

Prof. dr. doc. G. ZARNEA

Conf. dr. GR. MIHĂESCU

IMUNOLOGIE

EDITURA UNIVERSITĂȚII BUCUREȘTI
1995



BIBLIOTECA CENTRALĂ
UNIVERSITARĂ
BUCUREȘTI

Cota

/// 660869

Inventar

789521

Prof. dr. doc. G. Zarnea

Membru corespondent
al Academiei Române

Conf. dr. Gr. Mihăescu

IMUNOLOGIE

EDITURA UNIVERSITĂȚII BUCUREȘTI

1995

Biblioteca Centrală Universitară
B C A E 869
Cota
Inventar 789524

Referenți științifici: Prof. dr. Angheluță Vădineanu
Prof. dr. doc. Dumitru Mișcalencu

IMUNOLOGIE

Toate drepturile de autor sunt rezervate Editurii Universității
București. Orice reproducere sau traducere, fie și parțială, precum
și contrafacerea de orice tip, intră sub incidența Codului Penal.

ISBN - 973-9160-37-9

CUPRINS

Introducere	7
Etapale dezvoltării Imunologici ca știință	9
Diviziunile Imunologiei	13
<i>Capitolul I. Caracterizarea generală a antigenelor</i>	15
Modelul general de structură a unui antigen	15
Proprietățile esențiale ale antigenelor	16
Clasificarea antigenelor	16
Antigene naturale	16
Antigene artificiale	22
Antigene sintetice	25
Haptene	25
Antigene endogene	27
Determinanții antigenici	27
Antigenele heterofile	29
Antigene timodependente și timoidependente	30
Factorii care condiționează imunogenicitatea	31
Adjuvanții	38
<i>Capitolul II. Imunoglobulinele</i>	40
Structura moleculei de imunoglobulină	42
Heterogenitatea anticorpilor. Variantele izotipice	46
Variantele alotipice	48
Variantele idiotipice	49
Funcțiile moleculei de imunoglobulină	51
Imunoglobulina G	53
Imunoglobulina A	54
Funcțiile efectoare ale IgA	57
Imunoglobulina M	58
Imunoglobulina E	60
Imunoglobulina D	60
Interacțiunea antigen-anticorp	61
Bazele moleculare ale reacțiilor imune încrucișate	64
Bazele genetice ale diversității anticorpilor	66
Producerea anticorpilor monoclonali prin tehnologia hibridomului	74
Etapale obținerii hibridomului	76
Avantajele biotehnologiei hibridomului	80
Aplicații practice ale anticorpilor monoclonali	80

Capitolul III. Antigenele complexului major de histocompatibilitate (CMH)	82
Structura moleculară a antigenelor CMH clasa I	85
Structura moleculară a antigenelor CMH clasa II-a	89
Distribuția tisulară a moleculelor CMH clasa I și a II-a	90
Interpretarea evolutivă a antigenelor de histocompatibilitate	91
Capitolul IV. Sistemul imunitar (Sistemul imunocitar sau limfoid)	92
Limfocitele	94
Limfocitele T	96
Limfocitele B	99
Celule NK, K, LAK	99
Receptorul de antigen al limfocitelor T (RCT)	100
Receptorul de antigen al limfocitelor B	102
Dezvoltarea ontogenetică a sistemului imunocitar	104
Rolul bursei lui Fabricius în diferențierea limfocitelor B	106
Diferențierea limfocitelor B la mamifere	107
Timusul la mamifere	108
Rolul timusului în diferențierea limfocitelor T	110
Apariția receptorului T _i pe limfocitele intratimice	111
Factorii humoralii ai diferențierii limfocitelor	113
Organele limfoide secundare (periferice)	115
Ganglionii limfatici	116
Splina	117
Formațiuni limfoide asociate mucoaselor	119
Capitolul V. Răspunsul imun	123
Particularitățile generale ale răspunsului imun	124
Etapile răspunsului imun	126
Prelucrarea antigenelor exogene	129
Rolul moleculelor CMH în prezentarea și recunoașterea antigenelor	131
Cooperări celulare în elaborarea răspunsului imun	139
Dinamica răspunsului imun mediat humoral	143
Răspunsul imun secundar	144
Aplicații practice ale anticorpilor	149
Biosinteza imunoglobulinelor	149
Reglarea sintezei imunoglobulinelor	150
Catabolismul imunoglobulinelor	152
Imunitatea mediată celular (IMC)	153
Rolul IMC în apărarea antiinfecțioasă	156
Mediatorii moleculari ai reactivității imunitare	157
Bazele celulare și moleculare ale memoriei imunologice	162
Recircularea limfocitelor	164
Bazele moleculare ale fenomenului de „homing”	166
Recircularea limfocitelor în organele limfoide ale mucoaselor	168
Efectul stimulării antigenice asupra țesutului limfoid secundar	170

