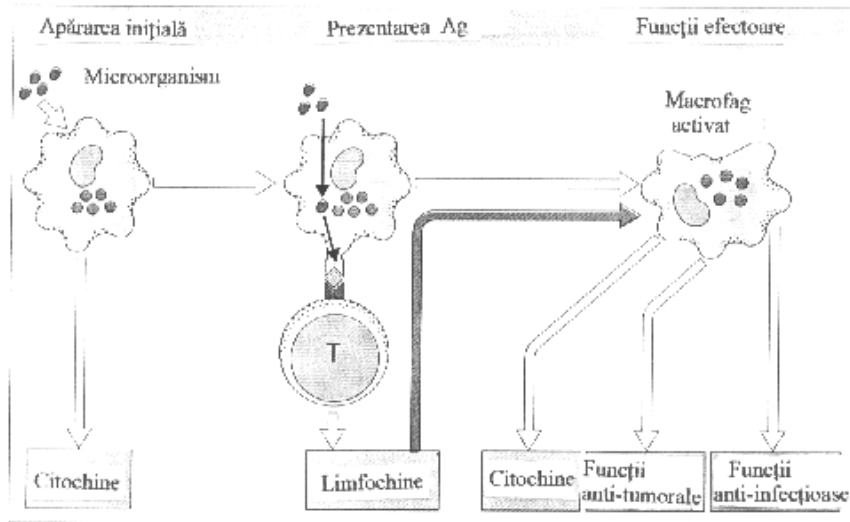


Fig. 99. *Macrofagele* sunt celule esențiale pentru funcția de apărare. Ele constituie o linie de apărare, înainte de activarea specifică a limfocitelor T și B. Participă la elaborarea răspunsului, în calitate lor de celule care prelucrează și prezintă antigenul. *Macrofagele* sunt activate de limfochinele eliberate de celulele T și eliberează limfochine cu funcții stimulatoare ale funcției imunitare (după Roitt, 1993).

Endocitoza

Endocitoza este activitatea biologică a macrofagului, cea mai bine exprimată. Ingestia macromoleculor dispersate în faza lichidă se numește *pinocitoza* (*pinos*, grec = a bea). *Pinocitoza* are loc prin invaginarea membranei, rezultatul fiind formarea unor vezicule mici (0,2 μm) și se numește *micropinocitoza* sau a veziculelor mai mari (până la 1-2 μm) și poartă denumirea de *macropinocitoza*.

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 mediata de receptori este un proces specific prin care macromoleculor și antigenelor particulate sunt înglobate după asocierea lor cu un receptor membranar.

Capacitatea de ingestie a macrofagului se materializează în următoarele funcții:

– funcția *citocateretica*, adică de epurare sau de sechestrare a celulelor senescente (de exemplu, hematii). Prin îmbatrânire, hematiile își pierd *acidul sialic* din glicoproteinele membranare și expun componente care sunt recunoscute de macrofag. În focarul inflamator, macrofagele curăța terenul de celulele moarte și asigură vindecarea leziunilor inflamatorii;

– funcția *antixenica* (clearance), adică de îndepărtare a materialelor străine, prin fagocitoză;

– funcția *imuna*, constă în participarea macrofagului la elaborarea răspunsului imun, prin prelucrarea Ag și cooperarea cu limfocitele.

Fagocitoza. Fagocitoza este procesul de ingestie a materialelor particulare, mai mari de 0,5 μm, printr-un mecanism *dependent de actina* și de obicei, independent de clatrina. 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 nonself, 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 embriogeneza, pentru remodelarea tisulară.

Aderența semnifică realizarea contactului fizic dintre particula străină și membrana fagocitului și este mediata 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 nemediata de receptori*, condiționată în principal de forțe ionice. Astfel sunt ingerate particulele inerte (de latex, de carbune, siliciu, azbest etc.), moleculele agregate de albumina;

– *fagocitoza mediata de receptori* este un proces prin care antigenele particulare sunt înglobate prin intermediul unui receptor membranar și este activă în ingestia bacteriilor.

Receptorii membranari pentru lectine, leaga nespecific componentele glucidice ale celulei nonself. 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-fagocitoza*. 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

suprafetei fagocitelor au rol de recunoastere a moleculelor nonselb.

Pe suprafata macrofagului se gasesc nu numai receptori de lectine, ci si *lectine cu functie endocitara*, cu rol în clearance-ul glicoproteinelor plasmatiche si chiar al eritrocitelor îmbatrânite sau al bacteriilor ajunse în mediul intern. De exemplu, lectina cu specificitate de *manoza* de pe suprafata macrofagului, are rol în apararea antimicrobiana nespecifica. Aceasta lectina leaga celulele infectioase ce expun pe suprafata lor grupari cu manoza, usurând fagocitoza si digestia lor intracelulara.

De cele mai multe ori, interactiunea dintre fagocit si celula straina este mediata de receptori specifici pentru diferite opsonine: Ig, C, fibronectina etc. Cei mai importanti sunt receptorii pentru Fc. Receptorii pentru regiunea Fc a imunoglobulinelor apartin la doua clase: cei implicati în functiile efectoare si sunt activatori ai functiilor macrofagului si cei care transporta imunoglobulinele prin barierele epiteliale.

Fagocitele recunosc si leaga celulele *opsonizate*. Toate opsoninele mediaza legarea celulei straine de suprafata fagocitului si stimuleaza ingestia sa.

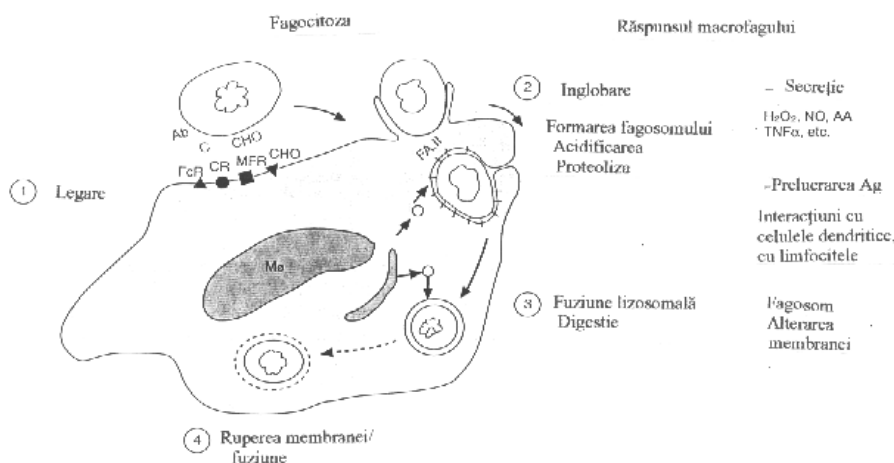


Fig. 100. Stadiile înglobării unui patogen ipotetic de catre macrofage. Receptorii cu rol în recunoasterea fagocitara sunt FcR, CR, MFR (manoza), CHO (glicidic). FA-11 (macroscialina) este o glicoproteina pan-macrofagica, exprimata abundant în fagosomi (dupa Gordon, 1998).

Opsoninele. Denumirea (*opsein*, grec = a aduce de mâncare) semnifica o categorie diversa de molecule care au rolul de a usura ingestia particulelor straine, functionând ca puncti de legatura între

fagocit și particula nonself. Oponina 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 receptorii pentru Fc γ . Legarea anticorpului pe particula nonself este mediata 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 patură 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 compusii 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 cailor 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 plasmatiche, 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 colectina 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 clindamicina și lincomicina) determină o opsonizare crescută cu C3 și o creștere a activității fagocitelor. Același efect, atribuit sintezei scăzute de proteina 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 fibronectina 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.

Persistentă 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, carbune) nu sunt atacate de echipamentul enzimatic al macrofagului și sunt păstrate mult timp. Dacă

acumularea lor depaseste o limita critica (în special în plamâni) se produc procese inflamatorii locale cu consecinte patologice. La mineri se cunosc afectiuni pulmonare profesionale: antracoza, silicoza, azbestoza (stocarea pulberilor în macrofagele pulmonare). Nefiind degradabile, acumularea excesiva a pulberilor în macrofage produce moartea celulei si eliberarea materialelor depozitate. Ciclul înglobării este reluat de alte macrofage. Macrofagul activat elibereaza enzime hidrolitice. Rezultatul este reducerea progresiva a suprafetei respiratorii, ca o consecinta a înlocuirii epiteliului alveolar, cu tesut conjunctiv (stare patologica denumita *emfizem*).

Rolul macrofagului în apararea fata de bacteriile cu localizare celulara

Practic, orice celula poate fi infectata, dar fagocitele mononucleare sunt infectate mult mai adesea, deoarece ele fagociteaza bacteriile, au viata lunga si capacitate sterilizanta antibacteriana limitata. Din aceasta cauza, fagocitele mononucleare sunt colonizate de bacterii ca *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, *L. monocytogenes*.

Pe de alta parte, monocitele fagocitare sunt efectori ai aparării antibacteriene. Pentru a contracara actiunea fagocitelor, bacteriile cu localizare intracelulara au elaborat modalitati strategice care le permit supravietuirea în mediul citoplasmatic ostil. Multiplicarea agentului infectios este esentiala pentru producerea infectiei si a manifestarilor patologice. Multe bacterii patogene, cu localizare intracelulara, nu numai ca se multiplica, dar unele au mecanisme specifice de a scapa din celula gazda si de a se disemina spre celulele vecine, chiar fara sa paraseasca nisa intracelulara.

Bacteriile cu localizare intracelulara au elaborat diferite strategii pentru supravietuire:

- invazia fagocitelor neprofesioniste
- localizarea în compartimente citoplasmatiche bine delimitate
- interferenta cu reactivii intermediari ai reducerii O_2
- inhibitia fuziunii fagosom-lizosom
- rezistenta la enzimele lizosomale
- interferenta cu maturarea fagosomilor prin inhibitia acidificării.

Fagocitele mononucleare reprezinta habitatul major pentru *M. tuberculosis* si *M. bovis*.

La interactiunea dintre fagosom si lizosomi se descriu trei raspunsuri potentiale:

- *fuziunea fagosom-lizosom*, proces în care microorganismele nepatogene si patogene sunt omorâte, iar patogenii cu localizare intracelulara, supravietuiesc si se multiplica în interiorul fagosomului (*L.*

monocytogenes, Leishmania, S. typhimurium);

– *absenta fuziunii* si agentii patogeni se multiplica în fagosomii nefuzionati (*T. gondii, M. tuberculosis*);

– *iesirea agentului patogen din fagosom, în citoplasma* (*T. cruzi* si posibil *M. leprae*).

Majoritatea patogenilor internalizati sau fagocitati în vezicule de origine membranara, ramân localizati în aceste structuri, dar au elaborat diferite strategii pentru a preveni actiunea mecanismelor celulare litice si le favorizeaza supravietuirea;

– unii agenti patogeni au învelisuri protectoare (capsula polizaharidica si LPS);

– enzimele bacteriene neutralizeaza radicalii O₂, iar enzimele proteolitice secretate, degradeaza proteinele lizosomale ale gazdei;

– unele bacterii patogene sunt dependente de factori ai fagolizosomului, ca semnale declansatoare ale multiplicarii intracelulare. De exemplu, *C. burnetii, S. typhimurium* necesita pH acid pentru a persista în mediul intracelular si pentru a initia replicarea;

– micobacteriile patogene si *L. pneumophila* modifica fagosomul primar ori împiedica acidifierea. Ele pot fi incluse de la început în vacuola celulara, la pH neutru; *M. tuberculosis* ramâne localizat într-o vacuola delimitata de membrana, care rezista fuziunii cu lizosomii si de aceea se acidifica foarte putin. Daca fuziunea are loc, membrana vacuolara nu are ATP-aza care sa pompeze protonii în vacuola (deoarece proteinele membranei sunt înlocuite cu proteine bacteriene) si vezicula ce înconjură celulele de *Mycobacterium* nu se acidifica. Chlamidiile sunt bacterii parazite, obligat-intracelulare, care ramân într-o vacuola neacida, pentru ca evita fuziunea cu lizosomii, în tot ciclul intracelular. Chlamidiile se diferentiaza în doua forme: una ce creste activ în interiorul celulei gazda (corpul reticulat) si forma infectioasa - corpul elementar extracelular - ce nu se divide;

– *S. typhimurium* intra în macrofag prin ondulara membranei si formarea *fagosomilor spatiosi*, în care se dilueaza enzimele lizosomale ale gazdei, ceea ce favorizeaza supravietuirea sa în macrofage. Alteori este posibila inhibitia fuziunii dintre fagosom si lizosomi;

– *L. pneumophila* este înglobata printr-un mecanism special, al fagocitozei "spiralate". Bacteria ramâne în fagocitul pulmonar, în interiorul veziculei membranare multistratificate si pH-ul nu scade. Acelasi mecanism protejeaza celula bacteriana si în gazda sa naturala, amoeba.

Sursa nutrientilor utilizati de bacterii în interiorul vacuolei nu este cunoscuta. Este posibil ca bacteriile internalizate sa altereze vacuola gazdei într-o masura suficienta, pentru ca nutrientii sa difuzeze din

citoplasma, spre lumenul vacuolei. Alta posibilitate (probabil la *Chlamydia*) este ca proteine de origine bacteriana sa se insere în membrana vacuolei si sa aiba rol de pori, prin care difuzeaza nutrientii.

Câtiva patogeni intracelulari au capacitatea de a *sparge vezicula de fagocitoza* si ramân în citoplasma, unde se multiplica (*L. monocytogenes*, *Shigella*). Unele specii de *Rickettsia* degradeaza enzimatic vezicula înconjuratoare si deplasarea lor intracelulara este orientata de componentele citoscheletului. Iesirea în citoplasma evita atacul mecanismelor antibacteriene si furnizeaza nutrientii necesari, dar este folosita de putini patogeni. Supravietuirea si multiplicarea lor este rezultatul unei interactiuni echilibrate între celula gazda si bacterie (Brett, 1997).

L. monocytogenes invadeaza celule fagocitare si nefagocitare. Dupa internalizare, vacuolele sunt acidificate si circa 14% dintre celulele de *Listeria* scapa din vacuola fagocitara, prin mecanismul lizei, mediata de *listeriolizina O* (o hemolizina), activata la pH-ul acid al vacuolei. Bacteriile care ramân în vacuola acida, sunt omorâte.

Adeseori, patogeneza acestor infectii nu este consecinta virulentei bacteriilor, ci se datoreaza raspunsului imunitar al gazdei. Rolul limfocitelor T este esential pentru reactivitatea imunitara fata de acesti agenti patogeni si pentru generarea manifestarilor patologice. Reactia tisulara de raspuns la infectia cu aceste bacterii este formarea *granulomului*. Bacteriile nu sunt eliminate complet din granulome si din acest motiv infectia devine *cronica*.

Toate aceste conditii sunt îndeplinite de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, iar *L. monocytogenes* se deosebeste numai prin aceea ca produce infectii acute.

Salmonella, *Shigella* au doar o faza intracelulara, la tranzitul din lumenul intestinal prin celulele epiteliale (M) ale placii Peyer, dar raspunsul imun este predominant humoral.

Funcțiile efectoare ale macrofagului se realizeaza prin urmatoarele mecanisme:

- producerea intermediarilor reactivi ai oxigenului si ai azotului
- limitarea disponibilitatii Fe
- acidifierea fagosomului prin fuziunea fagosom-lizosom
- producerea defensinelor.

Dupa ingestia particulei straine are loc o crestere brusca a intensitatii respiratiei macrofagului. Creste consumul de glucoza si O_2 , se activeaza oxidaza membranara dependenta de NADP. NADP-oxidaza reduce O_2 la O_2^- (radicalul superoxid), care este dismutat de SOD, dupa reactia:

O parte din H_2O_2 este descompusa sub actiunea glutatation-peroxidazei, reactie în care glutatationul este oxidat, iar glutatation-reductaza regenereaza glutatationul redus.

Fierul este un element esential pentru supravietuirea bacteriilor. Transferina saturata cu Fe este preluata de macrofag pe calea receptorilor specifici. Diminuarea receptorilor macrofagului pentru transferina determina scaderea intracelulara a Fe. Fe este necesar macrofagului pentru activarea mecanismelor care genereaza intermediarii reducerii O_2 si ai azotului, dar este si un nutrient esential al celulei bacteriene. Competitia pentru Fe pare a fi decisiva, în raport cu care fagocitul este un efector al apararii antibacteriene sau este un mediu protector pentru celula bacteriana.

Aceste bacterii nu produc invazine. Ele sunt fagocitate de macrofage cu mare usurinta, deoarece secreta si expun la suprafata cantitati mari de molecule care leaga fibronectina, ceea ce favorizeaza fagocitoza prin intermediul *receptorilor de fibronectina*. *M. tuberculosis* activeaza C si se tapeteaza cu C3, produce enzime care detoxifica intermediarii reducerii O_2 , iar NH_4^+ neutralizeaza pH-ul acid al vacuolei de endocitoza.

În concluzie, prin functia fagocitara, macrofagul reprezinta ultima bariera protectoare fata de infectie. Daca aceasta bariera este depasita, infectia se extinde si evolueaza spre septicemie si generalizare.

Alte functii ale macrofagului

Macrofagul este o celula care exercita efecte citotoxice asupra celulelor care poarta pe suprafata lor molecule nonself (celule tumorale). Citotoxicitatea fata de celulele maligne se produce prin câteva mecanisme distincte:

– citotoxicitatea mediata de limfochinele (MAF) secretate de limfocitele stimulate. MAF se leaga atât pe celulele tinta (tumorale) cât si pe macrofag;

– citotoxicitatea naturala, nespecifica, se exprima la un nivel mai scazut. Efectul s-a demonstrat *in vitro*, prin contactul macrofagelor cu celule alogene si se intensifica dupa stimularea nespecifica a macrofagelor cu diferiti factori chimici sau biologici;

– citotoxicitatea dependenta de anticorpi (ADCC), mediata de moleculele de imunoglobulina fixate pe celula tinta. Regiunea Fc a moleculei de Ig este recunoscuta de macrofag prin intermediul receptorilor specifici. Punctele moleculare între macrofag si celula tinta favorizeaza un contact spatial strâns si transferul factorilor litici.

Functia secretorie a macrofagului este la fel de importanta ca si

cea fagocitara. S-au identificat circa 75 de produse de secretie, *in vitro*, în mediul de crestere al macrofagelor sanguine si peritoneale, cu o mare diversitate structurala si cu efecte biologice foarte diverse.

Unii produse de secretie sunt *constitutivi*: lizozimul, componente ale complementului. Alte produse de secretie sunt *inductibile*, adica se sintetizeaza sub actiunea semnalelor primite de la receptorii suprafetei, activati în procesul de endocitoza, sub actiunea endotoxinelor, a limfochinelor, a modificarilor de pH, a hidrolazelor acide, a metabolitelor acidului arachidonic.

Dupa natura si functiile produselor de secretie ale macrofagului, se disting urmatoarele categorii:

– *produsi enzimatici*. Sunt enzime lizosomale active la pH acid, din categoria hidrolazelor: *colagenaza* si *elastaza* hidrolizeaza colagenul si elastina, dar si imunoglobulinele, fibronectina, fibrinogenul. Aceste enzime au rol important în patogeneza bolilor pulmonare distructive (emfizem), deoarece secretia lor creste dupa activarea macrofagelor. Macrofagele secreta *proteina activatoare a plaminogenului la plasmina*. *Plasmina* lizeaza fibrina din cheagul sanguin care se formeaza la periferia focarului de inflamatie. In focarul inflamator, macrofagul activat secreta *arginaza*. Epuizarea argininei produce inhibitia cresterii tumorale;

– *produsi de secretie cu rol în reactiile de aparare*. Macrofagul sintetizeaza si secreta lizozim (spre deosebire de granulocite care contin lizozim dar nu-l sintetizeaza, iar limfocitele nici nu contin si nici nu-l sintetizeaza). Nivelul seric al lizozimului este o reflectare a activitatii fagocitelor mononucleare. Concentratia serica si urinara a lizozimului creste în starile infectioase. Lizozimul are efect antineoplazic prin actiunea sa directa asupra membranei celulelor tumorale. Macrofagul sintetizeaza si secreta aproape toate componentele caili clasice si alterne a activarii C;

– în procesul infectios viral, macrofagul sintetizeaza interferon;

– *proteine plasmatic*. α 2-macroglobulina inhiba activitatea enzimelor proteolitice si astfel moduleaza efectele litice ale enzimelor lizosomale;

– *proteine ale cascadei de coagulare sanguina* (tromboplastina);

– *proteine structurale* (fibronectina, intra în alcatuirea membranei bazale);

– *compusi cu efect reglator* asupra altor celule: lipide bioactive (prostaglandine), factori reglatori ai raspunsului imun (IL-1);

– factorul stimulator al angiogenezei, în focarul inflamator;

Functii metabolice ale macrofagului. Macrofagul intervine în metabolismul urmatoarelor categorii de substante:

– *metabolismul Fe*. Hematiile sunt distruse de macrofagele

splenice, în momentul în care rezerva lor de ATP s-a epuizat. Macrofagul preia Fe din hemoglobina și îl cedează transferinei, care îl transporta la măduva osoasă. Transferina este sintetizată de macrofag:

- *metabolismul lipidelor*. Macrofagul captează lipidele plasmatiche 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 mitotice și de biosinteză ale fibroblastelor sunt foarte importante în procesul reparativ 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.

Numarul absolut al diferitelor categorii de celule în sângele circulant:

Tip de celula	Numar absolut/mm ³	Raportul procentual	Nou nascut
Hematii	5 milioane la barbat		5-8 milioane
	4,5 milioane la femeie		
Leucocite	5000 – 8000	100%	15000 –50000
P	150 – 400	3 – 5%	7000 –30000
M	3000 – 6000	54 – 62%	
N	50 – 200	1 – 3%	
N	15 – 50	0 – 0,75%	
nesegmentate	1500 – 3000	25 – 33%	2000 – 8000
PMNN segmentate	285 – 300	3 – 7 %	
PMNE	200 000 – 400 000		
PMNB			
Limfocite			
Monocite			
Trombocite			

Numarul total al leucocitelor este de circa $5 \times 10^3/\text{mm}^3$ sânge.

La adult, se remarca o tendinta de scadere a numarului de leucocite circulante: o scadere mai accentuata a numarului de PMNN si o diminuare usoara a numarului de limfocite.

Cresterea numarului de leucocite se numeste *leucocitoza*. Ea se realizeaza prin descarcarea în sângele circulant, a leucocitelor din maduva osoasa. Cel mai adesea, leucocitoza este însoțita de polinucleoza (cresterea numarului de PMNN), care pot ajunge la $50\ 000/\text{mm}^3$ în cursul infectiei cu agenti piogeni. Numarul leucocitelor creste în cazurile de septicemie, pneumonie, flegmoane, abcese, apendicite (10-15 000 în formele usoare, pâna la 50 000 în formele grave), în reumatism, în cazul tuturor distrugerilor tisulare (în infarctul miocardic). Cresterea este moderata în infectiile dentare, amigdalieni, urinare. Numarul leucocitelor creste în neoplazii. Necroza tesutului tumoral reprezinta un stimul pentru afluxul de leucocite.

Cresterea numarului de PMNN este frecventa în infectiile cu localizare periferica. Cresterea este rezultatul, atât al unei descarcari din depozite, cât si al hiperfunctiei medulare. Hiperfunctia medulara se manifesta prin cresterea numarului de celule tinere (nesegmentate) în sânge. Pentru fiecare neutrofil circulant, în maduva osoasa se gasesc 50 – 100 neutrofile mature.

Arneth a stabilit proportia procentuala a neutrofilelor în functie de numarul segmentelor nucleare. Dupa numarul 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% (distributie

normala)

21% 65% 14% 0% 0% (apendicita)

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 intestinale), 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 maduvei osoase. Sensibilitatea la infecții este foarte mare.

Diferențierea neutrofilelor

Circa 3/4 din celulele nucleate ale maduvei 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, lactoferina).

Granulațiile *secundare* (specifice ale lui Bainton) sunt mai mici, mai puțin electrono-dense și conțin fosfataza alcalină și lizozim. Nu

contin peroxidaza.

Mielocitul se matureaza si rezulta *neutrofilul*, fara diviziune celulara. În neutrofilul matur, adiacente membranei plasmaticice se gasesc microfilamente (actina si miozina), ce genereaza fortele contractile necesare locomotiei. Neutrofilul segmentat nu se divide. Cromatina este condensata, iar nucleolul lipseste. Lobulatiile caracteristice ale nucleului nu se coreleaza cu vârsta celulei.

La sfârșitul perioadei de maturare a neutrofilului, scade sarcina negativa de suprafata si creste gradul de deformabilitate a membranei. Dupa maturarea celulara, un mare numar de neutrofile se depoziteaza în maduva osoasa. Aici se gasesc circa 90% din neutrofile. De aici neutrofilul migreaza în lumenul capilar, printre celulele endoteliale.

Granulatiile specifice fuzioneaza foarte repede cu vacuola de fagocitoza, în timp ce aceasta este înca deschisa în spatiul extracelular. Din aceasta cauza, peste 90% din continutul lor se varsa în mediul extracelular. Granulatiile primare fuzioneaza mai târziu cu fagolizosomul. De aceea, circa 1/2 din continutul lor se pierde, iar restul ramâne în fagolizosom.

Sisteme bactericide active în PMNN

Dupa ingestia unui microorganism, în neutrofil se activeaza sistemele moleculare care omoara celula ingerata. In PMNN functioneaza doua sisteme bactericide: unul *independent de O₂* si altul *dependent de O₂*.

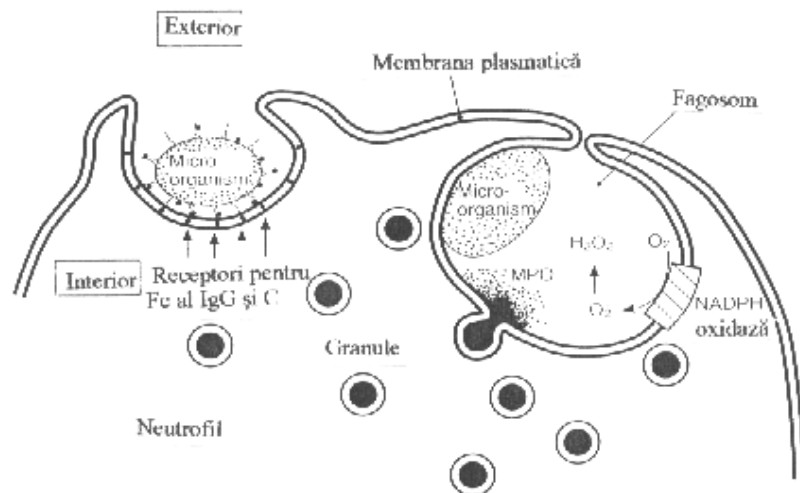


Fig. 101. Activarea neutrofilului. Contactul microorganismelor opsonizate cu receptori de suprafața ai neutrofilului (receptori pentru Fc și C) declanșează fagocitoza, activarea NADPH-oxidazei și degranularea. În interiorul fagosomului, produsele oxidative pot interacționa cu proteinele din granule, pentru a omorî microorganismele ingerate. MPO = mieloperoxidaza (după Roos, 1998).

Sistemul bactericid *independent de O₂* cuprinde o gamă largă de activități enzimice: 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 lizina, 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, colagen, elastina. *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): ataca mureina din peretele bacterian, prin scindarea legaturilor glicozidice β 1-4 din catenele polizaharidice ale mureinei, dintre resturile de N-acetilglucozamina si acidul N-acetilmuramic si rezulta dizaharide alcatuite din N-acetilglucozamina si acid N-acetilmuramic, la care se pastreaza atasate catenele peptidice. Dupa distrugerea structurii de rezistenta a peretelui celular, celula bacteriana aflata într-un mediu neprotejat osmotic, se lizeaza. Macrofagele secreta cantitati mari de lizozim si îl depoziteaza în granulatiile citoplasmatiche, spre deosebire de celelalte tipuri care îl secreta pe masura ce îl sintetizeaza.

Lizozimul se gaseste în granulatiile neutrofilelor, macrofagelor, în celulele epiteliale ale glandelor exocrine (celulele Paneth). Macrofagele secreta constitutiv lizozimul, dar rata sintezei creste în macrofagele activate. Neutrofilele si celulele Paneth depoziteaza lizozimul în granulatiile citoplasmatiche.

Efectul litic al lizozimului s-a evidentiat asupra peretelui celular de *Micrococcus lysodeikticus*, la care mureina reprezinta circa 80% din continutul structurii parietale. Actiunea lizozimului este mai putin eficienta asupra peretelui bacteriilor Gram negative si devine posibila dupa tratamentul celulelor cu un amestec generator de radicali activi (acid ascorbic, H_2O_2).

Lizozimul are efect bacteriostatic. Perturba fenomenele de oxido-reducere bacteriana si blocheaza procesele de crestere si diviziune.

Mediul acid din vacuola de fagocitoza are efect bactericid. Valoarea pH scade în câteva minute, datorita producerii acidului lactic prin metabolizarea anaeroba a glucozei. La pH acid se activeaza hidrolazele acide din granulatii.

Lactoferrina este o proteina usor bazica (pI = 8,7) din granulele secundare ale PMNN, sechestreaza Fe^{3+} si astfel inhiba activitatile vitale bacteriene dependente de Fe, având efect bacteriostatic. Lactoferrina se gaseste în serul uman, în lacrimi, este abundenta în lapte si în alte secretii. S-au descris trei variante de lactoferrina: α , β , γ , primele doua având activitate RN-azica. Celulele intestinale si fagocitele mononucleare au receptori pentru lactoferrina, dar n-o sintetizeaza. Lactoferrina leaga Fe, facându-l indisponibil metabolismului bacterian. Bacteriile Gram negative, în prezenta lactoferrinei, elibereaza LPS si devin sensibile la lizozim, ceea ce denota ca actiunea ei se exercita asupra membranei externe a peretelui celular. Lactoferrina are proprietati microbiostatice asupra microorganismelor cu necesitati mari de Fe (coliformi, levuri).

În focarul infectios, lactoferrina nesaturata este eliberata din

granulatiile specifice, în mediul extracelular. Ea leaga Fe în condițiile unui pH acid, iar transferina îl leaga la un pH mai mare. Complexul lactoferina-Fe este endocitat de macrofage, pe calea receptorilor pentru lactoferina. Astfel, lactoferina produce hipoferemie localizată la focarul infectios.

Defensinele sunt peptide mici de 3,5 kD (29-34 aminoacizi), bogate în cisteina, 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 granulatiilor primare (azurofile). *In 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 reductoare pentru producerea intermediarilor reducerii O₂, pare a fi o oxidază complexă cu FAD, legată de membrana PMN. Oxidaza se reduce preluând electronii de la o piridin-nucleotidă redusă (NADPH sau NADH) și se oxidează prin transferul electronilor la molecula de O₂: $\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{O}_2^- + \text{NADP}^+ + 2\text{H}^+$

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 reductor, fie ca oxidant. Când acționează ca reductor al unui substrat, pierde electronul suplimentar și este

convertit la O_2 . Când acționează ca oxidant al unui substrat, formează H_2O_2 .

Cei doi radicali ai O_2 , $HO_2\cdot$ și O_2^- interacționează într-o reacție de dismutație, în care unul se reduce iar celălalt se oxidează și rezultă O_2 și H_2O_2 , după reacția:

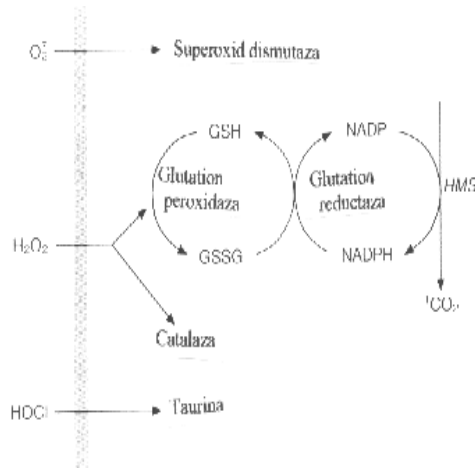
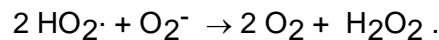


Fig. 102. În fagocite, *inter-mediarii reactivi ai reducerii oxigenului* sunt eliminați de superoxid dismutaza, de glu-tation oxidaza, de catalaza, de taurina. HMS = suntul hexozo-monofosfatului.



La pH alcalin predomină O_2^- . Dismutația este catalizată de SOD.

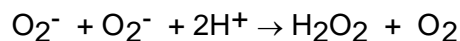
H_2O_2 este redusă de anionul superoxid (O_2^-), după reacția:

O_2^- și H_2O_2 sunt bactericide. H_2O_2 este și substrat al mieloperoxidazei (MPO), eliberată din fagolizosom. Efectul bactericid oxidativ este atribuit O_2^- , oxigenului singlet (1O_2), H_2O_2 , $OH\cdot$ și acidului hipocloros generat de mieloperoxidaza.

1O_2 se formează după ce molecula de O_2 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 (dependența 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 neutrofililor și a monocitelor (mieloperoxidaza) se găsește în granulațiile azurofile (primare) și este descărcată în fagosom printr-un proces de degranulare, consecutiv fagocitozei.

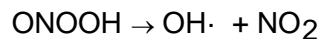
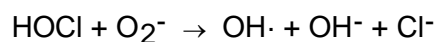
Mieloperoxidaza (neutrofil-peroxidaza = verdoperoxidaza, datorită culorii sale verzi) este o proteină bazică de 150 kD și catalizează oxidarea substraturilor donoare de H⁺ sau de electroni, de către H₂O₂.

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 rezulta un compus oxidant (acid hipocloros):

HOCl este oxidantul puternic, foarte toxic pentru microorganisme. HOCl poate reacționa cu diferiți compuși azotați pentru a forma monocloramină și dicloramină.

Fagocitele produc OH[·] prin reacția O₂⁻ cu HOCl sau cu NO:



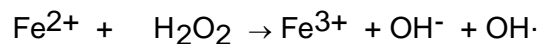
Sistemul MPO poate fi eliberat la exteriorul celulei și să devină toxic pentru microorganismele adiacente (bacterii, fungi, protozoare),

pentru virusuri, pentru helminti, pentru celulele normale si maligne.

Peroxidaza eozinofilelor poate utiliza Cl, dar este mai putin eficienta decât MPO.

Complexul $MPO - H_2O_2 - Iod$ formeaza un sistem de iodurare a bacteriei ingerate.

Ionul (OH^-) si radicalul hidroxil ($OH\cdot$) au efecte citotoxice puternice. Ei se formeaza prin interactia H_2O_2 , cu sarurile de Fe:



Când concentratia Fe este limitanta, este necesara reducerea Fe^{3+} pentru formarea $OH\cdot$.



Oxigenul singlet revine la starea obisnuita cu emisiune de lumina (chemiluminiscenta).

1O_2 pare sa se formeze în sistemul MPO- H_2O_2 -halogen. Acest sistem emite lumina, ceea ce sugereaza formarea 1O_2 în fagocite.

Leucocitul PMN este supradotat cu o gama larga de mijloace bactericide. PMN combina mai multi factori antibacterieni, în sisteme complexe cu o putere bactericida superioara fiecaruia izolat. Cel mai eficace sistem bactericid este MPO - H_2O_2 - halogen. Diferitele sisteme bactericide nu au o distributie egala la toate speciile de mamifere. La om, MPO are activitate maxima. Actiunea predominanta a unuia sau altuia dintre sistemele bactericide depinde si de natura celulei fagocitate.

Deficiente functionale ale sistemului PMNN

Sistemul PMNN este esential pentru apararea organismului fata de microorganismele infectioase. Deficientele sale numerice sau functionale se rasfrâng asupra rezistentei antiinfectioase a organismului.

Cele mai cunoscute anomalii ale sistemului PMNN sunt *neutropeniile*, de diferite grade. Când numarul PMNN scade sub 1000 celule/ mm^3 , riscul infectiilor creste mult, iar în cazul unei scaderi accentuate (200 PMNN/ mm^3) nu mai exista posibilitatea unui raspuns protector eficient. Neutropenia se datoreaza fie unei productii medulare sub nivelul normal, fie unei distrugerii periferice extensive a neutrofilelor.

Deficientele functionale ale neutrofilelor sunt foarte numeroase si diverse: deficiente de aderenta, de chimiotaxie, de fagocitoza, de

activitate bactericida.

Deficiențele de aderență se datorează absenței unor glicoproteine membranare (de 110 și 180 kD), ceea ce împiedică migrarea lor extravasculară. Pacienții suferă de 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 defecțiuni ale *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 catalază-pozitive, care inactivează H_2O_2 rezultată din propria lor activitate metabolică. Infecțiile cu bacterii, levuri (*Candida*), fungi filamentosi (*Aspergillus*) sunt tenace și însoțite de reacții inflamatorii ample, care evoluează în granulome, ca o reflectare a incapacității de a inactiva chemoatractanții 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 de 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 ore prin aceste organe, sângele se sterilizează.

Acțiunea 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 – 1000 de ori mai mică. Creșterea ratei fagocitozei complexelor imune și a particulelor tapetate cu componente ale C (C3b) este consecința prezentei

receptorilor pentru Fc și pentru C3b, pe membrana fagocitelor “profesioniste”, ceea ce le permite intensificarea specifică a activității de endocitoză. Ele se deosebesc de fagocitele “amatoare”(celulele reticulare), lipsite de astfel de receptori.

Sistemul complement

Sistemul complement este un set de proteine și glicoproteine plasmatică, care reprezintă circa 10% din globulinele serului normal uman și al vertebratelor, cu rol esențial în apărarea organismului. Majoritatea componentelor sale sunt proteine cu acțiune enzimatică (proteaze). Ele nu sunt imunoglobuline și concentrația lor plasmatică nu se modifică după imunizare.

Proteinele complementului C se găsesc în plasma tuturor vertebratelor. Ele acționează nespecific și completează efectele imunitare specifice ale anticorpilor.

Acțiunea sistemului C a fost evidențiată în 1884 de Grohman, iar ulterior, de Nuttall și Buchner. Ei au demonstrat că serul are efecte litice asupra unor bacterii *in vitro*, efecte care nu se mai produc după încălzirea serului la 56^o timp de 30 de minute. Factorul care mediază liza bacteriană este termolabil și Buchner l-a denumit *alexina* (*alexin* = a distruge). În 1890, Behring și Nissen au realizat un experiment, devenit clasic: serul proaspăt de la cobaiul imunizat a lizat celulele de *Vibrio metchnikovi*, dar serul de la cobaiul neimunizat nu a avut această proprietate. Așadar, factorul litic din ser (*alexina*) acționează în strânsă cooperare cu anticorpii.

Pfeiffer (1894) studia reacțiile imunitare la cobai, după infecția cu *Vibrio cholerae*, în diferite variante experimentale. La cobaii imunizați cu celule omorâte de *V. cholerae*, după inocularea vibriunilor virulenți în cavitatea peritoneală, a remarcat dispariția lor rapidă, iar la cei neimunizați, inocularea este urmată de infecția mortală. Fenomenul lizei vibriunilor a fost reprodus *in vitro*, prin punerea în contact a serului imun de cobai, cu celulele de *V. cholerae*. Încălzirea la 56^o (30 de minute) a serului imun de cobai anulează efectul său litic *in vitro*, dar este restabilit prin adăugarea serului proaspăt neimun. Activitatea litică a serului imun este rezultatul acțiunii cooperante a anticorpilor și a unui factor termolabil nespecific.

Se cunosc 11 proteine ale căii clasice, 3 proteine suplimentare ale căii alterne și 6 proteine cu efect reglator (inhibitorii). Componentele căii clasice sunt numerotate cu cifre arabe, în ordinea descoperirii lor, de la

1 la 9 și se activează în secvența 1, 4, 2, 3, 5 – 9. Majoritatea lor sunt beta-globuline (beta-1, beta-2).

Proteinele complementului sunt alcătuite din 1-2 catene peptidice, reunite prin punți S-S, cu excepția lui C4, care are 3 catene, iar C1q are o structură particulară unică.

Unele componente ale căii alterne sunt notate cu litere mari: B, P, D.

Fragmentele peptidice derivate din proteoliză sunt notate cu sufixele *a*, *b* etc. (de exemplu, C3a, C3b). Fragmentele *b* sunt mai mari și se combină direct cu o țintă membranară, iar fragmentele *a* sunt mai mici, se eliberează în soluție și stimulează răspunsul inflamator. Starea activată a factorilor C se marchează cu o bară: de exemplu C1.

Mecanismul general de activare a sistemului complement

Proteinele componente ale C se activează în două cascade enzimatice legate între ele, denumite *calea clasică* și *calea alternă*. Cele două cai se intersectează într-un punct, *clivajul lui C3*, evenimentul cheie al activării sistemului C.

Fiecare componentă activată este o protează înalt specializată, care la rândul ei clivează un fragment peptidic al unui precursor plasmatic. Consecutiv clivării, rezultă un fragment principal, care expune un situs de legare la membrană. Fragmentul se leagă pe membrană și la rândul său devine enzima activă următoare a secvenței de reacție.

Cascada de fixare a C se amplifică în fiecare etapă, deoarece fiecare enzimă poate activa numeroase molecule ale reacției următoare a secvenței. Ca mecanism general de acțiune, activarea C este analogă cascadei de coagulare și de fibrinoliză. Principala diferență constă în faptul că sistemul C este legat de membrane sau de complexe imune și în condiții fiziologice acționează local.

În calea clasică, complexul proteic C1 se leagă de complexe Ag-Ac și devine o protează activă, ce clivează și activează C4 și C2. Se formează o enzimă complexă - *C3-convertază*, care scindează specific C3.

Calea alternativă nu necesită prezența anticorpilor pentru activarea complementului. Unele componente chimice, în special cele din peretele bacterian și fungic, învelișul unor paraziti, peplorul viral, activează un alt set de proteine serice, care la rândul lor clivează C3.

Efectele finale ale activării sunt comune pentru ambele cai.

Calea clasica de activare a complementului

Mecanismul molecular al activarii C pe calea clasica s-a studiat pe complexul *eritrocit-anticorpi*

Calea clasica de activare a sistemului C este initiata de complexele Ag-Ac, care contin o molecula de IgM sau cel putin doua molecule de IgG (subclasele IgG₁ si IgG₃), fixate pe epitopi foarte apropiati. IgA si IgE nu fixeaza complementul. Pentru ca moleculele de IgG sa fie apropiate, determinantii antigenici trebuie sa aiba o anumita densitate. Daca epitopii sunt prea îndepartati, complementul nu va fi activat, indiferent de numarul moleculelor de IgG din complexul Ag-Ac.

Secventa evenimentelor fixarii complementului cuprinde urmatoarele etape: a) *recunoasterea*; b) *activarea enzimatica*; c) *atacul membranelor*.

Unitatea de *recunoastere* a sistemului C este complexul C1. C1 este un complex alcatuit din 3 proteine: C1q, C1r si C1s, asociate lax, necovalent, într-un complex cu Ca²⁺.

C1q este o proteina de 400 kD, formata din 18 catene polipeptidice, reunite în 3 subunitati de câte 6 lanturi fiecare. Fiecare din cele 3 subunitati ale C1q este formata din doua helice triple, în forma de Y, reunite la un capat printr-o structura în forma de tija, iar la capatul opus se termina printr-o conformatie globulara, nehelicala. Primii 80 de aminoacizi care formeaza helicea fiecarui triplu helix contin numeroase secvente de tipul Gly-Pro-Ileu-hidroxilizina, foarte asemanatoare cu a fibrelor de colagen. La nivelul extremitatii globulare se gasesc situsurile de legare cu molecula de Ig.

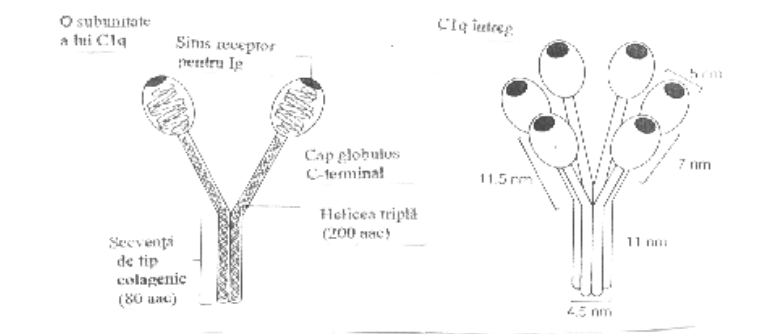


Fig. 103. Structura lui C1q. Cele 18 catene peptidice sunt reunite în 3 subunitati de câte

6 catene fiecare. Fiecare subunitate este formata de 2 helice triple, legate în forma literei Y la o extremitate, iar la cealalta se termina printr-un cap globular. Receptorii pentru fixarea complexului imunoglobulinic sunt situati la extremitatile globuloase.

Molecula de Ig expune situsul de legare pentru C1q, numai daca este legata de complexe Ag-Ac. C1q interactioneaza prin domeniul sau globular cu domeniul C2 al IgG si respectiv cu domeniul C3 al IgM din complexe imune. Regiunea Fc a IgG sau IgM sufera modificari conformationale si evidentiaza secventa de aminoacizi, la care se leaga C1q. Resturile de aminoacizi ale IgG care leaga C1q sunt Glu 318, Lys 320 si Lys 322. Cantitatea de C1q fixata, creste proportional cu patratul numarului de molecule de IgG si este proportionala cu concentratia de IgM.

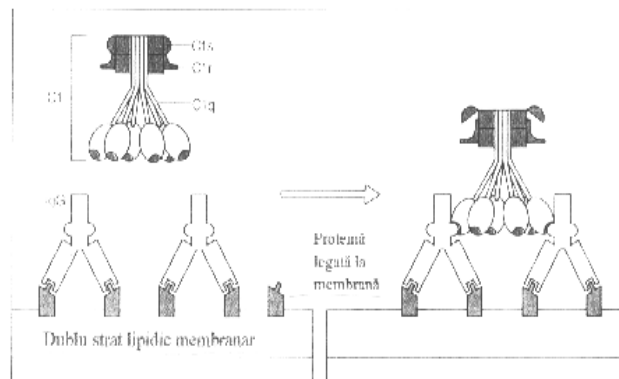


Fig. 104. Fixarea lui C1qrs. O pereche de molecule de IgG este fixata de un antigen proteic repetitiv, din membrana celulei. C1 se fixeaza la regiunea CH₂ a IgG. Activarea lui C1r si C1s are loc prin clivarea interna (reprezentata aici de modificarea orientarii lor fata de C1q).

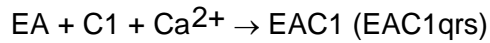
C1q nu are activitate proteazica.

În prezenta Ca²⁺, C1q se asociaza cu 2 catene C1r si 2 catene C1s. Mecanismul de activare a lui C1r si C1s nu este cunoscut. Ele sunt foarte asemanatoare (83 kD fiecare) si prin clivarea activatoare a lui C1r, rezulta 2 fragmente: unul usor de 27 kD si altul greu de 56 kD.

Fragmentul usor C1r are activitate serin-proteazica si pare sa actioneze asupra lui C1s, pe care-l cliveaza în doua fragmente inegale.

Fragmentul mic rezultat din clivarea C1s interactioneaza cu urmatoarele doua proteine – C4 si C2 – pe care le cliveaza si le activeaza.

Activarea lui C1 se face dupa reactia globala:



Sistemul de activare enzimatică

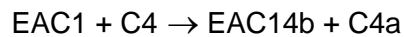
C1s are activitate esterazică și activează componenta C4.

C4 este alcătuit din 3 catene polipeptidice, legate prin punți S-S, notate cu α , β , γ .

C1s activat clivează un fragment amino-terminal (77 aminoacizi), de 9 kD, denumit C4a, din lanțul α . Restul moleculei, C4b, releva o punte tioester internă pe lanțul α și formează o legătură covalentă cu grupările $-NH_2$ sau $-OH$ ale multor proteine.

Clivarea lui C4 are loc în plasmă. Mai puțin de 10% din moleculele C4 se leagă la suportul activator, fie la complexul C1qrs, fie pe membrana într-un situs adiacent.

Reacția globală a activării lui C4:



În prezența ionilor de Mg^{2+} , C4b din complexul EAC14b leagă C2, pe care C1s îl clivează în două fragmente: cel mare, C2b, de 70 kD rămâne legat pe C4b și formează complexul *C4b2b*, denumit *convertaza lui C3*.

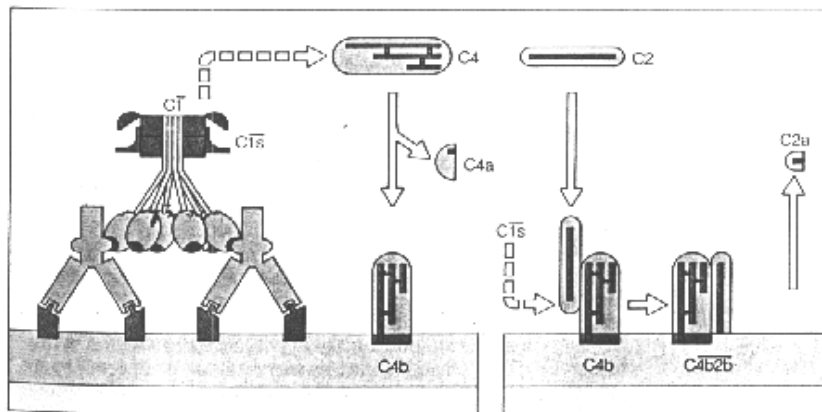


Fig. 105. Formarea lui *C4b2b* (convertaza lui C3 în calea clasică). C1s clivează C4 și eliberează fragmentul C4a. Fragmentul C4b se fixează pe membrana adiacentă, prin intermediul punții tioesterice care se expune. C2 seric se leagă de C4b în prezența

Mg²⁺ și este clivat de C1s, eliberând C2a și formând C4b2b (convertaza lui C3 pe calea clasică).

C2b din complexul EAC14b2b este relativ instabil (timpul de înjumătățire, 10 min., la 37^o) și se disociază ca fragment inactiv, dar restul complexului – EAC14b – leagă și clivează o altă moleculă de C2 și reface complexul EAC14b2b. Reacția globală a activării lui C2 este:



Clivarea lui C3 în calea clasică. Clivarea lui C3 este evenimentul central al fixării C, pe calea clasică sau alternă.

C4b2b (convertaza lui C3), dintr-un situs membranar adiacent sau din complexul C1qrs4b2b detasează un peptid de 77 aminoacizi (C3a), de la capătul N-terminal al lui C3 și relevă un situs de legătură tioesterică pe fragmentul mare C3b.

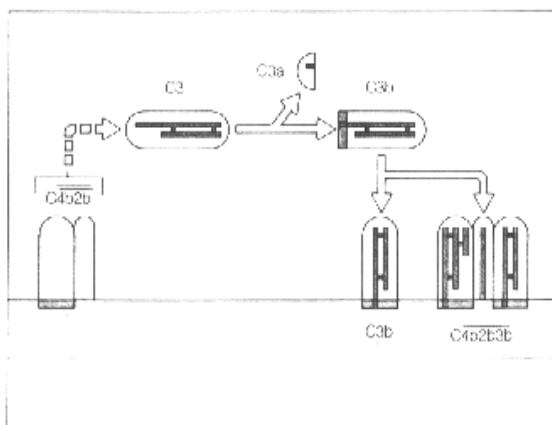


Fig. 106. Acțiunea convertazei C4b2b asupra lui C3. Complexul C4b2b clivează anafilatoxina C3a de la extremitatea N-terminală a peptidului α al lui C3. Anafilatoxinele au activitate chimiotactică pentru PMN, dar C3a are o activitate chimiotactică slabă. C3 clivat expune o punte tioesterică internă și determină legarea moleculelor de C3b, în apropiere de C4b2b. Unele molecule de C3b se leagă chiar la complexul C4b2b și formează C4b2b3b, care este convertaza lui C5 în calea clasică.

Peptidul de 9 kD este *anafilatoxina C3a*, iar C3b este principala *opsonina* a serului.

Fiecare unitate C1qrs4b2b clivează sute de molecule C3, deoarece C3 are o concentrație plasmatică ridicată. Majoritatea moleculelor de C3b rămân în plasmă și au rol opsonizant. Receptorii pentru C3b se găsesc pe toate celulele fagocitare (neutrofile, macrofage, eozinofile), dar și pe eritrocite, pe celulele epitelului glomerulului renal.

Moleculele opsonizate de C3b, prin situsul tioesteric se leaga de gruparile $-NH_2$ sau $-OH$ ale proteinelor din membrana celulara.

O parte a moleculelor C3b se leaga la complexul C4b3b de la situsul membranar si formeaza urmatoarea unitate catalitica, C4b2b3b – *convertaza lui C5*.

C3b cliveaza C5 si rezulta un peptid de 9 kD, adica C5a, din lantul α al lui C5, iar restul este C5b.

C5b se fixeaza pe membrana suport activatoare si initiaza formarea *complexului de atac membranar*. C5b liber este instabil si se agregata. Stabilitatea este conferita de complexarea cu C6.

Reactiile urmatoare ale caili au ca rezultat formarea complexelor moleculare progresiv mai mari, *fara ruperea legaturilor peptidice*.

Complexul C5b6 este *hidrofil*.

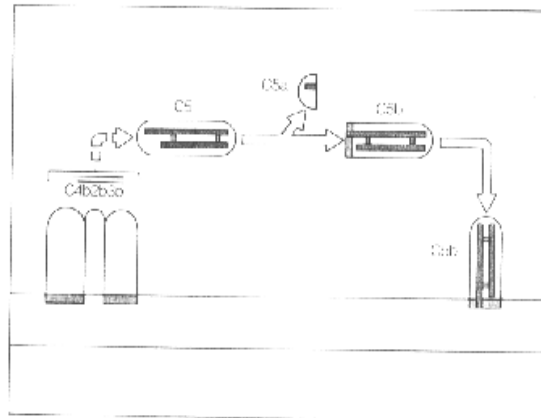


Fig. 107. Fixarea lui C5. C4b2b3b detaseaza fragmentul C5a (un peptid de 15 kD), din catena α a lui C5. Se formeaza fragmentul principal, C5b, care expune un situs de legare la membrana. Fixarea lui C5 initiaza activarea celorlalte componente ale cascadei, care duc la formarea complexului de atac membranar.

În prezenta lui C7 se formeaza complexul C5b67, cu proprietati *amfifile*: este hidrofob pentru ca expune grupari nepolare si nu formeaza legaturi de H cu moleculele de apa, dar se leaga cu fosfolipidele, însa are si grupari hidrofile. Existenta simultana a gruparilor hidrofobe si hidrofile în acelasi complex poate explica tendinta sa de polimerizare. In

solutie, C5b67 este instabil (timpul de înjumătățire este 0,1 secunde), dar se stabilizează prin inserția în dublul strat lipidic membranar și are proprietăți detergente.

La complexul C5b67 se polimerizează C8 și C9 și rezultă un complex macromolecular – C5b6789, de formă cilindrică, vizibilă la microscopul electronic prin tehnica criofracturării, în membrana hematiilor. Complexul are o suprafață externă hidrofobă, un ax central hidrofil și reprezintă *complexul de atac membranar* (CAM). Moleculile de C9 sunt esențiale pentru distrugerea celulei. Circa 18 molecule de C9 se leagă la un situs și prin polimerizare formează *canale transmembranare*. Aceste canale penetrează stratul lipidic al membranei, pe direcție perpendiculară și permit intrarea rapidă a cationilor (Ca^{2+} , Na^{+}) și a apei. Hematiile se umflă și se sparg, iar celulele nucleate devin permeabile, pierzând inițial moleculele mici (K^{+}) și apoi pe cele mari (nucleotide, proteine). Coloranții ionici, care sunt excluși de celulele intacte, patrund în citoplasmă (colorarea cu tripan blue sau eozina se folosește pentru a detecta celulele nucleate lezate prin fixarea complementului).

Formarea canalului transmembranar prin polimerizarea lui C9 are loc numai la nivelul situsului membranar. Complexul C5b6789 este instabil în soluție, ceea ce explică restrângerea efectului litic numai la situsul la care s-au inițiat evenimentele.

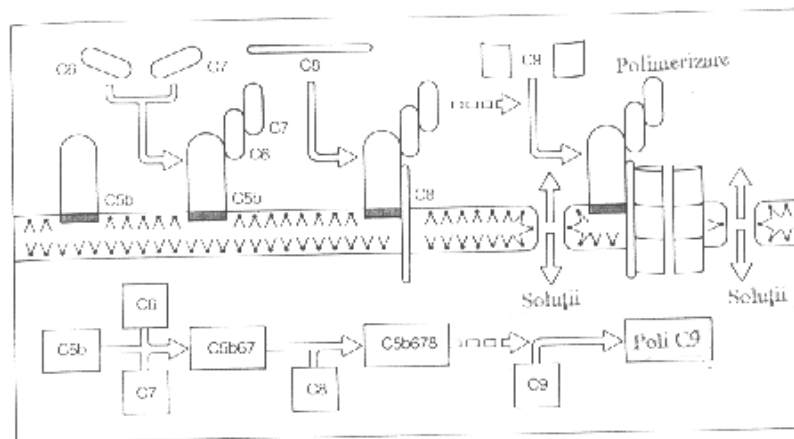


Fig. 108. Formarea complexului de atac membranar C5-9. După legarea lui C5b la

membrana, C6 și C7 se leagă pentru a forma complexul stabil C5b67, care reacționează cu C8, formând complexul C5b678, cu capacitatea de a disloca membrana. Complexul induce polimerizarea lui C9, ce formează structurile tubulare care traversează membrana. Dislocarea componentelor membranei permite schimbul liber al ionilor și al apei, rezultatul fiind *liza*.

Ansamblul CAM format din C5b-C9 a fost cunoscut ca având funcție litică asupra bacteriilor. Asamblarea CAM pe membrana leucocitară nu produce efect citotoxic. După inserția CAM în membrana leucocitară, celula se activează deoarece CAM acționează ca ionofor, producând creșterea concentrației Ca. Se generează radicalii toxici ai oxigenului și se activează metabolismul acidului arachidonic pe calea ciclooxygenazei și respectiv a lipooxygenazei. Leucocitul elimină o mică veziculă membranară care conține complexul CAM.

Amplificarea căii clasice. Capacitatea de amplificare a căii clasice este foarte mare. O moleculă de IgM legată de un epitop, leagă la rândul ei, o moleculă de C1. C1s activat clivează circa 100 molecule de C4, din care numai circa 20 molecule C4b se leagă de complexul Ag-Ac. Numai 5% din fragmentele C2b sunt legate pentru a forma C4b2b. Acest complex clivează mii de molecule C3.

Calea alternă a fixării complementului

Calea alternă sau *properdinică* a complementului se activează în absența complexelor imune. Fixarea complementului este activată de cristalele de urati (la persoanele cu gută), de suprafața unor bacterii, de polizaharidul pneumococic, de proteina C reactivă, detectabilă în sânge în faza acută a bolilor infecțioase.

Calea alternă de fixare a complementului este prima linie de apărare humorală față de infecție, înainte de intrarea în acțiune a sistemului imunitar.

Existența căii alterne a fost sugerată de Pillemer (1954), care studia mecanismele humorale de apărare la organisme neimunizate. Prin incubarea polizaharidului particulat din peretele levurilor, denumit *zimosan*, cu serul normal, Pillemer a observat că la 37⁰ are loc activarea complementului și epuizarea sa din ser. La temperaturi mai mici, complementul nu se activează, dar serul își modifică proprietățile, fiindcă după separarea particulelor de zimosan prin centrifugare, complementul nu se mai activează. Concluzia a fost că zimosanul interacționează cu un factor din ser, chiar la o temperatură inferioară activării complementului, care se poate elua de pe particule și restabilește capacitatea serului de a activa complementul. Factorul a

fost denumit *properdina* (pro = perdere).

Properdina a fost considerată mult timp ca un tip special de anticorpi naturali ai serului normal, cu un titru mic. Este o globulina de 150 kD, alcătuită din trei subunități identice, asemănătoare structural cu imuno-globulinele și are mobilitate γ . Are acțiune litică asupra bacteriilor, ce se exercită în cooperare cu proteinele sistemului complement și în prezența ionilor de Mg^{2+} . Se pare că properdina reprezintă un complex de anticorpi naturali ce se formează în cursul vieții ca rezultat al stimulărilor cu antigene ale microbiotei intestinale normale.

Clivarea lui C3 în calea alterna. Secvența alternativă a activării complementului este dependentă de fragmentul C3b și de trei proteine serice care nu participă la secvența clasică: *properdina (P)*, *factorul B* și *factorul D*. Este necesară prezența ionilor de Mg^{2+} .

Calea alterna este inițiată de diferite polizaharide, mai ales de origine microbiană (zimosan, inulina, LPS al bacteriilor Gram negative, acizii teichoici ai bacteriilor Gram pozitive), de suprafața unor paraziți, de molecule agregate de anticorpi (chiar ale izotipurilor care nu fixează complementul, IgG₄, IgA). Calea alterna pare a fi fiziologic activă la un nivel scăzut. Amplificarea ei este stopată de un grup de proteine reglatoare din plasmă și de pe suprafața celulelor tisulare, dar inexistente pe suprafața microorganismelor (bacterii, fungi). Polizaharidele lor constituie situsuri de legare pentru C3b și blochează efectele inhibitorii ale proteinelor reglatoare (unele microorganisme au dobândit factori de virulență, care se comportă ca proteine reglatoare ale complementului, pentru că leagă și inactivează C3b și inhibă fixarea complementului).

C3 nativ, cu cea mai mare concentrație plasmatică dintre componentele complementului (600-1800 mg/l) este instabil și se reînnoiește. O formă modificată a lui C3, denumită C3i este echivalentul funcțional al lui C3b, pentru că are o legătură tioester care se leagă covalent cu gruparea $-NH_2$ sau $-OH$.

Factorul B se leagă de C3b, fixat pe o suprafață activatoare, formând un complex C3bB. Cele mai multe molecule de C3b rămân în fază lichidă și sunt inactivate de factorul H, după formarea complexului C3bH. Unele suprafețe activatoare favorizează legarea factorului B pe C3b după excluderea factorului H. Complexul C3bB este clivat de factorul D (o protează activă din ser). Se formează un fragment mic (Ba) de 30 kD și complexul C3bBb, *convertaza lui C3*, analogul funcțional al lui C4b2b al căii clasice.

C3bBb se disociază ușor și își pierde activitatea, dar prin legarea

proteinei serice P se formeaza complexul PC3bBb, relativ stabil, cu proprietati proteolitice, care cliveaza C3 la aceiasi legatura peptidica, ca si în calea clasica si elibereaza aceleasi fragmente, C3a si C3b.

Este de mentionat ca C3b este atât componenta a complexului enzimatic, cât si produs al actiunii sale.

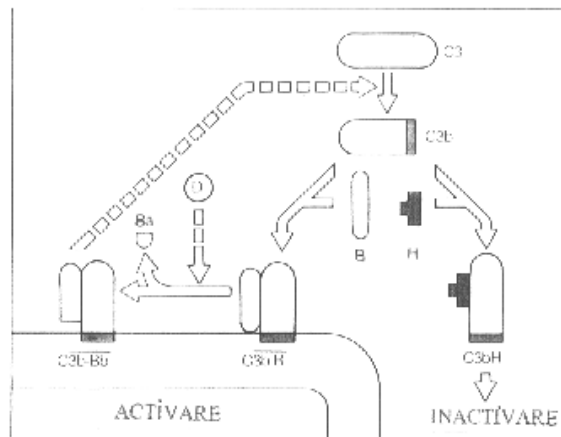


Fig. 109. Calea alterna. C3b si factorul B se asociaza si formeaza C3bB, care este convertit în convertaza activa a lui C3 – C3bBb, prin clivarea fragmentului Ba, sub actiunea factorului D. C3bBb amplifica conversia lui C3 în C3b, care se combina din nou cu factorul B si perpetueaza bucla retro-activa pozitiva. C3b leaga factorul B pe o suprafata activatoare. In faza lichida sau pe o suprafata neactivatoare, C3b leaga preferential factorul H, împiedicând formarea lui C3bB.

Treptele ulterioare ale activarii complementului sunt aceleasi, descrise în calea clasica.

Enzimele de clivare a lui C3 (C4b2b în calea clasica sau PC3bBb în calea alterna) se combina cu una sau mai multe molecule de C3b si formeaza convertazele lui C5.

Functiile complementului

Componentele sistemului C realizeaza 3 categorii de functii esentiale:

- *citoliza* (liza celulelor eucariote si bacteriene) si liza virusurilor învelite;
- *opsonizarea*, proces care implica tapetarea celulelor straine cu molecule derivate din activarea proteinelor complementului si usurarea ingestiei lor de catre celulele fagocitare;
- *activarea celulara* reuneste efectele generate de peptide derivate

din activarea complementului, care se leaga specific de receptorii unor celule si determina degranularea mastocitelor, migrarea unor celule mobile în focarul inflamator, intensificarea sau inhibitia raspunsului imun.

Efectul litic al activarii sistemului complement s-a studiat asupra hematiilor de berbec, tapetate cu anticorpi specifici. Pe suprafata hematiilor de berbec se gasesc antigene de tip Forssman, de natura lipopolizaharidica, foarte raspândite în natura (bacterii, plante animale). Ele lipsesc în tesuturile de iepure si de aceea, imunizarea iepurelui cu hematii de berbec stimuleaza sinteza anticorpilor specifici la titru înalt.

Sursa de sistem complementar este serul de cobai.

Hematiile se sensibilizeaza cu anticorpi, în doza subaglutinanta. Proportia hematiilor lizate creste odata cu cantitatea de complement adaugata în reactie.

Gradul de liza a hematiilor se masoara prin determinarea spectrofotometrica a intensitatii culorii supernatantului, datorita eliberarii hemoglobinei.

Unitatea hemolitica a complementului este definita de cantitatea de complement care lizeaza 50% din hematiile sensibilizate, în conditii standardizate (densitatea hematiilor, concentratia Ac, forta ionica a Mg^{2+} si Ca^{2+} , pH, temperatura).

În cazuri patologice (de exemplu, hemoglobinuria paroxistica nocturna), activarea complementului se produce si *in vivo*. Hematiile se comporta ca suprafata activatoare, initiind fixarea complementului pe calea alterna si liza prin activarea componentelor terminale ale complementului.

IgG anti-Rh, *in vitro*, în prezenta complementului nu lizeaza hematiile, probabil datorita distantei prea mari între determinantii antigenici ai suprafetei eritrocitului.

Bacteriile Gram negative, opsonizate cu anticorpi, pot fi lizate de complement, prin aceiasi secventa de reactii ca si hematiile. Bacteriile Gram pozitive si micobateriile sunt rezistente, probabil datorita structurii peretelui celular, deoarece protoplastii lor sunt lizati de complement.

In vivo, activarea complementului, în excesul cantitativ al complexelor imune circulante, produce lezarea celulelor sau favorizeaza procesele inflamatorii.

Efectul opsonizant al activarii complementului este rezultatul generarii unui numar mare de molecule de C3b, neimplicate în complexele C4b2b3b sau PC3bBb, care formeaza o patura moleculara opsonizanta pe suprafata celulei tinta, usurând aderența ei de receptorii pentru C3b ai fagocitelor. Formarea unei pelicule de molecule de C3b pe suprafata celulei tinta, este probabil una din cele mai importante

functii biologice efectoare ale cascadei de activare a C. Receptorii pentru C3b se gasesc si pe suprafata unor celule nefagocitare: limfocitele B, o subpopulatie a limfocitelor T, dar o importanta deosebita o au receptorii de pe suprafata hematiilor (la primate) si a plachetelor (la mamiferele neprimare). Receptorii eritrocitari pentru C3b au un rol esential în transportul complexelor Ag-Ac-C, la ficat si splina. Legarea complexelor imune pe suprafata hematiilor este esentiala pentru eliminarea lor. Diminuarea activitatii receptorilor eritrocitari pentru C3b are ca efect persistenta complexelor imune în circulatie, depozitarea lor în rinichi si plamâni, însoțita de manifestari patologice. Mecanismul de epurare (clearance), mediat de receptorul pentru C3b, probabil a evoluat ca o modalitate de a elimina cantitatile mari de complexe Ag-Ac, ce se formeaza în unele infectii cronice(cu virusul hepatitei B, C, cu agentul malariei, cu HIV etc.).

Activarea celulara este determinata de fragmente cu activitate biologica, rezultate din clivarea unor componente ale C, denumite *anafilatoxine* si consta în stimularea functiilor specifice ale unor tipuri celulare.

Anafilatoxinele C3a si C5a sunt peptide eliberate de la extremitatea N-terminala a lui C3 si respectiv C5, prin clivarea catalizata de convertazele specifice. Efectele acestor peptide de 77 aminoacizi sunt multiple, dar în esenta au functie de anafilatoxine. Termenul de "anafilatoxina" a fost atribuit, deoarece cobaii sufera socul fatal, asemanator *anafilaxiei* (stare fiziopatologica opusa celei de protectie), dupa injectarea unui ser homolog normal, care a fost incubat cu diferite componente activatoare ale complementului (de exemplu, inulina, complexe Ag-Ac, talc). Efectul anafilactic s-a atribuit anafilatoxinelor care deriva, în special, din clivarea lui C3 si C5, dar si a lui C4.

Anafilatoxinele C3a si C5a sunt generate *in vivo*, în reactiile inflamatorii ce au loc în imediata vecinatate a complexelor imune care fixeaza complementul. Rezultatul este cresterea concentratiei locale de proteine serice si a densitatii leucocitelor activate.

C3a, C4a si C5a sunt foarte asemanatoare ca structura: C3a si C4a au 77 aminoacizi, iar C5a are 74 aminoacizi. La capatul – COOH toate au Arg. C3a produce urmatoarele efecte:

– *contractia musculaturii netede în unele organe*

– *eliberarea histaminei din mastocite* (histamina este vasoconstrictoare în faza initiala si prin constrictia celulelor endoteliale mareste permeabilitatea capilara cu producere de edem; în faza a II-a histamina produce vasodilatatie periferica si scaderea brutala a tensiunii arteriale).

C3a este rapid inactivata în umorile organismului, sub actiunea carboxipeptidazei B, care cliveaza Arg terminala. Se cunoaste secventa aminoacizilor si activitatea ei biologica pare sa rezide în octapeptidul C-terminal. Injectarea C3a în tegumentul uman initiaza un raspuns prompt, care imita reactia de hipersensibilitate imediata (indurare si eritem), iar efectul este blocat de medicamente antihistaminice.

C5a este de 10-20 de ori mai activa decât C3a si are activitati biologice mai extinse, dar eficacitatea sa *in vivo* este mai redusa deoarece cantitatea de C5a formata în cascada de activare este mult mai mica decât cantitatea de C3b. C5a produce urmatoarele efecte:

- este factorul major al chimiotactismului pentru neutrofile
- determina fenomenul marginatiei lor în vase si neutropenie circulatorie
- activeaza neutrofilele, declansând cresterea metabolismului oxidativ al glucozei si producerea H₂O₂ cu efect bactericid;
- stimuleaza sinteza leucotrienelor de catre neutrofile (LTB₄), care prelungesc faza de permeabilitate crescuta indusa de C5a;
- stimuleaza degranularea mastocitelor;
- stimuleaza contractia musculaturii netede.

Proprietatile sale persista în restul peptidic, dupa scindarea Arg.

Proteine reglatoare ale activitatii sistemului C

Amplificarea excesiva a activitatii C este controlata de un set de 7 proteine reglatoare: 5 proteine ce inactiveaza complexe C în solutie si doua proteine de membrana ce inactiveaza complexe C pe celulele normale. Aceste proteine actioneaza în principal, prin inhibarea formarii, prin accelerarea degradarii sau prin inactivarea lui C3b si a convertazelor lui C3 si C5. Activitatea enzimatica a lui C1r si C1s este reglata de un inhibitor al esterazei C1 (C1-INH). C1-INH inhiba activarea în faza fluida a lui C1, când acesta nu este asociat cu complexe Ag-Ac, rezultatul fiind disocierea rapida a lui C1r si C1s. C1-INH formeaza un complex ireversibil cu C1r si C1s, blocând activitatile lor enzimatiche si le disociaza de C1q. Deficienta C1-INH este asociata cu angioedem. C2b si C4b stimuleaza contractia muschilor netezi si determina cresterea permeabilitatii vasculare, producând edem. C2b stimuleaza secretia membranelor mucoase si de aceea în forma ereditara a bolii (angioedem ereditar), episoadele implica tractul respirator (care pericliteaza viata) si durere intensa gastrointestinala. C1-INH este sintetizat în ficat si poate fi masurat cantitativ prin imunodifuzie radiala sau prin nefelometrie. 15% din pacientii cu angioedem ereditar au nivel normal al lui C1-INH, dar este inactiv.

Proteina care leaga C4b (C4bp) actioneaza ca un cofactor al proteazei serice (factorul I), care degradeaza C4b.

Factorul I este o serin-proteaza care cliveaza si inactiveaza C4b si C3b (în C3c si C3d). C3c este eliminat, iar C3d se asociaza cu C3b si îi inhiba activitatea enzimatica.

Factorul H este elementul cheie care controleaza functionarea caii alterne. El regleaza asocierea dintre C3b si factorul B. Formarea complexului C3bH blocheaza legarea factorului B. Factorul H disociaza complexul C3bBb. Factorul H se cupleaza cu C3b în oricare din localizarile sale, dar în special cu C3b liber în faza fluida.

Factorii H si I (inactivatorul lui C3b) controleaza enzimele ce cliveaza C3 si C5. Factorul I inactiveaza C3b si C4b, iar factorul H accelereaza degradarea C3-convertazei din calea alterna, prin disocierea Bb de complexul enzimatic. Factorii H si I au rol în clivirea C3b, la forma inactiva C3bi, clivat ulterior în C3c si C3d. C3b în faza fluida este inactivat de factorii H si I.

La pacientii cu deficiente ale factorilor H sau I, nivelul lui C3 este foarte scazut, datorita formarii necontrolate a C3-convertazei, ceea ce determina catabolismul rapid al lui C3 si a factorului B. Ei sufera infectii bacteriene recurente, datorita slabei opsonizari si chimiotaxii.

Proteina inactivatoare S se combina cu complexe C5b67 în solutie si blocheaza insertia lor în membrana celulara. Se formeaza complexul C5b67S, care poate sa interactioneze cu C8 si C9, dar nu mai are efect litic.

Proteine reglatoare asociate membranei celulare. Pe suprafata majoritatii celulelor sanguine (cu exceptia celulelor NK, a monocitelor medulare) si a altor categorii de celule se gaseste *factorul accelerator al disocierii* (DAF) celor doua convertaze ale lui C3. DAF solubil se gaseste în plasma si urina. Sub actiunea sa are loc disocierea complexelor C4b2b si C3bBb (rezultând C4b, C2b, C3b, Bb). Acest factor nu este o proteina integrata a membranei, ci este numai ancorata în membrana, prin atasarea cu capatul C-terminal la inozitol-fosfatidil.

Cofactorul proteic membranal este o proteina integrata, care se gaseste pe aceleasi categorii de celule ca si DAF. Functioneaza ca un cofactor proteolitic pentru disocierea proteolitica a lui C4b si C3b.

Functionarea cascadei de activare este controlata chiar de unele dintre propriile sale componente. De exemplu, C3bBb este o convertaza relativ instabila, cu timpul de înjumătățire de 5 minute. Disocierea factorului Bb produce inactivarea convertazei, cu efect sever de limitare a amplificării caii alterne asupra lui C3.

Properdina este un factor stabilizator al convertazelor lui C3 si C5, prelungind activitatea lor.

Epuizarea experimentală a complementului seric

Diminuarea experimentală a nivelului complementului plasmatic se realizează prin injectarea complexelor Ag-Ac formate *in vitro*. Injectia este însoțită de administrarea antihistaminicelor, pentru a preveni șocul anafilactic, consecutiv producerii anafilatoxinelor și eliberării masive a histaminei.

Cea mai selectivă și amplă depleție a lui C3 este produsă de veninul de cobra (*Naja naja*). Componenta activă a veninului de cobra (o proteină de 140 kD) este omologă, din punct de vedere funcțional cu C3b, dar este diferită structural de acesta și este rezistentă la activitățile inhibitorii care se exercită în mod normal asupra lui C3b. Deoarece funcționează ca C3b, factorul din veninul de cobra (CoF) interacționează cu factorul B și activează calea alternă. Se formează un complex stabil, *PCoFBb*, cu funcție de convertază a lui C3. C3b eliberat, formează o cantitate mare de *PC3bBb*, alimentând bucla de amplificare a convertazei C3. Astfel, C3 este eliminat eficient pentru 4-96 de ore.

Un efect similar de stabilizare a căii alterne de activare a complementului îl are *factorul nefritic* (NF). Factorul nefritic este un auto-anticorp IgG₃, mai mare decât IgG datorită glicozilării, cu specificitate față de C3-convertaza căii alterne (C3bBb). Factorul nefritic stabilizează complexul enzimatic C3bBb, împiedicând inactivarea de către proteinele H și I. În prezența NF, activarea C3 progresează necontrolat. Consecința este o hipocomplementemie profundă a lui C3, dar C4 rămâne normal. Pacienții cu NF prezintă infecții bacteriene recurente și au lipodistrofie parțială, o perturbare a metabolismului lipidic.

Biosinteza componentelor sistemului complement

Aproape toate componentele complementului sunt sintetizate în cea mai mare parte (peste 90%) în ficat, de către *hepatocite*: C3, C6, C8, factorul B. Fac excepție componentele C1, locul sintezei fiind *epiteliul gastrointestinal și urogenital*. *In vivo*, monocitele sanguine și macrofagele tisulare sintetizează C1, C2, C3, C4, C5, factorii D și B, properdina, factorii H și I, numai pentru propriile lor necesități, fără să influențeze concentrația complementului seric. Sinteza acestor componente se intensifică în macrofagele activate în procesele inflamatorii, furnizând un mediu favorizant al procesului inflamator.

Nivelul lui C1q este proporțional cu nivelul IgG, adică C1q scade în

hipogamaglobulinemie și crește în hipergamaglobulinemie. Alte câteva componente ale complementului (C3, B) sunt reactanți de fază acută, adică cresc cantitativ ca răspuns la procesul inflamator.

Deficiențele de biosinteză a componentelor sistemului C sunt asociate cu stări patologice, rezultate dintr-o capacitate diminuată de eliminare a complexelor imune.

Deficiența sintezei C1q, r, s sau a C4 este însoțită de manifestări patologice autoimune caracteristice lupusului eritematos diseminat. Absența totală a lui C3 este asociată cu infecții severe, în special septicemice, cu pneumococi și meningococi, ceea ce denotă importanța lui C3 și a componentelor care îl activează, în apărarea antiinfecțioasă a organismului. Deficiențele lui C5, C6, C7 sau C8 nu se asociază cu o sensibilitate crescută la infecții.

Rolul complementului în apărarea antiinfecțioasă

Funcția esențială a C este aceea de *opsonizare* a celulelor nonself și a virusurilor infecțioase, prin componenta C3b, dar are și funcții litice în cooperare cu IgM și IgG, specifici față de diferite componente ale agenților infecțioși (bacterii, fungi, virusuri).

Pentru ca efectul să fie bacteriolitic, trebuie să se producă lezarea ireversibilă a membranei externe a bacteriilor Gram negative sau a stratului mureinic al bacteriilor Gram pozitive.

Anticorpii față de structurile bacteriene care se extind la o distanță relativ mare de suprafața celulei (fimbrii, flageli) nu au efect litic, deoarece C este activat la o distanță prea mare de membrana externă a bacteriilor Gram negative.

Unele bacterii Gram negative și toate bacteriile Gram pozitive pot să-și păstreze viabilitatea, chiar în condițiile activării C. Atributul rezistenței lor la factorii serici este un factor de virulență al suprafeței bacteriene, care se comportă ca proteina reglatoare a activității C: inactivează C3b.

Structurile bacteriene care determină rezistența la factorii litici ai serului sunt, în primul rând, moleculele complete de LPS (cele care prezintă catenele polizaharidice laterale). Acestea sunt variantele virulente ce formează colonii S. Mutantele care cresc sub forma coloniilor R, sintetizează molecule LPS incomplete (lipsește polizaharidul terminal al moleculei) și sunt sensibile la factorii serici.

Mutantele coloniale S activează C la nivelul moleculelor de LPS cu catene laterale lungi, dar la o distanță prea mare de membrana externă și liza nu se produce.

La bacteriile Gram pozitive, principalul component activator al caili alterne a C, este peptidoglicanul.

Materialul capsular polizaharidic al bacteriilor patogene Gram pozitive si Gram negative, în general este un substrat ineficient al fixarii C, datorita continutului sau ridicat de acid sialic. Incapacitatea activarii caili alterne, de catre polizaharidele capsulare este cel mai important mecanism prin care bacteriile evita opsonizarea si atacul fagocitelor.

Acidul sialic al suprafetei eritrocitare are functii reglatoare fata de proteinele C, deoarece mareste afinitatea de legare a factorului H, fata de C3b legat de eritrocite.

Activarea C este initiata si de alte molecule serice cu rol de opsonine.

Proteina C reactiva se leaga cu mare afinitate de fosforil-colina, un component major al acizilor teichoici din peretele celular al bacteriilor Gram pozitive. Legarea proteinei C reactive de suprafetele celulare bogate în fosforil-colina initiaza calea alterna a fixarii C.

Fibronectina serica are rol de opsonina foarte eficienta. Ea se gaseste în plasma, dar si pe suprafata celulelor. Se fixeaza pe suprafata cocilor Gram pozitivi si leaga C1q, initiind calea clasica a fixarii C.

Proteina care leaga manoza (PBM) din serul mamiferelor si din ficat are rol în clearance-ul microorganismelor din sânge. Este o lectina cu rol opsonizant, care se leaga de oligozaharidele fungilor. Stimuleaza fagocitoza si activeaza C pe calea alterna, producând liza agentului patogen.

Sistemul complement a evoluat ca un sistem proteic de opsonizare a complexelor imune, ceea ce confera unor celule circulante si fixe, capacitatea de a lega aceste complexe.

Procesul inflamator

Inflamatia este o reactie de aparare locala, nespecifica. Etimologic, denumirea vine de la latinescul "inflamare" = a arde.

Sub aspect functional, *inflamatia este procesul prin care leucocitele si anumite categorii de macromolecule ale sângelui sunt eliberate în ariile tisulare avariate*. Cel mai adesea, inflamatia se produce independent de activarea sistemului imunitar.

Suportul anatomic al reactiei inflamatorii este teritoriul *microcirculatiei*: arteriole, capilare, venule postcapilare, sunturi arterio-venoase.

În reactia inflamatorie se activeaza o diversitate de sisteme

moleculare si celulare. Ele exercita efecte vasculare marcate si determina principalele manifestari ale reactiei inflamatorii: *rubor, tumor, calor, dolor* (eritem, edem, caldura, durere), descrise de Celsus, acum 2000 de ani.

Reactia inflamatorie este declansata de o multitudine de factori de agresiune: traume mecanice, agenti infectiosi, cristale de urati, inhalarea metalelor grele, complexe imune, procese neoplazice, sindromul ischemie-reperfuzie, temperatura scazuta sau crescuta, corpuri straine inerte, agenti chimici, radiatii si se caracterizeaza prin urmatoarele modificari anatomo-functionale:

- *vasodilatatie* (hiperemie), cu cresterea fluxului sanguin spre aria afectata;

- *cresterea permeabilitatii vasculare locale*, datorita contractiei celulelor endoteliale ale capilarelor lezate, sub actiunea histaminei si a chininelor. In conditii normale, endoteliul este relativ impermeabil pentru proteine, iar schimbul limitat între compartimentul vascular si cel extravascular se face prin celulele endoteliale si prin jonctiunile dintre celulele endoteliale. In reactia inflamatorie, celulele endoteliale din venulele mici se retracta si se desprind din jonctiuni, ceea ce creeaza pori mari. Astfel, compusii plasmei trec în spatiile extravasculare;

- unii mediatori moleculari ai inflamatiei au capacitatea de a dilata capilarele si de a contracta venulele, marind presiunea hidrostatica locala si favorizând astfel extravazarea componentelor sanguine. Consecinta acestor modificari vasculare este *edemul*, însoțit de durere. Pe masura ce extravazarea progresa, sângele intravenos se concentreaza, iar curgerea sa în noile conditii hemodinamice locale, încetinește. La nivelul leziunii endoteliale se produce *aderenta si agregarea plachetelor sanguine*, urmata de *aderenta eritrocitelor si leucocitelor*, care desavârsesc procesul coagularii sanguine;

- în focarele cu avarie tisulara severa, curgerea sângelui înceteaza si se produce *staza sanguina*. Spre deosebire de tromboza (datorata obturarii vasului cu un cheag sanguin), staza sanguina este un proces reversibil si dureaza minute, ore sau zile, în functie de intensitatea agresiunii;

- celulele endoteliale nu sunt numai substratul modificarilor de permeabilitate. Dupa activare, ele secreta PAF, un fosfolipid care activeaza plachetele, dar se fixeaza si pe leucocitele marginale, marind aderenta lor la endoteliu;

- celulele endoteliale produc IL-1 si tromboplastina (activatoare a trombinei);

- evenimentul celular esential care are loc într-un proces inflamator este *migrarea leucocitelor*, principalii efectori ai reactiei

inflamatorii.

Diapedeza

Venulele post-capilare sunt situsul primar la nivelul caruia mediatorii vasculari (histamina, serotonina, bradichinina, anafilatoxinele, LT) induc contractia endoteliala, dar si situsul la care leucocitele margineaza ca raspuns la chimioatractanti si parasesc patul vascular.

Migrarea leucocitelor în aria tisulara avariata este consecinta *activarii celulelor endoteliale vasculare* si cresterii permeabilitatii vasculare. Activarea celulelor endoteliale semnifica exprimarea moleculelor de suprafata, necesare aderenței celulelor inflamatorii circulante si eliberarea citochinelor proinflamatorii si a agentilor vasoactivi. Primele leucocite care migreaza în focarul inflamator sunt PMNN.

Populatia totala de neutrofile circulante în sângele periferic este alcatuita din doua subpopulatii:

– cele care circula în *curentul axial* (circa jumatate din numarul total al PMNN circulante);

– cele care circula în *zona marginala* a torentului sanguin si se deplaseaza încet, în contact cu endoteliul vascular.

În conditii normale, PMNN adera foarte rar la endoteliul vascular, dar consecutiv unei leziuni, marginatia leucocitelor se intensifica. In cazul unei infectii, sau a unor leziuni, celulele tisulare secreta citochine (IL-1, TNF α). Citochinele stimuleaza celulele endoteliale capilare sa expuna pe suprafata lor, molecule speciale denumite *selectine*.

Selectinele sunt o familie de lectine din categoria adezinelor, care mediaza contactul selectiv dintre celule. Familia cuprinde selectinele L, P si E. Adezinele L sunt *constitutive*, iar cele din clasele P si E sunt *adaptive*, adica se exprima intens pe suprafata luminala a celulelor endoteliale, a leucocitelor sau a plachetelor, ori de câte ori tesutul este expus unei agresiuni. Celulele endoteliale au o rezerva interna de selectine, pe care o mobilizeaza si o expun la suprafata, în decurs de câteva minute dupa actiunea stimulului inflamator.

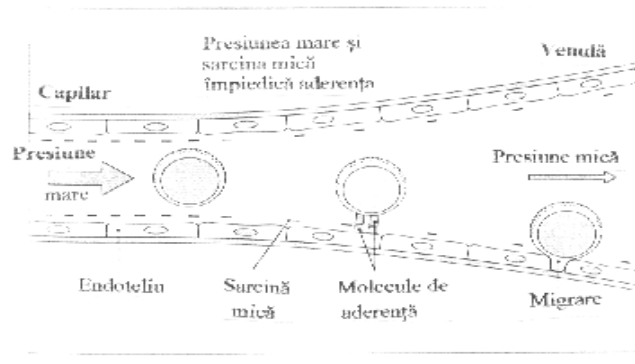


Fig. 110. Migrarea leucocitelor prin endo-teliu. Leucocitele circulante în patul vascular pot interacționa cu endoteliul venulelor prin-tr-un set de molecule de aderență. În venule, presiunea sângelui este mică, sarcina electrică a suprafeței endoteliului este redusă și se exprimă selectiv moleculele de aderență (după Roitt, 1997).

Selectinele E (endoteliu) se exprimă pe celulele *endoteliale* activate de mediatori ai reacției inflamatorii (IL-1, TNF- α), eliberați de celulele țesutului ca răspuns la leziune, infecție ori ischemie. Ele leagă specific glucidele exprimate pe leucocite, asemenea selectinei L.

Selectina P este o glicoproteină transmembranară (140 kD) exprimată atât pe *celulele endoteliale* sub acțiunea stimulilor inflamatori, cât și a *plachetelor*. Este depozitată în granulele ambelor tipuri de celule și este rapid translocată la suprafață, unde mediază aderența prin legarea glucidelor specifice ale celulei țintă. După activarea plachetelor sub acțiunea trombinei, IL-1, TNF- α sau a radicalilor O_2 , selectina P se redistribuie rapid pe suprafața celulelor.

Selectina L (β 2-integrina) se găsește pe suprafața celor mai multe *leucocite* circulante: limfocite, neutrofile, monocite. Spre deosebire de celelalte două tipuri, selectina L este exprimată *constitutiv* pe suprafața celulelor. Rolul ei primar constă în medierea aderenței limfocitelor T neangajate, de celulele endoteliale, în recircularea lor fiziologică spre ganglionii limfatici, dar funcționează și ca mediator al tranzitului leucocitelor în situsul inflamator. În 1994 s-a arătat că selectina L mediază chiar interacțiunea dintre leucocite: neutrofilul imobilizat pe endoteliul vascular, poate deveni substrat aderent pentru alte neutrofile. Interacțiunea neutrofil/neutrofil este complet blocată de AMC anti-selectina L. Selectina L este eliminată rapid de pe suprafața leucocitelor activate, fiind clivată prin proteoliză la situsul proximal

membranei și de aceea, nivele crescute ale selectinei L se găsesc în plasma pacienților cu focare inflamatorii infectioase, la pacienții leucemici și la cei cu SIDA.

Molecula de selectina, indiferent de specificitatea ei de legare, are trei domenii functionale:

– *domeniul membranelor* COOH terminal, cu rolul de a ancora molecula;

– *domeniul modular*, alcătuit dintr-un număr variabil de secvențe modulare, fiecare de circa 60 de aminoacizi, ce se găsesc și în proteinele ce leaga complementul, formează cea mai mare parte a moleculei;

– *domeniul lectinic* și secvența repetată a EGF, cu omologie de peste 60% a aminoacizilor pentru toate cele 3 tipuri de selectine, localizat la extremitatea liberă a moleculei, are rolul de a lega liganzii glucidici ai selectinei specifice, în prezența ionilor de Ca^{2+} .

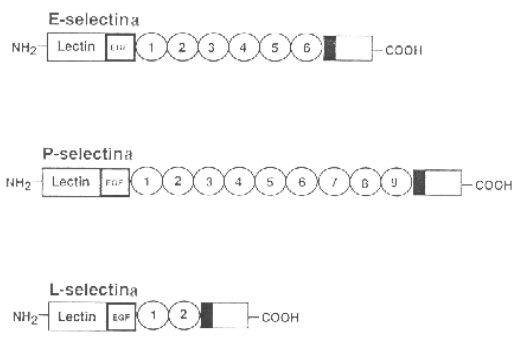


Fig. 111. Structura *selectinelor* E, P și L. *Selectina E* se exprimă pe celulele endoteliale activate. *Selectina P* este o glicoproteină transmembranară de circa 140 kD. După activare sub acțiunea trombinei, selectina P este redistribuită rapid pe suprafața plachetelor. *Selectina L* se găsește pe cele mai multe limfocite umane circulante, neutrofile, monocite. Spre deosebire de celelalte două, selectina L este exprimată constitutiv pe suprafața celulelor. După activare, limfocitele și neutrofilele eliberează selectina L. Domeniul lectinic și secvența repetată EGF sunt identice în proporție de peste 60%, la cele trei selectine. Modulele selectinelor au o lungime de circa 60 de aminoacizi și conțin 6 resturi cisteinil.