Toleranța imunitară	171
Factorii care condiționează inducerea stării de toleranță	173
Toleranța fătului	174
Capitolul VI. Conflictul gazdă-microorganisme patogene	177
Caracterele generale ale microorganismelor patogene	178
Patogenitatea	178
Virulența	179
Factorii care condiționează virulența	179
a) Agresivitatea	180
Molecule și structuri celulare cu rol de agresine	180
b) Infecțiozitatea	183
Structuri moleculare și anatomice cu rol de aderență	184
c) Toxigenitatea	187
Toxine de natură proteică	189
Structura moleculară a toxinelor bacteriene	190
Determinismul genetic al sintezei toxinelor	191
Rolul toxinelor în patogenizarea bacteriană	192
Receptori celulari pentru toxine	193
Pătrunderea moleculelor de toxină în celulă	194
Toxine citolitice	195
Toxine neurotrope	196
Toxina tetanică	196
Toxina botulinică	197
Toxina cărbunoasă	198
Toxine inhibitoare ale sintezei proteice	199
Toxina difterică	199
Exotoxina A produsă de <i>P. aeruginosa</i>	200
Toxina dizenterică	201
Enterotoxine	222
Toxina holerică	222
Enterotoxinele produse de <i>E. coli</i>	204
Exotoxina pertusis	204
Toxine streptococice	205
Toxine stafilococice	206
Endotoxine lipopolizaharidice	208
Structura chimică a moleculei de LPS	209
Endotoxine mureinice	112
Citotoxina de <i>B. pertusis</i>	212
Endotoxinele – mediatori ai patogenici în infecțiile cu bacterii Gram negative	212
Mecanismul molecular al efectelor endotoxinelor	215
Condițiile de apariție a procesului infecțios	219
a) Izvorul de infecție	219
b) Calca de eliminare a agenților patogeni	220

c) Calea de transmitere a agenților infecțioși	221
d) Poarta de intrare în organism	222
Infecția. Tipuri de infecții	223
Infecții locale și invazive	?
Modalitățile de manifestare a patologiei infecțioase	225
Posibilități de evoluție a procesului infecțios	228
Etapile maladiei infecțioase	321
Tipuri de evoluție epidemiologică a infecției	232
<i>Capitolul VII. Mecanisme de apărare antiinfecțioasă</i>	<i>232</i>
Imunitatea antiinfecțioasă	232
Structura antigenică a celulei bacteriene	233
Tipurile de imunitate dobândită (adaptativă)	236
Vaccinurile de origine bacteriană	239
Alte căi de obținere a unor noi vaccinuri virale	241
Caracterele generale ale imunizării artificiale active	243
Vaccinurile virale	245
Rezistența antiinfecțioasă nespecifică	247
Factorii mecanici ai apărării organismului	248
Rolul factorilor humorali în apărarea nespecifică	249
Sisteme celulare implicate în rezistența nespecifică antiinfecțioasă	252
Sistemul fagocitar mononuclear (SFM)	253
Fagocitoza	259
Oponinele	260
Funcții auxiliare ale macrofagelor	263
Sistemul celular polimorfonuclear (PMN)	266
Sisteme bactericide active în PMN neutrofile	269
Deficiențe ale sistemului PMN neutrofile	273
Inflamația	275
Chimiotaxia	279
Mediatorii reacției inflamatorii	281
<i>Capitolul VIII. Sistemul complement</i>	<i>284</i>
Mecanismul general de activare a sistemului complement	285
Calea clasică de activare a complementului	286
Calea alternativă a fixării complementului	290
Funcțiile sistemului complement	293
Anafilatoxinele	294
Proteine reglatoare ale activității sistemului complement	296
Epuizarea experimentală a complementului seric	297
Biosinteza componentelor sistemului complement	297
Rolul complementului în apărarea antiinfecțioasă bacteriană	298
<i>Bibliografie selectivă</i>	<i>300</i>

INTRODUCERE

Imunologia este o disciplină de sine stătătoare în plină evoluție, una dintre cele mai cuprinzătoare și competitive științifice moderne. Ea este o ramură a științelor biologice, caracterizată printr-un dinamism extrem de accentuat, cu o diversificare mereu crescândă a activităților normale și patologice, în care funcția imunitară este implicată. Imunologia se bazează pe o serie de concepte biologice pentru explicarea funcției imunitare ca funcție esențială a organismului.

Imunologia s-a dezvoltat inițial, ca un domeniu al Microbiologiei, sprijinindu-se pe Patologie și Biochimie, dar astăzi este implicată în toate disciplinele biologice de bază, precum și în numeroase specialități clinice.

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

Obiectul de studiu al Imunologiei a evoluat odată cu progresul științelor biologice în general și al aprofundării cunoașterii funcțiilor de apărare în special.

La începuturile sale Imunologia a studiat reactivitatea organismului uman și animal și elaborarea răspunsului imun în cursul infecției cu agenți patogeni, precum și particularitățile țesuturilor, celulelor și moleculelor care condiționează instalarea stării de imunitate. În sens clasic, noțiunea de imunitate definea starea de nereceptivitate sau de rezistență a organismului față de un agent patogen infecțios, atunci când erau îndeplinite toate condițiile pentru apariția unei maladii infecțioase. Din acest motiv, Imunologia s-a conturat, inițial, ca un domeniu al Microbiologiei. Efectul activării funcției imunitare era considerat ca fiind exclusiv benefic pentru organism.