Leucocitele marginale adera de moleculele de selectina ale endoteliului capilar. Interacțiunea selectina-PMNN este specifică și este inițiată de legarea cu mică afinitate a leucocitelor de endoteliul activat, ceea ce induce o *miscare de rostogolire* a leucocitului pe suprafața epiteliului. Miscarea de rostogolire este convertită în *interacțiunea stabilă* a leucocitului cu suprafața endoteliului, prin intermediul selectinelor L ale suprafeței leucocitare. Astfel, leucocitele sunt imobilizate. Consecutiv aderenței la endoteliu, leucocitul inițiază

migrarea prin endoteliu. Neutrofilul își extinde pseudopodele la jonctiunea dintre celulele endoteliale ale capilarului și se deplasează în acest spațiu prin mișcări amoeboidale, apoi penetrează membrana bazală a capilarului și pătrunde în țesut. Nu toate leucocitele care se rostogolesc la contactul cu endoteliul, vor părăsi patul vascular. Unele se eliberează din conexiunea cu endoteliul și reintra în circulație. Leucocitele preactivate, cu o disponibilitate înaltă pentru aderență, nu necesită treapta de rostogolire și se opresc foarte repede după ce au interacționat cu endoteliul vascular. Procesul migrării leucocitelor din lumenul vascular se numește *diapedeza*. Migrarea este ușurată de proteazele pe care leucocitul le secreta (elastază, colagenază), enzime care hidrolizează substanța cimentantă dintre celulele endoteliale și lizează membrana bazală.

Molecula cu un rol esențial în motilitatea leucocitelor este *actina*, care formează 50% din totalul proteinelor celulare. În celula aflată în repaus, actina polimerizată formează o rețea continuă sub membrana citoplasmatică, având rol esențial în păstrarea formei și în ancorarea ei de integritate din mediul extracelular. În leucocitul activat, reglarea raportului dintre actina monomerică și polimerizată favorizează deformarea celulei și trecerea prin spațiul endotelial îngust.

Chimiotaxia

Odată ajunse în spațiul extravascular, deplasarea leucocitelor spre celulele lezate, spre agentul infecțios sau iritant, este controlată de factori chimiotactici.

Capacitatea unui fagocit de a recunoaște și de a răspunde la un gradient chimic printr-o mișcare orientată se numește *chimiotaxie*.

Migrarea direcționată a leucocitelor este indusă de moleculele chimiotactice. Chimiotaxia trebuie deosebită de *chimiochineza*, care semnifică intensificarea mișcărilor întâmplătoare, neorientate. Unii mediatori ai inflamației (histamina) sunt chimiochinetici, dar nu sunt chimiotactici.

Cei mai importanți factori chimiotactici sunt C3a și C5a, eliberați în cascada de activare a complementului, sub acțiunea hidrolazelor tisulare sau a proteazelor bacteriene din focar. C5a este atrăgător pentru neutrofile și macrofage. Cele două anafilatoxine induc degranularea mastocitelor, care eliberează factorii ce modifică condițiile de vascularizație locală și factorii chimiotactici pentru macrofage.

Alți factori atrăgători ai leucocitelor sunt derivații ai cascadei de activare a complementului (C3b) sau sunt produși prin coagulare și fibrinoliză, sunt limfochine, factori sintetizați de fibroblaste, fragmente de colagen, peptide bacteriene (catena peptidică la procariote este inițiată

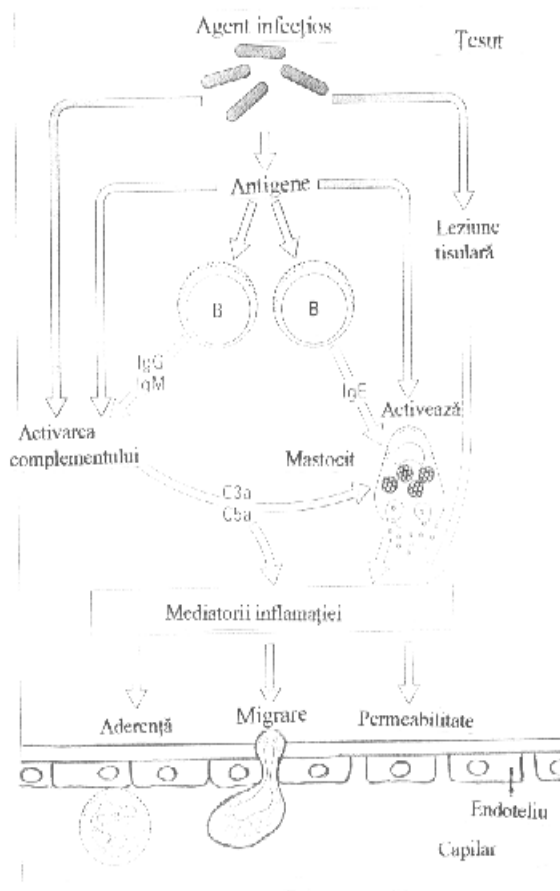
cu un rest de formil-metionil).

Neutrofilele, monocitele si macrofagele sunt atrase de concentratii foarte mici (1 nM) de peptide bacteriene (cu rest de formil-metionil).

Factorii chimiotactici sunt generati în focarul inflamator si difuzeaza spre capilarele locale.

Sub actiunea factorilor chimiotactici, leucocitele traverseaza endoteliul vascular si ajung în focarul inflamator. Ele au receptori pentru peptidele N-formil-metionil, pentru C3b, pentru regiunea Fc a moleculei de Ig. Neutrofilele din focarul inflamator sintetizeaza leucotriena B₄. Monocitele, neutrofilele, eozinofilele au receptori pentru leucotriena B₄, astfel încât primele neutrofile care ajung în focarul inflamator induc imigratia altora. Neutrofilia initiala induce neutrofilie.

În focarul inflamator, leucocitele elibereaza produse de catabolism sau se lizeaza si elibereaza enzime si mediatori ai reactiei de inflamatie. Aceste componente, alaturi de factorii de coagulare si de componentele complementului, amplifica procesul inflamator.



mastocitele eliberează me-diatorii granulari (PG și LT). Mediatorii induc inflamația locală și orien-teza migrarea leucocitelor (dupa Roitt, 1993).

Alături de neutrofile, în focarul de inflamație vin monocite, limfocite și chiar eritrocite, dacă leziunea vasculară este amplă.

Monocitul circulant, în condiții obișnuite, în absența stimulilor chimiotactici, intră în țesuturi pentru a deveni *macrofag tisular rezident*. Sub acțiunea stimulilor chimiotactici, trecerea monocitelor circulante în țesuturi, se amplifică.

Majoritatea mononuclearelor dintr-un focar inflamator provin *din monocitele circulante*, originare în măduva oaselor.

A doua sursă de monocite sunt cele rezultate prin *diviziune*, iar cea de a treia, sunt *mononuclearele rezidente în țesuturi*, cu viață lungă, care sub acțiunea factorilor chimiotactici se mobilizează și se

deplaseaza în focarul inflamator. Ele se gasesc în special în focarele inflamatoare cronice.

Tipul celular dominant din focar variaza mult, în functie de natura stimulului antigenic si dupa tipul de reactie inflamatoare pe care o declanseaza: *acuta* sau *cronica*.

Tipuri de reactii inflamatorii

Reactiile inflamatorii *acute* se caracterizeaza printr-o evolutie rapida într-o perioada scurta de timp, deoarece fortele de aparare ale organismului neutralizeaza agentul invadator si curata rapid focarul reactiei. Aceste focare contin exudat vascular, leucocite (în special PMNN), iar la periferie se gasesc celule fagocitare mononucleare si fibrina. Focarul are o cavitate centrala plina cu PMNN vii si moarte, celule invadante si resturi celulare. Centrul focarului este purulent. În final, focarul inflamator este sterilizat, iar regenerarea tisulara (cicatrizarea) progresa pâna la vindecare. Regenerarea tisulara este rezultatul proliferarii fibroblastelor si a sintezei colagenului. Daca antigenul este inert, zona focarului este delimitata de un inel fibros. In timpul proliferarii, fibroblastele produc mucopolizaharide acide, ce neutralizeaza efectele unor mediatori chimici eliberati de mastocite si de bazofile.

Reactiile inflamatoare *cronice* sunt determinate de persistenta stimulului antigenic. Ele prezinta aceleasi 4 semne cardinale, dar participantii celulari si moleculari sunt partial diferiti.

Focarele inflamatorii cronice se caracterizeaza totdeauna prin infiltrarea *limfocitelor T* si a *macrofagelor*.

Macrofagele sunt cele mai importante celule ale focarului. Ele curata teritoriul, ingerând resturile de celule avariate, ingera agentul patogen invadator, produc diferiti mediatori ai inflamatiei (radicalii O_2 , enzime lizosomale, proteaze, citochine) si stimuleaza raspunsul imun, pentru ca au rolul de a prezenta antigenul, limfocitelor din focar.

Formele extreme de inflamatie cronica produc *granuloame*. Exemplul clasic este *granulomul tuberculos*. Într-un astfel de granulom, macrofagele si limfocitele sunt cele mai abundente. Macrofagele au forme particulare, de *celule gigante* provenite prin fuziune si de celule *epitelioide* aplatizate, dar nu fagociteaza. Macrofagele predomina în zona centrala a granulomului, iar limfocitele sunt periferice.

Focarul de inflamatie cronica este produs în primul rând de microorganismele infectioase, rezistente la actiunea efectorilor

sistemelor de aparare: *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *L. monocytogenes*, *Brucella*, *Salmonella*, *Legionella*, *Chlamydia*.

În al II-lea rând, focarele de inflamatie cronica sunt generate de *autoantigene*. In starile patologice cu substrat imunitar (maladiile autoimune), generarea focarelor de inflamatie este inevitabila, pentru ca organismul nu poate sa elimine în totalitate, propriile antigene. Autoantigenele, dar si complexe imune, devin stimulii reactiilor inflamatorii cronice, iar la rândul lor determina eliberarea unor noi cantitati de autoantigene.

În al treilea rând, *adjuvantii* folositi pentru imunizarile experimentale (uleiul mineral din adjuvantul Freund complet sau incomplet, fosfatul de Ca, de Al) persista îndelung si induce formarea granuloamelor.

Mediatorii reactiei inflamatorii

Factorii mediator ai reactiei inflamatorii sunt produsi în cascada de activare a complementului, în limfocite, monocite, granulocite, mastocite, plachete, hepatocite. Ei determina manifestarile reactiei inflamatorii. Principala manifestare este alterarea fluxului sanguin si a permeabilitatii capilare. Actiunea lor se manifesta la nivelul vaselor mici din zona focarului. C3a si C5a nu au numai actiune chimiotactica, ci determina si efectul direct de contractie a muschilor netezi. Ambele induce degranularea mastocitelor, cu eliberarea histaminei. In prima faza, histamina are efect *vasoconstrictor*.

Mastocitele sunt celule din tesutul conjunctiv, mai numeroase în imediata vecinatate a vaselor sanguine. Ele sunt activate direct de moleculele de anticorpi citofili (în special IgE), de C3a si de C5a. In faza a doua, histamina este *vasodilatatoare* si produce prabusirea tensiunii arteriale. Deoarece reproduce manifestarile reactiilor anafilactice prin intermediul histaminei, C3a si C5a se numesc *anafilatoxine*. Mastocitele au receptori membranari pentru cele doua polipeptide. Dupa activare, în mastocite se produce un influx de Ca^{2+} si cresterea nivelului AMPc. Concomitent cu degranularea, se elibereaza fosfolipaza A₂, care scindeaza *acidul arachidonic* din fosfolipidele membranare. Acidul arachidonic este convertit în compusi icozanoidici (cu 20 de atomi de C): *prostaglandine* (PG) si leucotriene (LT). PG si LT maresc permeabilitatea capilara. Granulatiile mastocitelor contin histamina, enzime proteolitice, heparina, factori chimiotactici pentru monocitele sanguine, macrofagele tisulare, pentru neutrofile si eozinofile.

Macrofagele sunt retinute si activate în focarul inflamator, de

limfochine: MIF (factorul inhibitor al migrării) și MAF (factorul de “armare” a macrofagelor). Macrofagele rămân celulele esențiale ale focarului inflamator. După activare, ele secreta următoarele categorii de mediatori:

– enzime *lizosomale* care fluidizează substanța fundamentală a țesutului conjunctiv și ușurează deplasarea celulelor (colagenază, elazăză, hialuronidază);

– *compusi cu rol de apărare* antibacteriană (lizozim, beta-lizina, arginază) și antivirală (interferon), componente ale complementului;

– *factori reglatori* ai reactivității țesutului (IL-1, mediator al interacțiunii macrofag-limfocit);

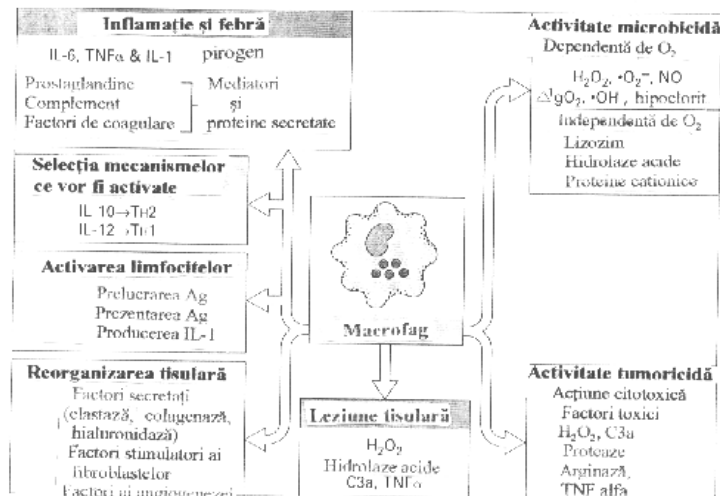


Fig. 113. Rolul central al macrofagului în imunitate și în inflamație. Macrofagele și produsele lor au rol important atât în inducerea procesului inflamator, cât și în reorganizarea și repararea țesutului (stânga). Funcțiile efectoare ale macrofagului (dreapta) pot cauza avaria țesutului, ca în cazul reacțiilor de hipersensibilitate (după Roitt, 1993).

– factori cu efect la distanță, asupra măduvei osoase, stimulând diferențierea neutrofilelor și asupra SNC;

– H₂O₂, care produce leziuni țesutului;

– factori cu acțiune microbicidă și tumoricidă.

Arginaza este o proteină sintetizată și eliberată de macrofagele activate. Are efect litic asupra unor celule maligne.

Rolul citochinelor în procesul inflamator

Rolul patologic al *citochinelor* în infecție a fost clar evidențiat în situația letală, denumită *socul septic* produs de bacteriile Gram negative. Efectul patologic ar fi datorat eliberării endotoxinei și inducerea sintezei unei varietăți de *citochine proinflamatorii* (activatoarele ale procesului inflamator): *IL-2*, *IL-6* și *TNF*. Aceste citochine induc sinteza altor mediatori: citochine chimiotactice (*IL-8*), *PG* și *LT* derivate din lipide, molecule endoteliale de aderență celulară. Consecința sintezei acestei diversități de molecule proinflamatorii este scăderea marcată a funcției cardiace, scăderea presiunii sanguine, staza sanguină datorită formării trombilor leucocitari. Aceste schimbări produc insuficiența organelor majore și sfârșitul letal. Șocul septic este o situație acută, dar același set de citochine proinflamatorii sunt implicate în patologia bolilor cronice infecțioase, ca leproza, tuberculoza, infecția periodontală.

Citochinele proinflamatorii au activități biologice foarte asemănătoare. Toate sunt factori *pirogeni endogeni* și creșterea temperaturii corpului pe care o induc, pare să stimuleze activitatea antibacteriană a leucocitelor. Aceleași citochine sunt esențiale pentru inducerea răspunsului de "fază acută", care este parte integrantă a apărării înăscute față de microorganismele infecțioase: amiloidul seric A, proteina care leagă manoză, a căror sinteză crește de peste 1000 de ori sub acțiunea citochinelor proinflamatorii. Funcția lor este de a opsoniza celulele bacteriene, ușurând astfel fagocitoza.

Citochinele proinflamatorii induc sinteza *selectinelor* (E) pe suprafața celulelor endoteliale, care recunosc antigenele leucocitare și determină fenomenul de *încetinire a mișcării* și de rostogolire a leucocitelor pe suprafața endoteliului, la situsul inflamator. Alte molecule endoteliale vasculare sunt cele de aderență intercelulară (ICAM). Acestea leagă cu afinitate înaltă contrareceptorii suprafeței leucocitare (β 2-integrine). Interacțiunea dintre integrinele leucocitare și ICAM determină oprirea leucocitelor și trecerea lor în spațiul extravascular prin procesul de *diapedeza*.

IL-1, *IL-6* și *TNF* sunt protectoare, dar starea febrilă înaltă și prelungită, produce leziuni tisulare. Celulele mezenhimale, adică ale țesutului conjunctiv (fibroblaste, osteoblaste, condrocitele cartilajului articular), cu rol important în producerea și turnover-ul matricei extracelulare, sub acțiunea prelungită a *IL-1* și a *TNF*, își pierd capacitatea de sinteză a matricei extracelulare (colagen), dar sintetizează o categorie de enzime (*matrixine*, din care fac parte

colagenaza si elastaza), care hidrolizeaza componentele matricei, consecinta fiind pierderea matricei. De aceea, cele 3 citochine sunt mediatori esentiali ai manifestarilor patologice

În procesul inflamator actioneaza semnale pozitive si negative. Citochina anti-inflamatorie este IL-1ra (receptor antagonist), care se leaga de receptorul pentru IL-1 si determina efect antagonic, de inhibitie a activitatii celulelor sensibile. Alte citochine anti-inflamatorii sunt IL-4, IL-10, IL-13, care inhiba sinteza proteica în macrofage.

Reactantii de faza acuta

Reactia de faza acuta este parte integranta a apararii în nascute, fata de microorganismele infectioase si este mediata de o serie de proteine, a caror sinteza se amplifica brusc sub actiunea citochinelor proinflamatorii.

β -lizina este o proteina cationica, termostabila (g m = 6000 D). Se gaseste în plachete si în umorile organismului. Omoara celulele bacteriene în câteva minute.

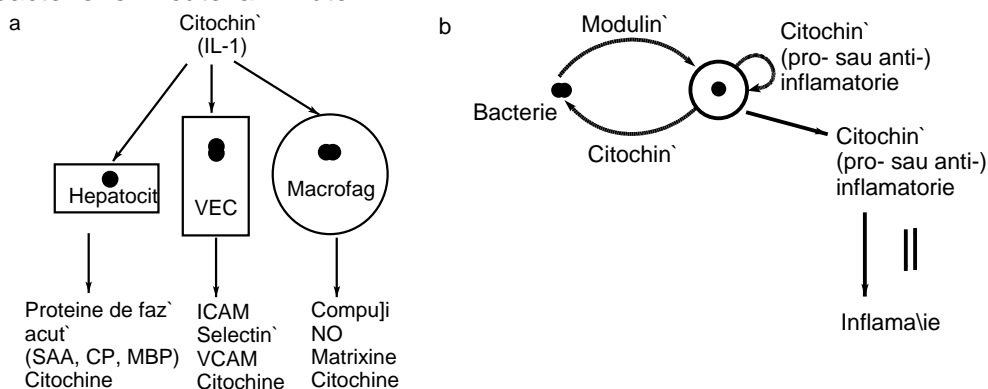


Fig. 114. a. Spectrul de proteine, enzime, receptori de aderență și mediatori lipidici, pe care îi sintetizează diferite tipuri de celule ca răspuns la stimularea cu citochine proinflamatorii, ca de exemplu IL-1. SAA = amiloidul seric A; CRP = proteina C reactivă; MBP = proteina care leagă manoza; VEC = celula endotelială vasculară; ICAM = molecula de aderență intercelulară; VCAM = molecula de aderență exprimată pe celulele vasculare;

b. Modulinele bacteriene (molecule care influențează reactivitatea imunitară) induc o rețea a citochinelor, prin intermediul căreia interacționează cu celulele gazdei. Citochinele stimulează sau inhibă răspunsul inflamator. Modulinele derivate din microbiota intestinală, interacționează cu celulele gazdei printr-o rețea de citochine anti-inflamatorii. Șoarecii knockout, cu deleția genei pentru o citochină anti-inflamatorie esențială (IL-2 sau IL-10) manifestă un răspuns inflamator sever față de modulinele microbiotei intestinale. Citochinele acționează nu numai ca modulatori ai

NO = oxidul nitric.

inflatiei, dar pot interactiona direct
cu bacteriile, efectul fiind inactivarea
citochinelor.

Lactoferrina este produsa si eliberata în focarul inflamator, de PMNN si are proprietatea de a lega Fe. Daca nu este saturata cu Fe, lactoferina inhiba cresterea bacteriilor, deoarece leaga Fe, un element esential al cresterii celulelor bacteriene. Procesele inflamatorii sunt însoțite de producerea *reactantilor de faza acuta*. Acestia sunt proteine plasmatic sintetizate în ficat, a caror concentratie sanguina creste în timpul si dupa procesul inflamator si au rol important în vindecarea leziunii. Sunt *proteine adaptative* care favorizeaza supravietuirea în perioada imediat urmatoare leziunii. Proteinele de faza acuta se sintetizeaza dupa infectii, interventii chirurgicale, arsuri, infarct miocardic. Unele cresc în timpul sarcinii si în starile neoplazice. Denumirea lor deriva din aceea ca, una dintre ele (proteina C reactiva) s-a descoperit în serul pacientilor în faza acuta a pneumoniei cu *Str. pneumoniae*. Termenul de "proteine de faza acuta" s-a pastrat si desemneaza un grup mare de proteine plasmatic, a caror concentratie plasmatica creste dupa leziuni tisulare si dupa infectii. Concentratia unor proteine plasmatic are o dinamica inversa, adica nivelul lor scade în timpul raspunsului de faza acuta (albumina).

Proteinele de faza acuta sunt sintetizate, în cea mai mare parte, în ficat. Concentratia unora creste de pâna la doua ori, iar altele înregistreaza o crestere de 1000 de ori sau chiar mai mult.

Cele mai tipice proteine de faza acuta sunt *proteina C reactiva*, *alfa 1-glicoproteina acida*, *haptoglobina*, *ceruloplasmina*, *alfa 1-antitripsina*.

Proteina C reactiva (CRP) este astfel denumita, deoarece precipita polizaharidul C (un acid teichoic cu ribitol, care contine fosforil-colina) al celulelor de *Streptococcus pneumoniae*. CRP se leaga pe suprafata acestor bacterii si mediaza fagocitoza. Activitatea opsonica a CRP este dependenta de capacitatea de a activa calea clasica si alterna a complementului. Importanta CRP ca factor opsonizant este limitata, dar are rol important în clearance-ul celulelor avariate ori moarte, de la situsul traumatismului. Face parte din mijloacele de aparare nespecifica a organismului si este cel mai semnificativ reactant de faza acuta. Se sintetizeaza în ficat si este alcatuita din 5 subunitati

polipeptidice identice, de 206 aminoacizi fiecare, asociate necovalent într-un disc cu simetrie pentameră. Fiecare subunitate leagă un grup fosfat și doi ioni de Ca. Funcția sa principală este de a forma complexe cu unele antigene exogene, în special de origine bacteriană, favorizând astfel epurarea lor. Stimulează activarea complementului pe ambele cai, efectul fiind opsonizarea, citoliza, fagocitoza, eliberarea anafilatoxinelor C3a, C5a etc. Nivelul seric normal al CRP este foarte scăzut (0,8 mg/L, sau sub 1 μg%, adică de ordinul nanogramelor), dar crește brusc, de până la 1000 de ori în primele 3-4 ore și de circa 3000 de ori în 12-24 de ore, în diferite stări patologice (infecția bacteriană, traumatisme, necroza tisulară) atât în ser cât și în umori (lichid pleural, articular, LCR). Infecțiile virale severe sunt asociate cu un răspuns semnificativ de fază acută, dar infecțiile virale localizate sunt mai puțin stimulatoare. Nivelul maxim al concentrației sanguine este atins la 24-48 de ore după producerea leziunii tisulare. CRP ar putea avea rol în supravegherea antitumorală.

Fibronectina este o moleculă multifuncțională, prezentă atât în matricea extracelulară cât și în plasmă. Rolul principal este acela de a media aderența intercelulară, dar are și funcția de stimulare a ingestiei particulelor nonself. Particulele tapetate cu fibronectina sunt recunoscute de receptorii de fibronectina ai fagocitelor, dar legarea nu este urmată de ingestie și de aceea fibronectina nu este considerată ca opsonină propriu-zisă. Fibronectina stimulează legarea particulelor opsonizate cu IgG și cu C3b, de receptorii fagocitelor, stimulând ingestia lor.

Alfa 1-glicoproteina acida (AGA) sau orosomucoidul, alături de α 1-antitripsina, haptoglobina și ceruloplasmina formează cel de *al doilea set al reactanților de fază acută*, a căror concentrație începe să crească la 12-24 de ore de la declanșarea procesului inflamator, fiind unul din indicatorii esențiali pentru diagnosticul și monitorizarea infecțiilor. Concentrația maximă este atinsă la 72-86 de ore.

AGA sau este o glicoproteină de 41 kD, cu o proporție peptidică de numai 58%. Concentrația serică normală este de 50-100 mg%. Rolul sau fiziologic nu este clarificat.

Determinarea cantitativă a AGA și CRP, simultană și secvențială prezintă o importanță deosebită pentru diagnosticul și monitorizarea infecțiilor. Cele două proteine oferă informații complementare. Scăderea CRP este markerul biochimic al însănătoșirii:

- concentrația crescută a CRP și AGA normală semnifică faza de început a infecției;
- nivelul crescut al ambelor proteine semnifică faza de mijloc a procesului infecțios;

– CRP la nivel normal si AGA crescuta, semnifica faza finala a procesului infectios, dar însanatosirea nu este completa;

– Nivelul normal al concentratiei celor doua proteine denota restabilirea situatiei normale.

Haptoglobina se sintetizeaza în ficat si are rolul de a îndeparta hemoglobina libera, rezultata prin hemoliza intravasculara. Se formeaza un complex stabil, ireversibil, care este epurat rapid de hepatocite. Dupa leziunea tisulara, haptoglobina creste de 2-4 ori si se gaseste în exudatul inflamator.

Nivelele scazute de haptoglobina au semnificatie clinica dupa vârsta de un an. Nivelul scazut se poate datora insuficientei hepatice, dar la majoritatea pacientilor, cauza este hemoliza intravasculara si clearance-ul rapid al complexelor haptoglobina-hemoglobina. Nu exista o corelare cantitativa între nivelul haptoglobinei plasmatice si amploarea hemolizei, pentru ca o hemoliza minora diminueaza masiv cantitatea de haptoglobina. Daca pacientul este în faza acuta a unui proces infectios sau inflamator de alta natura, nivelul "normal" al haptoglobinei nu exclude diagnosticul de hemoliza.

Alfa 1-antitripsina este un inhibitor al serin-proteazei. Desi se numeste *antitripsina*, tintele sale fiziologice sunt proteazele (elastaza, colagenaza), eliberate din leucocite (si nu tripsina).

Leucocitele elibereaza proteazele în timpul fagocitozei, în *reactia inflamatorie pulmonara cronica*, iar tesutul pulmonar este lezat.

În conditii normale, activitatea proteazelor este inhibata complet de α 1-antitripsina. Sinteza hepatica a α 1-antitripsinei creste de 4 ori în reactia inflamatorie. Deficienta sintezei acestei proteine are consecinte patologice.

Pierderea elasticitatii tesutului pulmonar este rezultatul procesului de îmbatrânire fiziologica, dar deficitul α 1-antitripsinei accelereaza procesul si produce *emfizem pulmonar*, în special la fumatori. Când se întrunesc cele doua conditii, atacul de emfizem începe la 30 de ani, cu sfârșit letal la 50. Poluarea aerului sau infectiile respiratorii au efecte defavorabile la pacientii cu deficit al sintezei alfa 1-antitripsinei. În absenta acestei proteine inhibitoare, proteazele leucocitare ataca tesutul înconjurator si produc leziuni care initiaza procesul inflamator.

Ceruloplasmina este glicoproteina principala ce transporta cuprul în plasma. 80-90% din cantitatea de Cu circulant este legata de ceruloplasmina, restul fiind legat mai lax de albumina si aminoacizi. Rolul ei este de a transporta Cu la citocrom-oxidaza, vitala pentru

producerea energiei. Absenta sau diminuarea cantitativa a ceruloplasminei, produce un proces degenerativ – maladia lui Wilson. Cuprul este absorbit în cantitati excesive, dar se depune în tesuturi.

Alfa 2-macroglobulina este al II-lea inhibitor al proteazelor plasmatiche, dupa α 1-antitripsina. Inhiba actiunea proteazelor în exces. Are rol în hemostaza, coagulare, fibrinoliza, activarea complementului.

Fibrinogenul se acumuleaza în focarul leziunii tisulare, în primele 7-14 zile dupa incizia chirurgicala. In prezenta enzimelor eliberate din PMN si plachete, se formeaza fibrina. Fibrina stimuleaza proliferarea fibroblastelor.

Starea febrila este un raspuns de faza acuta, care poate sa apara dupa multe tipuri de stimuli inflamatori, inclusiv în starile infectioase. Febra este produsa de actiunea IL-1 si PG asupra centrilor hipotalamici ai termoreglarii.

Un alt raspuns de faza acuta este cresterea numarului de granulocite circulante. Initial, cresterea reflecta eliberarea granulocitelor din maduva osoasa, iar ulterior semnifica productia crescuta.

Desi factorii celulari si moleculari care participa la raspunsul inflamator sunt numerosi, activitatea biologica esentiala care se desfasoara într-un focar inflamator acut este *fagocitoza*. O buna parte a moleculelor din focarul inflamator, prin efectul lor opsonizant, usureaza fagocitoza. Uneori însa, agentii patogeni infectiosi, parazitii sau celulele maligne elimina *factori chmiotactic negativi* (imunorepelenti) pentru fagocitele din focarul inflamator. Existenta lor s-a demonstrat în supernatantul unor linii celulare maligne. Factorii imunorepelenti sunt molecule mici (1-12 kD). Dupa injectarea la soarece si cobai, reduc influxul PMNN si al macrofagelor la locul inocularii celulelor de *L. monocytogenes*.

Capacitatea unor agenti patogeni, de a inhiba mobilizarea si concentrarea efectorilor celulari la locul focarului de inflamatie este unul din cele mai comune mecanisme de virulenta.

În esenta, reactiile inflamatorii declansate de factori exogeni sunt *benefice* pentru organismul gazda. Ele reprezinta un mecanism nespecific de limitare a procesului infectios si de eliminare a resturilor celulare rezultate din leziunea tisulara. Actiunea efectorilor reactiei inflamatorii pregateste terenul pentru procesele de *reparare si cicatrizare tisulara*.

Interferenta cu procesele inflamatorii are consecinte grave asupra capacitatii de aparare a organismului.

Procesele inflamatorii declansate de antigene endogene au totdeauna efecte *defavorabile* asupra organismului, deoarece produc distrugere tisulara sau chiar necroza. Raspunsul inflamator consecutiv

leziunilor tisulare provocate de infarctul de miocard, de atacul cerebral sau de transplantul de organe, prezinta un interes clinic special. Sindromul raspunsului inflamator sistemic, care se produce în asociatie cu infectia sistemică, cu arsurile extensive, cu traumatisme sau cu socul hemoragic, are de asemenea efecte defavorabile.

În concluzie, agentii infectiosi, substantele inerte sau traumatismele sunt initiatorii procesului inflamator, dar fortele de aparare specifica si nespecifica mediaza dinamica procesului inflamator. Formarea focarului inflamator este initiata de molecule si celule nespecifice. Totusi, uneori, evolutia procesului inflamator de natura infectioasa, este decisa în ultima instanta, de *amplitudinea raspunsului imun*. Acest fapt este ilustrat de existenta diferitelor grade de gravitate a infectiei cu *M. leprae*. Boala leprei prezinta forme diverse, de la *lepra lepromatoasa*, caracterizata prin existenta unor focare inflamatorii multiple, cu macrofage încarcate cu celule bacteriene, putine limfocite T în focar si un raspuns imun mediat celular de mica intensitate, pâna la *lepra tuberculoida*, caracterizata prin focare inflamatorii mai putin numeroase si macrofage cu putine celule bacteriene, un numar mare de limfocite T în focar si raspuns imun mediat celular intens.

Indepartarea antigenului este semnalul pentru terminarea reactiilor mediate de mecanismele inflamatorii celulare si pentru începerea *fazei de cicatrizare*.

Procesele fiziologice care au loc la nivelul aparatului reproducator feminin – ovulatia, luteoliza, modificarile ciclice ale mucoasei uterine si implantatia ovulului fecundat, se aseamana în multe privinte cu reactia inflamatorie clasica.

Fumatul este o sursa importanta de radicali liberi, care pot duce la activarea plachetelor si a neutrofilelor *in vivo*, cu amplificarea ratei generarii radicalilor liberi.

Capitolul 8

REACTII IMUNITARE *IN VIVO*

De cele mai multe ori, în special în procesele infectioase, reactiile imunitare au o finalitate benefica, având un rol determinant în eliminarea agentilor patogeni. Uneori, dupa contactul cu antigenele (în special moleculare), activarea functiei imunitare are rol prejudiciant, defavorabil asupra organismului, deoarece raspunsul imun se instituie drept cauza si mecanism pentru producerea diferitelor maladii (alergii, boli autoimune).

Reactiile Ag-Ac *in vivo*, cu consecinte defavorabile pentru organism, fac obiectul de studiu al unui domeniu bine conturat, denumit *Imunopatologie*.

Activarea neadecvata a functiei imunitare determina doua categorii de manifestari clinice:

- a) *starile de hipersensibilitate*
- b) *maladiile autoimune*

Diminuarea activitatii sistemului imunitar, genereaza o categorie speciala de manifestari clinice, cunoscute sub denumirea generica de *imunodeficiente*. Ele pot fi *înascute* (primare) sau *dobândite* (secundare).

Imunopatologia studiaza reactivitatea functiei imunitare în *starile neoplazice, reactivitatea consecutiva transplantului de tesuturi si organe, în maladiile infectioase virale, bacteriene, fungice si în maladiile parazitare*.

1. Starile (reactiile) de hipersensibilitate

Starile de hipersensibilitate sunt *reactii tertiare*, consecutive reactiilor Ag-Ac *in vivo*. Ele sunt o consecinta a faptului ca procesul de imunizare dupa contactul primar cu antigenul si generarea efectorilor imunitari (anticorpi si limfocite efectoare) nu confera totdeauna o stare favorabila, de rezistenta a organismului. Contactul primar cu antigenul creeaza, uneori, o *stare de sensibilizare* fata de antigenul respectiv. Sensibilizarea este o stare fiziologica daunatoare organismului si se

manifesta, 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* = alta 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, *alergia* se definește 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. Tesutul 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 boală cronică, ce afectează circa 25% din populație în țările dezvoltate, cu severitate variabilă, de la o simplă iritare, până la periclitaarea 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

circulanti 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 tuberculina, brucelina, lepromina 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 declansatoare 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 declansarea stării de hipersensibilitate, numai la contactul cu același alergen care a creat starea de sensibilizare sau cu un antigen înrudit, care da reacție serologică încrucișată cu alergenul inductor. Între antigenul sensibilizant, cel declansator și starea de hipersensibilitate este o relație specifică;

– organismele sensibilizate prezintă un răspuns imun de tip humoral sau celular. Starea de hipersensibilitate este mediata 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.

Reactiile de hipersensibilitate imediata de tip I

Reactiile de hipersensibilitate de tip I, denumite si *reactii anafilactice* au cea mai mare frecventa si se manifesta foarte diferit, atât în ceea ce priveste intensitatea, cât si a organului tinta al reactivitatii.

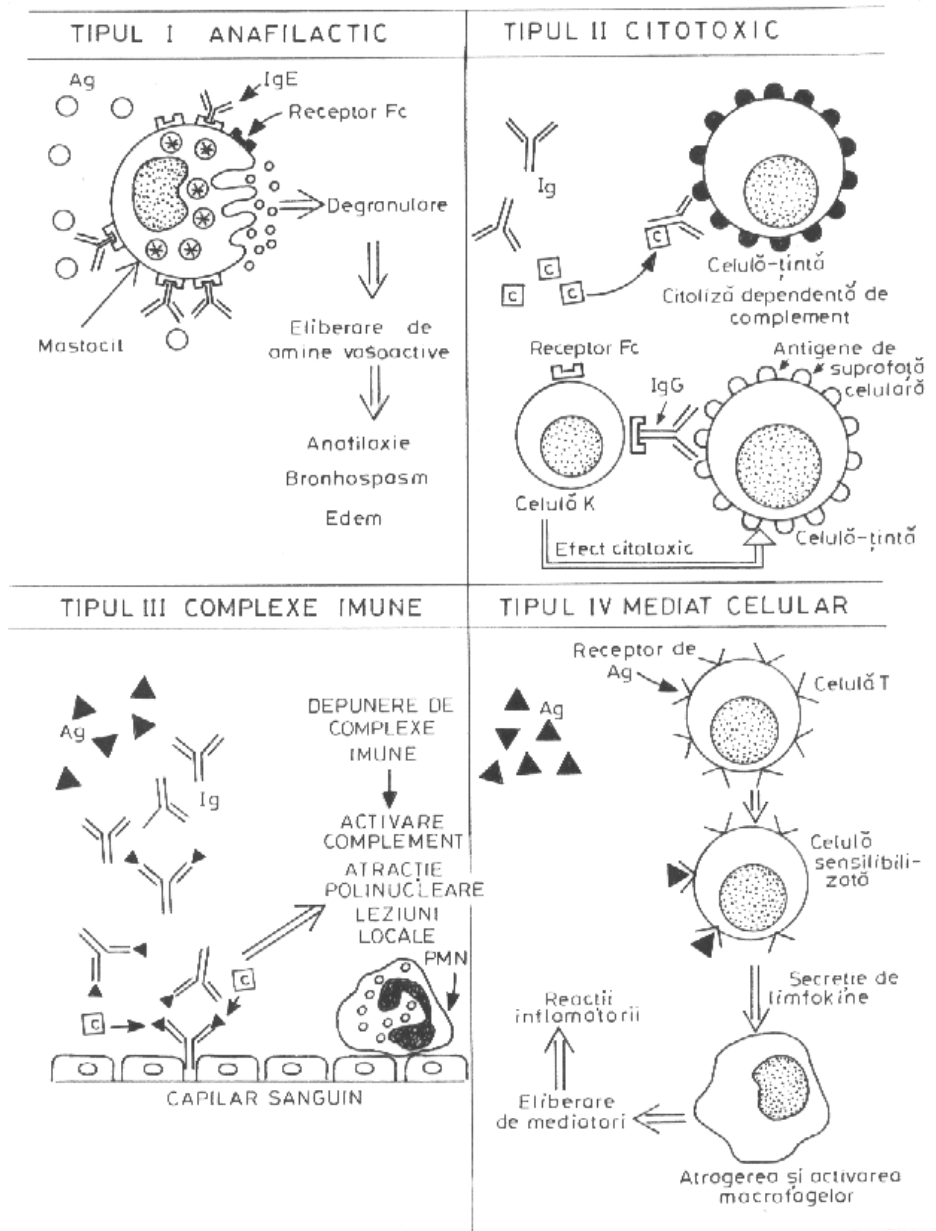


Fig. 115. Reprezentare schematică a particularităților de evoluție a celor patru tipuri de reacții de hipersensibilitate.

Declansatorii

Antigenele care induc manifestarile reactiilor anafilactice se numesc *alergene*. Ele se gasesc în polenul unor plante, în praful de casa, în veninul insectelor sau în produse alimentare. Alergenele sunt un set de antigene, stimulatoare ale sintezei de IgE. Natura lor chimica este foarte heterogena. Un studiu german recent, releva ca organismul uman vine în contact cu circa 14000 de substante chimice: unele sunt substante *alimentare*, altele sunt ingerate odata cu alimentele, fiind adaugate în *procesul industrial* al prelucrării. O categorie larga o formeaza *substantele poluante*. Din punct de vedere chimic, alergenele sunt *glicoproteine* si *polizaharide* de origine vegetala sau animala sau molecule mici, cu rol de *haptene*.

Haptenele sunt molecule organice sau anorganice, cu greutate mica, insuficienta pentru a fi antigene, dar devin alergene dupa cuplarea lor cu macromoleculele tisulare. De cele mai multe ori, haptenele alergice sunt substante de uz farmaceutic, de 500-1000 D. Dupa legarea covalenta ireversibila cu proteinele serice, rezulta un *conjugat haptena-proteina*, cu specificitate antigenica modificata si adeseori alergic. Toate medicamentele în stare nativa, dar si derivatii lor de degradare partiala pot sa se comporte ca haptene si sa devina alergene.

Intensitatea reactiilor de hipersensibilitate este dependenta de calea de patrundere în organism, de doza, de frecventa expunerii si de caracteristicile moleculare ale alergenului. Cel mai adesea, alergenele se clasifica în functie de *calea de patrundere* în organism. In raport cu calea de patrundere a alergenelor, se disting:

- alergene *inhalate*
- alergene *ingerate*
- alergene *inoculate*

Alergenele inhalate sunt glicoproteine din polen, din fungi, din praful animalelor de casa. Greutatea moleculara nu depaseste 50 kD, deoarece moleculele mai mari nu strabat membranele mucoase ale tractului respirator. Un alergen inhalat poate determina simptome respiratorii: rinita, astm. Crizele se produc numai în prezenta alergenului. Unele alergene sunt sezoniere (polen), altele sunt perene (praful de casa).

Polenul este, din punct de vedere cantitativ, cea mai importanta sursa de alergene. Plantele din familiile *Gramineae*, *Compositae*, *Betulaceae*, *Fagaceae* produc polen alergic. Toate polenurile alergice provin de la plante polenizate de vânt (anemofile). Ele produc cantitati mult mai mari de polen decât plantele entomofile si în perioada înfloririi îl

elibereaza în atmosfera. Alergenele din polen sunt glicoproteine înrudite chimic și dau reacții încrucisate. Serul imun de iepure, fata de un alergen din polen precipita o diversitate de alergene polenice.

Sporii fungilor se gasesc în aer, în cantitate de circa 5 ori mai mare decât granulele de polen, dar produc mai putine stari alergice. In regiunile temperate, numarul 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 substanta alergica de origine fungica, izolata în stare pura, este *penicilina*.

Cantitatile de alergene care patrund pe cale respiratorie, sunt foarte mici: sub 1 $\mu\text{g}/\text{an}$.

Reactiile alergice la alergenele fungice apar la 30 de minute de la expunere, iar cele toxice, la 6-8 ore dupa ingestie. Reactiile toxice nu au substrat imunologic. Micotoxinele au greutate moleculara mica (sub 1 kD) și pot fi eliminate din extractele de alergene fungice, prin dializa.

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 manifestari locale, nazale și/sau oculare, denumite generic "febra 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 caile inferioare, unde reactiile alergice tind să se manifeste sub forma de *astm*. Sporii fungici diferă ca dimensiuni și determină reacții alergice ale tractului respirator superior și inferior.

Alergenele ingerate se gasesc în compozitia unor alimente: în ou, ciocolata, capsuni, cirese, uleiul de ficat de peste, în semintele de *Glycine max* (soia), în faina unor cereale (grâu, orz), în semintele de *Arachys hypogea* (alun de pământ) etc. La copii, laptele de vaca și soia sunt cauzele majore ale reacțiilor alergice, urmate de cereale, oua și peste. Vârsta manifestarilor este variabila: după primele zile de viață (fata de laptele de vaca), până la doi ani. La 90% din cazuri, intoleranța dispare după trei ani. Cele mai comune manifestari 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 vaca și la peste este mai frecventă la populațiile care consuma 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 feritina, au evidențiat că unele antigene intacte și fragmente de antigene particulare din tubul digestiv, dobândesc accesul la tesuturile limfoide ale gazdei, în special la persoanele cu deficit al sintezei de IgA. Antigenele ce ajung în contact

cu structurile limfoide ale mucoaselor, stimuleaza raspunsul imun al gazdei.

Penetrarea antigenelor la nivelul tractului digestiv se face pe doua cai:

– prin *endocitoza* de catre celulele intestinale absorbante, la polul luminal. Se formeaza fagosomi, în interiorul carora se produce digestia materialului endocitat, dar cantitati mici ramân nedigerate si sunt exocitate în spatiul extracelular, la polul bazal. Starile de hipo- sau aclorhidrie favorizeaza tranzitul proteinelor prin mucoasa intestinala.

– patrunderea antigenelor alimentare la nivelul *celulelor epiteliale M*, ce acopera placile Peyer, foarte numeroase în regiunea distala a intestinului subtire. Aceste celule functioneaza ca adevarate “sonde de antigen”, adica au capacitatea de a îngloba antigenele derivate în special din microorganisme si într-o masura mai mica, antigene de origine alimentara.

Celulele M reprezinta un sistem de avertizare timpurie pentru sistemul imunitar al organismului. Ele sunt acoperite de un strat subtire de mucus, au microvili scurți, dar au capacitatea de a endocita antigene luminal, prin mecanismul pinocitozei. Celulele M sunt diferite, contin lizosomi si nu degradeaza antigenele pe care le pinociteaza, dar le transfera macrofagelor din foliculii subiacenti.

Deși au evoluat ca o modalitate strategica protectoare fata de antigenele luminal, totusi celulele M reprezinta poarta de intrare pentru microorganismele patogene, care la acest nivel își dobândesc accesul la tesuturile subiacente mucoasei.

Studiile electrono-optice cu molecule marcate cu peroxidaza de hrean, au aratat ca acestea sunt transportate din lumenul intestinal si ajung în spatiul subiacent celulelor M, unde se gasesc limfocite si macrofage. Se stimuleaza astfel raspunsul imun local. Structurile limfoide asociate mucoaselor constituie prima *bariera de protectie* fata de antigenele tractului digestiv. Uneori, cantitatile relativ mari de antigene de origine bacteriana si alimentara, nu sunt anihilate local, de structurile limfoide ale mucoaselor si trec în mediul intern, ajungând la cea de a II-a bariera majora de protectie fata de antigene, care este *ficatul*. Circa 30% din numarul total de celule ale ficatului au capacitatea de a fagocita si epureaza sângele adus de vena porta din teritoriul digestiv.

Antigenele inoculate sunt proteine din veninul de insecte, în special *Hymenoptere* (albina, viespe), care contine 7-10 antigene. Alergenele din venin sunt diferite forme ale fosfolipazei A. Veninul de albina contine fosfataza acida, hialuronidaza, dopamina si norepinefrina si un peptid care produce degranularea mastocitelor.

Serurile imune obtinute pe diferite specii de animale (heteroantiseruri), dupa injectare la om, adeseori activeaza raspunsul imun al organismului receptor. Multi diabetici tratati cu *insulina* de origine animala sau cu insulina sintetizata în celule reprogramate prin metodele ingineriei genice, sintetizeaza anticorpi anti-insulina.

Agentii farmacologici, administrati în scop terapeutic sau diagnostic, pot cauza o varietate de dezordini imunitare, deoarece actioneaza ca haptene care se cupleaza cu diferite proteine tisulare, conferindu-le imunogenitate. Legarea covalenta a unui medicament ori a unui metabolit reactiv derivat prin metabolizarea lui, de o macromolecula, creeaza un *conjugat haptena-macromolecula*, inductoare a raspunsului imun specific. Legarea covalenta a celor doua molecule se numeste *haptenare*.

Se descriu doua tipuri de haptenare:

– *haptenarea directa* a celulelor (a moleculelor membranare) si a moleculelor extracelulare, sub actiunea compusilor chimici cu reactivitate nativa (intrinseca). De exemplu, penicilinele de semisinteza (benzil-penicilina, cefalosporinele), dar si alte medicamente se cupleaza cu diferite proteine serice, formând conjugate cu functie de alergene. Circa 10% din moleculele de penicilina injectata, se leaga covalent prin gruparea $-NH_2$, de proteine plasmatice sau membranare. Celula poate lega mii de haptene β -lactamice, în câteva minute dupa tratament.

– *haptenarea indirecta* a moleculelor membranare sau libere, cu derivatii rezultati din catabolizarea partiala a unor molecule, care în stare nativa sunt putin reactive sau areactive.

Metabolizarea are loc în hepatocite, cheratinocite (si în alte celule) si poate crea intermediari reactivi ce formeaza legaturi covalente cu molecule carrier.

Uneori, catabolismul medicamentelor este concomitent cu sinteza proteica. Se produce haptenarea moleculelor în cursul sintezei (haptenare interna) si pot fi expuse ca antigene pe suprafata celulei.

a = inel β -lactamic

b = inel tiazolidinic

Dupa fisiunea inelului β -lactamic rezulta gruparea peniciloil, principalul inductor al reactiilor anafilactice la om.

Metabolitii reactivi pot fi secretati în spatiul extracelular si se leaga cu proteine extracelulare.

Unii indivizi sunt predispusi la reactiile alergice fata de diverse medicamente, în special antiinfecioase. Daca un individ manifesta

fenomene alergice fata de un compus antimicrobian, riscul alergiei fata de o alta clasa de compusi farmacologici creste de 9 ori. Circa 10% dintre adulti sunt alergici fata de o clasa de compusi si intra în categoria celor cu risc crescut fata de alti compusi farmacologici.

Reactiile de hipersensibilitate imediata de tip 1, induse de medicamente, se manifesta variat: anafilaxie, urticarie, angioedem.

Unele substante pot produce mai mult de un tip de reactie, la un organism sensibil. De exemplu, penicilina poate cauza o reactie anafilactica de tip I, o anemie hemolitica datorata reactiei citotoxice de tip II, dezordini functionale de tip III cu complexe imune sau o reactie de hipersensibilitate întârziata.

Reactiile de hipersensibilitate apar, de cele mai multe ori, în tesuturile bogate în mastocite: tegument, mucoase, mucoasa linguala, plamân, tractul gastrointestinal.

Daca reactia de hipersensibilitate imediata este localizata în mucoasa nazala si în conjunctiva oculara, simptomele includ rinoree, lacrimare, stranut, congestie nazala, cresterea numarului eozinofilelor în sânge. Titrul IgE seric poate sa creasca sau sa ramâna scazut.

Daca reactia de hipersensibilitate imediata este localizata în bronhii, manifestarea clinica este astmul alergic, caracterizat prin scurtarea si îngreunarea respiratiei.

Mediatorii reactiei de hipersensibilitate imediata de tip I

Reactiile de hipersensibilitate imediata de tip 1 se datoreaza sintezei unor izotipuri de anticorpi cu proprietati particulare.

Din punct de vedere functional, anticorpilor sunt *conventionali* si *citofili*.

Anticorpilor *conventionali* (Ig A, IgG, IgM) din ser se detecteaza *in vitro*, prin reactia de aglutinare, precipitare sau de fixare a complementului. *In vivo*, anticorpilor conventionali se combina cu antigenul si îl neutralizeaza. Reactiile de hipersensibilitate de tip 1 se datoreaza sintezei anticorpilor citofili, cu proprietati functionale particulare.

Anticorpilor *citofili* au proprietatea de a se fixa pe suprafata unor celule care au receptori pentru regiunea Fc si în primul rând pe mastocite, dar si pe bazofile, eozinofile, macrofage. Nu produc reactii secundare de aglutinare, precipitare sau de fixare a complementului.

Anticorpilor citofili declansatori ai reactiilor de hipersensibilitate imediata se numesc *reagine*, deoarece produc modificari ale reactivitatii tisulare: maresc permeabilitatea vasculara prin intermediul histaminei, eliberata din mastocite. La om, reaginele majore sunt IgE si IgG₄. IgE este termolabil (se inactiveaza la 56^o, timp de 30 de minute), iar IgG₄ este termostabil. Ambele izotipuri se sintetizeaza dupa imunizari

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 stimulantă 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 γ de mare afinitate ai bazofilelor, neutrofilelor, ai celulelor endoteliului vascular, ai celulelor epiteliale alveolare pulmonare. Sângele transportă IgE la masocitele țesutului 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 histaminergici*. Mastocitele se găsesc în zonele cele mai vascularizate (eminentele mediane, 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, bronsic, cutanat, cerebral, ocular.

În citoplasma bazofilelor și mastocitelor, la microscopul electronic se observă granule electrono-dense, ce reprezintă până la 40% din volumul celular. Ele conțin mediatori preformați, cei mai importanți fiind *aminele biogene* (histamina și serotonina).

Mastocitele conțin *histamina* (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 histamina.

Histamina este larg distribuită în țesuturile organismului uman. La om, neuronii histaminergici ai SNC reprezintă o sursă nemastocitară de histamina. 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 distincti: H₁, H₂, H₃.

Serotonina (5-hidroxi-triptamina) se formează prin decarboxilarea moleculei de triptofan hidroxilat. Mastocitele umane nu conțin serotonina. Serotonina s-a izolat inițial din ser (tonina din ser), deoarece are efect vasoconstrictor. Produce edem și are rol important în reacțiile anafilactice.

Histidina
(5-hidroxi-triptamina)

Histamina

Serotonina

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 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;

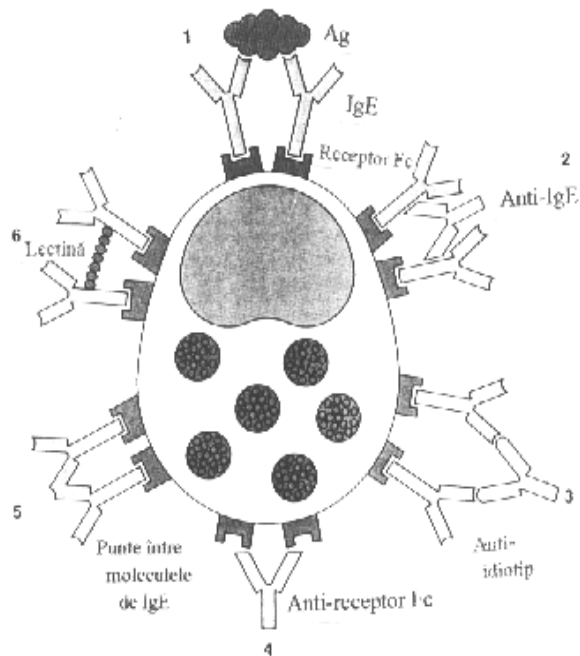


Fig. 116. Activarea masto-citelor este mediata de legarea încrucișată a receptorului $Fc\ \epsilon$. Aceasta poate fi realizată de legarea antigenului de IgE fixat pe receptorii pentru $Fc\ \epsilon$, de anticorpii bivalenți care recunosc determinanții izo-tipici ai regiunii Fc a IgE, de anticorpii anti-idiotipici ai regiunii Fab ai IgE, de anticorpii anti-receptor care se fixează direct pe receptorul pentru $Fc\ \epsilon$, 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, deoarece nu realizează legarea încrucișată a receptorilor

(după Roitt, 1993).

- neuropeptide endogene, fapt care explică alergiile determinate de stimularea sistemului nervos
- anafilatoxinele C3a și C5a
- peptidele bacteriene ce conțin formil-metionina
- 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 $Fc\ \epsilon$, membrana granulelor fuzionează cu membrana citoplasmatică și eliberează conținutul.

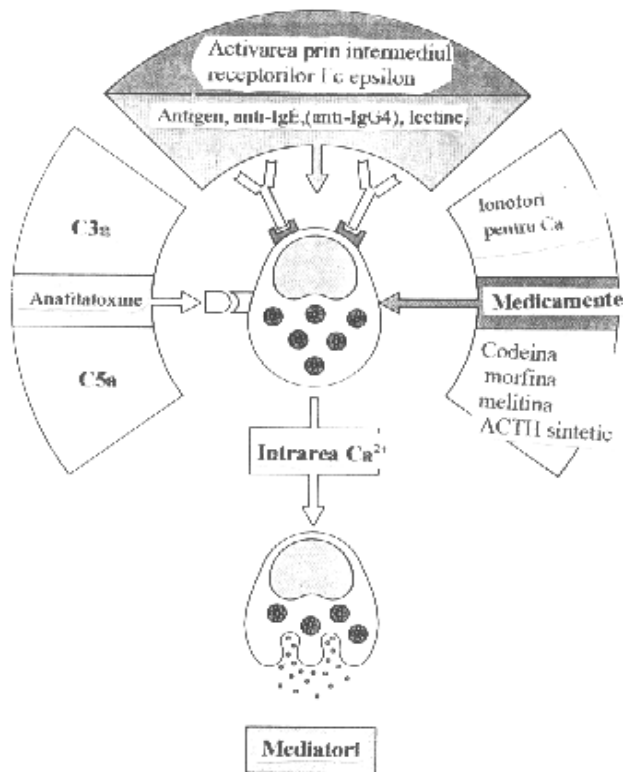


Fig. 117. Alti stimuli activatori ai mastocitelor. Anafilatoxinele C3a, C5a sau substanele medica-mentoase (ionoforii de Ca^{2+} , codeina, morfina, ACTH sintetic) activeaza mastocitele pe o cale directa. Toate aceste substane induc patrunderea Ca^{2+} în mastocit, declansatoare a fenomenelor biochimice care duc la degranularea si eliberarea mediatorilor.



- Eliberarea mediatorilor preformati
- histamina
 - triptaza - activeaza C_3
 - Heparina

Moleculele de IgE pot fi legate încrucisat de *lectine* (PHA, Con A), prin asocierea lor cu resturile glucidice ale regiunii Fc. Astfel se explica

urticaria produsa de capsuni si cirese, care contin cantitati mari de lectine.

Stimulul activator al mastocitelor este transmis prin receptorii pentru IgE. Activarea se datoreaza legarii încrucisate a doua situsuri Fab, printr-o molecula de alergen. Mastocitele au si receptori pentru Fc γ , care leaga IgG cu afinitate mult mai mica. Degranularea mastocitelor este precedata de influxul masiv de Ca^{2+} . Granulele pline cu mediatori preformati, migreaza la periferia celulei, fuzioneaza cu membrana externa si elibereaza continutul: *histamina*, *proteaze neutre* (triptaza, chimaza, carboxipeptidaza), *proteoglicani* (heparina, condroitin-sulfatul).

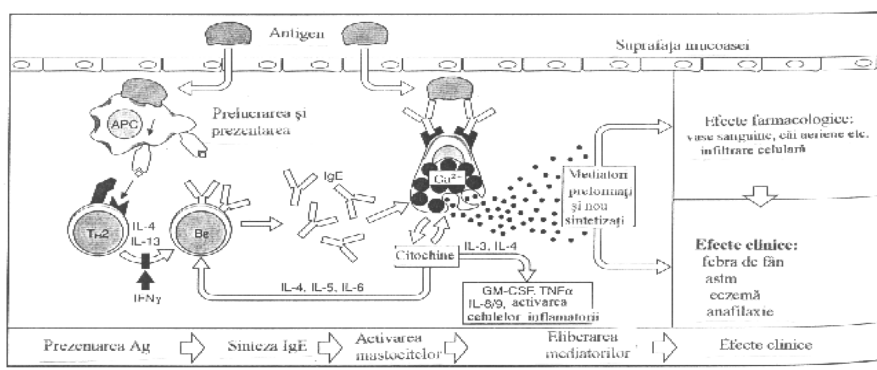


Fig. 118. Inducerea si mecanismele efectoare ale *hipersensibilitatii de tip I*. Prelucrarea antigenului se face la nivelul mucoaselor. Reexpunerea la alergen declanseaza degranularea mastocitelor si producerea mediatorilor ce determina simptome alergice (dupa Mirakian, 1998).

Triptaza (prezenta în mastocite, dar absenta în bazofile) produce constrictiona muschilor netezi ai bronhiilor, iar *chimaza* stimuleaza secretia mucoasei bronșice.

Proteoglicanii din granulele mastocitelor au rol în împachetarea mediatorilor preformati în granule.

Heparina este proteoglicanul predominant în mastocitele pulmonare umane. Mastocitul este singura sursa endogena de heparina la om si la rozatoare. Heparina are efect anticoagulant.

Mastocitele contin SOD si peroxidaza.

Degranularea activeaza o *lipaza* care mobilizeaza *acidul arachidonic* din membrana mastocitului. Prin metabolizarea acestuia se sintetizeaza mediatori noi ai reactiei de hipersensibilitate imediata. Astfel, din acidul arachidonic, pe calea lipooxigenazei se sintetizeaza

leucotriene, iar pe calea ciclooxigenazei se formeaza *prostaglandine* si *tromboxan*.

Efectele mediatorilor mastocitari

Manifestarile reactiilor alergice, inclusiv alergia respiratorie, pot sa se produca în doua faze:

– *faza timpurie*, care se desfasoara în câteva minute, datorita eliberarii mediatorilor preformati;

– *faza tardiva* se produce la 3-4 ore dupa expunerea la alergen, datorita infiltratului celular, ca raspuns la mediatorii fazei timpurii.

În *prima etapa*, actiunea histaminei consta în *contractia muschilor netezi* ai tractului respirator si digestiv. Histamina produce constrictia celulelor endoteliale si creste permeabilitatea vaselor mici. Acelasi efect îl are serotonina. Prin constrictia celulelor endoteliale si cresterea permeabilitatii capilare, se produce *edemul tisular*.

În *etapa a II-a*, histamina produce *dilatarea* vaselor periferice si rezultatul este scaderea brutala a tensiunii arteriale. Ţocul hipotensiv este una din manifestarile dramatice ale anafilaxiei generalizate.

Alti mediatorii ai fazei a II-a sunt *chininele*. Ele se formeaza din chininogenul plasmatic si sunt polipeptide mici:

– *metionil-chinina* (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 alcatuit din 11 aminoacizi si (acid sialic)_n, la una sau la ambele extremitati. Este o α -globulina (2 mg/ml ser).

Chininele au efect *vasodilatator* si maresc permeabilitatea capilara, producând edem.

În *faza a III-a* se sintetizeaza alti mediatorii, care întretin în timp diferitele efecte initiate de mediatorii eliberati din mastocite, prin efectul *chimiotactic* fata de celulele sanguine:

ECF (eozinofil-chemotactic factor) determina afluxul de eozinofile

NCF (neutrofil-chemotactic factor)

PAF (factorul activator al plachetelor).

Leucotrienele (LC₄, LD₄, LB₄, LE₄) determina contractia de durata a muschilor netezi, edem al mucoaselor si stimularea secretiei lor.

Exemple de reactii de hipersensibilitate de tip I

Prima reactie de hipersensibilitate imediata a fost descrisa de Prausnitz si 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 plasmatică (sub 1 ng/ml).

Dacă alergenul este injectat *intravenos*, răspunsul este *sistemic*, adică are loc o *anafilaxie generalizată*, care poate duce la *soc 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 plasmăi 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 injectiei 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 socului toxic, dar dozele mici sunt suportate. O injectie secundară la câteva săptămâni mai târziu, produce o *reacție anafilactică generalizată*, cu paralizii musculare respiratorii și socul fatal. Instalarea stării de soc 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 albumina serica bovina. La 8 zile dupa injectarea *dozei sensibilizante*, animalul devine sensibil la socul anafilactic si are sensibilitate maxima la 21 de zile. Doza *declansatoare* a socului este mai mare. Raspunsul anafilactic este prompt si manifestarile încep în primele zeci de secunde: piloerectie dorsala, agitatie motorie, stranut, tuse zgomotoasa, cianozarea mucoaselor, pierderea reflexelor de mictiune si defecatie, blocaj respirator, convulsie, moarte. Tabloul acestor modificari patologice se succede în câteva minute. Muschii netezi bronsici ai cobaiului sunt foarte sensibili la histamina si bronhoconstrictia fatala este caracteristica anafilaxiei la aceasta specie.

Reactiile anafilactice generalizate la om se manifesta în primul rând fata de alimente si se exteriorizeaza prin *urticarie generalizata*. Urticaria afecteaza 15-23% din populatie. Suportul manifestarilor patologice care însotesc aceste reactii, este *tegumentul*.

Anafilaxia generalizata la om, este declansata si de alti factori: penicilina, aloseruri, heteroseruri, veninul insectelor (albina, viespe) si se manifesta prin urticarie generalizata, spasmul muschilor bronsici, edem laringian, dispnee severa, cianoza, soc hipotensiv. Intensitatea manifestarilor este dependenta de gradul de sensibilitate. Sensibilitatea alergica a pacientilor variaza în limita a circa 1/1000.

Raspunsul sistemic cu reactii tegumentare generalizate, tulburari gastrointestinale, tahicardie, aritmie cardiaca, hipotensiune medie, este asociat cu cresterea concentratiei plasmatice a histaminei peste nivelul de baza. Reactia ampla care pericliteaza viata, cu hipotensiune severa, fibrilatie ventriculara, spasmul muschilor bronsici, stop cardiac si respirator, este asociata cu nivelul crescut al histaminei, de 12 ng/ml. La om, histamina are efect vasodilatator asupra vaselor periferice, cu scaderea presiunii vasculare.

Hipersensibilitatea imediata la *penicilina* produce circa 500 decese/an/glob. Reactia este declansata de penicilina nativa sau de derivatii rezultati din degradarea ei (acidul peniciloic, acidul penicilenic).

Anticorpilor anti-penicilina apartin izotipurilor IgE si IgG₄ si se gasesc chiar în serul persoanelor netratate cu penicilina. Probabil ca sinteza lor a fost indusa de penicilina din carne. Originea penicilinei este în masa miceliana de la fabricile de antibiotice, care se adauga în hrana animalelor, ca stimulator al cresterii.

Alergenele *inhalate* produc manifestari locale, la poarta de intrare.

Reactii atopice. Termenul de *atopie* defineste starile de hipersensibilitate imediata cu substrat ereditar, limitate la om. Starile atopice se manifesta la 10-20% din populatie, sub forme variate.

Reactiile atopice au un tablou clinic mai simplu si se produc atunci

când reacția alergenului cu anticorpii specifici are loc pe suprafața unei mucoase sau în epitelul tegumentar.

Rinita alergică sau *febra de fân* este forma cea mai simplă a atopiei și se manifestă prin secreție abundentă a glandelor epitelului nazal, iar *astmul bronșic*, prin contractia mușchilor cailor 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 *Ambrosia*, o plantă care răspândește o cantitate mare de polen (100 kg/plantă/an). Graunțoarele 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 MC γ) conțin histamina și *triptaza*, iar după stimularea alergică, se degranulează, 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.

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 caile nazale se pot obtura alternativ.

Faza primară a rinitei (strănut, rinoree, obstrucție nazală) este

dependenta de histamina din mastocite, de leucotriene si prostaglandine, iar faza tardiva (obstructie nazala ampla prin hiperreactivitate si anosmie) este dependenta de bazofile.

Astmul alergic, o varianta complexa a reactiilor atopice, este o maladie cronica inflamatorie a plamânului, cu o prevalenta crescândă a morbiditatii si mortalitatii în ultimele doua decenii. Desi s-a considerat ca este o boala a muschilor netezi ai cailor respiratorii, în ultima decada s-a acceptat ca astmul este, în primul rând, o boala *inflamatorie*. Structural, caile aeriene ale astmaticilor se caracterizeaza prin *inflamatie cronica*, cu infiltrarea intensa a mucoasei bronsice, cu limfocite, eozinofile si mastocite, cu descuamarea epitelului, hiperplazia celulelor mucoase, îngrosarea submucoasei. Aceste modificari se asociaza cu manifestarile clinice, care includ obstructia cailor aeriene si hiperreactivitatea cailor aeriene.

Astmul bronsic alergic are determinism multifactorial, *atopia* (predispozitia genetica de a sintetiza IgE ca raspuns la aeroalergenele comune) fiind cel mai comun factor predispozant. Dupa expuneri repetate la doze mici de alergene, indivizii atopici sintetizeaza IgE. Expunerea secundara la alergene initiaza raspunsul imun humoral. Evenimentele reactiei alergice, consecutive expunerii la alergen, se desfasoara în doua faze: faza *timpurie*, de ordinul minutelor, consta în *raspunsul bronhospastic* si faza *tardiva*, de ordinul orelor, ce consta în *raspunsul inflamator*.

Raspunsul rapid se caracterizeaza prin *edemul* mucoasei, *cresterea tonusului muschilor netezi* si îngustarea cailor respiratorii, asociata cu degranularea mastocitelor. Manifestarile astmatice imediate sunt dependente de eliberarea histaminei din mastocite. Pacientii cu astm alergic au o concentratie de IgE de 6 ori mai mare decât astmaticii nealergici, ceea ce confirma relatia dintre concentratia IgE si starea patologica.

Unii astmatici alergici dezvolta raspunsul de *faza tardiva*, la 3-6 ore dupa stimularea cu alergenul, care, în absenta terapiei, poate sa persiste câteva zile. Raspunsul tardiv, este asociat cu migrarea eozinofilelor, dar si a neutrofilelor si limfocitelor din sânge, în parenchimul pulmonar. Limfocitele TCD₄ au rol esential în patogeneză astmului. În plamânul astmatic, alergenul este înglobat, prelucrat si prezentat de macrofagul alveolar, de celulele epiteliale ale mucoasei si de celulele dendritice. Limfocitele Th-2 secreta IL-4, 5, 6, 9, 10, 13, stimulative ale sintezei de IgE.

Alergiile la alimente formeaza o categorie de stari atopice foarte

comune la copii si se manifesta fata de alergene din lapte, oua, ulei de peste, ciocolata, capsuni, cirese, portocale. Manifestarile reactiilor alergice la alimente pot fi *locale* sau *generalizate*.

Reactiile alergice locale se caracterizeaza prin eruptii urticariene (pustule eritematoase) la nivelul mucoasei bucale, însoțite uneori de tulburari digestive (colici abdominale, diaree). La vârsta adulta, subiectii vor manifesta reactii alergice respiratorii.

Nu toate urticariile tegumentare sunt determinate de reactii alergice. Urticaria *neimuna* de contact poate fi declansata de *agenti chimici* (salicilati, sulfiti, acidul benzoic, acidul sorbic, acidul nicotinic si esterii sai din alimente, din guma de mestecat, din sampoane, din parfum, din unguente) sau de *agenti fizici* (traumatisme, frigul). Acestia stimuleaza eliberarea factorilor chimici inductori ai urticariei. Mecanismele ei nu se cunosc, dar efectele se manifesta asupra endoteliului vascular. Simptomele sunt arsura, usturimea, pruritul, edemul si eritemul.

Urticaria este *acuta* sau *cronica*. Cea cronica se manifesta prin aparitia zilnica sau aproape zilnica a leziunilor tegumentare, pentru un interval de cel putin 6 saptamâni, cauzata de stimuli fizici.

În toate cazurile de urticarie, imuna sau neimuna, pe tegument apar leziuni eritematoase (macule) si edematoase, însoțite de prurit. Urticaria implica dermul superficial.

Leziunea cutanata eruptiva este datorata cresterii permeabilitatii capilarelor si dilatarii venulelor. Plasma paraseste patul vascular si determina formarea pustulei tegumentare pruriginoase, înconjurata de o zona de culoare rosie intensa. Lichidul veziculelor eruptive este infiltrat cu limfocite si PMNN. Eruptia tegumentara dispare la 24-48 ore, fara urme în cazul reactiilor acute sau persista mai multe zile la cele cronice.

În manifestarile cu angioedem, edemul se extinde subcutan sau submucos si leziunile pustulare sunt mai mari si pot sa dureze 72 de ore. Se manifesta la nivelul buzelor, limbii, pleoapelor, dar poate fi afectata orice zona corporala.

Pseudoalergii. Simptomele clinice ale alergiilor (urticarie, rinita, astm, socul anafilactic) apar adeseori din cauze nealergice. Numarul lor depaseste pe acela al alergiilor. Iata principalele cauze:

- histamina se gaseste în cantitati mari în unele alimente si activeaza mediatorii specifici ai reactiilor alergice;
- histidina din alimente este precursorul histaminei;
- tiramina de origine alimentara determina dureri de cap pulsatile si hipertensiune;
- feniletilamina produce migrena;
- benzoatul de origine alimentara si din acidul benzoic produce

astm și rinită;

– bisulfitul de sodiu, bioxidul de sulf și metabisulfonii (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 starilor 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 secvența 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 limfocitele 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 deriva din surse naturale care conțin majoritatea sau toate izoformele de alergen. Înlocuirea acestor alergene cu cele clonate, pentru diagnostic,

va rezolva unele probleme, dar va crea altele. Unii cercetatori apreciaza ca majoritatea indivizilor raspund la un numar limitat de epitopi ai oricarui alergen. De aceea se considera ca un numar mic de alergene (circa 40) ar putea sa fie suficiente pentru a identifica majoritatea indivizilor alergici.

Testele cutanate constau în injectarea subcutana a *alergenelor* la diferite dilutii. La organismul alergic, reactia de hipersensibilitate se manifesta în câteva minute, prin aparitia la locul injectarii, a unei reactii inflamatorii pruriginoase, înconjurata de o zona mai extinsa de eritem. Reactia de hipersensibilitate la proteinele salivei de tântar are acelasi aspect. Alergenul injectat (sau inoculat) se leaga specific de IgE fixat pe mastocitele din piele. Mastocitele elibereaza histamina în câteva minute, cauzând edemul localizat, eritem (vasodilatatie) si prurit. Leziunile locale ale reactiei de hipersensibilitate imediata se reproduc prin injectarea unei cantitati mici de histamina.

Determinarea cantitativa a IgE seric al pacientului, ramâne cel mai bun criteriu de diagnostic. IgE se dozeaza prin metoda RIA:

- alergenul (de exemplu, penicilina) se fixeaza pe suportul inert (dextran);
- proba de ser de cercetat se pune în contact cu alergenul fixat pe suport. IgE din ser se fixeaza pe alergenul imobilizat;
- se adauga ser imun de iepure, care contine IgG marcat radioactiv, anti-IgE uman;
- se masoara indirect cantitatea de IgE fixata pe suport, prin masurarea cantitatii de IgG radioactiv legat specific.

Combaterea starilor de hipersensibilitate imediata de tip I se face prin evitarea alergenelor, prin terapie medicamentoasa si prin imunoterapie.

Masurile de *evitare a alergenelor* sunt ideale pentru prevenirea reactiilor: evitarea alimentelor, medicamentelor, controlul prafului de casa, evitarea contactului cu animalele al caror praf este alergic, combaterea mucegaiului din încaperile locuite.

Medicamentele antihistaminice au efect antagonic fata de histamina, deoarece intra în competitie cu receptorii pentru histamina ai celulelor tinta. Astfel, se poate bloca cresterea permeabilitatii vasculare, vasodilatatia, contractia muschilor bronhiilor si ai mucoasei gastrointestinale. Rinita alergica necesita terapie antihistaminica locala. Cromoglicatul de sodiu protejeaza pacientii astmatici. Teofilina (o metilxantina) relaxeaza muschii netezi bronsici.

Imunoterapia sau hiposensibilizarea consta în administrarea planificata a alergenului la un pacient pentru a diminua sinteza IgE. Rinita alergica, astmul bronsic si anafilaxia la veninul de insecte pot raspunde la aceasta terapie. Alergenul este injectat saptamânal, în doze

declinul. Locul IgE este luat de IgG care fixeaza alergenul si-l împiedica sa stimuleze mastocitele, blocând reactia alergica.

Reactiile de hipersensibilitate de tip II

Reactiile de hipersensibilitate de tip II sunt de tip *citotoxic*, dependente de anticorpi si sunt consecinta actiunii *fagocitelor* asupra celulelor nucleate, dupa opsonizarea lor prealabila cu anticorpi sau cu componente ale complementului.

Diferitele izotipuri de anticorpi variaza în ceea ce priveste posibilitatea lor de a initia aceste reactii, în functie de capacitatea de a lega C1q sau de a interactiona cu receptorii pentru regiunea Fc, ai celulelor efectoare. Mediatorii reactiilor de hipersensibilitate de tip II sunt IgG, IgM, si componentele complementului (C3), care se leaga specific de antigenele celulare sau tisulare.

Consecinta legarii anticorpilor, este aparitia leziunilor, limitate la celulele sau tesuturile care expun antigenele. In general, anticorpii specifici fata de antigenele suprafetei celulelor proprii, produc efecte defavorabile iar cei specifici fata de antigenele intracelulare sunt inofensivi.

În reactiile de hipersensibilitate imediata de tip citotoxic, anticorpii specifici fata de antigenele suprafetei celulare coopereaza cu componentele complementului si cu celulele efectoare.

Celulele efectoare sunt macrofagele, neutrofilele, eozinofilele, celulele NK. Toate au receptori pentru regiunea Fc a Ig si receptori pentru C3. Legarea anticorpilor prin intermediul receptorului pentru Fc, stimuleaza fagocitele sa produca leucotriene si prostaglandine, implicate în raspunsul inflamator.

Mecanismul prin care celulele efectoare ataca celulele tinta este acelasi prin care ele sunt active fata de agentii infectiosi. Agentii patogeni sunt înglobati în fagolizosom, unde, de cele mai multe ori, virusurile sunt inactivate iar celulele sunt omorâte sub actiunea intermediarilor reducerii O₂, a enzimelor lizosomale, a pH acid.

În reactia de hipersensibilitate imediata de tip citotoxic, tinta celulara este prea mare pentru a fi fagocitata si de aceea, continutul granulatilor si al lizosomilor citoplasmatici este eliberat la contactul cu celula sensibilizata, prin *exocitoza*.

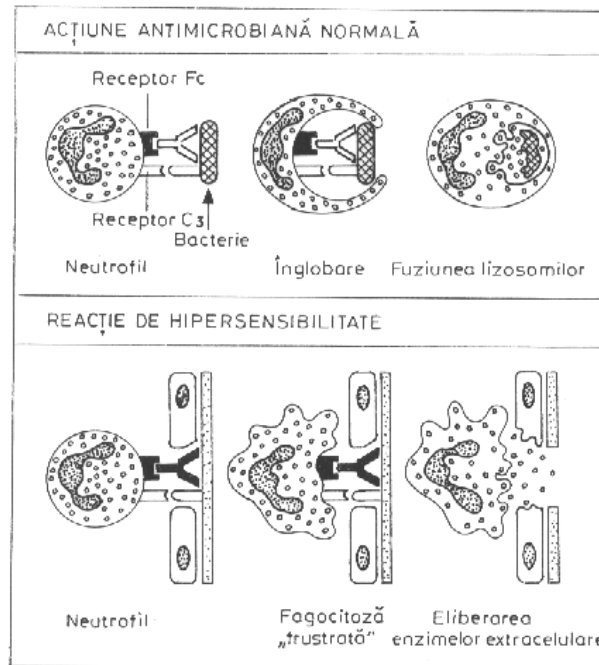


Fig. 120. Fagocitoza „frustrată” are rol în producerea leziunilor tisulare, în reacția de hipersensibilitate imediată de tip II (jos) și este prezentată comparativ cu funcția fagocitară normală a neutrofilelor (sus).

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.

Declansatorii 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 fetomaternală în cazurile de incompatibilitate Rh
- în transplantul de țesuturi și organe.

Aloimunizarea post-transfuzionala

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 eritocitar din sistemul ABO, există diferențe antigenice mai fine ale glicoproteinelor suprafeței eritocitare, care induc sinteza IgG în organismul receptor. Circa 8% dintre receptorii politransfuzati se imunizează față de antigenele eritocitare 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 eritocitare. Alteori, reacțiile de hipersensibilitate se manifestă la câteva zile sau chiar săptămâni după transfuzie, interval necesar sintezei anticorpilor. Reacțiile de hemoliza produc icter* și anemie. Icterusul 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 fetomaternală în incompatibilitatea Rh **

În timpul sarcinii, dar în special în timpul expulziei fătului, hematiile fetale pot traversa placentă 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 placentă.

Antigenul Rh este o glicoproteină, ancorată în stratul lipidic membranar. 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 placentă și

se fixeaza pe eritrocitele fetale, cauzând distrugerea lor prin mecanismul hipersensibilitatii de tip citotoxic, adica anticorpii fata de componentele celulare stimuleaza fagocitoza hematiilor prin aderenta opsonica sau distrugerea are loc prin activarea complementului si hemoliza. Consecinta este anemia, icterul, edemul. Situatia patologica se poate preveni prin administrarea organismului matern, imediat dupa nastere, a gama-globulinei anti-Rh (anti-D), care elimina celulele fetale Rh⁺ intrate în circulatia materna si protejeaza urmatoarea sarcina Rh⁺.

Imunizarea Rh⁻ este mult mai putin frecventa decât incompatibilitatea materno-fetala Rh, din urmatoarele cauze: transferul placentar al hematiilor fetale poate sa nu aiba loc; 30% dintre femeile Rh⁻ nu raspund la stimularea cu o cantitate mica de hematii Rh⁺, iar un procent mic nu raspunde nici dupa stimulare cu 50 ml de hematii Rh⁺; fatul poate fi incompatibil cu organismul matern în sistemul ABO. De exemplu, pentru mama cu grup O si fatul cu grup A sau B, hemaglutininele materne α si β (IgM) elimina celulele fetale înainte ca ele sa stimuleze sinteza anticorpilor anti Rh.

Anticorpii anti D se pot detecta folosind Ig de iepure anti-Ig umana, care leaga încrucisat IgG anti-D, în prezenta unui amestec de ser, cu albumina serica bovina, care reduce sarcina suprafetei eritrocitelor, usurând aglutinarea.

Un primitor de sânge Rh⁻ poate sintetiza anticorpi anti-D, daca este transfuzat cu sânge RhD^u. O gravida RhD^u se poate imuniza anti-D, daca eritrocitele fetale sunt Rh⁺ cu antigen complet. De aceea, orice gravida, Rh⁺D^u este considerata Rh⁻ si este testata pentru prezenta anticorpilor anti-Rh.

În transfuzie, persoanele Rh⁺D^u se considera ca fiind Rh⁻, în cazul în care sunt receptoare si Rh⁺, daca sunt donoare de sânge.

Anemia hemolitica indusa de medicamente(imunoalergica).

Unele reactii imunitare fata de celulele sanguine (eritrocite, plachete) se pot manifesta ca o consecinta a uzului de medicamente. Reactia este orientata fata de molecula nativa sau fata de un derivat rezultat din degradarea sa. Astfel de reactii imunoalergice sunt produse de penicilina, quinina, sulfamide etc.

Anemiile hemolitice imunoalergice se datoreaza modificarii specificitatii antigenice a unor molecule ale suprafetei eritrocitare, sub actiunea unor medicamente care actioneaza ca haptene. Pentru ca un medicament sa fie imunogenic, este necesar ca molecula nativa sau un metabolit al sau, sa se cupleze cu o molecula proteica *in vivo*. Antibioticele β -lactamice sunt un exemplu de molecule cu proprietati de

haptene. Ele formeaza legaturi covalente cu proteinele, datorita ruperii spontane a inelului β -lactamic si datorita producerii spontane a gruparii peniciloil cu reactivitate chimica crescuta. La doze mari de antibiotic, moleculele proteice ale organismului sunt modificate, dupa legarea moleculelor β -lactamice. Conjugatul antibiotic-proteina este inductor al sintezei IgM si IgG si rezultatul este *hemoliza*.

Alte medicamente care genereaza reactii imunitare, în absenta sintezei anticorpilor sunt sulfonamidele. Ele produc metaboliti care se leaga preferential cu anumite proteine. Grupul enzimelor cu citocrom P450 este tinta legarii metabolitilor sulfonamidei. Proteina alterata genereaza un peptid care se asociaza cu complexul CMH al celulei, devenind tinta atacului limfocitelor T.

Mecanismele moleculare ale inducerii reactiilor hemolitice imonoalergice sunt ipotetice. Reactia autoimuna se datoreaza modificarii specificitatii antigenice a unor molecule ale suprafetei eritrocitare, sub actiunea unor medicamente care dupa ce se adsorb pe suprafata hematiei, actioneaza ca haptene, fie în stare nativa, fie dupa generarea unui intermediar reactiv. Se formeaza *conjugate haptena-proteine* eritrocitare, în care haptena are rol de epitop stimulator al raspunsului imun. Alteori, molecula legata necovalent, actioneaza prin modificarea conformatiei native a proteinei. Noul epitop stimuleaza limfocitele TCD₄, care activeaza limfocitele B. Se sintetizeaza anticorpi cu specificitate foarte larga: anticorpi anti-haptena care se leaga cu conjugatul, anticorpi care reactioneaza cu proteinele membranare în absenta haptenei. Dupa fixarea complementului se produce hemoliza.

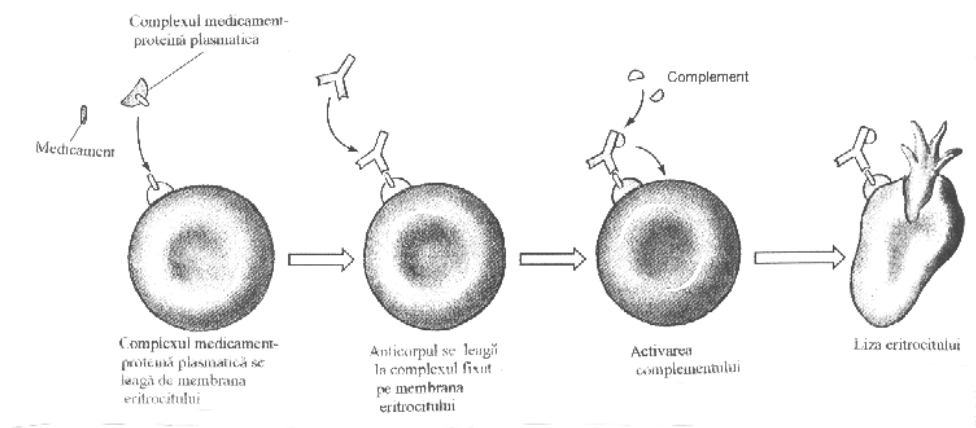


Fig. 121. Reactia de hipersensibilitate de tip II, indusa de medicamente. Molecula nativa

sau un produs al metabolismului sau, se poate lega de membrana eritrocitara sau de o proteina plasmatica pentru a forma un complex care se leaga de membrana eritrocitara sau altereaza proteina membranara. Se sintetizeaza auto-anticorpi – IgG sau IgM – care se fixeaza pe complex si activeaza complementul, producând liza eritrocitului.

Medicamentele se pot complexa cu proteine plasmatiche si formeaza conjugate haptena-proteine, inductoare ale sintetzei anticorpilor specifici. Se formeaza complexe imune, care se adsorb pe hematii si ulterior se produce liza.

Un anumit medicament poate produce o varietate de fenomene patologice, la diferiti pacienti: hemoliza, trombocitopenia, neutropenia sau combinatii ale acestor fenomene.

Anemia hemolitica indusa de medicamente este divizata în 4 grupe patofiziologice majore:

– *hemoliza de tip haptenic* apare la pacientii expusi la doze mari de penicilina (10-20 milioane de unitati/zi). Moleculele de penicilina sau derivatii sai activi se cupleaza cu glicoproteinele suprafatei eritrocitului si au rolul de haptena. Conjugatele stimuleaza raspunsul imun cu sinteza de IgG. Diagnosticul se poate stabili prin incubarea serului pacientului cu eritrocitele de la un donor normal, preincubate cu penicilina. IgG se fixeaza pe suprafata eritrocitelor tapetate cu penicilina si se detecteaza prin *testul antiglobulinic* (testul Coombs direct). Acelasi tip de hemoliza este indus de cefalosporine;

– *hemoliza de tip quinidinic*. Quinidina sau derivatii sai se fixeaza pe proteine plasmatiche sau de membrana eritocitara si au rolul de haptene. Se sintetizeaza IgM antiquinidina, se activeaza calea clasica a complementului si C3 se depune pe suprafata eritrocitului;

– *hemoliza indusa de α -metildopa*. O proportie mare (25%) dintre pacientii tratati cu α -metildopa devin pozitivi pentru testul Coombs. Se sintetizeaza IgG specific fata de antigenul Rh. Hemoliza survine la mai putin de 1% dintre pacientii tratati cu α -metildopa;

– *hemoliza indusa de cefalotina* este rara. Antibioticul se fixeaza pe membrana eritrocitului si astfel celula se tapeteaza cu diferite proteine plasmatiche. Se sintetizeaza IgG si testul antiglobulinic este pozitiv.

Majoritatea pacientilor cu anemie imunolaergica au un titru scazut al IgG si hemoliza are un nivel scazut. Tratamentul cu glucocorticoizi are efecte benefice, deoarece diminueaza sinteza de IgG, determina elutia IgG de pe suprafata eritrocitelor si interfereaza cu receptorii macrofagelor pentru Fc γ , ceea ce prelungeste perioada de supravietuire a eritrocitelor.

Respingerea acuta a grefelor de tesuturi si organe, ca o

consecinta a citotoxicitatii, va fi discutata ulterior.

Reactiile citotoxice mediate de anticorpi specifici fata de antigenele tisulare sunt consecutive *maladiilor autoimune*.

Unele maladii autoimune sunt însoțite de sinteza anticorpilor anti-membrana bazala. Regiunea Fc a anticorpilor fixati, este recunoscuta de PMNN, care își revarsa continutul enzimatic și produc leziuni tisulare. Actiunea PMNN este frusta, deoarece ele nu pot fagocita o tinta tisulara de dimensiuni mari.

Reactiile de hipersensibilitate imediata de tip III

Hipersensibilitatea imediata de tip III este dependenta de *complexele imune* și este consecinta formarii și *persistentei complexelor imune* în organism.

In vivo, complexele imune se formeaza de fiecare data când anticorpii întâlnesc antigenul specific. De obicei, complexele imune sunt epurate (eliminate din circulatie) de celulele SFM, iar persistenta lor produce manifestari patologice (reactii de hipersensibilitate).

Complexele imune *in vivo* se formeaza în urmatoarele trei situatii:

– în *infectiile cronice* cu streptococ α -hemolitic, cu stafilococ, cu *Plasmodium*, cu virusurile hepatice B și C, cu HIV. În toate aceste cazuri, antigenele persista timp îndelungat. Se sintetizeaza anticorpi specifici și se formeaza complexe imune, care eventual se depun în tesuturi;

– complexele imune pot fi rezultatul *proceselor patologice autoimune*. Sinteza continua a anticorpilor fata de componentele self modificate, determina formarea complexelor imune, care nu pot fi eliminate în ritmul formarii și se depun;

– complexele imune se pot forma cu *antigenele exogene*, care nu se multiplica în organism, dar patrund în mod repetat, în cantitate mare. Astfel, antigenele vegetale, bacteriene (din actinomicete), fungice sau antigene de origine animala, după inhalarea repetata în plămân, induc sinteza locala a anticorpilor și formarea complexelor imune.

Complexele imune interactioneaza cu celulele sistemului imunitar (macrofage, limfocite), producând activarea sau inactivarea lor. Un alt efect major este stimularea rețelei citochinelor. Proteinele plasmatiche C1q, C4b, C3b, factorul H sau anticorpii anti-IgG (factorul reumatoid), anticorpii anti-idiotipici și anti-fibronectina măresc dimensiunile complexelor imune.

Complexele imune sunt structuri tridimensionale ce formeaza o

retea moleculara alcatuita din antigen si anticorpii specifici, ale carei dimensiuni variaza în functie 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

doua cai:
1) estimarea cantitativa a complexelor imune, cu caracterizarea izotipului de imunoglobulina din complex si componentul complementului, utilizând teste screening conventionale; 2) analiza specificitatii anticorpilor si a antigenului complexat.

Testele screening rapide pentru detectarea complexelor imune se bazeaza pe capacitatea complexelor imune de a interactiona cu receptorii naturali, humorali si celulari. O tehnica clasica este testul legarii C1q, bazat pe capacitatea complexelor imune de a interactiona cu domeniul globular al lui C1q. C1q purificat, radiomarcant, se leaga cu complexe imune si ansamblul rezultat se detecteaza prin metoda excluderii dimensionale cu PEG. O varianta tehnica mai simpla consta în amestecul unei concentratii mici de PEG, cu efect precipitant asupra complexelor macromoleculare si analiza ulterioara a precipitatului. AMC specifici fata de C1q imobilizati pe suport, pot fi utilizati pentru a capta C1q, fixat pe complexe imune *in vivo*, cu evidentierea ulterioara a imunoglobulinei din complex.

Alta metoda pentru detectarea complexelor imune pe o faza solida, consta în utilizarea conglutininei sau a factorilor reumatoizi, pentru captarea complementului legat cu complexe imune. Conglutinina este o proteina din serul normal de bovine, cu proprietatea de a lega componentele complementului.

Complexele imune se pot detecta pe calea utilizarii interactiunii lor cu receptorul Fc de pe suprafata macrofagelor sau plachetelor. Testul cel mai folosit se bazeaza pe folosirea receptorilor pentru C3b de pe suprafata celulelor limfoblastoide transformate *in vitro*. Testul inhibitiei rozetelor EAC (eritrocite-anticorpi-complement) masoara gradul inhibitiei formarii rozetelor, de catre complexe imune, dintre o subpopulatie de limfocite B circulante si eritrocitele tapetate cu C3.

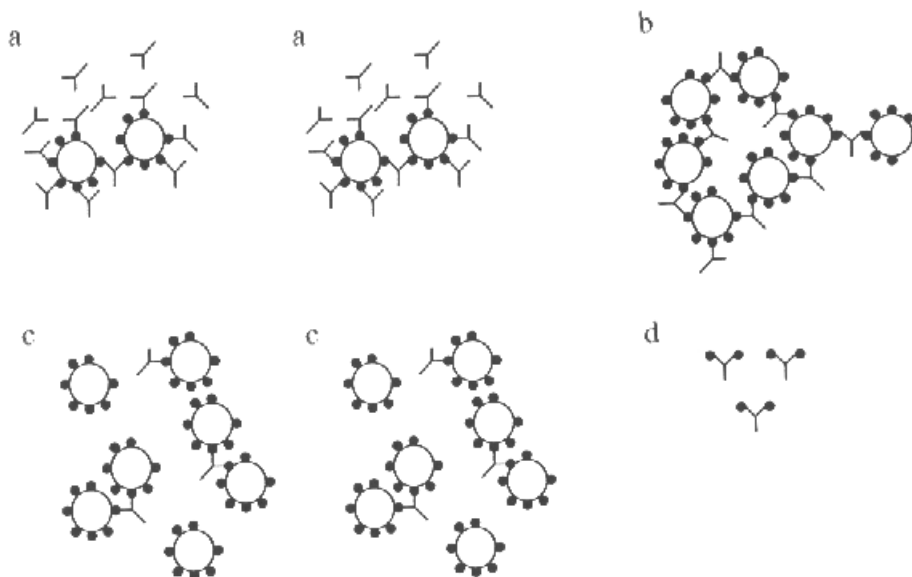
Epurarea complexelor imune si cauzele persistentei lor în organism

Complexele imune persista în organism, datorita incapacitatii organismului de a le elimina. Rata eliminarii este dependenta de mai multi 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 circula 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 bolilor 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 complexele 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 patrund 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 carora 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 primat. Neprimatelor le lipsește receptorul 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° nu mediază legarea, iar tratamentul prealabil al serului cu factorul veninului de cobra 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 circula 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 îmbatrânite. 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 persistenta complexelor imune în circulație și depunerea lor în țesuturi: tegument, articulații, rinichi, plămân, retina. 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 – 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, inhalati odată cu praful, sunt principalii agenți inductori ai maladiei. Serul pacienților, *in vitro*, precipită antigenele de actinomicete.

Maladia pulmonară a crescătorilor de pasări 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 porumbel, papagal etc. Antigenele de la pui 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,

consecutiva modificarilor vasculare si de aceea, reactia se produce numai în teritorii vascularizate. Este o reactie anafilactica locala, în interiorul vaselor si în jurul peretilor vasculari. Fenomenul Arthus se evidentiaza usor, la nivelul tegumentului.

Fenomenul se induce prin injectarea repetata la iepure, subcutan sau intradermic, a serului de cal, la interval de o saptamâna, pâna când în sânge se realizeaza un titru ridicat al IgG anti-proteine heterologe de cal.

Dupa primele 2-3 injectii saptamânale de antigen, nu se observa modificari tisulare. Dupa a 3-a sau a 4-a injectie, la circa 30 de minute, local, apare un edem eritematos moderat care persista câteva ore. Dupa injectiile urmatoare de antigen, edemul este tot mai extins si mai persistent. Dupa 6-7 injectari, se produce necroza locala a tesutului.

Fenomenul Arthus este o reactie de hipersensibilitate locala, caracterizata prin necroza dermica, la locul unde se injecteaza repetat, acelasi antigen. Se sintetizeaza un titru crescut de anticorpi circulanti, iar antigenul este în exces în spatiul extravascular. Se formeaza complexe imune solubile, datorita excesului de antigen.

Din punct de vedere histopatologic, fenomenul Arthus este o *reactie inflamatorie* clasica. La locul injectarii, initial se produce un edem eritematos, curgerea sângelui fiind îngreunata. In lumenul vascular se formeaza trombi plachetari si leucocitari, datorita aderenței plachetelor si leucocitelor de celulele endoteliale: circulatia sângelui se întrerupe si zona se necrozeaza.

Mecanismul celular si molecular al fenomenului Arthus. La locul injectarii repetate a antigenului se formeaza complexe Ag-Ac, cu IgG si IgM. Complexele imune se formeaza extravascular, cu anticorpii adusi pe cale circulatorie, care trec în spatiul extravascular, datorita cresterii permeabilitatii vasculare. Complexele imune se depun pe membrana bazala a capilarului. Se activeaza cascada complementara si se elibereaza C3a si C5a. Anafilatoxinele maresc permeabilitatea vasculara, dar sunt si factori atractanti pentru leucocite (PMNN).

C3a si C5a activeaza mastocitele, din care se elibereaza histamina. Se sintetizeaza leucotriene si, alaturi de histamina, maresc permeabilitatea vasculara si determina aflux de PMNN în spatiul extravascular.

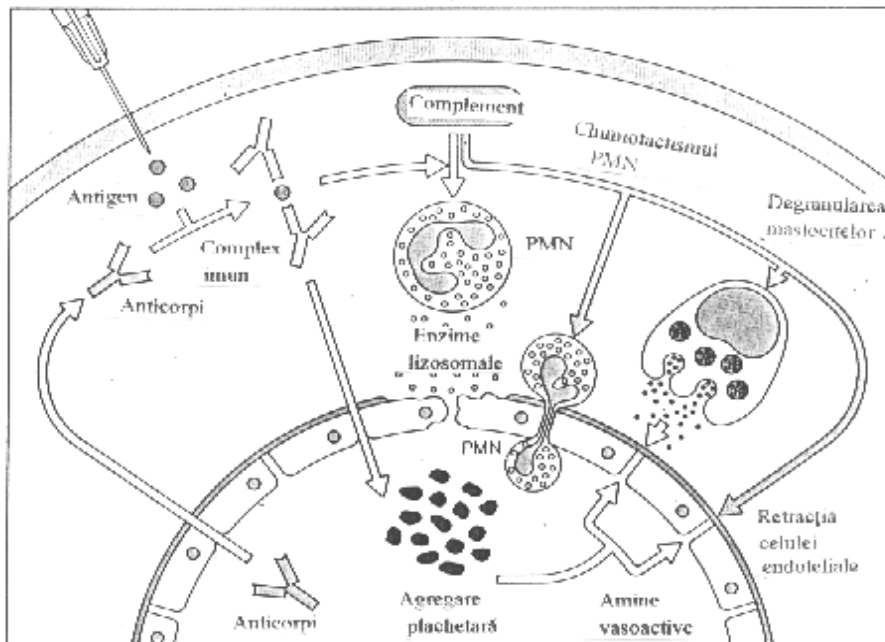


Fig. 123. Fenomenul Arthus. Antigenul injectat pe cale intradermica se leaga cu anticorpii circulanti specifici si formeaza complexe imune. Complexele activeaza complementul si activeaza plachetele, care elibereaza aminele vasoactive. Fragmentele C3a si C5a ale complementului provoaca o retractie a celulelor endoteliale, degranularea mastocitelor si atragerea polinuclearelor spre situsul de reactie. Produsele eliberate de mastocite, în special histamina si leucotrienele, induc cresterea debitului sanguin si a permeabilitatii capilare. Reactia inflamatorie este amplificata de enzimele lizosomale eliberate de polinucleare. C3b opsonizeaza complexe imune si usureaza fagocitarea lor (dupa Roitt, 1984).

Din mastocite se elibereaza factorul de agregare plachetara (PAF), iar din plachete se elibereaza amine vasoactive. PMNN extravasculare descarca continutul enzimatic si lezeaza peretele capilar.

Injectarea intradermica a antigenelor fungice sau de actinomicete, la indivizii cu aspergiloza pulmonara si respectiv la cei cu plamân de fermier, produce reactii de hipersensibilitate de tip Arthus.

Ca mecanism intim, fenomenul Arthus este o reactie de hipersensibilitate imediata, deoarece complexe Ag-Ac se formeaza foarte repede, dar manifestarea fenomenului (eritem si edem) este tardiva.

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 declansator;

– 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, capra, iepure), în institutele de profil. În perioada 1920-'40, înaintea introducerii antibioticelor în terapia anti-infectioasă, 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*: febra, 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 anamnestică generalizate (reacție de hipersensibilitate imediată).

Se descriu trei tipuri de reacții:

– *reacția de tip imediat* se desfășoară în 24 de ore, chiar cu necroza 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.

Reactia locala (la locul injectarii serului) este foarte puternica. Moartea poate sa survina prin colaps vasomotor;

– o reactie dupa dinamica raspunsului imun primar, la 20-25 de zile, se manifesta dupa administrarea unei singure injectii de ser heterolog si se produce la 50% dintre indivizi.

Mecanismul manifestarilor patologice ale maladiei serului, rezida în *actiunea complexelor imune asupra vaselor sanguine*. În sânge se formeaza complexe Ag-Ac, care se depoziteaza lent în vasele mici (capilare), între endoteliul vascular si membrana bazala, mai ales în ansele glomerulare renale.

Tipul de leziuni renale este dependent de dimensiunile complexelor imune. In conditiile excesului de antigen, complexele imune sunt mici si se depoziteaza în spatiul subepitelial, complexele mari se depun subendotelial.

Complexele depozitate activeaza complementul si determina eliberarea anafilatoxinelor C3a si C5a, care produc degranularea mastocitelor si bazofilelor. Creste permeabilitatea vasculara si sunt atrase neutrofilele. Ele ingera complexele imune si elibereaza enzimele lizosomale, care lizeaza celulele endoteliului vascular si intensifica reactia inflamatorie. Proteinuria însoteste leziunea glomerulara.

Pentru depistarea predispozitiei la accidente serice de hipersensibilitate fata de serul de cal se utilizeaza diferite teste:

– *proba oftalmica* consta în depunerea unei picaturi de ser heterolog diluat 1/10, pe conjunctiva primitorului de ser. La persoanele hipersensibile, în 30 de minute apare un eritem intens si edem;

– *proba cutanata* consta în injectarea intradermica a cantitatii de 0,1 ml ser heterolog diluat 1/10. La hipersensibili, la locul injectarii, apare o reactie imediata, în 20-30 de minute, cu eruptie urticariana, înconjurata de o zona de eritem. Reactia dispare în 30-60 de minute. Daca este intensa, reactia dureaza 6-12 ore.

Din cauza reactiilor de hipersensibilitate de tipul maladiei serului, seroterapia trebuie sa utilizeze *seruri omologe*.

Maladia serului se induce *experimental*, la iepure, prin injectarea intravenoasa a albuminei serice bovine. Se sintetizeaza anticorpi specifici, care leaga antigenul în exces. Complexele imune, neputând fi eliminate cu o rata egala cu cea a formarii, se depoziteaza pe membrana bazala a glomerulilor renali si în peretele vaselor mici. Complexele imune fixeaza complementul si se elibereaza lent histamina

din bazofile.

Reactiile de hipersensibilitate de tip IV (Hipersensibilitatea întârziata)

Hipersensibilitatea întârziata cuprinde toate reactiile care, dupa clasificarea lui Coombs si Gell (1963), necesita mai mult de 12 ore pentru a deveni evidente.

Reactiile de hipersensibilitate întârziata au urmatoarele particularitati:

- aparitia lor este lenta si atinge amplitudinea maxima la 24-72 de ore de la contactul secundar cu antigenul;

- reactia de hipersensibilitate întârziata nu afecteaza un anume organ tinta, ci este o stare cu rasunet *sistemic*, cu simptome generalizate, ceea ce o deosebeste de reactiile de hipersensibilitate imediata;

- în reactiile de hipersensibilitate întârziata nu se produce liza celulara, cu exceptia cazurilor grave;

- reactiile de hipersensibilitate întârziata nu sunt dependente de factorii humorali (anticorpi) si de aceea nu se transfera prin intermediul serului. Sunt dependente de limfocitele T sensibilizate si se transfera prin suspensia celulara din exudatul inflamator (exudat peritoneal), bogat în limfocite si macrofage;

- nefiind dependenta de molecule proteice circulante, reactiile de hiper-sensibilitate întârziata se manifesta în tesuturile vascularizate si nevascularizate.

Declansatorii reactiilor de hipersensibilitate întârziata

Declansatorii acestor reactii sunt foarte diferiti, dar au o caracteristica functionala comuna, ce consta în aceea ca devin stimuli cronici:

- substante anorganice: $HgCl_2$, sulfat de nichel, compusi ai cromului, colorantii de anilina;

- glucidele, cu rol de haptene, dupa ce *in vivo* se complexeaza cu o proteina purtator;

- substante proteice produse de *M. tuberculosis* (tuberculina), de *Brucella* (brucelina), dar si celulele întregi, al caror perete este rezistent la actiunea anticorpilor si a complementului: celule de *M. tuberculosis*,

vaccinul BCG, *M. leprae*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Treponema*, *Bordetella*, *Brucella*, *Listeria*, *Salmonella*.

- fungii *Candida*, *Histoplasma*;
- parazitii *Schistosoma*, *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Leishmania*;
- virusuri: rujeolic, herpetice, adenovirusuri etc;
- antigenele celulare din grefele de tesuturi si organe.

Modul de administrare a antigenului influenteaza reactivitatea imunitara. Asocierea antigenului cu adjuvantul Freund complet, favorizeaza reactia de hipersensibilitate întârziata, iar injectarea intravenoasa este defavorabila acestui proces.

Reactiile de hipersensibilitate imediata si întârziata coexista pentru orice antigen, cu predominanta uneia sau alteia, fara sa se excluda complet.

Se cunosc trei tipuri de reactie de hipersensibilitate de tip întârziat:

- *reactia întârziata de tip tuberculinic*
- *hipersensibilitatea întârziata de contact*. Ambele tipuri de reactie apar la 48-72 de la reexpunerea la antigen;
- *hipersensibilitatea întârziata granulomatoasa* se manifesta în 21-28 de zile. Granuloamele se formeaza prin agregarea si proliferarea macrofagelor si pot sa persiste un interval de mai multe saptamâni.

1. Reactiile de hipersensibilitate întârziata de tip tuberculinic

Hipersensibilitatea întârziata este o reactie caracterizata printr-un proces inflamator, care devine vizibil macroscopic la 6-12 ore dupa contactul secundar cu antigenul si atinge intensitatea maxima la 24-72 de ore. Histologic se caracterizeaza prin infiltrare limfocitara si mononucleara.

Cea mai cunoscuta reactie de hipersensibilitate întârziata este cea indusa de *tuberculina*, dar antigene ca *lepromina*, *brucelina*, *histoplasmina*, diferite componente ale celulelor de *Candida* etc., produc reactii asemanatoare

Tuberculina este o substanta proteica, netoxica, pe care celulele de *M. tuberculosis* o elimina extracelular. Este inofensiva pentru organismele umane care nu au experienta antigenica a contactului cu *M. tuberculosis* sau cu componente antigenice ale celulelor sale.

R. Koch a descoperit tuberculina, dar si reactiile de hipersensibilitate întârziata la tuberculina, în experiente de genul urmator:

- a inoculat subcutan în regiunea coapsei cobailor normali, o suspensie de celule vii de *M. tuberculosis*. Celulele bacteriene se multiplica local si determina o reactie inflamatorie în ganglionii regionali.

Se produce adenopatia tuberculoasa (cresterea volumului ganglionar). Infectia progresa lent, se generalizeaza si dupa câteva luni, animalul moare;

– la 2-3 saptamâni de la prima inoculare, R. Koch a reinoculat cobaii cu o noua doza de celule de *M. tuberculosis*, vii sau omorâte.

La locul celui de al II-lea inocul se produce o reactie ampla, caracterizata prin inflamatie masiva în câteva ore, ce progresa rapid si în 2-3 zile determina necroza zonei învecinate, urmata de eliminarea brutala a tesutului.

Reactia de necroza si eliminare tisulara, cu o delimitare foarte neta fata de tesutul inconjurator, a fost denumita fenomenul Koch.

Fenomenul Koch este o reactie de hipersensibilitate întârziata si poate fi reprodus prin injectarea corpilor celulari de *M. tuberculosis*, fie numai a tuberculinei.

La organismele infectate sau care au experienta anterioara a contactului cu antigene de *M. tuberculosis* (dobândita prin vaccinare), reinjectarea celulelor de *M. tuberculosis*, vii sau moarte ori a tuberculinei, determina o reactie de hipersensibilitate întârziata severa, cu producerea leziunilor tisulare ce se succed astfel: induratie locala, eritem cu reactie inflamatorie intensa, puroi si necroza, în cazul în care reactia este intens pozitiva. Fenomenul Koch este detrimental pentru gazda, pentru ca *M. tuberculosis* se multiplica repede în tesutul necrotic.

Reactia este locala, dar injectarea unei cantitati mari de tuberculina la un organism sensibilizat, poate produce o reactie sistemica (generalizata), urmata de soc grav si moarte.

Dupa contactul secundar cu antigenele de *M. tuberculosis* se produc doua tipuri de raspuns:

– o *reactie locala*, cu aparitia unei congestii si a unui edem la locul injectiei, însoțita de o adenopatie locala;

– o *reactie focala*, ce consta în activarea focarelor de tuberculoza latentă, eventual existente în organism. Focarele latente se activeaza, printr-o reactie inflamatorie locala.

Reactia de hipersensibilitate la tuberculina nu a fost interpretata corect de descoperitorul ei. Koch a injectat tuberculina, ca vaccin, în scop imunoterapeutic, la bolnavii de tuberculoza. Consecinta a fost reactivarea focarelor de latente de infectie tuberculoasa la cei vindecati clinic (asimptomatici) si agravarea tuberculozei la pacientii cu proces infectios evolutiv.

Bacilul *M. tuberculosis* nu are efecte toxice directe asupra celulelor infectate, dar reactiile de hipersensibilitate celulara pot sa determine leziuni tisulare si chiar necroza. De aceea, dupa contactul primar, efectele antigenelor de *M. tuberculosis* sunt minime sau

absente.

Efectorii celulari ai reactiilor de hipersensibilitate întârziata

Celulele efectoare ale reactiei de hipersensibilitate întârziata sunt de doua categorii:

– *celule de origine sanguina*: limfocite T sensibilizate, care recunosc specific antigenul, monocite, bazofile, neutrofile;

– *celule rezidente tisulare*: celule endoteliale vasculare, macrofage tisulare (care înglobeaza antigenul, îl prelucreaza si îl prezinta limfocitelor T), mastocite (îsi elibereaza continutul si modifica permeabilitatea capilarelor).

Recrutarea bazofilelor si neutrofilelor este mediata de chemoattractantii produsi în focar, iar limfocitele T activate produc factori de inhibare a migrarii. Infiltratul celular format din monocite si limfocite patrunde în derm si dezorganizeaza fasciculele de collagen, sub actiunea enzimelor eliberate de macrofage. Monocitele si limfocitele infiltratului se gasesc în proportii egale. In teritoriul focarului inflamator, monocitele se diferentiaza în macrofage.

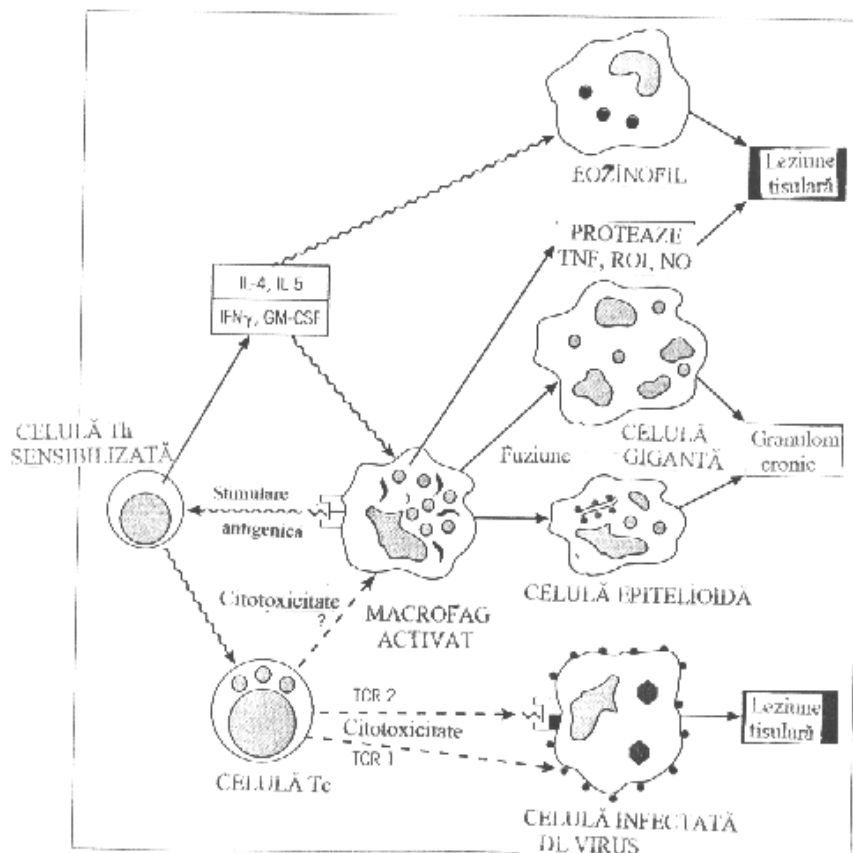


Fig. 124. Bazele celulare ale hipersensibilitatii de tip IV.

Macrofagele, celulele dendritice si posibil chiar limfocitele B preiau moleculele de tuberculina, le prelucreaza si le expun în asociatie cu moleculele CMH II. Antigenul este recunoscut de limfocitele TCD₄ si elibereaza limfochine (IL-2, IFN γ), cu efect activator asupra macrofagelor, pe care le retin în focarul inflamator.

Reactia inflamatorie, caracterizata anatomic prin edem si eritem, atinge intensitatea maxima la 48-72 de ore. Daca antigenul este degradat, ulterior, intensitatea reactiei de hipersensibilitate întârziata diminueaza treptat. Daca antigenul nu poate fi eliminat, persistenta lui determina *reactia granulomatoasa*, cea mai importanta forma de

manifestare a hipersensibilitatii întârziate.

2. Reactia de hipersensibilitate întârziata de tip granulomatos

Reactia granulomatoasa este produsa de antigene persistente, fiind cea care determina efectele patologice ale infectiei cu *M. tuberculosis* sau cu *M. leprae*. Granuloamele tuberculos si lepros sunt cele mai cunoscute.

Persistenta celulelor de *M. tuberculosis* si *M. leprae* este atribuita unor factori care împiedica fuziunea lizosomilor cu vacuola de fagocitoza. Uneori este posibila chiar multiplicarea celulelor de *Mycobacterium*.

Granulomul este indus nu numai de persistenta celulelor de *Mycobacterium*, ci si de încarcarea macrofagelor din focar, cu pulberi nedegradabile (talc, siliciu, azbest, carbune).

Granulomul pulmonar este tipic pentru natura sa imunitara si este consecinta reactiei inflamatorii cronice a tesutului care înconjura celulele infectate cu *M. tuberculosis*. Granulomul este o structura care izoleaza celulele infectate cu *M. tuberculosis* si previne diseminarea lor, fiind alcatuit din doua categorii de celule: *macrofage* si *limfocite T*.

Macrofagele infectate cu *M. tuberculosis* se hipertrofiază si dobândesc caractere morfologice *epitelioide* sau fuzioneaza si formeaza *celule gigante*. Ele ocupa o pozitie centrala în granulom, iar limfocitele sunt situate la periferie. În jurul celulelor din focar, fibroblastele proliferaza si sintetizeaza colagen, formând un *tesut fibros* de acoperire.

Granuloamele care contin bacili de *M. tuberculosis* ramân latente pentru zeci de ani, la circa 90% dintre cei aproximativ 2 miliarde de indivizi umani infectati, cu focare de tuberculoza latentă, dar fara manifestari clinice. La restul de 10%, celulele centrale ale granulomului se lizeaza din mai multe cauze: lipsa O₂, proliferarea bacililor tuberculosi, actiunea TNF si a limfocitelor T_c. Consecutiv lizei celulelor din centrul granulomului, se formeaza *granuloame cazeoase* (de consistenta cheagului de cazeina), în interiorul carora celulele de *M. tuberculosis* se dezvoltă foarte bine. Dupa ruperea peretelui fibros, bacilii se disemineaza prin contiguitate în tesutul adiacent, pe cale sanguina, în alte organe sau pe cale aeriana, la alti indivizi.

Raporturile numerice si functionale dintre limfocite si macrofage, determina intensitatea reactiilor de hipersensibilitate întârziata si conditioneaza chiar formarea granulomului. Argumentul este infectia cu *M. leprae*, care determina doua tipuri extreme de manifestari:

– *lepra leproida*, asociata cu leziuni multiple si un numar enorm de bacili în leziuni. Testul la lepromina 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 10^{10} /gram de țesut). Granuloamele sunt formate din macrofage inactive, 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 Ts specifice. Macrofagele sunt pline cu bacili și chiar după chimioterapie prelungită, bacilii sunt eliminați lent.

– *lepra tuberculoida* este o boală localizată, cu granuloame bine organizate, în care macrofagele sunt diferențiate în celule epitelioide, celule gigante Langhans active, care omorâ și digeră bacilii de *M. leprae*. Infiltratul limfocitar al granulomului este intens, cu predominanță 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. Starile 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 tuberculina, 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 pastreaza în stare liofilizata.

Cel mai folosit este testul *intradermic* (*intradermoreactia* = IDR), denumit si testul Mantoux, ce consta în injectarea unui volum de 0,1 ml din preparatul de PPD. Reactia se citeste la 24-48 de ore. Se apreciaza aria eritemului, gradul infiltratiei dermice (edemul) sau chiar necroza tisulara indusa de antigenul test.

La persoanele pozitive pentru reactia de hipersensibilitate întârziata, apare o induratie locala (întarire a tesutului) eritematoasa. Zonele de induratie de 0,5 cm sau mai mari sunt înregistrate ca pozitive. Reactia de intensitate medie dispare în 2-3 zile si denota ca organismul a fost vaccinat. La cei cu reactie intens pozitiva, manifestarile sunt mai severe, cu febra usoara, alterarea starii generale, dureri ale membrelor, ce se instaleaza dupa 24 de ore. La locul injectarii tuberculinei, tesutul se necrozeaza. Reactia ampla se datoreaza focarelor multiple latente de tuberculoza, existente în organism.

În absenta reactiei tisulare (absenta edemului si a eritemului), reactia de hipersensibilitate întârziata este negativa. Semnificatia este ca persoana nu are experienta contactului anterior cu antigenele de *M. tuberculosis*, nici prin vaccinare si nici prin infectie naturala.

Testul *alergiei de contact* se foloseste pentru evaluarea alergiei tegumentare si consta în impregnarea unei fibre textile cu tuberculina (sau cu oricare substanta test), fixata pe leucoplast si aplicare tegumentara pentru o perioada mai lunga de timp. Alergenul patrunde în tegument. La 48-72 de ore apar reactii eritematoase.

Acelesi teste se folosesc pentru evaluarea gradului de sensibilizare a organismului fata de *Brucella*, *L. monocytogenes*, *T. pallidum*, fata de boli parazitare (toxoplasmoza, malarie etc.), fata de infectiile virale, fungice.

In vitro, cel mai folosit este testul *proliferarii limfocitelor*. Suspensia de limfocite se obtine din sânge si se cultiva în mediu cu ser de vitel si antibiotice. Celulele sunt stimulate cu PHA, Con A, PWM sau cu preparate antigenice din *Candida*, anatoxina tetanica, PPD sau orice antigen relevant pentru maladia pacientului. În studiile cu lectine mitogene, celulele se marcheaza cu timidina H^3 si culturile se sacrifica la 2-3 zile. Culturile stimulate cu antigene se sacrifica la 6-7 zile.

Sinteza ADN în culturile stimulate cu mitogen sau cu antigene, se compara cu sinteza ADN în cultura martor.

PHA si Con A sunt mitogeni ai limfocitelor T. PWM induce proliferarea si maturarea limfocitelor B, dar raspunsul lor necesita functia accesorie a limfocitelor T.

În culturile stimulate cu antigene, prolifereaza limfocitele TCD 4. Raspunsul limfocitelor reflecta gradul de sensibilizare printr-o expunere anterioara a subiectului, la antigenul test.

Raspunsul limfocitelor T la aloantigene se masoara în *reactia limfocitara mixta* (RLM), în care celulele de la doi indivizi se cultiva împreuna. In reactia unidirectionala, una din cele doua populatii de limfocite se inactiveaza prin iradiere sau tratament cu mitomicina C. Ele nu sintetizeaza ADN propriu, dar stimuleaza limfocitele celeilalte populatii. Sinteza ADN se determina prin masurarea H^3 , dupa cel mult 7 zile. In RLM prolifereaza limfocitele TCD₄ si TCD₈.

3. Hipersensibilitatea de contact (*dermatita de contact*)

Hipersensibilitatea de contact, la om, se prezinta ca o *inflamatie a tegumentului*, adica o leziune tegumentara cu eritem, edem moderat si distrugerea epiteliului la locul de contact cu alergenul. Reactia este maxima la 48-72 de ore dupa contactul secundar.

Dermatita alergica de contact este o forma de hipersensibilitate întârziata si este rezultatul sensibilizarii limfocitelor. Unele haptene (de exemplu, dinitroclorbenzenul), sensibilizeaza aproape toti indivizii umani.

Moleculele *inductoare* ale hipersensibilitatii de contact sunt mici (sub 1 kD), dar se comporta ca haptene: compusi ai Ni, Co, Cr (bicromatul de K), ai Hg, cauciucul, compusi acrilici, esentele de lemn care contin substante toxice (otetar veninos, stejar veninos), formolul, unele substante cosmetice, diferite rasini, unii coloranti (de anilina), pesticide, antiseptice, antibiotice, anestezeice.

Reactia de hipersensibilitate de contact se desfasoara în doua faze:

1) *Faza de sensibilizare* (faza contactului primar). Moleculele mici (mai mici de 500 D) de orice provenienta, traverseaza tegumentul si se leaga covalent sau necovalent cu proteine tisulare constitutive, în special cu colagenul, prin gruparea NH_2 a lizinei. Astfel se formeaza, *in vivo*, un *conjugat haptena-proteina*, recunoscut de sistemul imunitar al tegumentului. Celulele Langerhans, localizate în straturile suprabazale ale epidermei sunt principalele celule prezentatoare ale antigenului. Ele exprima la nivel membranal, molecule CMH II, precum si receptori pentru regiunea Fc si pentru componentele complementului. In faza de sensibilizare, celulele Langerhans transporta conjugatul antigenic, fie internalizat, fie asociat membranei, de la nivelul tegumentului, în ganglionii limfatici regionali.

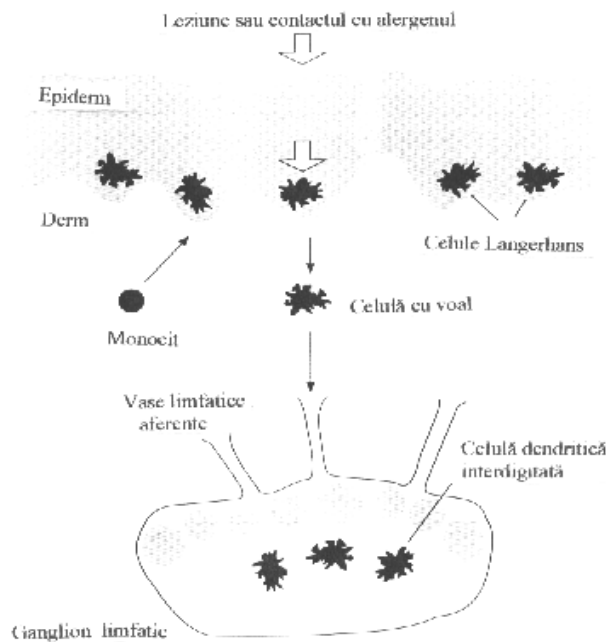


Fig. 125. Migrarea celulelor Langerhans din epiderm, în ganglionul limfatic. Antigenele sunt prelucrate în epiderm de către celulele Langerhans și stimulii produși de cheratinocite, stimulează migrarea celulelor în ganglionii limfatici, unde se diferențiază în celule dendritice prezentatoare de antigen. 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 patrunderii 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 efectorie și celule de memorie cu specificitate față de haptena. 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) *Reactia propriu-zisa* 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).

Celulele Langerhans care au legat conjugatul haptena-proteina, se deplasează din epiderm spre derm și secreta mediatori atractanți pentru limfocitele TCD₄ de memorie. Acestea secreta 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 secreta IL-1 și alte interleuchine. IL-1 stimulează celulele Langerhans și limfocitele infiltrate în aria de contact cu antigenul. Interleuchinele sunt factori atractanți pentru macrofage și limfocite, fără specificitate de antigen. Aceste celule infiltrează 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 – limfocite și macrofage – secreta 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, secreta citochine atractante 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. 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-membrana 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 initiator 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 vascularizare 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, interventii chirurgicale, procese infectioase), antigenele sechestrate se elibereaza si devin accesibile limfocitelor, declansând raspunsul imun. Un astfel de mecanism patogen s-a presupus ca este activ în generarea *oftalmiei imune* si în *aspermia autoimuna a tubilor seminiferi*. Proteinele cristalinelui, în cursul interventiilor chirurgicale, dupa traumatismele ce sparg capsula sau dupa afectiunile care permeabilizeaza cristaloida, se comporta ca antigene care declanseaza un raspuns imun anti-cristalin. Astfel, pot fi afectate irisul, procesele ciliare, coroida. Proteinele spermatice, în cazurile de spermostaza, induc sinteza locala a anticorpilor în structurile epididimului. Anticorpii reactioneaza cu antigene acrosomale sau flagelare ale spermatozoizilor si produc imobilizarea sau chiar aglutinarea lor, consecinta fiind *sterilitatea autoimuna*. Prin acelasi mecanism, al eliberarii antigenului sechestrat, se pot declansa alte maladii autoimune: *afectiuni demielinizante ale SNC, tiroidita Hashimoto*. Sistemul nervos central si tiroida sunt delimitate de bariere anatomice etanse, care nu permit accesul efectorilor sistemului imunitar. Dupa traumatisme, interventii chirurgicale sau consecutiv unor infectii distructive, antigenele specifice acestor tesuturi, se pot elibera si patrund în circulatie. Fata de ele se poate declansa raspunsul imun, generator al maladiilor demielinizante cu componenta autoimuna si al tiroiditei autoimune.

b) *Pierderea starii de toleranta*, ca mecanism posibil al generarii starilor de autoimunitate, este tot mai mult acceptata. Datorita unor mutatii, ar fi posibila aparitia *clonelor de celule limfoide* imunocompetente, care pierd proprietatea de toleranta fata de self. Limfocitele T si B autoreactive, genereaza efectorii raspunsului imun care interactioneaza specific cu componentele self. Aparitia clonelor autoreactive ar fi asociata cu un deficit al celulelor Ts, precum si cu activarea celulelor Th.

c) *Modificarea structurii chimice a antigenelor proprii* (teoria selfului alterat). Sub actiunea unor *factori fizici* (arsuri, radiatii), *biologici* de natura infectioasa (bacterii, virusuri, fungi) sau a unor substante *chimice* (medicamente), proteinele proprii se modifica si expun determinanti antigenici interni sau se altereaza configuratia lor moleculara. Moleculele modificate devin autoantigene.

Virusurile învelite au un rol important în generarea autoanticorpilor, deoarece, pe suprafata celulelor infectate sunt expuse antigene virale, care pot sa modifice specificitatea antigenica a

moleculilor proprii membranei celulare. Virusurile învelite înmuguresc prin membranele celulei gazda 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 gazda. Astfel sunt stimulate limfocitele T față de proteinele self.

d) *Asemanarea antigenică între antigenele exogene și componentele self.* Uneori, microorganismele infectioase 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*. Anticorpul anti-proteina 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 infectioase (sifilis, lepra) 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. Anticorpul anti-idiotipic, care în mod obișnuit are 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 strabat 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 bolilor autoimune. Bolile 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 bolilor autoimune, în special a artritei reumatoide.

j) *Factorii genetici*. Bolile autoimune tind să aibă o incidență familială, ceea ce sugerează substratul genetic predispozant la bolile autoimune.

Inducerea experimentală a bolilor 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 '30, Rivers și colab. au indus encefalomielite la maimuță, prin injectarea mojaratului de creier

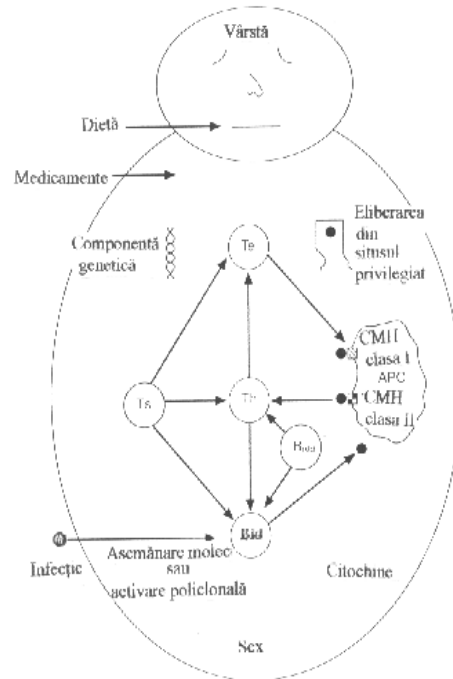


Fig. 127. Natura multifactorială a fenomenelor autoimune. B_{1d} = celula B care secreta autoanticorpi; B_{1fald} = celula B care secreta anticorpi anti-idiotipici; T_e = celula T efectoare.

Ulterior, s-a demonstrat ca cea mai sigura modalitate experimentală de a induce o manifestare autoimună, este injectarea mojaratului tisular singenic, alogenic sau xenogenic, în asociatie 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 ca unul din mecanismele producerii bolilor autoimune este similar mecanismului sintezei autoanticorpilor, adică prin stimularea cu antigene înrudite. În sprijinul afirmației, există cazuri de analogie directă.

Encefalomielita autoimuna, consecutiva administrarii vaccinului rabic, este declansata de antigenele tesutului nervos de iepure (mielina). Preparatul vaccinal atenuat, utilizat chiar de Pasteur, era maduva spinarii de la iepurele infectat cu virus rabic, uscata si macerata.

Capacitatea antigenelor înrudite chimic, de a induce sinteza anticorpilor care reactioneaza încrucisat cu componente proprii, are ca rezultat întreruperea starii de toleranta. De exemplu, utilizarea preparatelor de insulina din pancreasul de bovine sau de porc, a creat dificultati majore în tratamentul pacientilor cu diabet insulino-dependent, deoarece insulina bovina difera de cea umana prin 3 aminoacizi, iar insulina de porc, printr-un singur aminoacid. Aceste diferente sunt suficiente pentru stimularea reactivitatii imunitare a receptorului de insulina. O complicatie suplimentara a fost generata de faptul ca preparatele de insulina sunt contaminate cu *proinsulina*. Insulina se sintetizeaza în celulele B insulare, ca *preproinsulina*, care, fata de proinsulina are o catena de 20 de aminoacizi la capatul N-terminal. Dupa clivarea acestei catene, ramâne proinsulina, în care aminoacidul 1 din catena A este reunit cu aminoacidul 30 din catena B, prin catena C. Proinsulina este convertita la insulina si este depozitata în granule, de unde este eliberata în circulatie. Proinsulina nu se gaseste în mod normal în circulatie si nu induce starea de toleranta. De aceea, administrarea proinsulinei induce sinteza autoanticorpilor anti-insulina.

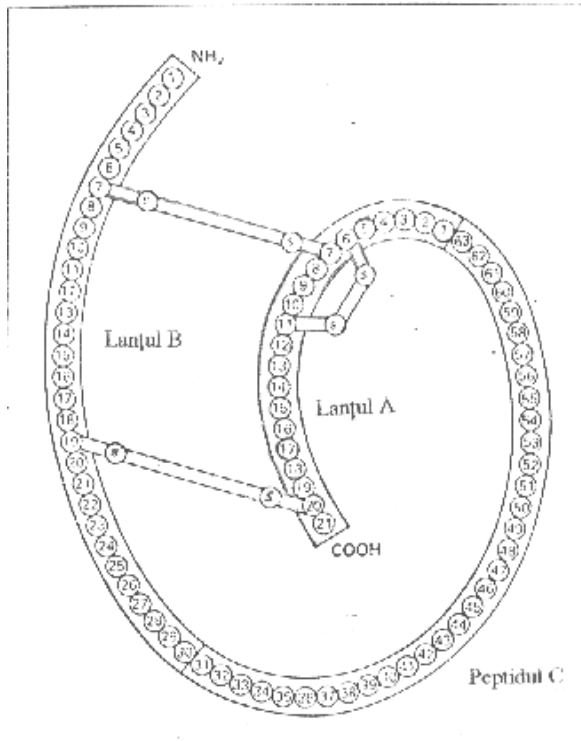


Fig. 128. Structura primara a *proinsulinei*, molecula precu-soare a insulinei dupa clivarea enzimatica a peptidului C. Proinsulina este în mod obisnuit, sechestrata de contactul cu sistemul imunitar, dar daca se elibereaza în circulatie, activeaza sinteza anticorpilor care se combina cu molecula de insulina. Catenele A si B ale insulinei sunt legate prin puncti S-S.

Întelegerea naturii chimice a multor autoantigene este insuficienta, iar auto-anticorpilor se detecteaza observând legarea lor de sectiunile tisulare, prin tehnica *imunofluorescentei*. Sectiunea tisulara este foarte complexa din punct de vedere antigenic si interpretarea rezultatelor necesita experienta si prudenta.

Mecanisme celulare si moleculare ale progresiei maladiilor autoimune

Indiferent de mecanismul declansator, maladiile autoimune se caracterizeaza prin sinteza autoanticorpilor sau prin generarea limfocitelor T autoreactive. Leziunile tisulare consecutive actiunii efectorilor imunitari, se produc pe una din urmatoarele cai:

– autoanticorpilor au, uneori, o actiune *directa* fata de antigenele tisulare cu care formeaza complexe imune. Se activeaza complementul si rezultatul este liza celulelor;

– alteori, autoanticorpilor au actiune *indirecta*. Complexele imune (Ag - Ac - C) se depun la nivelul vaselor mici (arteriole, capilare) din diferite organe si produc reactii inflamatorii, consecinta fiind distrugerea tesutului;

– în alte cazuri, tesutul tinta este lezat sub actiunea *limfocitelor Tc* infiltrate.

La pacientii la care se sintetizeaza autoanticorpi, maladiile autoimune au o particularitate comuna: *inflamatia cronica* fara o cauza infectioasa cunoscuta. Autoanticorpilor pot initia procesul patologic, pot contribui la patogeneză si sunt utili pentru diagnostic. In evaluarea semnificatiei autoanticorpilor trebuie avute în vedere urmatoarele situatii: 1) autoanticorpilor pot fi *agentii efectori* ai maladii, ca de exemplu, în anemia hemolitica autoimuna; 2) alteori, dupa lezarea unor tesuturi (nervos, cardiac) se sintetizeaza autoanticorpi care reactioneaza cu tesuturile respective; 3) autoanticorpilor semnifica prezenta unui agent etiologic, fara sa aiba rol în patogenitate si indica originea infectioasa a maladii; 4) autoanticorpilor se gasesc uneori, mai ales la vârstnici, în absenta manifestarilor patologice.

Unele maladii autoimune se caracterizeaza prin procese patologice *strict localizate*, adica efectorii (în special anticorpilor) au actiune specifica fata de antigenele proprii organului sau tesutului tinta. Astfel, în maladia autoimuna *diabetes melitus* insulino-dependent, auto-anticorpilor au specificitate numai fata de celulele B din insulele Langerhans, iar în *tiroidita Hashimoto*, autoanticorpilor sunt specifici fata de celula epiteliala tiroidiana.

La centrul spectrului se situeaza leziunile care tind sa fie localizate într-un singur organ, dar autoanticorpilor nu au specificitate de organ. Exemplul tipic este *ciroza biliara primara*, în care, canaliculele biliare sunt tinta infiltrării cu celule inflamatorii, dar anticorpilor serici, în special

anti-mitochondriali nu au specificitate de organ (nu sunt specifici fata de mitocondriile hepatice). De asemenea, în sindromul Goodpasture, autoanticorpul se fixeaza pe membrana bazala a glomerulului renal si a epitelului alveolar, producând glomerulonefrita cronica si hemoragii pulmonare.

La cealalta extremitate a spectrului sunt *maladiile autoimune diseminate*, caracterizate prin sinteza autoanticorpilor fata de antigene cu distributie tisulara larga (de exemplu, anticorpi anti-nucleari în lupusul eritematos diseminat).

<i>Spectrul maladiilor autoimune</i>	<i>Organ sau tesut afectat</i>	<i>Antigenul</i>
Tiroidita Hashimoto	Tiroida	Tiroglobulina
Mixedemul primar	Tiroida	Citoplasma, suprafata celulei
Maladia Basedow (tireotxicoza)	Tiroida	Receptorul pentru TSH al suprafetei celulare
Anemia pernicioasa Biermer (deficitul vitaminei B ₁₂)	Mucoasa gastrica	Factorul intrinsec (FI)
Diabetul juvenil	Celulele B insulare	Citoplasma celulelor insulare
Unele alergii atopice	Sistemul nervos periferic	R e c e p t o r u l beta-adrenergic
Myasthenia gravis	Muschi striat si cardiac	Receptor de acetilcolina -----
Sterilitatea masculina	Spermatozoid	Citoplasma
Maladia lui Addison	C e l u l e l e corticosuprarenalei	Citoplasma celulelor pro-ducatoare de steroizi
Menopauza precoce	Ovar	Suprafata hematiei Suprafata plachetelor
Anemia hemolitica autoimuna	Hematii	Celula hepatica, actina
Purpura trombocitopenica idiopatica	Plachete	Piruvat dehidrogenaza mitochondriala
Hepatita cronica activa fara HBs	Ficatul si muschiul neted Mitocondrii	Regiunea Fc a moleculei de IgG
Ciroza biliara primara	Membrana sinoviala	Membrana bazala ADN, ADN-proteine, IgG
Poliartrita reumatoida	Rinichi si plamâni	Lipopolizaharidul celulelor epiteliale Mitocondrii, nuclei

Sindromul Goodpasture		Membrana bazala a epidermei
LED	Distributie difuza	Miofibrilele si sarcolema celulei musculare cardiace
Colita ulcerativa	Mucoasa colonului	ARN, miozina
Sindromul Sjogren	Glande lacrimale si salivare	
Pemphigus vulgaris	Tegumentul	
Cardiomiopatia autoimuna	Muschiul cardiac	
Miozita	Muschiul striat	

Autoanticorpilor se sintetizeaza preponderent, fata de antigenele tesuturilor endocrine: tiroida, corticosuprarenale, celulele insulare pancreatice, paratiroide, hipofiza, ovar. Titrul cel mai crescut se înregistreaza în cazul maladiei tiroidiene.

Autoanticorpilor pot fi specifici fata de diferite componente antigenice:

- fata de molecule ale suprafetei celulare si au rol patologic (ca de exemplu, anticorpilor anti- receptori de hormoni);
- fata de tinte extracelulare (molecule circulante sau ale matricei extracelulare) si pot fi agravanti ai maladiei autoimune;
- fata de componente intracelulare.

Autoanticorpilor au specificitate fata de molecule self. Prezenta autoanticorpilor este, uneori, un indiciu al riscului pentru viitoare maladii autoimune, iar alteori, titrul lor seric este o reflectare directa a amplitudinii dezordinii autoimune. Evidentierea autoanticorpilor nu este niciodata revelatoare pentru diagnosticul unei maladii, deoarece se pot gasi si în serul organismului normal. Prezenta lor în serul normal are o frecventa variabila în functie de vârsta si sex: cea mai mica frecventa, autoanticorpilor o au în serul barbatilor tineri, iar în serul femeilor vârstnice, frecventa este cea mai mare.

Autoanticorpilor se identifica prin tehnicile de *aglutinare pasiva si precipitare*. Tehnicile de aglutinare utilizeaza particule de latex sau eritrocite, tapetate cu antigenul molecular.

Autoanticorpilor antitiroidieni se detecteaza prin hemaglutinarea pasiva (HAI), adica antigenul tiroidian este legat pe suprafata eritrocitelor, iar aglutinarea particulelor de latex tapetate cu imunoglobulina este cea mai folosita pentru detectarea factorului

reumatoid. Imunofluorescenta indirecta este folosita pentru evidentierea anticorpilor antinucleari.

Nu toti pacientii cu o anumita dezordine endocrina sintetizeaza autoanticorpi. Testul negativ al detectarii autoanticorpilor nu exclude maladia autoimuna, iar testul pozitiv nu are semnificatia obligatorie a unui diagnostic pozitiv. Autoanticorpii fata de celulele insulare pancreatice au o particularitate ce consta în faptul ca procentajul serurilor pozitive scade dupa declansarea bolii.

Maladii autoimune ale tesutului conjunctiv (colagenoze)

Cele mai frecvente colagenoze sunt *lupusul eritematos diseminat* (LED), *artrita reumatoida* (AR) si *febra reumatismala*. Din punct de vedere imunologic, toate se caracterizeaza prin prezenta autoanticorpilor în ser, care formeaza complexe imune cu diferite antigene tisulare. In febra reumatismala, autoanticorpii lezeaza tesutul miocardic si articulatiile. In artrita reumatoida sunt lezate articulatiile, iar în LED sunt afectate mai multe organe.

Lupusul eritematos diseminat

Denumirea de *lupus* semnifica efectul distructiv asupra tesuturilor, iar calificativul *sistemic* reflecta implicarea unui numar mare de tesuturi, ceea ce confera caracterul generalizat al maladiei; termenul *eritematos* desemneaza eritemul tegumentar care însoteste fazele acute ale maladiei. Lupusul eritematos diseminat este prototipul maladiilor autoimune sistemice. Maladia poate sa apara la orice vârsta, dar femeile în perioada sarcinii sunt cele mai afectate.

Lupusul este asociat cu multiple fenomene autoimune si se exteriorizeaza prin manifestari clinice plurifocale extrem de diverse, care implica sisteme de organe: tegument, articulatii, rinichi.

Din punct de vedere citologic, LED se caracterizeaza prin prezenta celulelor LE (lupice), evidentiata de Hargreaves în maduva osoasa a pacientilor. Celula LE este un PMN care a ingerat nucleul altei celule si poate sa apara în sângele periferic.

Semnul distinctiv al maladiei este nivelul seric ridicat al IgG cu specificitate anti-nucleara. Manifestarile clinice heterogene par a fi asociate cu producerea autoanticorpilor. In serul pacientilor s-au identificat peste 28 de specificitati diferite de autoanticorpi. Cei mai

semnificativi sunt anticorpii antinucleari (FAN), anti-leucocitari, anti-muschi neted de stomac, anti-eritrocitari, anti-plachetari, anti-ribosomalii. Titrul crescut de anticorpi anti-ADN dublu catenar, asociat cu nivelul scazut 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 haptena, iar anticorpii au specificitate față de ADN. Anticorpii anti-ADN aparțin clasei IgG și dau reacții încrucisate multiple: cu polizaharidele bacteriene, cu proteinele fibrilare ale citoscheletului, cu cardiolipina. 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 peretilor 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 complexele 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, boala 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 boală și detectarea lor este utilă pentru diagnostic. Anticorpii anti-nucleari

reactioneaza cu toate tipurile de nucleu, indiferent de origine, dar reactioneaza si cu antigenele nucleare ale gazdei si de aceea sunt considerati autoanticorpi. In LED, titrul anticorpilor antinucleari este crescut, dar anticorpi anti-ADN se sintetizeaza si in artrita reumatoida, in sindromul Sjogren, myasthenia gravis, hepatita cronica activa. Anticorpii antinucleari sunt antinucleosomali (structuri ce constau din ADN si histone). ADN poate fi de origine eucariota sau procariota, dublu catenar sau monocatenar, polidispers sau omogen. Anticorpii se fixeaza pe nucleul unei largi varietati de tesuturi animale, ceea ce permite evidentierea lor in serul pacientilor prin metoda *imunofluorescentei indirecte*. Metoda utilizeaza timus de vitel, dar in special sectiuni de ficat de sobolan, obtinute prin criotomie. Sectiunile se acopera cu serul de cercetat. Lama cu sectiuni se spala pentru indepartarea anticorpilor care nu au reactionat specific cu nucleul hepatocitului. Lamele se incuba cu ser de iepure anti-IgG umana, conjugat cu fluoresceina. Sectiunile se examineaza la microscop, cu lumina ultravioleta. Daca in serul de cercetat se gaseste FAN, se observa fluorescenta celulelor hepatice de sobolan.

Multi pacienti cu LED au anticorpi serici, nu numai fata de antigenele nucleare, ci si fata de antigenele citoplasmice.

Cel mai comun fenomen patologic la pacientii cu LED este *vasculita inflamatorie*, datorata depunerii locale a complexelor imune, in deosebi a acelor care contin ADN, in peretii vasculari.

Maladia se reproduce experimental la soarece prin injectarea unei endotoxine care determina liza celulara, cu eliberare de ADN. ADN liber sau complexe ADN-anticorpi se fixeaza pe membrana bazala.

Agentul declansator al LED nu se cunoaste. Retravirusurile sunt posibili agenti etiologici, deoarece la pacientii cu LED este indusa sinteza unui interferon atipic (IFN-lentivirus), iar in culturile de limfocite de la pacientii cu LED s-a evidentiat revers-transcriptaza.

Predominanta neta a pacientelor (9:1) fata de barbati sugereaza rolul hormonilor sexuali in aceasta maladie. Numeroase date sugereaza un dezechilibru al raportului cantitativ al hormonilor androgeni si estrogeni in plasma. Barbati cu LED manifesta o prevalenta superioara a hipo-androgenismului. Boala pare sa implice emergenta si activarea limfocitelor TCD₄ si B cu potential autoreactiv.

Declansarea si progresia LED are o baza genetica complexa, cu contributia genelor CMH si a multor gene din afara complexului. Complexitatea genetica in bolile poligenice se datoreaza penetrantei scazute a fiecarei gene in parte, adica este o mica probabilitate ca o anumita alela sa determine expresia maladiei. Datorita penetrantei incomplete, chiar in prezenta unui set complet de alele susceptibile,

maladia nu se manifesta totdeauna.

Artrita reumatoida

Artrita reumatoida este o maladie inflamatorie cronica ce afecteaza predominant membrele superioare si inferioare, dar poate sa implice orice articulatie. Este o maladie autoimuna cronica, sistemica, cu etiopatogeneza necunoscuta. Debutul ei este, de regula, dupa 40 de ani, dar poate sa apara la orice vârsta. Maladia este mult mai frecventa decât LED si este consecutiva persistentei complexelor imune în circulatie, pentru perioade lungi de timp. Este una din cele mai comune maladii autoimune, de 2-3 ori mai frecventa la femei decât la barbati. Artrita reumatoida este caracterizata prin inflamatie si distrugerea cartilajului articular, producând deformarea degetelor.

Waalder si Rose au evidentiat ca serul pacientilor de AR aglutineaza eritrocitele de berbec, tapetate cu o doza subaglutinanta de anticorpi specifici. Concluzia lor a fost ca serul contine un factor specific, care recunoaste regiunea Fc a moleculelor de anticorpi ce tapeteaza hematiile si l-au denumit *factor reumatoid* (FR).

Factorul reumatoid aglutineaza hematiile oricarei specii, daca sunt tapetate cu anticorpi specifici. Factorul reumatoid este autoanticorp, un IgM anti-regiunea Fc a IgG denaturat. *In vitro*, FR precipita cu IgG denaturata chimic sau termic.

In vivo, modificarea structurii IgG se produce dupa ce IgG reactioneaza cu antigenul corespunzator, sau *in vitro*, dupa ce se fixeaza nespecific pe un suport inert sau dupa denaturare termica.

Factorul reumatoid se sintetizeaza fata de molecula IgG a carei conformatie moleculara a fost modificata *in vivo* si se gaseste la circa 70% dintre pacientii cu artrita reumatoida. Dupa modificarea conformatiei moleculare, IgG expune determinanti antigenici inaccesibili pe molecula intacta. Sinteza FR se face în plasmocitele din ganglionii limfatici, dar si în cele din *tesutul de granulatie* al membranei sinoviale. Tesutul de granulatie este un tesut conjunctiv reparator care se formeaza în focarul reactiei inflamatorii.

Determinantii antigenici ai IgG umana, care reactioneaza cu FR, nu se gasesc la toti indivizii. Factorul reumatoid care reactioneaza cu IgG de iepure, este diferit de cel care reactioneaza cu IgG umana. Factorul reumatoid este considerat ca *autoanticorp*, dar nici un FR din aceasta categorie nu se poate numi autoanticorp, din urmatoarele motive:

– nu precipita cu IgG nativa a propriului organism. O varianta a FR se combina cu IgG numai de origine umana si numai daca este legat în

complexe imune, dar nu reactioneaza cu IgG libera;

- factorul reumatoid care se combina cu IgG umana, frecvent recunoaste numai IgG denaturat si agregat prin tratament termic;
- factorul reumatoid precipita IgG cu specificitate alotipica, diferita de aceea a pacientului
- factorul reumatoid precipita cu IgG de alte specii.

Pe baza reactiei cu FR, indivizii umani se împart în doua grupe:

- cei al caror IgG precipita cu FR
- cei al caror IgG nu reactioneaza cu FR.

Determinantii antigenici ai moleculelor de IgG sunt omologi antigenelor de grup sanguin si se numesc *Gm*(gama marker). Ei reprezinta variante antigenice alotipice ale IgG umane. Indivizii al caror IgG reactioneaza cu FR apartin grupului *Gm(a⁺)*, iar ceilalti sunt *Gm(a⁻)*.

Biologia moleculara a artritei reumatoide

Mecanismul declansator al maladiei este incert. Nu se cunoaste natura stimulului antigenic. Reactia autoimuna ar fi declansata de o *infectie cu micoplasme* sau cu un *virus* (EBV, CMV sau un retravirus) care ar avea epitopi asemanatori cu autoantigenele. Antigenele de *Salmonella*, *Shigella* sau *Yersinia* pot sa activeze diferite artrite. Raspunsul fata de aceste antigene este detectat la situsul sinovial al inflamatiei, fara ca microorganismul sa fie prezent. Antigenele bacteriene cu potential autoimun pot fi transportate în articulatii si initiaza sau amplifica un raspuns imun anormal. Printre posibillii factori etiologici ai AR, o atentie speciala s-a acordat *proteinelor de raspuns la socul termic*. Alti autori considera ca un *autoantigen* (gp 39, componenta a tesutului articular) este recunoscut ca nonself de sistemul imunitar. S-a sugerat posibilitatea ca AR sa se datoreze unei *insuficiente corticosteroidiene*, odata cu descoperirea efectelor antiinflamatorii ample ale cortizonului, în aceasta maladie. Ipoteza n-a fost confirmata, dar nici infirmata.

Dupa altii, maladia este declansata de *complexele imune circulante* care se fixeaza în articulatii. Complexele imune sunt recunoscute specific de limfocitele B, care leaga antigenul din complex, prin receptorul imunglobulinic.

Artrita reumatoida este o colectie de maladii autoimune, pentru care antigenul declansator difera, la diferite forme ale maladiei. Desi AR este considerata o maladie autoimuna, tabloul patologic distinctiv este dominat net de o reactie inflamatorie intensa, severa si cronica, stimulata de antigene infectioase sau de superantigene.

Etiologic, AR pare a fi rezultatul unei combinatii de factori care include predispozitia genetica si stimularea antigenica, posibil ca rezultat al infectiei cu microorganismele. Procesul imunologic are un rol central în patogeneza AR, argumentat de urmatoarele observatii:

- prezenta autoanticorpilor serici (FR)
- în situsul inflamator se gasesc factorii rezultati din activarea C
- în situsul articular inflamator se gasesc neutrofile, limfocite T, B, macrofage si citochinele lor
- sensibilitatea la AR este asociata cu expresia unor alele specifice CMH II.

Limfocitele T sunt implicate direct în mecanismul patogeniei AR. În tesutul sinovial reumatoid, celulele care delimiteaza cavitatea sinoviala sunt hiperplazice si sunt infiltrate cu limfocite B, T si macrofage. Utilizarea AMC marcati cu fluoresceina, arata ca în tesuturile sinoviale sunt celule T care exprima molecule CMH II.

Oricare ar fi stimulul, la nivelul articulatiei se declanseaza *reactia inflamatorie*, proces patologic care determina progresia AR. Se presupune ca celulele Th₁ recunosc un antigen self în tesutul sinovial, se activeaza si produc limfocine (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IFN γ) si activeaza limfocitele B, care se diferentiaza în plasmocite si secreta IgG, ce formeaza complexe imune (CI). CI activeaza cascada C si se elibereaza C3a si C5a, cu actiune chimiotactic pozitiva si activatoare fata de leucocite, inclusiv pentru limfocite, care amplifica reactia inflamatorie. Celulele Th₁ secreta citochine care activeaza celulele fagocitare ce elibereaza produse de oxidare a acidului arachidonic, radicalii oxigenului si metaloproteaze lizosomale, care degradeaza matricea extracelulara a tesutului articular.

Macrofagele elibereaza IL-1, cu efecte multiple: stimuleaza proliferarea si eliberarea moleculelor proteolitice si chimiotactice din macrofage, stimuleaza osteoclastele si condroclastele. Osteoclastele si condroclastele ataca si lizeaza cartilajul, amplificând inflamatia articulara. Factorii de crestere si citochinele stimuleaza hiperplazia fibroblastelor si angiogeneza în jurul articulatiei, iar în membrana sinoviala a articulatiei se organizeaza foliculi limfoizi, cu centri germinativi în care se gasesc numeroase plasmocite. Raspunsul imun si raspunsul inflamator initiaza si întretin o sinovita, care poate progresa la forma eroziva a artritei, la pacientii pozitivi pentru epitopul antigenic declansator sau datorita contactului repetat cu un epitop de origine infectioasa, stimulator al reactivitatii imunitare si al reactiei inflamatorii.

Trasatura esentiala a patologiei AR este *degradarea cartilajului articular*, sub actiunea *metaloproteazelor* derivate din celulele inflamatorii infiltrate si din condrocitele rezidente: colagenaze,

gelatinaze, stromelizine etc. Sinteza lor este stimulata de citochinele inflamatorii. Cartilajul articular este un tesut unic pentru ca celulele sale componente se gasesc în lacune izolate, fara contact direct cu alte celule. Cartilajul este nevascularizat si este foarte rezistent la invazia cu vasele sanguine si de catre celulele tumorale.

Molecule din categoria FR se sintetizeaza si la persoane cu dezordini limfoproliferative. Factorii reumatoizi de la persoanele normale sunt componente ale familiei anticorpilor naturali, cu afinitate mica fata de self. Adeseori, anticorpii naturali sunt polispecifici, reactionând cu antigene self si cu antigene exogene. In contrast, factorii reumatoizi de la pacientii cu artrita reumatoida au adeseori afinitate înalta.

Artrita reumatoida se reproduce experimental prin injectarea *fibrinei* heterologe. Se produce o hiperplazie a celulelor membranei sinoviale, eroziunea cartilajului articular si a osului subiacent si inflamatia cronica a membranei sinoviale.

Alt model experimental al artritei este *artrita de adjuvant*. Prin injectarea intradermica a antigenului, asociat cu adjuvantul Freund complet, la sobolan se dezvolta o afectiune similara artritei reumatoide.

Febra reumatismala sau reumatismul articular acut (RAA).

Febra reumatica este o complicatie relativ rara a faringitei streptococice, ce apare la 2-4 saptamâni dupa infectia bacteriana. Febra reumatismala este o afectiune provocata de *complexele imune circulante*, care se localizeaza în regiunile articulare. Se manifesta ca o poliartrita febrila, cu evolutie favorabila, singurul risc fiind complicatiile valvulare cardiace, miocardice sau pericardice. Febra reumatismala este consecutiva infectiei tractului respirator cu *Str. haemolyticus*. Dupa 2-3 saptamâni, se dezvolta o maladie asemanatoare maladei serului, cu febra, artrita, uneori chorea si cardita. Anticorpii cu reactie încrucisata ataca valvele cardiace, pentru ca antigenele self ale tesutului cardiac se aseamana cu proteina M din *Str. haemolyticus*. Riscul complicatiilor cardiace este mai mare pentru indivizii cu grup sanguin A. Toate grupele sanguine au un precursor antigenic comun – *antigenul H* (codificat de gena H) – pe suprafata eritrocitelor, bine exprimat cantitativ la persoanele de grup O. Specificitatea antigenica a hematiilor de *grup O* este conferita de *L-fucoza*. *Grupul A* are o alta gena ce codifica sinteza glicozil-transferazei, enzima ce adauga N-acetil-D-galactozamina, la galactoză preterminala a substantei H. De aceea, specificitatea antigenica a eritrocitelor *grupului A* este data de *N-acetil-D-galactozamina si L-fucoza*.

Indivizii *grupului B* au o gena ce adauga D-galactoza la galactoza preterminala a moleculei H si specificitatea antigenica a eritrocitelor este data de *D-galactoza si L-fucoza*.

Glucidul terminal al polizaharidului streptococic este N-acetil-D glucozamina, legata de un polimer de ramnoza. Diferenta dintre N-acetil-D glucozamina si N-acetil-D galactozamina este grupul OH. De aceea, antigenele de grup sanguin A se aseamana cu antigenul streptococic, mai mult decât ale grupului O. La fel pentru antigenele de grup B, la care D-glucoza este mai asemanatoare structural cu N-acetil-D glucozamina de *Str. pyogenes*, decât cu L-fucoza grupului O. Ca urmare, anticorpii produsi de indivizii de grup A, dupa infectia cu *Str. pyogenes*, se cupleaza cu antigenele tisulare care contin antigene ale grupului A si produc reactii inflamatorii. Tesutul cardiac contine grupe moleculare, similare cu substanta de grup A.

Anticorpii anti-streptococici se leaga cu antigenele înrudite (o reactie încrucisata), ceea ce explica frecventa superioara a febrei reumatice la indivizii cu grup sanguin A si B, fata de indivizii cu grup sanguin O.

Chorea care însoteste febra reumatica, se poate explica prin asemanarea unor molecule ale ganglionilor bazali, cu antigene streptococice.

Febra reumatismala debuteaza în momentul în care încep sa se sintetizeze anticorpi antistreptococici. Absorbția antigenelor streptococice în circulatia sanguina, determina, în special, sinteza anticorpilor anti-streptolizina O (ASLO). Se formeaza complexe imune circulante. Ramâne neexplicat faptul ca numai 2-3% dintre indivizii atinsi de infectia cu *S. pyogenes* fac reumatism articular acut.

Tesutul cardiac este adeseori implicat, deoarece anticorpii dau reactie încrucisata cu antigenele streptococice si cu antigenele de organ ale fibrei musculare striate din muschiul cardiac si chiar cu muschiul neted din peretii vasculari. Anticorpii anti-streptolizina O reactioneaza cu sarcolema fibrelor musculare cardiace. O fractie a anticorpilor anti-streptococici, reactioneaza încrucisat atât cu antigenele glucidice bacteriene, cât si cu o proteina structurala de pe valvele cardiace. Complicatiile pericardice, uneori consecutive infectiei cu *S. pyogenes*, nu sunt explicate, pentru ca în pericard nu se gasesc antigene care sa reactioneze încrucisat cu cele bacteriene.

Biologia moleculara a maladiilor autoimune organo-specifice

O serie de maladii cu substrat imunitar se caracterizeaza prin spectrul foarte limitat al specificitatii autoanticorpilor serici si implicit prin limitarea leziunilor tisulare la tesutul tinta: tiroidita autoimuna Hashimoto, boala Basedow-Graves, diabetul zaharat insulino-dependent, myasthenia gravis, anemia pernicioasa, boala Addison, insuficienta ovariana primara, pemphigus.

Cel mai adesea, autoanticorpilor sunt specifici fata de componente ale sistemului endocrin. Adeseori, în cazuri patologice, în organism se sintetizeaza anticorpi cu specificitate fata de un anumit *receptor hormonal*. Mecanismul inductiei sintezei acestor anticorpi nu se cunoaste, dar se considera ca receptorii de hormoni sunt "secretati" de celule în mediul intern. Moleculele sunt preluate si prelucrate de celulele specializate si sunt prezentate limfocitelor. Anticorpilor anti-receptor hormonal pot sa blocheze functia hormonului respectiv.

Autoanticorpilor fata de receptorii pentru hormonii hipofizari si fata de receptorii organului tinta au rol determinant în progresia unor maladii. Cei mai studiatii sunt anticorpilor anti-receptor pentru TSH si anti-receptor de insulina. Efectele fizio-patologice ale anticorpilor anti-receptorii hormonali sunt variate. Anticorpilor pot stimula activitatea receptorului si efectul este intensificarea activitatii secretorii a glandei (efect mimetic hormonal) sau invers, blocheaza receptorul si efectul se reflecta în inhibitia activitatii secretorii. La acelasi pacient pot coexista ambele variante de anticorpi. De exemplu, anticorpilor fata de *receptorul periferic de insulina*, se gasesc la un numar mic de pacienti cu diabetus melitus insulino-rezistent, dar si la cei hipoglicemici. Pacientii cu aceste manifestari au o maladie autoimuna de fond, cel mai adesea lupus eritematos diseminat.

Uneori, pacientii hiperglicemici insulino-rezistenti, evolueaza spre hipoglicemie. S-a presupus ca autoanticorpilor cu titru crescut, distrug receptorul de insulina si de aici ar rezulta rezistenta maladiei la hormonul circulant, iar autoanticorpilor anti-receptor de insulina, cu titru scazut, produc o stimulare a receptorului (mimeaza actiunea hormonului) si efectul este hipoglicemia. Se pare însa ca autoanticorpilor au specificitate fata de epitopi diferiti ai receptorului, ceea ce explica diferentele actiunii lor.

Diabetus mellitus insulino-dependent

Diabetul zaharat este cea mai frecventa maladie endocrina.

Diabetes mellitus insulino-dependent (IDDM) rezulta din distrugerea celulelor pancreatice B, producatoare de insulina. Rezultatul este hipoinsulinemia si hiperglicemia. IDDM pare a fi o maladie autoimuna. Predispozitia genetica este o conditie necesara pentru declansarea maladii, dar factorii de mediu – infectiile virale, regimul alimentar, diferite toxine, au un rol important în expresia clinica a acestei maladii. Maladia s-a reprodus experimental la soarece. Insulele sunt infiltrate cu limfocite. Sunt lizate celulele B ale insulelor, procesul distructiv excluzând alte tipuri celulare, care ramân intacte. Dupa instalarea hiperglicemiei, gradul infiltrarii mononucleare scade. Infiltratul consta din macrofage, celule dendritice, TCD₄, TCD₈, NK si mai putin limfocite B.

În ser se detecteaza anticorpi anti-celule insulare pancreatice, cu specificitate citoplasmatica si anticorpi anti-componente membranare (decarboxilaza acidului glutamic). Aceasta enzima se gaseste în citoplasma celulelor B pancreatice, dar functia ei este necunoscuta. Aceiasi enzima se gaseste în neuronii care produc inhibitorul transmiterii impulsului nervos – acidul γ -aminobutiric. La epileptici, ca si la pacientii IDDM, titrul anticorpilor anti-glutamic acid-decarboxilaza este crescut. Enzima citoplasmatica se gaseste si la nivelul membranei plasmaticice, unde devine tinta sistemului imunitar si induce sinteza autoanticorpilor. Agentul etiologic al IDDM nu este cunoscut, dar poate fi un picornavirus (Coxsackie B₄) litic pentru celulele B insulare, ale carui antigene dau reactie încrucisata cu antigene self. Diferite substante toxice cu efect litic ar elibera antigenele celulare. Celulele B insulare pot fi lizate direct, sub actiunea infectiei virale sau de catre macrofage, care detecteaza antigenele virale. Agentii chimici diabetogeni (aloxan, streptozocina etc.) distrug celulele B prin diferite mecanisme si reproduc maladia, cu sinteza auto-anticorpilor anti-celule insulare.

Maladii autoimune tiroidiene

Tiroida secreta tiroxina (T₄) si triiodotironina (T₃), hormoni reglatori ai ratei metabolismului bazal si ai functiilor cardiace si neurologice. Afectiunile tiroidei pot determina modificari ale secretiei hormonale, hipertrofia glandei sau ambele consecinte.

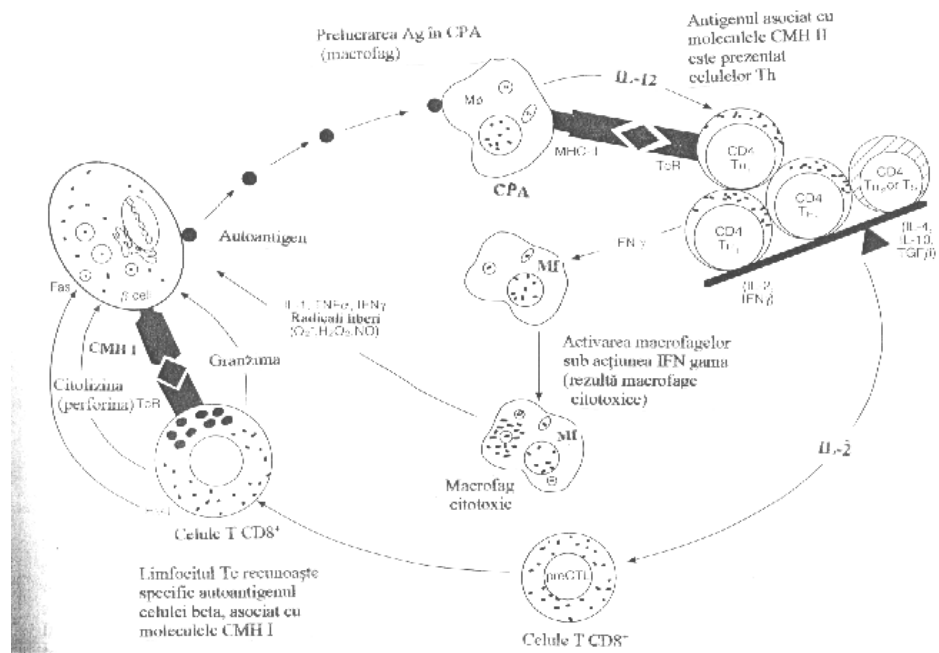


Fig. 129. Reprezentare schematica a dezvoltării *diabetului zaharat insulino-dependent* (IDDM). Autoantigenele eliberate din celulele β în timpul turnover-ului natural sau lizei celulelor datorita infectiei virale, sunt prelucrate de macrofage si prezentate celulelor Th în asociatie cu moleculele CMH II. Macrofagele elibereaza IL-12, activatoare a limfocitelor Th1. În acelasi timp, IL-2 si alte citochine eliberate de celulele CD4⁺, activeaza limfocitele T cu potential toxic fata de celulele insulare β . IFN γ eliberat de celulele Th stimuleaza functia citotoxica a macrofagelor. Ele elibereaza citochine cu efect toxic pentru celulele β (IL-1 β , TNF α , IFN γ) si radicali liberi. Celulele Th secreta interleuchine care activeaza alte celule Th, limfocite B si celule Tc. Celulele Tc (CD8⁺) pot sa recunoasca autoantigenele exprimate pe celulele β normale. Ele elibereaza granzima si citolizina (perforina), cu efect toxic asupra celulelor β insulare. Distrugerea celulelor β ar putea fi datorata apoptozei mediata de interactiunea receptorului Fas cu ligandul Fas. Astfel, macrofagele, celulele T si citochinele coopereaza sinergic pentru distrugerea celulelor β , rezultatul fiind diabetul zaharat insulino-dependent (dupa Ji-Woon Yoon, 1998).

În ariile geografice în care ingestia iodului alimentar este adecvata necesitatilor, maladiile tiroidiene au, în primul rând, mecanisme imunitare. Ele apar cu o frecventa de circa 4% în populatia umana si se manifesta prin *hipertiroidism* cu sau fara *oftalmopatie* sau prin *hipotiroidism*. În ambele cazuri, tiroida poate sa creasca în volum (gusa).

S-au descris trei specificitati de autoanticorpi anti-tiroidieni: *anti-tiroid peroxidaza* (antigenul microsomal); *anti-tiroglobulina*; *anti-receptor pentru TSH* al celulelor acinare tiroidiene.

Hipertiroidismul cu cresterea volumului glandei este cunoscut sub denumirea de boala Graves sau von Basedow sau boala Parry, iar insuficienta *tiroidiana* poarta numele de *tiroidita autoimuna*, caracterizata prin infiltrare limfocitara. În functie de aspectul clinic, se disting doua stari patologice: *tiroidita Hashimoto* (gusogena) si *tiroidita atrofica* (mixedem primar). În ambele cazuri, tesutul tiroidian se distruge.

Boala tiroidiana autoimuna apare în special la organisme feminine si din punct de vedere imunologic se caracterizeaza prin autoanticorpi circulanti, celule T activate fata de antigenele tiroidiene si prin infiltrarea limfocitara a organului.

Maladia Basedow-Graves (tirotoxicoza) este de natura autoimuna si se caracterizeaza prin sinteza anticorpilor (IgG) anti-tiroidieni, detectabili la 85% dintre pacienti, iar histologic se observa leziuni structurale. Anticorpilor anti-tiroidieni sunt autoanticorpi specifici fata de *receptorul pentru TSH*. Anticorpilor se fixeaza pe receptorul celular pentru TSH si efectul este o stimulare de durata a functiei tiroidei. Autoanticorpilor s-au denumit LATS (*Long-Acting-Thyroid-Stimulating*). Mecanismul lor de actiune este acelasi ca si al TSH, prin intermediul adenil-ciclazei.

Interactiunea autoanticorpilor cu antigenul celular (receptorul pentru TSH) nu produce distrugerea celulei, ci efectul este proliferarea si stimularea activitatii ei. Un efect stimulator asemanator îl are IgG anti-imunoglobulina de suprafata a limfocitului B. Rezultatul este transformarea blastica a limfocitului.

Actiunea anticorpilor anti-TSH nu se supune controlului feed-back prin hormonul tiroidian, a carui sinteza este stimulata. Tiroida se activeaza, secreta hormon tiroidian si creste mult în volum. Celulele foliculare se divid si hiperplazia tiroidei este asociata cu hiperfunctia.

Autoanticorpilor anti-receptor pentru TSH traverseaza placenta si determina hiperplazia tiroidiana a fatului, cu manifestarile clinice ale hipertiroidismului, ce persista pâna când anticorpilor de origine materna sunt catabolizati.

Maladia este influentata de diferiti factori: vârsta, sex, rasa, starea hormonală. Maladia se remite în timpul sarcinii, dar se activeaza la modificari hormonale: pubertate, perioada post-partum, menopauza. Boala este mai grava la barbati (desi ei sunt numai 25% dintre pacienti), cu titru mare de anticorpi.

Oftalmopatia se datoreaza hipertrofiei musculare extraoculare, cresterii volumului tesutului adipos si a tesutului conjunctiv înconjurator,

cu infiltrat celular inflamator si al celulelor imunitare. Se pare ca anticorpii si limfocitele T recunosc determinanti antigenici pe muschii extraoculari sau pe fibroblastele orbitale, cu fenomene de citotoxicitate mediata celular, dependenta sau independenta de anticorpi.

Tiroidita Hashimoto. La pacientii cu maladia autoimuna a tiroiditei Hashimoto, se gasesc autoanticorpi cu diferite specificitati, dar definitorie pentru aceasta maladie este înlocuirea tesutului tiroidian, cu tesut limfoid. Volumul glandei creste foarte mult, dar nu, sintetizeaza hormoni (gusa uscata). In serul pacientilor se gasesc autoanticorpi care reactioneaza cu tiroglobulina, anticorpi anti-celule tiroidiene, anticorpi anti-TSH si anticorpi fata de antigenele microsomale asociate cu lipoproteinele. Microsomii sunt constituinti intracelulari ai veziculei de exocitoza a celulei tiroidiene, în care se matureaza hormonul tiroidian. Veziculele de exocitoza transporta tiroglobulina spre suprafata apicala a celulei si o elibereaza prin fuziunea cu membrana polului apical. Microsomii tiroidieni se exprima si pe membrana laterobazala a celulei, când vezicula de exocitoza fuzioneaza gresit cu aceasta zona. Astfel, hormonul devine accesibil sistemului imunitar. Microsomii constituie autoantigenul, potential stimulator al raspunsului imun.

Anticorpii anti-microsomi tiroidieni au facut posibila detectarea unei proteine de 993 aminoacizi – *tiroid-peroxidaza* (TPO), enzima tiroidiana asociata microsomialor, cu rol esential în generarea hormonilor tiroidieni din tiroglobulina.

Anticorpii anti-tiroglobulina au titru de pâna la 1/2500 si se detecteaza în reactia de precipitare dintre serul pacientilor si mojaratul de tesut tiroidian.

In vivo, autoanticorpii se fixeaza pe tesutul tiroidian. Se produce inflamatia cronica a tiroidei si cresterea volumului ei (gusa). Se disting doua situatii patologice: tiroidita gusogena si tiroidita atrofica (mixedem primar).

În ambele cazuri, celulele foliculare tiroidiene se lizeaza. Consecinta este deficitul tiroidian (*hipotiroidia*), proportional cu volumul tisular pierdut. Hipotiroidismul este asociat cu mixedemul primar. In serul pacientilor se gasesc anticorpi anti-receptor pentru TSH, care blocheaza legarea TSH, fiind astfel inhibata regenerarea foliculilor, o trasatura a gusii Hashimoto, dar si anticorpi anti-muschi neted de stomac, anticorpi anti-factor intrinsec. Rolul autoanticorpilor în distrugerea celulelor tiroidiene nu este determinat, iar maladia este, în primul rând, rezultatul actiunii limfocitelor T care infiltreaza tesutul glandular.

Maladia se induce experimental prin injectarea mojaratului de tesut tiroidian omolog sau heterolog, la iepure, asociat cu adjuvantul

Freund. Tiroida se infiltreaza cu limfocite mici. Liza tesutului tiroidian este rezultatul imunitatii mediate celular, fata de antigenele tiroidiene.

Autoanticorpii fata de antigene ale membranei se sintetizeaza în diferite *neuropatii*. Sunt cunoscuti anticorpii specifici fata de *gangliozidele* celulei nervoase. Aceste molecule alcatuite dintr-un lipid, ceramida (sfingozina legata de un acid gras), combinate cu o varietate de oligozaharide, se gasesc în membrana neuronilor periferici. In serul pacientilor cu diferite neuropatii se gaseste IgM specific fata de o anumita gangliozida. Anticorpii nu initiaza procesul patologic si nu au specificitate de maladie, ci se sintetizeaza dupa leziuni ale tesutului nervos (dupa atacul cerebral, dupa traumatisme ale cutiei craniene sau chiar la pacientii cu spondiloza cervicala).

Anemia pernicioasa

Anemia pernicioasa apare în stadiile terminale ale gastritei autoimune distructive si este consecinta distrugerii celulelor parietale ale glandelor gastrice, datorita conflictului imunitar. In absenta celulelor parietale, vitamina B₁₂ nu se absoarbe.

Denumirea "pernicioasa", data de Biermer (1972), subliniaza progresia inevitabila spre fatalitate si s-a pastrat, desi ea este caracteristica numai pentru faza terminala a bolii.

De fapt, maladia debuteaza si se manifesta ca o *gastrita autoimuna*, pentru care exista dovezi histologice din 1970, dar conditionarea dintre anemie si gastrita a fost precizata de Biermer.

Procesul patologic autoimun este initiat la nivelul mucoasei gastrice si este de lunga durata (circa 20 de ani), cu mult înaintea epuizarii functionale a celulelor parietale. În serul pacientilor se gasesc autoanticorpi cu mai multe specificitati, dar cei *anti-stomac* au titrul cel mai înalt. Sediul sintezei lor este în plasmocitele din mucoasa gastrica si se leaga specific fata de doua categorii de auto-antigene:

– *ATP-aza H⁺K⁺* (o enzima) din celula parietala, cu specificitate celulara, dar nu de specie, ceea ce denota importanta rolului fiziologic al moleculei în celula parietala gastrica;

– un produs de secretie a celulelor gastrice parietale, denumit *factor gastric intrinsec* sau *transcobalamina*, o glicoproteina a carei functie este de a lega vitamina B₁₂ si de a permite absorbtia ei intestinala.

Enzima ATP-aza H⁺K⁺ functioneaza ca pompa protonica si realizeaza acidifierea sucului gastric. Ea apartine familiei ATP-azelor de tip P, cu rol în fluxul ionic (Na⁺K⁺-ATP-aza, Ca²⁺-ATP-aza). Anticorpii anti-factor intrinsec au o frecventa de 80-90%, în cazurile clinice de

anemie pernicioasa si se evidentiaza prin inhibitia fixarii vitaminei B₁₂ radiomarcate, în sucul gastric. Enzima gastrica ATP-aza H⁺K⁺ este localizata pe membranele intracelulare si pe membrana apicala a celulei gastrice parietale.

Factorul gastric intrinsec este o glicoproteina de 44 kD. Vitamina B₁₂, în mediul acid al sucului gastric, se elibereaza din legaturile sale cu proteinele si se leaga cu transcobalamina. Daca secretia acida este inhibata de inactivitatea H⁺K⁺-ATP-azei, cantitatea de vitamina B₁₂ disponibila pentru a se lega cu factorul intrinsec diminueaza mult, iar situsul de legare cu transcobalamina este blocat de autoanticorpi. Rezultatul este malabsorbtiia vitaminei B₁₂. Gastrita autoimuna progresa pâna când vitamina B₁₂ scade la nivele ce nu mai pot sa sustina metabolismul neuronal. Pacientul devine anemic, cu complicatii neurologice.

Anticorpii sunt IgG si alaturi de limfocitele T, participa la distrugerea celulelor gastrice. Pe masura ce inflamatiia progresa, se reduce numarul celulelor principale si al celor parietale. Reactia autoimuna este limitata la corpul stomacului. Rezultatul este atrofia gastrica, dar rata progresiei este variabila. La unii indivizi, capacitatea de a absorbi vitamina B₁₂ se mentine timp de circa 20 de ani, iar la altii atrofia este rapida si se instaleaza anemia pernicioasa.

Myasthenia gravis

Myasthenia gravis se caracterizeaza clinic prin diminuarea progresiva a fortei muschilor scheletici, cu atingerea musculaturii oculare, a membrelor, a trunchiului si, în cazuri severe, a muschilor respiratori.

Maladia este asociata cu sinteza anticorpilor *anti-receptor de acetilcolina* (Ach), prezent pe membrana celulei musculare la nivelul placii motorii, prin intermediul careia neuronul intra în contact cu fibra musculara. Receptorii sunt localizati la vârful pliiurilor membranei postsinaptice ale fibrelor muschilor striati si sunt proteine alcatuite din trei catene (α , β , γ). Ei leaga acetilcolina eliberata din terminatia nervoasa, în fanta sinaptica. Acetilcolina este eliberata de potentialul presinaptic si ca raspuns, se deschid canalele cationice specifice pentru Na, producându-se depolarizarea locala a membranei postsinaptice si declansarea potentialului de actiune al muschiului. Imunizarea iepurelui cu receptori purificati de Ach din organul electric de peste *Electrophorus*, produce autoanticorpi anti-receptor de Ach si simptome

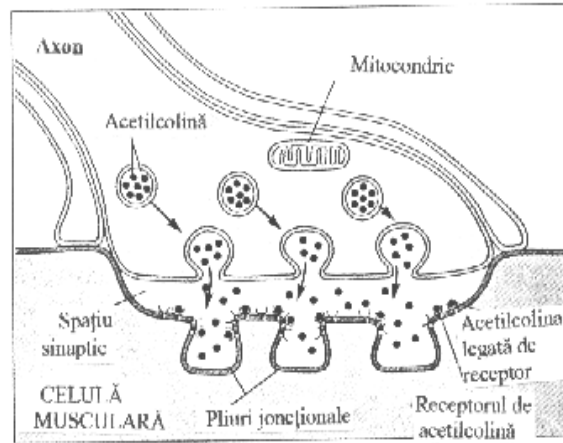
asemanatoare cu *myasthenia gravis*. Legarea anticorpilor de receptorul de Ach, blocheaza legarea Ach si functia canalelor ionice.

Maladia afecteaza indivizi de la vârsta copilariei, pâna la cei vârstnici.

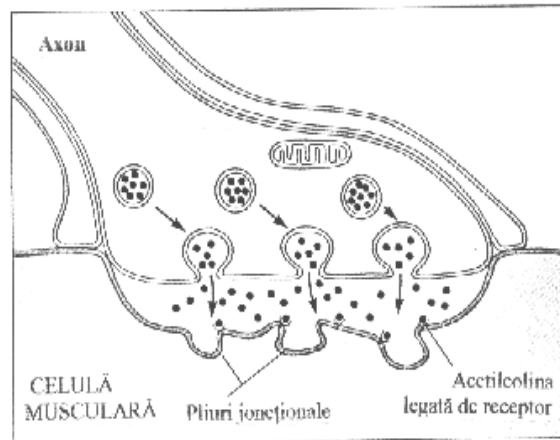
Leziunile placii motorii pot fi amplificate prin mecanisme dependente de complement. La nivelul placii motorii, numarul receptorilor de acetilcolina diminueaza semnificativ. Odata cu pierderea receptorilor se instaleaza *oboseala musculara*, trasatura clinica esentiala a maladii, pentru ca impulsul nervos, chiar daca elibereaza o cantitate normala de acetilcolina, nu este urmat de contractia musculara. Muschiul nu este afectat, iar receptorii de acetilcolina se reînnoiesc cu o rata optima. Oboseala musculara se datoreaza scaderii numarului si functiei receptorilor de acetilcolina. Pierderea receptorilor de acetilcolina, diminueaza sensibilitatea membranei postsinaptice la acetilcolina. Astfel, potentialele electrice produse de eliberarea acetilcolinei din terminatia nervoasa motoare au o frecventa redusa, scade amplitudinea lor si diminueaza amplitudinea contractiei.

Autoanticorpii fata de receptorii de acetilcolina se detecteaza la 85-90% din pacientii cu *myasthenia gravis* generalizata si la 50-60% dintre cei cu maladia limitata la musculatura oculara. Practic, sunt absenti la persoanele sanatoase.

Eliminarea anticorpilor din sânge este conditia recuperarii. Sinteza anticorpilor poate fi inhibata prin supresia limfocitelor B producatoare de anticorpi. Anticorpii plasmatici pot fi eliminati prin procedeul plasmaferezei.



a



b

Fig. 130. *Myasthenia gravis* presupune pierderea recepto-rilor de acetilcolina (Ach) de la jonțiunea neuromuscu-lara. **a.** O sinapsa neuro-musculara normala are un numar mare de receptori ce leaga Ach. **b.** Pacientii miastenici au un numar semnificativ mai mic de receptori de Ach.

Serul de la miastenicii negativi pentru anticorpii anti-receptor de acetilcolina poate sa transfere maladia la animale de experienta, sugerând ca maladia poate fi produsa de anticorpi fata de o alta proteina.

Titrul anticorpilor nu se coreleaza cu severitatea bolii, ceea ce

sugereaza rolul preponderent al altor factori (neimunitari) în evolutia maladiei.

La jonctiunea neuro-musculara, în stadiile de acutizare a simptomatologiei, se gasesc macrofage.

În special la persoanele tinere afectate de *myasthenia gravis*, timusul se maresta, rezultând un *timom* de natura epiteliala, limfoida sau mixta, iar alteori timusul ramâne nemodificat. În 70-80% din cazurile de timom, în timus se formeaza centrii germinativi, ceea ce denota o sinteza locala a anticorpilor. Rareori, timomul este un epiteliom. Efectul favorabil se obtine prin timectomie, ceea ce a stimulat identificarea unui factor timic circulant, susceptibil de a deprima conducerea neuromusculara. Goldstein a izolat, din timusul de vitel, un factor polipeptidic, cu greutatea mulara de 6000 D, pe care l-a denumit *timopoetina*, cu un posibil rol în diferentierea limfocitelor T.

La persoanele vârstnice, timusul este atrofie. La jonctiunea cortico-medulara se gasesc celule mioide, cu receptori de acetilcolina de tip extrasinaptic (embrionar). Maladia poate fi initiata în timus, fata de receptorii de acetilcolina ai acestor celule, iar ulterior se extinde fata de receptorul sinaptic de acetilcolina.

Maladia se reproduce experimental la iepure, prin imunizarea organismului cu receptori de acetilcolina, purificati din organul electric de *Electrophorus*. Forta musculara se reduce, ca si în situatia clinica umana. În serul pacientilor se gasesc autoanticorpi cu alte specificitati: anti-muschi striati, anti-nucleari, anti-muschi netedi, anti-celula parietala de stomac.

Ciroza biliara primara

Ciroza biliara primitiva (CBP) fara antigenul HBs este o maladie cronica enigmatica a ficatului, caracterizata prin obliterarea inflamatorie progresiva a ductelor biliare intrahepatice. Limfocitele T se infiltreaza si distrug cele mai mici *ducturi biliare intrahepatice*, rezultatul fiind obstructia biliara progresiva lenta, icter si în final, ciroza. Maladia se detecteaza cu precadere la femei, cu o varietate de autoanticorpi, cu complexe imune circulante si activarea complementului, cu disfunctia celulelor T reglatoare, cu defecte de comutare izotipica a sintezei imunoglobulinelor, cu predominanta celulelor T în infiltratele hepatice periductale.

Autoanticorpii sunt specifici fata de autoantigenele tiroidiene, anti-muschi netedi, anticorpi fata de antigenele nucleare. Autoanticorpii anti-tiroidieni sunt citotoxici, dar semnul distinctiv al maladiei este conferit de *anticorpii anti-mitochondriali*, cu titru înalt, la 90% dintre

pacientii cu ciroza. Anticorpilor anti-mitocondriali nu au specificitate de organ si nici de specie.

Titrul seric al imunoglobulinelor creste, iar proteinele complementului diminueaza cantitativ, datorita activarii cascadei. Scade numarul limfocitelor TCD₄ si TCD₈.

La examenul histologic, ductele biliare sunt înconjurate si penetrate de limfocitele T infiltrate, în special CD₈, care formeaza adevarate granuloame, ceea ce este neobisnuit pentru patologia autoimuna. În mod normal, epiteliul ductelor biliare exprima numai molecule CMH I, dar la pacientii CBP, celulele epiteliale biliare exprima si molecule CMH II. Aparitia acestor molecule poate fi relevanta si definitorie pentru ciroza biliara primitiva autoimuna, pentru ca celulele epiteliale ale ductelor biliare pot avea rolul de celule prezentatoare de antigen pentru limfocitele TCD₄.

Autoanticorpilor specifici antimitocondriali constituie semnul distinctiv al CBP. Anticorpilor recunosc proteine majore ale membranei mitocondriale interne. Proteinele mitocondriale sunt enzime intracelulare, componente ale unor complexe enzimatice mari. Autoanticorpilor par a fi orientati fata de situsurile functionale ale enzimelor, deoarece interfera cu functiile lor metabolice. Diagnosticul se bazeaza pe capacitatea serului de la pacientul cu CBP de a *inhiba* activitatea catalitica a complexului enzimatic al *piruvat-dehidrogenazei*.

Mecanismul molecular al etiologiei acestei maladii autoimune nu este înteles. Este posibil ca antigenele unui agent infectios sa dea reactie încrucisata cu autoantigenele mitocondriale. Pe de alta parte, autoantigenele sunt sintetizate în citoplasma si transportate în mitocondrii. Mutatiile în secventa leader sau defecte ale degradarii lor, pot duce la generarea unor molecule noi si la exprimarea lor pe membrana celulei, unde devin tinta reactivitatii imunitare. Autoanticorpilor anti-mitocondriali nu au efect patologic. Transplantul ficatului normal la un pacient cu CBP nu este urmat de manifestarile patologice, desi anticorpilor antimitocondriali persista.

Sindromul Wiskott-Aldrich este x-lincat si se caracterizeaza prin trombo-citopenie si sângerari. Nivelul IgG este scazut, iar IgA si IgE sunt crescute.

Sterilitatea imuna a barbatilor este caracterizata prin sinteza anticorpilor în lichidul seminal, specifici fata de antigenele spermatozoizilor, care imobilizeaza spermatozoizii, iar la titru înalt, produc chiar aglutinarea lor. Anticorpilor se sintetizeaza local, în structurile epididimului, deoarece concentratia lor este mult mai înalta decât în sânge.

Maladia Addison

Maladia Addison survine ca o consecinta a distrugerii tesutului *suprarenalian*, în proportie de 90%. Tesutul poate fi distrus pe cale chirurgicala, datorita tuberculozei renale, histoplasmozei, criptococozei, prin mecanism autoimun sau datorita altor cauze necunoscute (maladia Addison idiopatica).

În maladia Addison autoimuna, tesutul glandular este infiltrat cu limfocite, iar în ser se gasesc autoanticorpi specifici fata de antigene din citoplasma celulelor corticosuprarenalelor, cu specificitate de organ. Autoanticorpii sunt detectabili la circa 80% dintre pacientii cu boala Addison de natura autoimuna.

Tehnica imunofluorescentei evidentiaza ca autoanticorpii reactioneaza cu toate cele trei straturi celulare ale corticosuprarenalei. Serul unor pacienti reactioneaza cu antigene ale celor trei zone corticale, alte seruri reactioneaza cu zona fasciculata si cu zona reticulata si o mica proportie reactioneaza numai cu zona glomerulara, ceea ce sugereaza heterogenitatea bolii Addison, cu implicarea preferentiala a diferitelor antigene ale corticosuprarenalei.

Anticorpii serici dau reactie încrucisata si cu antigenele altor celule care secreta hormoni steroidici: cu celulele trofoblastice ale placentei ce secreta HCG; cu celulele interstițiale testiculare Leydig; cu celulele corpului galben ovarian.

Celulele zonei corticale se distrug, iar acolo unde mai ramân, nu mai pastreaza arhitectura normala a distributiei în cele trei zone corticale. Celulele sunt hipertrofiate si au aspect vacuolar. Tesutul corticosuprarenalian este infiltrat cu macrofage si plasmocite. Zona medulara este intacta sau infiltrata cu un numar mic de celule limfoide.

Boala Crohn si colita ulcerativa

Boala Crohn si colita ulcerativa sunt maladii ulcerative ale *intestinului gros*. Ambele constau dintr-un infiltrat intens al macrofagelor si limfocitelor, cu un numar mare de celule plasmaticice. In colita ulcerativa, modificarea patologica consta în inflamatia difuza, cu ulcere ale mucoasei. Este implicata numai mucoasa, fara straturile profunde.

În boala Crohn, infiltratul inflamator formeaza adeseori granuloame si se poate extinde în stratul muscular. Se sintetizeaza predominant IgG. Marimea zonei mucoase infiltrate este diferita. Simptomele principale sunt diareea si hemoragia colica.

Leziunile colice sunt induse de anticorpii sintetizati fata de

antigenele bacteriene, care dau reactie încrucișata 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 boală 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 dezechilibri 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. Boala 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 37⁰) sau IgM, *de reacție la rece* sau *crioglobuline** (se fixează pe hematii la temperaturi mai mici de 30⁰, în capilarele periferice, în sezonul rece). Cea mai comună este boala 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 37⁰, condiții în care se fixează și complementul și de aceea s-a denumit *hemoliza 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

fagociteaza în absenta C3b, dar în prezenta C3b, captarea lor este mai rapida. Hemoliza este aproape totdeauna extravasculara si celulele tapetate cu IgG sunt epurate în special în splina. De aceea, splenectomia este o masura strategica, cu remisiune partiala a maladii.

Anticorpilor adsorbiti pe suprafata hematiilor pot fi IgG sau IgM, dar pentru ca nu produc aglutinarea, s-au numit în mod eronat, *anticorpi incompleti*. Evidentierea anticorpilor adsorbiti pe hematii se face prin *testul Coombs direct*, denumit si *testul antiglobulinic* *.

Testul detecteaza orice anticorp fixat pe suprafata hematiilor(anticorpi anti- Rh sau specifici fata de alte antigene eritrocitare) si utilizeaza antiseruri monospecifice marcate cu fluorocromi, obtinute pe iepure, fata de antigenele purificate: seruri anti-IgG, anti-IgM, anti-C3, anti-C4. Serurile imune monospecifice se pun în contact cu eritrocitele bolnavului. Daca pe suprafata lor sunt adsorbiti anticorpii, se evidentiaza fluorescenta sau, daca titrul autoanticorpilor este prea mare, se produce chiar aglutinarea hematiilor.

Purpura trombocitopenica este o maladie autoimuna, caracterizata prin diminuarea numarului plachetelor sanguine, pâna la 1/10 din valoarea normala. In serul pacientilor se detecteaza anticorpi antiplachetari. Serul pacientilor determina aglutinarea plachetelor indivizilor normali si liza în prezenta complementului.

Pemphigus este o maladie a pielii si a membranelor mucoase, caracterizata prin *acantoliza*, adica pierderea aderenței intercelulare si prin sinteza autoanticorpilor ce se fixeaza pe suprafata celulelor epidermice. Anticorpilor au specificitate fata de dezmosom, o componenta structurala cu rol în coeziunea celulelor epidermice. Autoanticorpilor nu sunt declansatori ai maladii, dar au rol important în progresia ei. Imunofluorescenta directa a epidermei lezate, evidentiaza imunoglobulinele legate pe suprafata celulelor epidermice. Nivelul anticorpilor anti-celule epidermice se coreleaza cu gravitatea leziunilor, iar îndepartarea anticorpilor prin plasmafereza este urmata de ameliorarea clinica. Maladia poate fi transferata pasiv, prin ser sau imunoglobuline de la pacienti. Anticorpilor anti-epidermici apartin subclasei IgG4.

Miozita este o maladie idiopatica(cauza necunoscuta) inflamatorie a muschilor, cu o componenta autoimuna. Adeseori, pacientii prezinta autoanticorpi specifici pentru una sau alta dintre maladiile autoimune. Cel mai adesea, autoanticorpilor sunt specifici fata de proteinele sau ribonucleoproteinele cu rol în sinteza proteica si se cupleaza cu ARN.

Cei mai studiatii sunt autoanticorpilor fata de *histidil-ARNt sintetaza*

si respectiv glicil-, alanil-, treonil-, izoleucil-ARN sintetaza. Anticorpilor se cupleaza cu ARN si inhiba actiunea enzimei. Titrul lor este variabil, în raport cu stadiul maladiei. Enzimele nu se gasesc pe suprafata celulelor musculare, dar se elibereaza prin liza celulelor musculare consecutiva infectiei cu un picornavirus miotropic, ca de exemplu virusul encefalomiocarditei. Aceste virusuri pot produce miozita si ARN viral poate fi substratul aminoacil-ARNt-sintetazei. Rolul autoanticorpilor în progresia acestei maladii este îndoielnic.

Alta componenta citoplasmatica, inductoare a sintezei anticorpilor este *miozina*. Miocardita, infarctul miocardic, chirurgia valvulara, grefarea arterelor coronare bypass induc sinteza anticorpilor antimiozina, dar nu se cunoaste rolul lor patologic.

În concluzie, reactiile autoimune, caracterizate prin sinteza autoanticorpilor si generarea limfocitelor Tc autoreactive, însotesc multe maladii. Uneori, ele progreseaza spre maladii autoimune. Autoanticorpilor specifici fata de componente ale suprafetei celulare (de exemplu, receptori de hormoni) sunt inductori ai proceselor patologice, iar cei specifici fata de tinte extracelulare (molecule circulante, matricea extracelulara) pot sau nu sa produca leziuni. Anticorpilor specifici fata de tinte intracelulare produc efecte patogene, daca antigenul este eliberat din celula si devine accesibil sistemului imunitar, daca antigenul este orientat gresit si expus pe suprafata celulei sau daca o molecula ce da reactie încrucisata are o localizare accesibila fixarii anticorpilor.

Anticorpilor își exercita efectele prin agregare, blocaj, stimulare, opsonizare, fixarea C, sensibilizare la actiunea altor celule efectoare.

Capitolul 9

IMUNODEFICIENȚELE

Organismele imunodeficientare 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 imunodeficienti, a evidențiat faptul că cele două compartimente celulare ale sistemului limfoid sunt semiautonome, 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 *înscrute* (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 *deletii 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 *perturbarii 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 imunodeficiente se datoreaza sintezei deficitare a anticorpilor, 10% sunt imunodeficiente celulare, 20% sunt imunodeficiente combinate, 18% sunt deficiente ale fagocitelor si 2% sunt deficiente ale proteinelor complementului.

Imunodeficientele înascute

Imunodeficientele înascute (primare) au fost descoperite de O. Bruton (1952), odata cu descrierea *agamaglobulinemiei* si *hipogamaglobulinemiei* infantile sex-lincata. Maladia afecteaza baietii si se transmite prin cromosomul X. Pacientii ramân asimptomatici în primele luni de viata, deoarece în aceasta perioada imunoglobulinele materne asigura protectia antiinfectioasa. Dupa vârsta de 5-6 luni, pacientii devin foarte sensibili la infectiile tegumentare cu bacterii piogene si la infectii ale tractului respirator cu streptococi, meningococi, *H. influenzae*. Pacientii sunt lipsiti de reactivitatea imunitara mediata humoral. In tesuturile limfoide lipsesc plasmocitele, iar foliculii limfoizi nu se formeaza nici dupa stimularea antigenica repetata. La electroforeza, serul pacientilor nu releva fractia gamaglobulinica. IgG are concentratia de 1/10 (1 mg/ml fata de 10 mg/ml), iar IgM are concentratia de 1/100 din valorile normale. Lipsesc IgA, dar lipsesc si hemaglutininele α si β . În mod normal limfocitele B reprezinta 5-18% din totalul limfocitelor circulante, dar la acesti pacienti, proportia lor este foarte mica (mai putin de 0,1%). Absenta limfocitelor B mature se datoreaza defectelor de maturare, determinate de *tirozin-kinaza* nefunctionala, codificata de gena mutanta.

Pacientii au reactivitate normala a imunitatii mediate celular: testul hipersensibilitatii întârziate la tuberculina este pozitiv, resping alogregele, limiteaza infectiile virale, cu exceptia hepatitei B (care evolueaza rapid spre ciroza) si a celor cu enterovirusuri. Limfocitele T au valori numerice normale. Vaccinurile virale atenuate sunt bine suportate si nu produc infectii clinice.

Disgamaglobulinemiile selective se caracterizeaza prin incapacitatea sintezei unui anumit izotip imunoglobulinic. Se cunosc deficiente selective ale IgM, IgA sau ale IgM si IgA, IgA si IgG, IgM si IgG.

Deficientele IgA se asociaza cu o frecventa crescuta a infectiilor tractului digestiv si respirator, iar deficientele sintezei IgG si IgM se însotesc cu cresterea sensibilitatii fata de infectiile tegumentare cu bacterii piogene: *Streptococcus*, *Staphylococcus*.

Agama-, hipogama- si disgamaglobulinemiile selective se

amelioreaza net, prin administrarea intravenoasa a gamaglobulinelor.

Sindromul Di George este consecinta hipoplaziei sau ageneziei timice. In cursul vietii embrionare se produce o perturbare a dezvoltarii structurilor derivate din perechile a 3-a si a 4-a de pungi faringiene. Agenezia timica este însoțita de absenta paratiroidelor si de aceea, pacientii, initial, prezinta alte simptome: hipocalcemie, malformatii cardiace. Timusul este foarte redus ca dimensiuni sau chiar lipseste la 1/3 dintre pacienti. Adeseori, timusul exista sub forma glandelor ectopice. Imunitatea mediata humoral este normala, reflectata în valorile normale ale concentratiei imunoglobulinelor.

Daca supravietuiesc, la câțiva ani, pacientii manifesta sensibilitate înalta fata de infectiile virale, fata de bacteriile intracelulare sau fata de infectia fungica cu *Pneumocystis carinii*.

Imunodeficienta severa combinata (SCID) se caracterizeaza prin deficitul ambelor compartimente ale imunitatii, atât celular, cât si cel humoral. Deficienta se datoreaza absentei *celulelor stem* de origine a limfocitelor. Lipsesc limfocitele T, B si granulocitele, datorita hipoplaziei generalizate a *tesutului reticular hematopoetic*. Organele limfoide secundare sunt hipoplazice, iar timusul este absent. Lipsesc imunoglobulinele serice.

Pentru restabilirea functiei imunitare se impune *transplantul maduvei osoase*.

Imunodeficientele dobândite

Imunodeficientele dobândite (secundare) cuprind diverse maladii, datorate unor cauze patologice care interfera direct sau indirect cu functia imunitara.

Imunodeficientele dobândite pot fi cauzate de *hipercatabolismul* imunoglobulinelor. Concentratiile serice ale imunoglobulinelor reflecta raportul dintre rata sintezei si rata catabolismului acestor molecule. Cresterea ratei catabolismului poate sa conduca la o deficiente selectiva a unei clase de imunoglobuline, ce se manifesta prin *hipoproteinemie*.

Imunodeficientele dobândite se pot datora *pierderii excesive* a imunoglobulinelor, la nivelul tractului urinar sau gastrointestinal. Pierderea urinara este consecinta defectelor renale glomerulare, a unor disfunctii tubulare sau unor defecte combinate.

Deficientele glomerulare sunt asociate cu pierderea proprietatilor de sita ale endoteliului capilarelor glomerulare. Moleculele imunoglobulinice mici (IgG) trec în urina cu o rata superioara fata de moleculele mari (IgM). Totusi, IgG₃ si IgG₄ ramân normale, ceea ce

sugereaza ca, în afara greutatii moleculare, sunt importanti si alti factori care conditioneaza functia filtrului renal. Nivelul seric al IgG scade, proportional cu gradul perturbarii functiei de sita a endoteliului glomerular, iar IgM ramâne normal.

A II-a cale majora a pierderii majore a imunoglobulinelor este tractul gastrointestinal, la nivelul vaselor limfatice. Cele mai multe situatii patologice la acest nivel nu induc hipogamaglobulinemie, cu exceptia *limfangiectaziei intestinale*. Aceasta se caracterizeaza prin dilatarea excesiva a canalelor limfatice si este însoțita de pierderea masiva de proteine si chiar a limfocitelor. Dilatarea vaselor limfatice este cauzata de obstructia limfatica, datorita unei infectii (de exemplu, tuberculoza), unei malignitati (limfom) sau datorita cresterii presiunii hidrostatice în insuficienta cardiaca severa congestiva. Rata sintezei imunoglobulinelor este normala sau crescuta, dar turnover-ul este rapid, datorita pierderii excesive a proteinelor la nivel intestinal.

Imunodeficiente datorate micronutrientilor. Deficienta fierului creeaza conditii predispozante pentru candidoza mucocutanata cronica. Deficienta zincului supreseaza functia celulelor T si predispune la infectii oportuniste. Seleniul este important pentru functia celulelor T. Deficienta partiala la copii, predispune la infectii.

Imunodeficiente induse de medicamente. Cele mai multe medicamente *citotoxice* si *imunosupresoare*, utilizate în tratamentul malignitatilor, al inflamatiilor si în imunosupresia pacientilor cu transplant de organe, deprima functia imunitara celulara si humorala, iar neutropenia predispune la infectii cu bacterii Gram negative si la infectii fungice. Compusii *steroidici* utilizati în tratamentul maladii reumatismale, *ciclofosfamida* si *azatioprina*, folosite în tratamentul neoplaziilor, dupa administrare prelungita, deprima imunitatea mediata celular, dar si nivelul seric al imunoglobulinelor.

Unele imunodeficiente sunt consecutive altor procese patologice, care interfera cu efectorii sistemului imunitar: *deficienta renala* sau *hepatica* are ca efect acumularea substantelor toxice în organism, cu efect supresor asupra reactivitatii imunitare.

Dezechilibrul *endocrin*, cu producerea în exces a cortizonului suprarenalian (în maladia Cushing) este asociat cu imunodeficienta. Cortizonul lizeaza limfocitele T si B circulante si diminueaza monocitele periferice.

Starile neoplazice, în special cele care afecteaza sistemul imunocitar, monocitar sau granulocitar induc un deficit al functiei imunitare. În maladia Hodgkin – neoplazia liniei monocitare a ganglionilor limfatici – se instaleaza deficienta imunitatii mediate celular, dar imunitatea humorala este normala. În alte malignitati, efectele

neoplaziei asupra sistemului imunitar, nu s-au putut disocia de efectele provocate de casexie.

Mielomul multiplu (tumora plasmocitara localizata în maduva osoasa) este însoțit de scaderea cantitativa severa a tuturor claselor de imunoglobuline normale si de aici, deficiente ample ale imunitatii humorale, dar imunitatea celulara ramâne normala.

Imunodeficienta consecutiva infectiei cu HIV

Imunodeficienta consecutiva infectiei cu virusul HIV este, în esenta, expresia incapacitatii organismului uman de a neutraliza virionii, în timpul fazei *acute* a infectiei. Dupa contactul primar cu antigenele HIV, organismul se apara prin mecanisme imunitare specifice. Se sintetizeaza anticorpi specifici, la un titru crescut. Testul ELISA pentru diagnosticul infectiei cu HIV se bazeaza pe detectarea anticorpilor anti-HIV. Titrul maxim al anticorpilor se coreleaza în timp, cu nivelul viremiei.

Imunitatea mediata celular anti-HIV se detecteaza foarte timpuriu dupa infectie si este dominata de numarul mare de limfocite TCD₈, al caror numar creste de 10-20 de ori fata de valorile normale (200-600/μl). Ele manifesta activitate citotoxica specifica anti-HIV si lizeaza limfocitele infectate, care expun pe suprafata lor, proteinele *env* (SU si TM).

Limfocitele TCD₈ diminueaza viremia primara, atât prin efect *citotoxic* direct asupra celulelor în care virusul se replica, cât si prin efect represor asupra replicarii virale, mediat de citochine. Celulele NK lizeaza celulele infectate prin mecanismul ADCC.

Raspunsul imun primar, humoral si celular represeaza replicarea virala dupa infectie. Desi foarte energic, raspunsul imun primar nu elimina complet virusul si nici celulele infectate. Organismul nu se sterilizeaza deoarece anticorpii specifici anti-HIV, produsii în timpul infectiei primare, nu au activitate neutralizanta optima. Anticorpii raspunsului imun primar, în esenta, *nu au efect protector*, deoarece raspunsul imun este neadecvat, fie cantitativ, fie calitativ. O proportie importanta a virionilor nu este neutralizata, pastrându-si infectiozitatea. Ramân de asemenea, multe celule infectate cu virus, în special în ganglionii limfatici, atât limfocite cât si celule foliculare dendritice.

Anticorpii neutralizanti se detecteaza mai târziu, dupa trecerea de la faza acuta a infectiei, *la faza cronica*. Probabil ca anticorpii neutralizanti sunt specifici fata de epitopii care nu sunt expusi pe virionii asamblati în cursul infectiei primare sau anticorpii raspunsului imun secundar sufera fenomenul maturarii de afinitate si se leaga mai eficient de epitopi.

Pe măsura ce infecția progresează, anticorpii neutralizanti 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. Grupurile 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/μl. 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 divida, 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 organismele 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 heterosexuala, mai ales la femei, care transmit infecția fatului.

Capitolul 10

IMUNOLOGIE TUMORALA

Dupa malignizare, membrana citoplasmatica este cea mai modificata structura celulara. Semnalele reglatoare de control al cresterii si multiplicarii, care actioneaza în primul rând prin intermediul receptorilor membranari, nu-si mai gasesc tinta structurala. Incapacitatea celulelor de a receptiona semnalele reglatoare ale cresterii si diviziunii sau de a raspunde adecvat acestor semnale, este cauza principala a comportamentului invaziv al celulelor maligne. Pierderea inhibiției de contact este reflectarea modificarilor suprafetei celulare.

Adeseori, malignizarea este însoțita de sinteza unor molecule noi, localizate în oricare din compartimentele celulei si care se comporta ca *antigene tumorale*.

Orice structura chimica a celulei maligne, absenta în sau pe celulele normale ale tesutului de origine a tumorii, susceptibila de a induce o reactie imunitara la gazda primara sau dupa injectare la o noua gazda, poate fi considerata ca antigen tumoral.

ANTIGENE TUMORALE

Se disting urmatoarele categorii de antigene tumorale:

1. *Antigenele tumorale de diferentiere*, denumite si *antigene oncofetale*, deoarece se gasesc atât pe suprafata celulelor unor tumori, dar sunt prezente si în timpul unei faze de diferentiere embrionara. Ele lipsesc pe suprafata celulelor organismului adult sau se gasesc în cantitati foarte mici, nedectabile.

a) *Antigenul carcinoembrionar (CEA)* s-a izolat din sângele unui pacient cu cancer de colon (1965). Este o glicoproteina de 180-200 kD, localizata pe membrana celulelor normale ale tractului digestiv la fat, dar se gaseste în cantitati foarte mici la subiectii normali adulti.

La fat, CEA este sintetizat în celulele mucoasei gastro-intestinale si este concentrat în glicocalix, pe suprafata luminala a acestor celule. In celulele embrionare normale, CEA pare a avea rol în aderența celulara, dar probabil favorizeaza metastazarea celor maligne.

CEA este un grup foarte heterogen de molecule, cu o cantitate foarte variabila de glucide. Raportul proteine/glucide variaza între 1/1 si 1/5. Componenta glucidica este reprezentata, în primul rând, de acidul sialic. Imunogenitatea moleculei este conferita de componenta proteica.

La adult, CEA se gaseste în cantitati mici pe mucoasa colonului, în plamân, în tesutul mamar, dar reapare în cantitati mari pe celulele maligne ale tractului digestiv uman (intestin subtire, pancreas, ficat, stomac, colon, rect). CEA se gaseste nu numai asociat suprafetei celulelor maligne, dar trece si în sângele a 60-80% dintre pacientii cu cancer de colon. Nu se cunoaste mecanismul prin care CEA ajunge în sânge.

Din sângele pacientilor neoplazici, CEA sintetizat de celulele maligne, este epurat la nivelul ficatului. De aceea, cele mai mari concentratii de CEA apar la neoplazicii cu insuficienta hepatica (metastaze hepatice, ciroze).

CEA este un *antigen nespecific*, deoarece poate sa apara, în concentratii mici (10 ng/ml), în sângele unor pacienti cu maladii nemaligne: la cei cu ciroza alcoolica a ficatului sau cu insuficienta renala, astfel ca speranta detectarii cancerului prin depistarea CEA în sânge, s-a naruit.

Leziunile de orice natura ale mucoasei tractului gastrointestinal sunt însoțite de cresterea sintezei si secretiei CEA, care trece si în sânge: în maladia inflamatorie a intestinului, în colita ulcerativa, polipi ai tractului digestiv, tumori ale tractului gastrointestinal.

Unele tumori secreta CEA, mai ales dupa o metastazare hepatica (adenocarcinomul colonului, tumorile de pancreas, ficat, plamân).

Nivelul CEA foarte crescut, reflecta o evolutie rapida a tumorii.

b) *Alfafetoproteina (AFP)* este o glicoproteina majora a fatului timpuriu, o globulina normala (69 kD) a sângei fetal uman si a celorlalte mamifere, descoperita în 1956. Continutul glucidic este de 3,5%. Din punct de vedere structural, AFP este asemanatoare albuminei. Genele codificatoare ale celor doua proteine au organizare similara. AFP se detecteaza în plasma la embrionul de 4 saptamâni si creste rapid în primul trimestru de sarcina. Nivelul maxim (2-3 mg/ml) se gaseste la fatul de 14 saptamâni si scade la valorile caracteristice adultului, la vârsta de 6-10 luni. AFP se gaseste nu numai în plasma, ci si în fluidele fetale: lichidul amniotic, lichidul cerebrospinal, urina. Cantitati mici de AFP (500 ng/ml) strabat placenta si se gasesc în serul femeilor gravide.

În timpul vietii fetale, AFP se sintetizeaza în ficat, în celulele gastrointestinale. La adultul normal, concentratia sa este nedetectabila prin metodele imunochimice obisnuite, dar creste în neoplaziile de

carcinom hepatic. Circa 70% din cancerele 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 afecțiunile inflamatorii ale intestinului: boala Crohn, colita ulcerativă.

AFP este un marker util pentru depistarea cancerului hepatic la populațiile cu risc înalt (chinezi, japonezi, eschimosi din Alaska), dar este inutilă pentru celelalte populații, datorită creșterii nivelului sau în afecțiuni nemaligne.

În lichidul amniotic, nivelul crescut al AFP este asociat cu defecte ale tubului neural (spina bifidă).

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-antichimotripsina, ceea ce influențează valorile furnizate de determinarea sa cantitativă.

PSA crește mult în cancerul prostatic, cel mai comun cancer la vârsta de peste 75 de 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 si se detecteaza în ser, saliva, ori sunt adsorbite pe eritrocite. Ele s-au identificat odata cu disponibilitatea anticorpilor monoclonali: CA 15-3, CA 125, asociate cu cancerule ovariene, CA 19-9, identificat într-o tumora colorectala (CA = cancer associated). Modificarea cantitativa a glucidelor membranare poate modifica dramatic malignitatea, influentând potentialul de metastazare.

Markerii tumoralii imunoglobulinici se identifica prin electroforeza serului sau a urinii. Apartin izotipurilor IgG, A, M, E sau sunt catene k sau λ libere. Aproximativ, 1% din adulti au *proteine serice M* (monoclonale), iar din acestea 25% au semnificatie nedeterminata. 50% din totalul proteinelor serice M sunt datorate mielomului multiplu. Determinarea proteinelor M în sânge sau urina este utila pentru monitorizarea raspunsului la terapie.

b) *Antigenele specifice fiecărei tumori* sunt *antigene individuale* (TSTA = tumor specific transplantation antigen), proprii fiecărei tumori. Sunt exprimate numai în celulele tumorale si nu sunt niciodata detectabile în tesuturile normale. Sunt caracteristice tumorilor induse chimic (L. Gross, 1953). Chiar tumorile multiple induse de acelasi agent chimic (metilcolantren), în acelasi tesut (tegument) al unui organism, sunt diferite în ceea ce priveste specificitatea antigenelor de transplantare. Aceasta semnifica faptul ca informatia genetica declansatoare a malignizarii, rezida în gene diferite, care sufera mutatie sub actiunea agentului chimic.

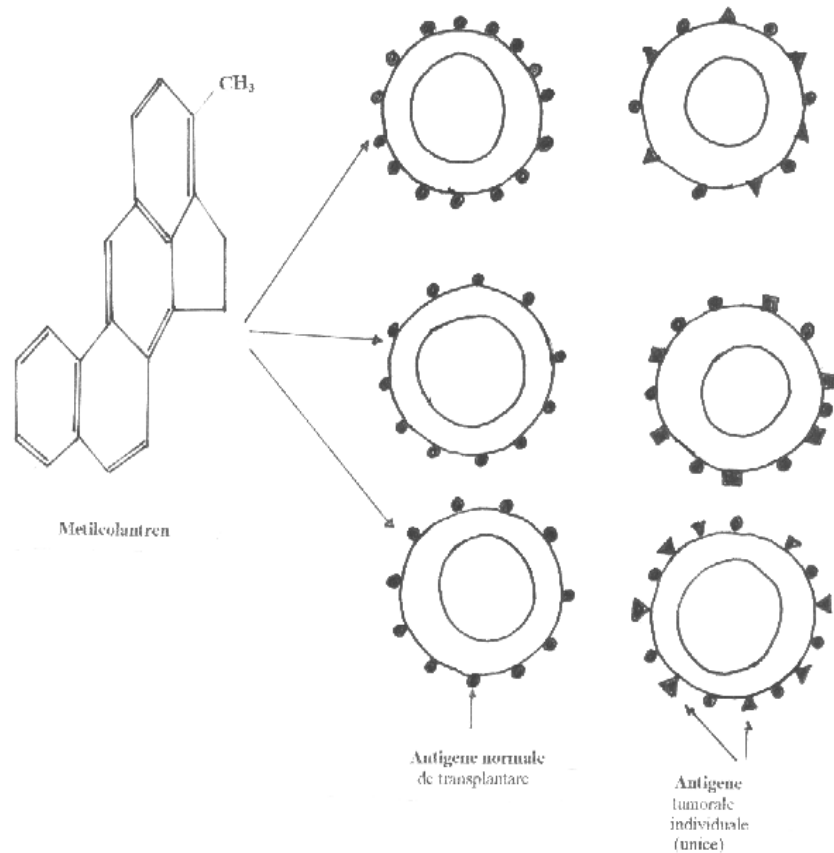


Fig. 131. Tumorile tegumentare induse de un agent chimic (de exemplu, metilcolantrenul) poseda *antigene tumorale strict individuale*.

Toate celulele unei tumori induse de metilcolantren sunt identice din punct de vedere antigenic, fapt demonstrat experimental: soarelele imunizat cu mojarat de celule tumorale, respinge ulterior o grefa de celule vii ale aceleiasi tumori.

Datorita unicitatii lor antigenice, fiecare tumora indusa chimic, stimuleaza imunitatea fata de antigenele proprii, iar reactiile încrucisate sunt absente totdeauna.

Antigenele tumorale specifice de transplantare sunt complexe *glicoproteice* sintetizate în celula si inserate în membrana citoplasmatica.

Celulele maligne pot sa prezinte simultan, atât antigene tumorale comune, cât si 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 *oncodnavirusuri* 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 oncodnavirusuri, 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 greață 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 oncodnavirusuri 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 oncovirusuri.

Antigenele tumorilor induse de oncovirusuri sunt codificate de gena *env* si au specificitate de grup. Multiplicarea oncovirusurilor nu interfereaza cu capacitatea celulelor de a creste si de a se divide. Deoarece antigenele tumorale sunt proteine structurale ale virionilor, imunizarea organismului cu o suspensie virala inactivata, confera protectie fata 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 – HPV₁₆, HPV₁₈)

– limfomul Burkitt si carcinomul nazofaringian (induse de virusul Epstein-Barr)

– leucemia celulelor T mature (indusa de HTLV-1).

4. *Antigenele tumorale codificate de protooncogene*. Mutatiile punctiforme ale oncogenelor – genele ce regleaza cresterea normala si diferentierea - si mutatiile genelor supresoare ale oncogenelor, ca de exemplu, p53 si Rb, produc substitutii ale unui singur aminoacid in catena polipeptidica codificata, care le transforma in antigene tumorale, codificate de genom. Ele au localizare nucleara, citoplasmatica sau membranara. S-au descris peste 10 antioncogene (supresoare ale oncogenelor) si circa 100 de oncogene (de exemplu, genele *ras*), ale caror *mutatii punctiforme* determina sinteza unor molecule cu substitutii punctiforme de aminoacizi, unice sau multiple si care se deosebesc de moleculele normale. Antioncogenul p53 codifica o proteina nucleara, reglatoare a diviziunii celulare. In celulele maligne, p53 se sintetizeaza in exces.

Dupa localizare, antigenele tumorale sunt:

– antigene expuse la suprafata celulei. Sunt cele mai importante, deoarece sunt accesibile efectorilor raspunsului imun (TSTA, TATA);

– antigene intracelulare, localizate in nucleu sau in citoplasma.

Ambele categorii de antigene, se pot elibera fie din celulele vii, fie dupa necroza si se gasesc in circulatie, la distanta de tumora. Eliberarea lor poate stimula raspunsul imun sau are un efect de blocare a reactivitatii imunitare, prin fenomenul de *inundare antigenica*.

Anticorpii antitumorali se obtin prin injectarea celulelor tumorale viabile, ori a mojaratului tumoral, la organisme ale altei linii genetice sau altei specii, care poarta alte molecule CMH. Celulele vor fi respinse ca o grea alogena. Antiserul contine anticorpi anti-antigene tumorale, dar si anticorpi anti-antigene CMH. De aceea, serul imun trebuie absorbit cu antigene tisulare normale. Astfel s-a evidentiat CEA la pacientii cu

tumori de colon si AFP la cei cu hepatoame. Antigenul evidenciat de anticorpi în serul absorbit poate fi un antigen tumoral sau un antigen normal, exprimat abundent pe celulele tumorale.

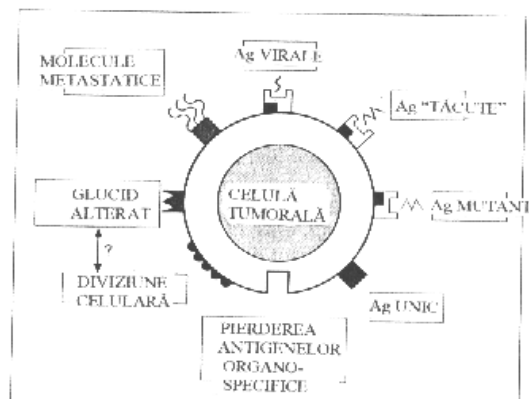


Fig. 132. Modificari ale suprafetei celulei, asociate cu transformarea maligna (dupa Roitt, 1997).

Procesul dezvoltarii tumorii are loc în câteva trepte:

- transformarea celulei normale în celula maligna
- cresterea exponentiala a celulei maligne si constituirea tumorii primare
 - angiogeneza
 - invazia tesutului înconjurator
 - intravazarea si eliberarea celulelor tumorale individuale, în vasele sanguine si limfatice, unde trebuie sa supravietuiasca
 - oprirea celulelor tumorale în diferite localizari (ficat, plamân etc.)
 - extravazarea celulelor tumorale si invazia acestor tesuturi
 - cresterea tumorii la noile situsuri de metastazare si angiogeneza.

Fiecare etapa a dezvoltarii tumorii este influentata de factori imunologici si neimunologici. De exemplu, integritatea conditioneaza interactiunile dintre celule. Cu cât aderența celulelor maligne este mai bine exprimata, cu atât tendința ei de metastazare este mai limitata. Celulele maligne elibereaza unele componente membranare, ca de exemplu, fibronectina. Pierderea fibronectinei pare sa determine scaderea aderenței majoritatii tipurilor de celule maligne si precede metastazarea. Componentele glicocalixului sunt eliberate sub actiunea

proteazelor, pe care le secreta celulele tumorale. Proteazele (din categoria metaloproteazelor) modifica consistenta substantei fundamentale a tesutului conjunctiv, degradeaza colagenul si proteoglicanii, usurând metastazarea si invazia.

RASPUNSUL IMUN ANTITUMORAL

Cresterea anormala este prevenita prin diferite mecanisme de control: mecanisme de reparare a ADN, actiunea genelor supresoare ale oncogenelor (antioncogene) sau prin apoptoza celulelor care au suferit leziuni ireversibile. Daca aceste mecanisme nu mai sunt operative, celula continua sa prolifereze. Celula maligna se afla într-o interactiune dinamica cu micromediul, ce determina supravietuirea sau moartea ei.

Imunogenitatea tumorilor pentru gazda si stimularea timpurie a raspunsului imun antitumoral a condus la formularea conceptului *imunosupravegherii*, în acord cu care, organismele elimina celulele potential canceroase care apar în cursul vietii individuale. Conform acestui concept, cancerul clinic este consecinta scaparii celulelor maligne, de actiunea mecanismelor protectoare. De aceea, factorii care interfera cu reactivitatea imunitara, predisun la malignitate. In conceptia actuala, malignizarea este rezultatul *activarii oncogenelor* sau *pierderii functiei genelor supresoare ale oncogenelor (antioncogene)*.

Teoria supravegherii imune afirma ca sistemul imunitar, monitorizeaza constant organismul, pentru aparitia celulelor tumorale si ca majoritatea acestor celule aberante sunt detectate si lizate de sistemul imunitar, înainte de a produce tumori clinice. Asa se întâmpla cu celulele tumorale intens imunogene. Majoritatea (sau toate) celulele tumorale care apar spontan, sunt imunogene si raspunsul imun inhiba cresterea tumorii.

Argumentele în favoarea sau contra acestei teorii sunt greu de obtinut. Ele sunt extrapolate din observatii asupra tumorilor clinice.

Disparitia spontana a tumorilor si recuperarea completa a pacientilor cu cancer diseminat, este rara, dar exista si este explicata prin insuficienta vascularizatiei, prin procese de diferentiere a celulelor tumorale, prin mecanisme psihosomatice. O explicatie *imunologica*, este ca raportul dintre cresterea tumorii si raspunsul imun antitumoral este în favoarea raspunsului imun. Exista dovezi care sugereaza ca organismul uman raspunde la prezenta tumorilor, prin mecanisme imunitare:

– *regresia spontana*, în special a melanoamelor maligne, a carcinoamelor renale, a neuroblastomului si retinoblastomului,

semnalata în peste 100 de cazuri publicate;

– unele tumori *evolueaza latent*, o lunga perioada, adica cresc foarte încet sau sunt complet inactive si apoi brusc metastazeaza. Latenta se poate explica prin echilibrul dintre tumora si sistemul imunitar;

– frecvent tumorile sunt *infiltrate cu celule mononucleare*: limfocite, monocite, putine plasmocite. Celulele T si macrofagele sunt prezente abundent în tumorile umane, sugerând un raspuns imun antitumoral. Celulele T activate fata de tumora autologa, 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 *reactie inflamatorie* evolueaza mai lent decât cele care nu manifesta un raspuns inflamator;

– tumorile sunt mai frecvente la organisme foarte *tinere* (datorita imaturitatii sistemului imunitar) si la cele *vârstnice* (datorita senescentei sistemului imunitar);

– anumite categorii de tumori (cancerile de piele cu papiloma virus, limfoamele pozitive pentru antigenele EBV) au o incidenta crescuta la pacientii cu transplant, supusi *imunopresiei*. Imunosupresia prelungita (20 de ani), este asociata cu cresterea incidentei tumorilor de origine virala, în timp ce incidenta celorlalte categorii de tumori, creste foarte putin. Dovezile clinice sugereaza ca raspunsul imun este orientat predominant fata de infectia cu virusuri oncogene si neoncogene, iar rata aparitiei altor tumori este relativ nemodificata. Aceasta arata, indirect, ca supravegherea antitumorală este relativ ineficienta. Datele experimentale sprijina ideea ca supravegherea imuna este orientata, în primul rând, fata de virusuri oncogene ADN si nu fata de oncorna- sau fata de tumorile induse de agentii chimici carcinogeni.;

– *celulele metastatice* sunt comune la pacientii cu cancer, dar frecventa implantarii lor si cresterea tumorilor secundare este mica.

Efactorii raspunsului imun antitumoral

Daca sunt prezente, multe antigene tumorale stimuleaza raspunsul imun la animalele de experienta si pot induce o stare de rezistenta antitumorală fata de celulele transplantate. Raspunsul imun antitumoral are o eficienta foarte variabila, în functie de natura antigenelor. Astfel, antigenele induse de virusurile oncogene sau ale tumorilor induse de radiatiile UV, sunt foarte imunogene si stimuleaza raspunsul imun protector, iar antigenele de transplantare ale tumorilor

induse chimic sunt slabe. Tumorile care apar spontan la animale si la om sunt putin antigenice si induc un raspuns imun de mica intensitate.

Antigenele asociate celulelor tumorale sunt recunoscute ca nonself, de sistemul imunitar al gazdei, dar tumorile secreta *antigene solubile*, care tind sa produca fenomenul de inundare antigenica si paralizie imunitara.

Raspunsul imun antitumoral este *humoral* si *celular*. Anticorpilor specifici, de cele mai multe ori, nu au eficienta antitumorală. Cel mai adesea, celulele tumorale supravietuiesc actiunii factorilor humorali si se multiplica. Ineficienta actiunii lor s-a demonstrat în experiente cu celule maligne închise în camere poroase, permeabile numai pentru molecule, amplasate în cavitatea abdominala a unor organisme imunizate cu mojarat de tesut tumoral. Anticorpilor sunt efectori eficienti fata de celulele maligne de origine limfoida (leucemii, limfoame). Dupa activarea complementului, se produce liza celulei tinta.

Efectorii imunitatii antitumorale sunt *celulele*. Rolul lor s-a demonstrat cu acelasi gen de experiente, cu celule maligne plasate în camere poroase, care permit trecerea celulelor efectoare ale raspunsului imun. Rezultatul actiunii celulelor imunitare este liza celulei tinta.

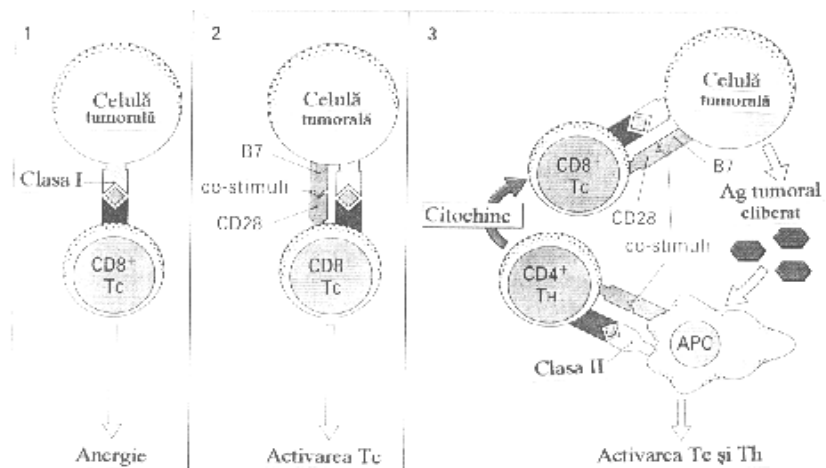


Fig. 133. Antigenul tumoral poate fi prezentat celulelor T, pe diferite cai: direct, în absenta co-stimulilor necesari, rezultatul fiind anergia; direct de celula tumorală care exprima molecule co-stimulatoare, rezultând activarea celulelor Tc; direct de celulele tumorale si indirect via CPA, producând activarea limfocitelor Tc si Th (dupa Roitt, 1997).

Imunitatea celulara antitumorală este mediata de celule capabile să lizeze celulele țintă, prin interacțiune specifică 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. Exprierea moleculelor CMH I poate duce chiar la scăderea 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 soareci congenital atimici sau cei timectomizați 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 efectoră eliberează factori citotoxici solubili: perforină, 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 limfocine).

Activarea celulelor NK și K nu produce memorie imună. Nu există diferențe între răspunsul imun primar și secundar.

Citotoxicitatea mediata de macrofage

Macrofagul neactivat (de la indivizi normali) exprima un nivel minim de *citotoxicitate antitumorală*.

Macrofagul *activat* distinge celulele tumorale de celulele normale și poate să omorie 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—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 secreta diferite molecule antitumorale:

– enzime hidrolitice care degradează țesutul conjunctiv

– IFN- α , activator al celulelor NK

– TNF- α (casetina) 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-arginina.

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 metastază sunt ganglionii limfatici, plămânul, ficatul.

În studiile experimentale, macrofagele activate s-au dovedit a fi foarte eficiente în reducerea incidenței metastazelor unor tumori.

Imunitatea mediata de celulele T

Imunitatea antitumorală mediata de celulele T, ca mecanism, este analoga 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 limfocine și monocine (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 microtumora.

Mecanisme de scapare a celulelor tumorale

Antigenele tumorale se gasesc pe suprafata celulelor tumorale. Ele sunt antigene TSTA, mai concentrate sau mai diluate. Antigenele CMH normale nu dispar, dar diminueaza cantitativ.

Cresterea tumorilor, în conditiile activarii raspunsului imun, nu este explicata satisfacator. S-au propus mai multe mecanisme prin care celulele tumorale evita recunoasterea de catre efectorii raspunsului imun. Când sistemul imunitar este alertat, tesutul tumoral este prea dezvoltat si nu mai poate fi înlaturat.

De cele mai multe ori, *tumora nu este imunogena*. Lipsa imunogenitatii nu se datoreaza absentei antigenelor tumorale, ci faptului ca celulele tumorale nu sunt eficiente în prezentarea antigenului.

Cel mai surprinzator si cel mai studiat mecanism de evitare a raspunsului imun este *modularea antigenica*. Fenomenul modularii antigenice defineste capacitatea tumorii de a masca sau de pierde antigenele, în prezenta efectorilor imunitari. De exemplu, celulele leucemice transplantate la soarecele imunizat cu mojaratul celulelor leucemice care contin antigenul TL, au pierdut antigenul TL, dar antigenul reapare dupa transplantul celulelor leucemice la soarecii care nu au anticorpi serici anti-TL.

Imunoselectia. Antigenele exprimate pe suprafata celulelor tumorale activeaza raspunsul imun mediat celular, iar antigenele solubile stimuleaza sinteza anticorpilor. Unele celule tumorale, ca rezultat al instabilitatii genetice, pierd antigenele initiale si astfel evita efectorii raspunsului imun specific. Ele devin dominante în masa tumorii. Noile variante antigenice induc raspunsul imun specific, dar fenomenul schimbarii specificitatii antigenice se repeta. Raspunsul imun nu induce schimbarea specificitatii antigenice a suprafetei celulei maligne, ci selecteaza celulele care au suferit modificarea antigenica si astfel au devenit rezistente la actiunea efectorilor imunitari.

Diminuarea reactivitatii imunitare pe cale naturala sau artificiala este însotita de cresterea incidentei neoplaziilor. Imunosupresia naturala este mediata de limfocitele Ts. Antigenele tumorale par sa activeze mai usor celulele Ts decât limfocitele Th. Limfocitele Ts sunt mai numeroase la pacientii neoplazici si pot sa reprezeze raspunsul imun pâna la ineficienta totala.

Celulele tumorale secreta *citochine cu actiune imunosupresoare*, prin efectul lor inhibitor asupra interleuchinelor. Celulele maligne produc IL-10, detectata în lichidul peritoneal si în serul pacientelor cu cancer ovarian sau cu alte neoplasme intraperitoneale. IL-10 inhiba exprimarea

moleculilor 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 *masării antigenelor tumorale*. De exemplu, sialomucina, abundentă pe suprafața celulelor unor tumori, mășchează 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 anticorpii 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 apărea fața 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 tumora, 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 greșite, 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:

– anticorpilor ar putea induce un efect imunosupresor, deoarece prin feedback inhibă sinteza anticorpilor potențial citolitici;

– anticorpilor de enhancement sunt citofili, adică se leagă specific pe suprafața celulelor tumorale, formându-se complexe Ag-Ac, care blochează fizic atașarea efectorilor humoral și 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 resectie chirurgicala.

Terapia *chirurgicala* are ca scop reducerea dimensiunilor tumorilor solide, în stadiile timpurii ale neoplasmelor de sân, colon, plamân, prostata - cele 4 malignitati majore la om, ce reprezinta peste 50% din totalul tumorilor solide.

Radioterapia poate fi primara sau secundara. Cea primara se practica în cancerele capului, gâtului si în maladia Hodgkin (neoplazie a ganglionilor limfatici, din diferite regiuni ale corpului). Radioterapia este mai eficienta pentru tesuturile moi, în arii adiacente maxilarelor si cailor nazale. Iradierea totala se practica înainte de transplantul maduvei osoase si este foarte eficienta pentru anumite leucemii acute, refractare la chimioterapie si pentru tratamentul unor tumori solide (cancer de sân), care au revenit dupa câtiva ani de remisiune.

Chimioterapia consta în tratamentul cu medicamente citotoxice, majoritatea fiind produse de sinteza chimica. Scopul chimioterapiei este de a omorî selectiv celulele maligne, deoarece au o rata superioara de crestere si diviziune. Cele mai sensibile la chimioterapie sunt *leucemiile*. Efectul medicamentelor citotoxice este dependent de doza. Dozele prea mici nu produc efect, iar cele mari au efecte toxice asupra organismului, în special asupra maduvei osoase si asupra celulelor cu o rata mare de diviziune. Doza se calculeaza la aria de suprafata corporala, preferabila raportarii la greutate. Majoritatea agentilor citotoxici se administreaza intravenos, calea orala fiind adecvata pentru ciclofosfamida (si pentru tamoxifen).

Agentii chimioterapeutici, în functie de mecanismul actiunii lor, apartin mai multor clase.

Agentii alchilanti induc formarea legaturilor transversale stabile între cele doua catene ale ADN (prin legarea de N₇ a guaninei) si inhiba replicarea moleculei de ADN. Interactiunea poate sa se produca cu una sau cu ambele catene ADN. Alchilarea guaninei induce împerecherea anormala cu timina sau depurinarea prin excizia resturilor de guanina. Consecinta este ruperea catenei de ADN. Daca legatura transversala se face între resturile de guanina ale celor doua catene, excizia reparatorie poate sa rupa molecula de ADN si sa rezulte o mutatie letala pentru celula. Agentii alchilanti reactioneaza chimic cu gruparile sulfhidril, amino, hidroxil si fosfat. Actiunea lor nu are specificitate de faza a ciclului celular, dar celulele sunt mai sensibile în faza G₁ si S. Efectul se manifesta prin blocarea ciclului celular dupa faza G₂.

Mecanismul rezistentei dobândite la agentii alchilanti poate sa conste într-o retentie scazuta a agentului în celula, în cresterea sintezei compusilor sulfhidril cu greutate mica si în cresterea capacitatii de reparare a leziunilor ADN. Desi au mecanisme asemanatoare de

actiune, diferentele structurii moleculare reduc gradul rezistentei încrucisate între compusii subclaselor majore. Efectele secundare sunt gastrointestinale (greață, vomă) și hematologice (mielosupresie).

Ciclofosfamida este cel mai folosit agent alchilant, în tratamentul malignitatilor hematologice și a tumorilor solide. Este convertită la forma activă în ficat

Compusii platinei (cisplatin, carboplatin) nu sunt agenți alchilanti, dar acționează printr-un mecanism similar, adică se leagă de N7 al guaninei și realizează legarea încrucisată a catenelor de ADN. Se leagă și cu alte molecule: adenina, citozina, ARN, proteine.

Antimetabolitii (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.

Antagonistii 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.

Antagonistii purinelor. *6-mercaptopurina și 6-tioguanina* sunt convertite la forma nucleotidică de *hipoxantin-guanin fosforibozil transferaza (HGPRT)*. Metabolitii lor inhibă unele enzime ale căii purinice. Unii metaboliti 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

Antagonistii 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 maduva 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

considerata ca rezultat al unei rate înalte a mutatiilor celulelor maligne, consecinta fiind aparitia unor subpopulatii heterogene, din care unele sunt rezistente la diferite medicamente. Cea mai importanta mutanta este cea cu *rezistenta medicamentoasa multipla*, mediata de *glicoproteina P*, o glicoproteina membranara, care functioneaza ca o *pompa de efflux*, dependenta de energie. Pompa elimina activ din celula, o varietate de agenti citotoxici: alcaloizii din plante, antibioticele (dactinomicina, doxorubicina, daunorubicina) si unii agenti sintetici (melphalan). Celulele maligne mutante, care exprima gena codificatoare a glicoproteinei P, sunt rezistente la o larga varietate de medicamente anticanceroase.

Imunoterapia încearca sa distruga celulele maligne, prin manipulari de stimulare a reactivitatii a sistemului imunitar.

Injectarea citochinelor sau stimularea *in vitro*, cu IL-2, a limfocitelor autologe, obtinute din sângele pacientului, are efecte stimulatorie asupra raspunsului imun. Rareori s-a produs remisiunea completa a neuroblastomului, a carcinomului renal sau a melanomului malign, ceea ce evidentiaza ca raspunsul imun fata de aceste neoplazii poate fi stimulat.

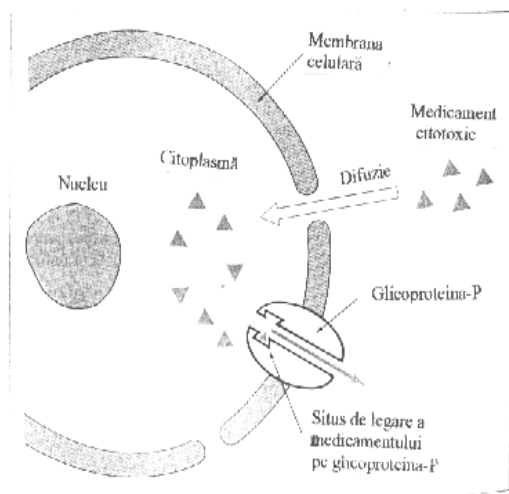


Fig. 134. Modelul unei celule maligne care exprima glico-proteina P, o proteina transmembranara care functioneaza ca o *pompa de efflux*. Ea are situsuri acceptoare la care se leaga diferite medicamente anti-canceroase (naturale sau artificiale), dupa care sunt pompate la exteriorul celulei. Functia glico-proteinei P poate fi inhibata competitiv de agenti 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 (I^{131} , 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 limfocitului.

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 asociație cu chimioterapia, iar celulele 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.

Imunoprolaxia cu vaccinuri, pentru anumite virusuri, a avut succes la animale. Boala lui Marek, produsă de un herpesvirus, este o boală limfoproliferativă la puii de găină. Incidența leucemiei felinei a scăzut, ca rezultat al unui program de vaccinare. Nu există vaccinuri protectoare față de neoplaziile umane.

Capitolul 11

IMUNITATEA ÎN TRANSPLANTUL DE TESUTURI SI ORGANE

Chirurgia transplantului a depasit dificultatile de ordin tehnic. Reusita transplantului depinde exclusiv de reactivitatea imunitara, care declanseaza un raspuns de respingere.

Ideia înlocuirii unui organ lezat, cu unul sanatos, a preocupat medicina din timpuri foarte îndepartate. În mitologia greaca se vorbea de *organisme himere*, pastrate si astazi în reprezentarile sculpturale sub forma monștrilor fabulosi, a caror origine sugereaza o tripla heterogrefa: leu-capra-coada de dragon sau leu-capra-sarpe. Combinatia este interpretata ca o materializare pe plan abstract, a ideii de a asocia organisme foarte diferite. Sirenele (jumătate femeie-jumătate peste) si minotaurii (jumătate om, jumătate taur) exprimau ideia de asociere a acestor organisme foarte diferite.

Perioada stiintifica a transplantului începe cu Alexis Carrel (medic american, care a lucrat în Franta, autorul lucrarii "Omul – fiinta necunoscuta"), cel care a pus bazele cultivarii celulelor si tesuturilor. În 1902, Carrel a facut grefe de rinichi la animale. În 1906, a grefat plămâni la pisica si a facut primul transplant de inima la câine, legând inima de vasele regiunii cervicale. Animalul a trait 21 de ore.

K. Landsteiner, unul din promotorii perioadei stiintifice, a descris grupele sanguine si conditiile de compatibilitate majora între donor si receptor. În 1944, Medawar a conchis ca respingerea grefelor de tesuturi si organe are cauze imunitare, iar curând dupa aceea, Billingham, Brent si Medawar au descris fenomenul de *toleranta imunitara*.

G. Mathé (hematolog francez) a creat *himerele biologice*. El a pornit de la ideia ca fenomenele de respingere a grefelor de tesuturi si organe sunt datorate stimulării activității sistemului imunitar. În lucrările sale experimentale, a recurs la metoda *paralizării reactivității imunitare*. În acest scop, puii nou-nascuti de sobolan au fost supusi iradierii totale, cu doza de 800 de razi. Rezultatul iradierii este desfiintarea barierelor imunitare, adica anihilarea reactivității imunitare fata de grefa. La animalele iradiate a inoculat câteva milioane de celule din maduva osoasa de soarece. Autorul a creat astfel, *himera biologica* soarece-sobolan (sobolan cu elemente figurate sanguine de soarece).

Himera este sensibilă la infecția cu virusul leucemiei soarecelui și face leucemia, în timp ce sobolanii 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 grefă, 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*.

Notiunea de transplant are un sens mai larg. Ea include fecundarea ovulului de către spermatozoid, ca transplant natural. Fatul este o alogrefă 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 Observații și antigenică între organismul donor și receptor	Tipul de grefă (Denumire nouă)	Denumire veche	Tipul de țesut
Identitate Individul este donor cât și receptor	Autogrefă	Grefă autologă (autohtonă, a u t o g e n a)	Țesut autogenic atât
Identitate <i>Organisme</i> <i>identice</i> ale unei inbred. om, uni-	Singrefă (Homogrefă singenică)	Izogrefă (Grefă izogenă Grefă izologă)	Țesut singenic (congenic) linii Pentru gemeni vitelini.

Diferite altul	Alogrefa	Grefa homologa	Tesut	<i>Allos</i> =
Organisme ale aceleiasi specii	(Homogrefa a l o g e n i c a)			alogenic
variante diferite.				dar cu alelice
Foarte diferite = strain apartin specii (câine-	Xenogrefa	Heterogrefa (Grefa heterologa)	Tesut xenogenic	<i>Xenos</i> Indivzii u n o r diferite iepure).

Autogrefele se practica cu o frecventa mare: în cazuri de arsuri, interventii chirurgicale estetice. Pielea dintr-o regiune a corpului este implantata într-o zona compromisa.

Alte denumiri se refera la particularitatile tesutului transplantat:

– grefele homovitale se fac pentru asigurarea viabilitatii tesutului transplantat

– grefele homostatice sunt acelea în care tesutul grefat are rolul numai de suport structural, pe care se poate dezvolta tesutul gazdei, pentru restabilirea arhitecturii initiale. Astfel de grefe sunt lipsite de orice urma de tesut antigenic, se practica pentru a înlocui un fragment de vas sau de os.

În raport cu locul de unde tesutul a fost luat si locul unde se reimplanteaza, se disting grefe *ortotopice* (tesutul grefat este asezat la receptor în aceiasi pozitie) si grefe *heterotopice* (tesutul grefat este implantat în alt situs anatomic al organismului receptor).

Dupa 1956, primul succes al grefei de rinichi între gemeni univitelini, transplantul de organe a devenit o practica curenta. Interesul pentru transplant s-a deplasat de la actul chirurgical, la aspectele imunologice.

Argumente ale rolului reactivitatii imunitare în respingerea grefei

Respingerea grefei este rezultatul activarii mecanismelor imunitare, datorita diferentelor antigenice între moleculele CMH I si 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 <i>prinde</i> .
B -----	A ----	O	Grefa este <i>respinsă</i> , pentru că organismele diferă prin moleculele CMH.
B -----	AxB ----	O	Grefa este <i>acceptată</i> . Capacitatea de a accepta o grefa 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 <i>respinsă</i> .

– 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 greșirea timusului;

– debutul fenomenelor de respingere este foarte mult întârziat, dacă organismului receptor de grefa 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 sanatoase sunt tolerate mai bine decât cele

care prezinta o stare de uzura biologica.

Evolutia respingerii grefei de piele

În raport cu dinamica desfasurarii, se disting trei modalitati de respingere a grefei de piele.

Respingerea acuta sau hiperacuta este foarte rar întâlnita si se datoreaza incompatibilitatii totale între donor si receptor, care nu apartin aceluiasi grup sanguin în sistemul ABO. In organismul receptor de grefa, exista anticorpi circulanti preformati (aglutininele α si β) fata de antigenele tesutului transplantat. Lor li se adauga efectele imediate produse de macrofagele si neutrofilele activate, de anafilatoxinele eliberate din fixarea complementului. Vasele din organul grefat se obtureaza prin formarea trombilor de coagulare. Grefa nu se vascularizeaza, ramâne alba si în câteva ore este respinsa.

Respingerea dupa dinamica raspunsului imun primar survine în cazul în care, între donor si receptor este o incompatibilitate relativa. Grefa se vascularizeaza, dobândește o culoare normala (roza), dar dupa 10-12 zile, culoarea se închide, devine purpurie, apar fenomene de respingere si grefa este eliminata.

Respingerea dupa dinamica raspunsului imun secundar este de tip accelerat si are loc la organismele la care grefa s-a repetat dupa o alta grefa cu tesut de la acelasi organism donor sau de la un organism al aceleiasi linii înbred. Raspunsul este accelerat, în sensul ca fenomenele de infiltratie cu macrofage, neutrofile si limfocite T sensibilizate, se produc foarte repede si în 3-4 zile, grefa este respinsa.

Respingerea grefei de rinichi

Respingerea hiperacuta se produce foarte repede dupa ce s-au stabilit conexiunile vasculare cu organul grefat si se datoreaza incompatibilitatii totale între donor si receptor, care nu apartin aceluiasi grup sanguin în sistemul ABO. In primele ore dupa stabilirea conexiunilor vasculare se produce încetinirea fluxului sanguin, urmata de o staza circulatorie în organul grefat. Rinichiul se încarca cu o cantitate mare de sânge si dobândește culoarea rosie, fenomen denumit *hepatizare*. Oprirea circulatiei sanguine initiaza procesul de coagulare la nivelul capilarelor sanguine.

Cauzele respingerii hiperacute. In sângele organismului receptor se gasesc *anticorpi preformati* (aglutinine), specifici fata de antigenele din organul grefat. Antigenele de grup sanguin în sistemul ABO se

gasesc nu numai pe *eritrocite*, ci și pe *celulele endoteliale* ale capilarelor sanguine. *Aglutininele* α și β ale receptorului de grefa 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 adera PMNN. La acest nivel, celulele endoteliale exprimă *selectinele*, prin intermediul cărora leucocitele adera 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 xenogrefa. Pentru a elimina anticorpii naturali, se practică plasmafereza sângelui receptorului și absorbția anticorpilor pe coloana. Complementul este eliminat prin administrarea veninului de cobra.

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 țesutului se eliberează din rinichi și trec în circulație, ajungând în ganglionii limfatici regionali.

Antigenele declansatoare 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 γ 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 grefa 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;
- antigene 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 grefa, 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 tesutul grefat. Ele exprimă molecule CMH II la densitate foarte înaltă, care determină stimularea inițială a limfocitelor gazdei.

Moleculele 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 tesutul grefat este mediat în primul rând de *limfocitele T*. Ca dovadă, soarecii atimici (nuzi) nu resping grefele alogene de piele și tolerează chiar grefe xenogene.

La examenul histologic al unei grefe de piele, în cursul respingerii, se observă *infiltratul* cu mononucleare, multe fiind limfocite. Acumularea lor în tesutul 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 tesutul grefat, ca și limfocitele Tc.

Macrofagele secreta IL-1, care produce *febra* ce însoțește reacția de respingere a grefei. Limfocitele patrunse în tesutul grefat sunt pasagere. Ele parasesc grefa, trec în limfa 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 tesutul grefat nu migrează limfocitele transferate, ci migrează limfocitele organismului gazda, activate de IL secretate de limfocitele transferate.

Rolul anticorpilor. Ca răspuns față de antigenele tesutului grefat, se sintetizează anticorpi specifici față de antigenele de transplantare. Anticorpii au rol secundar în reacția de respingere a grefei de tesuturi

si organe. Anticorpilor au rol foarte important în respingerea grefei, în situatiile în care, anticorpilor anti-CMH preexista la un titru crescut în momentul transplantarii. Sinteza lor este indusa de sarcinile multiple, de transfuzii repetate sau de o grefa anterioara. Grefa este respinsa imediat.

Anticorpilor au rol important în respingerea grefelor cu incompatibilitate grava între donor si receptor, deoarece fixeaza complementul si produc fenomenul de *citoliza*. Daca nu fixeaza complementul, anticorpilor au rol de *opsonine*, adica sensibilizeaza celulele grefate fata de actiunea macrofagelor si neutrofilelor. Anticorpilor sintetizati în tesutul grefat, determina eliberarea mediatorilor reactiei de hipersensibilitate imediata (de exemplu, histamina), care produc modificari circulatorii în vasele grelei.

Anticorpilor fata de antigenele eritrocitare sunt singurii efectori imunitari eficienti în transfuzia incompatibila. Efectul lor consta în aglutinarea si liza eritrocitelor.

Dupa grefarea unui organ sanatos într-un organism uzat, din punct de vedere functional, organul grefat se alinaza repede la starea generala de uzura a gazdei.

Transplantarea maduvei osoase se realizeaza pentru tratamentul pacientilor cu maladii imunodeficitare, anemie aplazica severa, leucemie, limfom, iar mai recent, pentru dezordinile hematopoetice cu substrat genetic.

La pacientii imunodeficitari, transplantul maduvei osoase este destinat sa furnizeze *celule stem* pentru a restabili sistemul imunitar al receptorului, fara sa înlocuiasca în mod necesar compartimentul mieloid. Datorita starii nefunctionale a sistemului imunitar, transplantul maduvei osoase poate fi facut fara tratamentul imunosupresor al gazdei.

Maduva este recoltata prin aspiratie din crestele iliace anterioare si posterioare, de la donorul anesteziat. Amestecul de maduva osoasa si sânge este plasat în mediu de cultivare cu heparina, într-o punga hematologica si se administreaza fara întârziere organismului receptor, prin infuzie intravenoasa, în cantitatea de 2×10^8 - 6×10^8 celule medulare/kg. Infuzia se face la 1-24 ore dupa ultima iradiere totala a corpului sau la 36 de ore dupa ultima doza de ciclofosfamida. Celulele stem circula în sânge, însamânteaaza cavitatea medulara si încep sa se divida. În 2-4 saptamâni, creste populatia celulara a maduvei si în acelasi timp creste numarul celulelor sanguine periferice. La donor, maduva se reface repede.

Prevenirea respingerii grefelor de organe este posibila printr-o împerechere cât mai adecvata a donorului si receptorului din punctul de vedere al asemanarii moleculelor CMH si, ulterior, prin instituirea

tratamentului imunosupresor. Dar, spre deosebire de alte celule, cele din maduva osoasa sunt foarte antigenice (au o mare densitate a moleculelor CMH I) si din aceasta cauza, receptorul trebuie sa fie supus unui tratament radio-chimioterapeutic intens, pâna la limita suportabilitatii, pentru ca transplantul de maduva sa aiba succes. Chiar astfel, la pacientii leucemici, respingerea maduvei osoase poate sa aiba loc, în cazul unei împerecheri antigenice neadecvate.

Transplantul de maduva osoasa ridica o problema speciala: celulele transplantate fiind imunocompetente, pot sa initieze reactia "grefa contra gazda", fata de antigenele receptorului. Reactia este initiata fata de antigenele tegumentare, ale ficatului si intestinului si este letala la 10-15% dintre receptorii de maduva osoasa cu molecule HLA identice si la 40% dintre receptorii cu molecule HLA neidentice.

Teste de histocompatibilitate

În transplantul de tesuturi si organe, esentiala este asemanarea cât mai accentuata a moleculelor CMH ale donorului si receptorului. Pentru testul gradului de asemanare, se analizeaza comportamentul limfocitelor celor doi parteneri, *în amestec* (reactia de amestec limfocitar, RAL). Testul evidentiaza diferentele antigenice dintre donor si receptor, în ceea ce priveste moleculele CMH II. Pentru reusita grefei, este obligatorie identitatea acestor molecule. Perechea donor-receptor care produce cel mai usor raspuns în RAL, ofera cea mai buna sansa de acceptare a grefei.

Cel mai adesea se folosesc limfocitele din sânge. Celulele trebuie sa fie viabile si în mediu se adauga ser de vitel (1-10%) si 2-mercaptoetanol. Limfocitele donorului se cultiva în amestec cu limfocitele receptorului, în prezenta timidinei H³. Se masoara nivelul radioactivitatii limfocitelor, consecutiv încorporarii timidinei H³ pentru sinteza ADN. RAL reflecta raspunsul proliferativ al celulelor T, cu putine sau fara celule B. Transformarea blastica nu se produce în RAL a gemenilor monozigoti. Într-un amestec celular $a \times b + a \times c$, raspunsul este *bidirectional*. Cea mai ampla reactie are loc între limfocitele care se deosebesc prin moleculele CMH. Cel mai puternic stimul în RAL îl reprezinta aloantigenele CMH II, cu un polimorfism foarte înalt, iar aloantigenele clasa I au un rol stimulator limitat. Moleculele CMH II se gasesc pe limfocitele B, pe macrofage, pe celulele dendritice, iar pe limfocitele T, numai dupa activare. Se pare ca raspunsul în RAL nu este orientat fata de epitopii CMH propriu-zisi, ci fata de o larga varietate de peptide self legate de moleculele CMH, rezultate probabil prin

degradarea diferitelor proteine celulare. Dat fiind polimorfismul deosebit al moleculelor CMH, probabil ca marea majoritate a limfocitelor T din amestec manifesta aloreactivitate fata de cel puțin unul din aloantigenele CMH ale speciei.

Pentru raspunsul *unidirectional*, una din cele doua populatii celulare (de obicei a donorului) se inactiveaza prin tratament cu mitomicina C (pentru inhibitia sintezei ADN) sau se supun iradierii.

Tratamentul inactiveaza celulele T, dar nu interfera cu imunogenitatea lor. In RAL se activeaza numai limfocitele receptorului de grefa, ca raspuns la aloantigenele donorului.

În cazul grefei unui organ imunocompetent la o gazda imunodeficienta, în RAL se inactiveaza limfocitele receptorului, pentru a evalua reactivitatea limfocitelor donorului, care ar putea initia o reactie grefa contra gazda.

Compatibilitatea donor-receptor pentru antigenele CMH I se testeaza cu *seruri imune* anti- CMH I. Se analizeaza reactia limfocitelor celor doi parteneri, fata de un numar cât mai mare de seruri anti CMH I. In laboratorul de profil exista seturi de seruri anti-CMH I, recoltate de la persoane care au o bogata experienta antigenica HLA:

– persoane care suferit transfuzii sanguine multiple si astfel s-au imunizat fata de antigenele HLA;

– femei multipare, care au avut sarcini multiple cu parteneri diferiti.

Serurile anti-CMH se pun în contact cu limfocitele donorului si cu ale receptorului de grefa. Anticorpilor anti-CMH se fixeaza pe suprafata limfocitelor si astfel este initiata transformarea blastica. Se determina un *coeficient de reactivitate* (coeficient de transformare blastica), pe baza numarului de limfocite transformate.

Daca limfocitele donorului si receptorului se comporta asemanator fata de un numar mare de seruri, concluzia este ca cele doua populatii de limfocite sunt asemanatoare.

Daca titrul anticorpilor anti-CMH în ser este crescut, se poate produce nu numai activarea limfocitelor, ci chiar aglutinarea imuna sau, dupa fixarea complementului, citoliza.

Xenotransplantarea

Termenul semnifica transplantul de tesuturi si organe între organismele unor *specii diferite*. Interesul clinic pentru xenotransplantare a fost determinat de lipsa organelor umane. Succesul alotransplantului a creat un necesar care depaseste disponibilul. In 1963, transplantul de rinichi de cimpanzeu la om, a prelungit supravietuirea cu 9 luni si moartea a survenit dupa complicatiile

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 boala Parkinson, transplantul de maduva 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 *reactia 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 alternă. În esență, respingerea hiperacută se datorează *reactiei endoteliale* la activarea complementului, mediata 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.

Tinta 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 *acuta*, datorită aceluși 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 releva mai puțină hemoragie, dar cu tromboza 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 cărui titru crește rapid.

Progresul în xenotransplantare s-a făcut în sensul prevenirii respingerii hiperacute: imunosupresia receptorului de grea și ingineria genică a donorului pentru a elimina marile diferențe antigenice dintre xenogrefe și alogrefe. La soarece s-a reușit eliminarea genei galactozil-transferazei prin recombinare homologică, 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 monozigoti. 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 îmbatrânite 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 greșat (rinichi, ficat, inimă). În cazul bolilor 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 îndeplinească următoarele criterii:

– să *inhibe activarea răspunsului imun* și să fie eficient față de

procesele imunitare în curs de desfășurare;

– să aibă *actiune 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 greșei, transfuziile de sânge cu specificitatea antigenică a donorului sau transfuziile nespecifice, ca și teste 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 greșea țesutului, cât și pacienților cu boli 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 bolilor autoimune.

Chimioterapia administrată pacienților neoplazici produce, uneori, o imunosupresie profundă. Medicamentele citotoxice sunt imunosupresoare deoarece distrug celulele imunocompetente sau blochează proliferarea lor.

Agentii citotoxici folosiți pentru imunosupresie (dar și în tratamentul neoplaziilor) sunt:

– agenți alchilanti

– antimetaboliti: analogi ai purinelor (6-mercaptapurina și azatioprina); analogi pirimidinici (citozin-arabinozida);

– antagoniștii acidului folic (methotrexatul).

Ciclofosfamida este compusul prototip al agenților alchilanti. Acțiunea sa este nespecifică, asupra tuturor subpopulațiilor de limfocite și a celulelor nelimfoide care intră în faza S.

Agentii din categoriile menționate, au *actiune 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 blocata, dar actiunea neselectiva a acestor agenti produce efecte secundare toxice prea severe si rezultatele au fost considerate ca nesatisfacatoare.

Ciclosporina este un peptid ciclic lipofil, izolat din culturi de microorganisme si actioneaza specific asupra limfocitelor, inhibând transcrierea genica pe o cale dependenta de Ca, adica blocheaza progresia ciclului celular de la G₀ la G₁. Este un agent imunosupresor mai selectiv, deoarece actioneaza asupra celulelor Th, fara efecte notabile asupra altor subpopulatii de limfocite T, asupra limfocitelor B, granulocitelor sau macrofagelor. Efectul major pare a fi inhibitia sintezei IL-2. Imunosupresia cu ciclosporina este o modalitate imunofarmacologica, datorita actiunii sale selective fata de celulele imunocompetente.

În ultimii ani s-au identificat câtiva compusi chimici naturali, izolati ca si ciclosporina, din culturi de microorganisme: tacrolimus, sirolimus (rapamycin), mizoribine si spergualin.

Tacrolimus este o lactona macrociclica lipofila, cu mecanism de actiune asemanator cu al ciclosporinei. *Sirolimus* este un macrolid care inhiba proliferarea celulelor T, prin blocarea trecerii de la faza G₁ la faza S.

Imunosupresorul ideal va media inducerea tolerantei, în special în transplant, adica va permite sistemului imunitar sa adopte ca self, moleculele CMH specifice tesutului grefat.

Radiatia ionizanta x si gama produce ionizarea atomilor si genereaza radicali liberi, în special radicalul OH·, foarte reactiv, principalul agent ce mediaza moartea celulelor iradiate. Efectele radiatiilor ionizante sunt dependente de doza. Celulele stem si celulele imature sunt foarte sensibile. Limfocitele T sunt mai rezistente decât limfocitele B, iar monocitele si macrofagele sunt relativ rezistente.

Corticosteroizii sunt cele mai folosite medicamente, cu efect inhibitor asupra raspunsului imun, dar si al proceselor inflamatorii. S-a propus mecanismul limfolizei, dar la om acest efect nu se produce. Timp de 4-6 ore dupa administrare, corticosteroizii reduc numarul de leucocite circulante (limfocite, monocite, eozinofile), dar creste semnificativ numarul neutrofilelor. Valorile leucocitelor revin la normal în 24 de ore. Limfocitele T, precum si monocitele parasesc circulatia si migreaza în maduva osoasa, iar limfocitele B sunt relativ rezistente la corticosteroizi. Eozinopenia, dupa injectarea corticosteroizilor, explica efectele benefice ale acestor hormoni la persoanele alergice.

Serul antilimfocitar (SAL) si *globulina antitimocitara* se obtin prin injectarea limfocitelor, respectiv a timocitelor, la o specie xenogena. Se folosesc celulele ductului toracic sau timocitele pentru imunizarea

iepurelui sau calului. Din serul heterolog se separa fractia imunoglobulinica, ce se administreaza intravenos pentru depasirea unei stari critice dupa grefare.

Anticorpilor policlonali din SAL au fost înlocuiti cu AMC specifici fata de antigene celulare de suprafata: AMC anti-receptor de IL-2 si anti CD4.

Deoarece citochinele sunt molecule foarte importante în reactia imunitara, s-a încercat neutralizarea lor cu receptori solubili.

Deletia specifica a populatiilor de limfocite este posibila cu preparatele denumite *imunotoxine*. Acestea sunt complexe ce constau din doua componente: un anticorp monoclonal care asigura recunoasterea specifica a tinteii celulare si o componenta toxica (ricina, toxina difterica).

Capitolul 12

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 alarma*, menit să contracareze efectele factorului de stress. Intensitatea răspunsului adaptativ este dependentă de vârsta, gen, starea hormonală și de alți factori genetici.

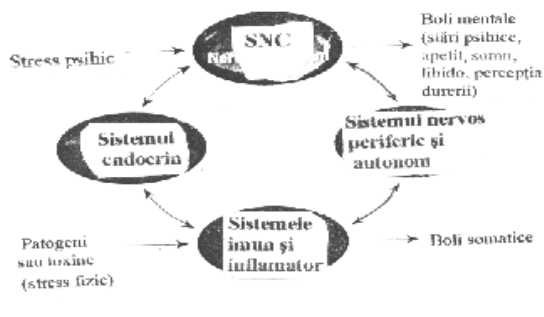


Fig. 135. Interacțiuni neuro-endocrino-imunitare.

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 răspuns la stress se produc modificări fizice ale sistemului circulator, care redirectionează 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-corticosuprarenală 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 corticosteroidelor;
- 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 raspuns la stress functioneaza ca o bucla feedback pozitiva, bidirectionala. Activarea unui component al sistemului, activeaza pe celalalt. Serotonina si acetilcolina activeaza raspunsul la factorii de stress, iar MSH (hormonul stimulator al melanocitelor) si acidul gama aminobutiric sunt inhibitori.

Corticosteroidii sunt componentele majore ale sistemului de raspuns la stress si inhiba cele doua componente majore ale raspunsului (secretia CRH si sistemul nervos vegetativ), dar si reactivitatea imunitara si raspunsul inflamator.

Raspunsul activator la stress influenteaza axa hipotalamo-hipofizara cu componentele ei: hipotalamus-hipofiza-tiroida (HHT) si respectiv, hipotalamo-hipofizo-gonadala (HHG).

Chiar daca stressul acut stimuleaza secretia hipofizara a hormonului de crestere, stressul cronic, prin intermediul CRH, stimuleaza secretia hipofizara a somatostatinei (inhibitor al cresterii). Somatostatina, a carei secretie este stimulata de CRH, inhiba secretia de TSH, iar glucocorticoizii inhiba conversia tiroxinei, relativ inactiva, la triiodotiroxina. Aceste raspunsuri sunt adaptative si se coreleaza cu necesitatea limitarii pierderii energiei.

Activarea raspunsului la stress inhiba axa HHG, la mai multe nivele. CRH inhiba sinteza factorului eliberator al hormonului luteinizant din nucleul arcuat hipotalamic, fie direct, fie prin intermediul corticosteroidilor. Corticosteroidii inhiba secretia hormonului luteinizant (LH) hipofizar si concomitent, productia hormonilor gonadali: estrogeni, progesterona, testosteronul.

Hormonii tiroidieni si sexosteroizi influenteaza activitatea axei hipotalamo-hipofizo-corticosuprarenale (HHC). Hipotiroidismul inhiba axa HHC. La organismele de sex feminin (soarece, sobolan, om), axa HHC este mai activa decât la masculi, adica stressul induce un raspuns mai amplu, masurabil prin nivelul mai înalt al corticosteroidilor. Ovarectomia diminueaza eliberarea corticosteroidilor, iar orhiectomia mareste rata sintezei corticosteroidilor la stress.

Raspunsul integrat neuro-imuno-endocrin este mediat nu numai de hormoni, ci si de interleuchine, cele mai cunoscute fiind IL-1 si IL-6.

IL-1 activeaza axa hipotalamo-hipofizo-corticosuprarenala, stimulând eliberarea ACTH hipofizar, iar sinteza ei este inhibata de glucocorticoizi. Endotoxinele stimuleaza producerea IL-1 în hipofiza si astfel secretia ACTH este reglata local, în hipofiza.

IL-1 este sintetizata local, în arii discrete ale SNC (hipotalamus, hipocamp). Aceste arii regleaza raspunsul la stress.

Rolul corticosteroizilor în reglarea funcției imunitare

Asemanarea 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.

Corticosteroizii reglează toate componentele răspunsului imunitar și inflamator, chiar și creșterea și diferențierea timocitelor. Nivelul corticosteroizilor crește într-un interval de ordinul minutelor, după expunerea la factorul de stres. Rolul lor este de a limita extensia răspunsului și a procesului inflamator. Amplitudinea lor prea mare poate să producă leziuni, inclusiv maladii autoimune.

Administrarea corticosteroizilor, 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 corticosteroizilor, produsă de stres, induce apoptoza timocitelor.

Corticosteroizii par să fie implicați în selecția timocitelor cu specificitate față de antigenele nonself. Concepția dominantă presupune că timocitele sunt selectate pentru apoptoza 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 apoptoza, sub acțiunea corticosteroizilor. Supraviețuiesc numai timocitele cu receptori de afinitate medie pentru moleculele CMH. Selecția limfocitelor în timus este controlată de hormonii sintetizați local. Astfel, timusul exprimă activități neuroendocrine multiple, inclusiv sinteza CRH și ACTH. CRH stimulează secreția ACTH, iar ACTH induce producerea corticosteroizilor 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.

Corticosteroizii reglează dezvoltarea subpopulațiilor Th1 și Th2 de limfocite, inhibând sinteza citochinelor Th1 (IL-2, IFN γ).

Rolul sexosteroizilor

Hormonii steroizi sexuali influenteaza maturarea si diferentierea timocitelor. Timusul sufera modificari profunde în timpul sarcinii, dupa gonadectomie sau dupa administrarea exogena a hormonilor sexuali. Dupa gonadectomie, masa timusului creste, iar administrarea hormonilor sexuali (estrogen, testosteron) are efecte inverse.

Factorul hipotalamic de eliberare a hormonului luteinizant (RFLH), regleaza atât functia de reproducere, cât si functia imunitara. Acest hormon se sintetizeaza nu numai în creier, ci si în gonade, în glandele mamare, în placentă, splina si timus, având rol integrator al functiei neuro-endocrine reproducatoare si al functiei imunitare. În timus, limfocitele T sintetizeaza RFLH si au receptori specifici pentru acest hormon.

Îmbatrânirea sistemului imunitar, la om, începe dupa 30 de ani si se caracterizeaza prin cresterea productiei de autoanticorpi si diminuarea capacitatii de a produce anticorpi fata de antigenele nonself. Diminua sinteza IL-2, dar creste rata sintezei IL-4, IL-5 si IL-6. Aceste schimbari sugereaza o crestere numerica a subpopulatiei de limfocite Th2, în raport cu subpopulatia Th1. Diminua functia citotoxica. Creste nivelul plasmatic al IL-6, cu rol reglator al sintezei anticorpilor, dar si cu rol în progresia maladiilor autoimune sau a altor procese patologice, ca osteoporoza.

Un rol important în procesul de îmbatrânire se atribuie dehidroepiandrosteronului (DHEA), secretat de corticosuprarenale, sub controlul ACTH. Este un intermediar al biosintezei altor hormoni (testosteronul si estradiolul). DHEA circula în forma inactiva, de sulfat. Hormonul se activeaza numai în tesuturile care au DHEA-sulfataza, cu distributie diferentia în organele limfoide. Nivelul plasmatic al sulfatazei scade odata cu îmbatrânirea sistemului imunitar si scade brusc în diferite boli cronice, inclusiv maladiile autoimune. Administrarea DHEA la rozatoare si om, restabileste functia imunitara la organismele vârstnice si are efect antagonic corticosteroizilor, care produc atrofia timica.

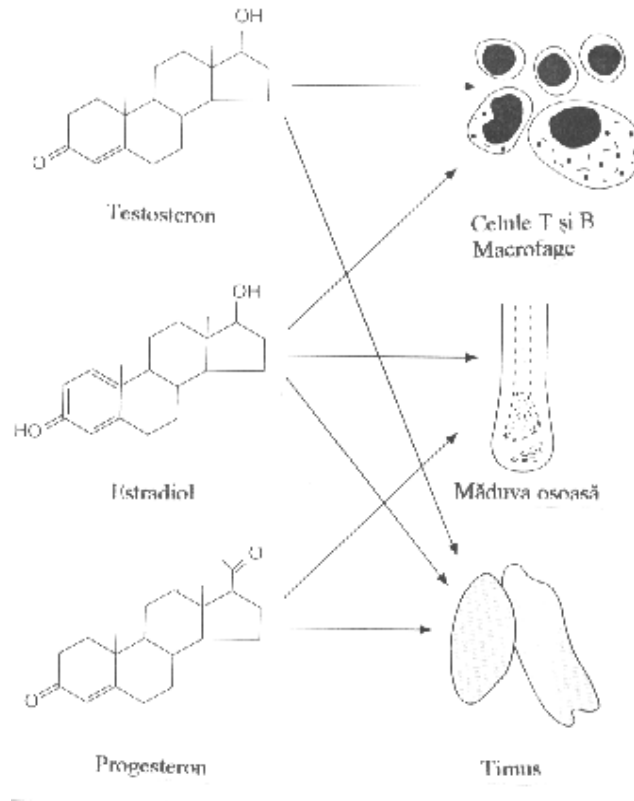


Fig. 136. Organele și celulele influențate de *hormonii steroizi sexuali*. Acești hormoni pot acționa în timpul dezvoltării celulelor imunitare, dar și direct asupra celulelor mature efectoare.

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 precursorilor 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. Țoarecii hipotiroizienți au timus și splină hipoplazică, număr redus de celule TCD8.

Interacțiunile neuro-imuno-endocrine sunt bidirectionale. Tesuturile și celulele sistemului imunitar sintetizează un spectru larg de hormoni neuro-endocrini. Foarte importantă este sinteza CRH, un

reglator esential al raspunsului la stress, în timus, splina, hipofiza anterioara, corticosuprarenale, ovar, testicul, intestin, inima, plamân. In timus si splina, CRH este sintetizat de celulele T, unde exercita efecte reglatoare autocrine sau paracrine. CRH este de asemenea sintetizat local în focarele inflamatorii acute sau cronice, inclusiv în lichidul sinovial al pacientilor cu artrita reumatoida.

Factori neuroendocrini favorizanti ai maladiilor autoimune umane

Diferentele functionale cu privire la intensitatea raspunsului axelor hipotalamo-hipofizo-corticosuprarenaliene (HHC) si hipotalamo-hipofizo-gonadale (HHG) sunt importante pentru înțelegerea manifestarilor autoimune. Maladiile autoimune sunt mult mai frecvente la femei decât la barbati. 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 sa se dezvolte, sa aiba intensitate maxima ori sa diminue, în perioadele de schimbare a activitatii axei HHG (pubertate, menstruatie, sarcina, perioada postpartum, menopauza sau în timpul unui stress psihologic de amploare). Toate aceste perioade sunt asociate cu modificari ale secretiei factorului hipotalamic de eliberare a LH, a LH hipofizar, a hormonilor sexuali si a altor hormoni. Frecventa fenomenelor autoimune creste cu vârsta, corelata cu schimbarile neuroendocrine.

Artrita reumatoida este asociata cu o insuficienta a sintezei corticosteroizilor. Nivelul corticosteroizilor plasmatici tinde sa se coreleze cu severitatea inflamatiei, dar pacientii cu afectiune de intensitate medie au nivele inferioare ale corticosteroizilor comparativ cu indivizii normali. Nivelul testosteronului la pacientii cu artrita reumatoida, în special la barbati, tinde sa aiba valori scazute, iar nivelul estrogenului este nemodificat. Terapia cu testosteron amelioreaza maladia. Estrogenii nu par sa produca o exacerbare a artritei reumatoide, iar contraceptivele orale încetinesc evolutia maladiiei. Odata cu scaderea brusca a nivelului estrogenilor (perioada postpartum, intervalul care precede menstruatiea, menopauza), artrita reumatoida se intensifica. In acelasi timp diminuea secretia de corticosteroizi, deoarece estrogenii influenteaza axa HHC. Nivelul prolactinei la pacientii cu artrita reumatoida este variabil(crescut, normal sau scazut). Artrita reumatoida se remite frecvent în timpul sarcinii si se reactiveaza sau se declanseaza în perioada postpartum, îndeosebi la femeile care alapteaaza. Alaptarea este însoțita cu cresterea marcata a secretiei de prolactina si cu supresia functiei axei HHC.

Lupusul sistemic eritematos are o dominanta neta la femei, ceea

ce denota rolul hormonilor sexuali în declansarea 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. Barbații cu lupus sunt prevalent hipoandrogenici. Nivelul scăzut al androgenilor favorizează imunitatea mediata 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 corticosteroidilor, 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. Corticosteroidii, estrogenii și progesterona scad la nivele subnormale, iar imunitatea mediata 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

Continutul acestei carti a fost redactat pe baza consultarii unui numar mare de articole aparute în diferite *periodice* si a unor *capitole speciale* sau *volume de Imunologie*, publicate în tratate de *Microbiologie* sau de *Virologie*. Sintezele aparute în *Annual Review of Immunology* au constituit o sursa informationala de o valoare deosebita.

Periodice

Annual Reviews Biochemistry
Annual Reviews Immunology
Annual Reviews Microbiology
Bulletin d'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

Carti

DELVES P.J, ROITT I. M. – *Encyclopedia of Immunology*, vol. 1-4, sec. ed., 1998, Acad. Press.

FIELDS B. N., KNIPE D. M., HOWLEY P. M. – *Fields Virology*, 3rd edition, Lippincot Raven Publishers, Philadelphia, 1996

MALE D., CHAMPION B., ANNE COOK – *Advanced Immunology*, J.B. Lippincot Company, 1987.

PATRICK S. ADN LARKIN M. J. - *Immunological and molecular aspects of bacterial virulence*, J. Wiley & Sons, 1995.

ROITT I. M. – *Essential Immunology*, ninth edition, 1997, Blackwell Science

SAMTER M, TALMAGE D. W., FRANK M. M., AUSTEN K. F., CLAMAN H. N. – *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 – *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. – *Immunology*, seventh edition, Longman Group, UK, 1993.
ZARNEA G. – *Tratat de Microbiologie*, vol. IV *Imunobiologie*, Ed. Academiei Române,
1990.
ZARNEA G., Mihaescu Gr. – *Imunologie*, Ed. Universitatii Bucuresti, 1995.
ZWILLING B. S., EISENSTEIN T. K. – *Macrophage- Pathogen Interactions*, 1994, New
York, Basel, Hong Kong.