Începând cu anii '60 interesul științific pentru Imunologie a crescut considerabil, din două motive: a) s-a demonstrat că funcția imunitară este esențială pentru organism, insuficiența sa mărin­d riscul infecțiilor cu microorganisme patogene sau potențial patogene, iar disfuncția imunitară severă este

incompatibilă cu viața; b) s-a arătat că activarea funcției imunitare are nu numai un rol benefic pentru organism, ci uneori determină apariția unor leziuni tisulare severe, chiar ireversibile sau facilitează manifestarea unor stări patologice. Iată câteva situații de acest gen:

1) **Stările de hipersensibilitate** sunt caracterizate prin faptul că organismul, la primul contact cu o anumită substanță străină se sensibilizează față de aceasta și la un contact ulterior, chiar cu cantități foarte mici ale substanței respective, reacționează cu manifestări patologice de intensități variabile, al căror rezultat final poate fi fatal; alergii la polen, la diferite medicamente (penicilină), alergii alimentare, sensibilitatea tegumentară (de contact) față de diferite substanțe chimice (coloranți etc.);

2) **Maladiile autoimune** sunt manifestări patologice ale activării funcției imunitare și constituie un domeniu medical vast, în continuă expansiune. Mecanismul general al apariției lor este întreruperea stării de toleranță perfectă pe care sistemul imunitar normal o manifestă față de componentele chimice proprii organismului. Toleranța este rezultatul unui proces de selecție clonală care are loc în perioada dezvoltării embrionare a celulelor efectoare ale răspunsului imun. Datorită unor stări anormale legate de procese de îmbătrânire, infecțioase și patologice degenerative sau datorate utilizării substanțelor medicamentoase, în organism apar modificări chimice tisulare care nu mai sunt tolerate de sistemul imunitar. Consecința este declanșarea unui răspuns imun față de componentele proprii ale organismului. Se inițiază astfel un conflict autoimun, în care sistemul imunitar se activează și componentele modificate chimic devin ținta activității sale;

3) **Respingerea grefelor de țesuturi și organe** este rezultatul activării sistemului imunitar sub acțiunea componentelor chimice proprii țesutului sau organului grefat. Autogrefele sunt tolerate totdeauna. Cu cât diferențele genetice și biochimice între organismul donor și receptor de grea sunt mai accentuate, cu atât grea este respinsă mai repede.

Datorită extinderii sferei de cuprindere a funcției imunitare, în concepția modernă, ea se definește ca o proprietate biologică esențială a organismului uman și animal, care constă în capacitatea de a diferenția foarte rapid și specific, substanțele proprii de cele străine. Față de substanțele proprii, sistemul imunitar este tolerant, deoarece a „învățat” să le recunoască în timpul vieții embrionare, dar diferențiază cu mare finețe substanțele străine, față de care se activează prompt pentru a le îndepărta din organism.

Componentele chimice proprii organismului, pe care sistemul imunitar le tolerează sunt incluse în noțiunea de „self” (englez = propriu), iar cele străine poartă denumirea generică de „substanțe nonself” sau antigene.

Funcția imunitară este o funcție biologică esențială, prin intermediul căreia organismul diferențiază substanțele self de cele nonself și are rol hotărâtor pentru păstrarea homeostaziei mediului intern și a individualității biochimice a fiecărui organism. Sistemul imunitar recunoaște și tolerează structurile chimice proprii organismului, dar se activează în prezența celor care se abat de la normele chimice tolerate și le îndepărtează. Funcția sa fundamentală – discriminarea între self și nonself – este mediată de receptori celulari și molecule solubile cu rol de recunoaștere. Așa cum sistemul genetic asigură stabilitatea și integritatea unei specii ca sistem biologic, sistemul imunitar asigură păstrarea homeostaziei biochimice a organismului.

Etapele dezvoltării imunologiei ca știință

Imunologia este o știință relativ tânără, care a apărut inițial ca un domeniu al Microbiologiei, după descoperirile lui Pasteur și Metchnikoff, cu care păstrează încă legături de importanță fundamentală, deși astăzi imunologia este una dintre ramurile cele mai importante și mai dinamice ale științelor biologice.

Apariția Imunologiei ca știință a fost precedată cu milenii, de observații empirice, referitoare la faptul că vindecarea unor boli infecțioase era urmată de o stare de rezistență permanentă la reinfecție sau cel mult, de forme ușoare de îmbolnăvire.

Cu 2-3 secole înaintea erei noastre, în China și India s-a observat că unele maladii infecțioase foarte grave (variola, ciurma), induc o stare de imunitate foarte solidă la persoanele care supraviețuiesc, datorită căreia rezistă la reinfecții ulterioare.

În infecția variolică apar leziuni caracteristice, în special pe tegumentul feței (vărsat de vânt). Leziunile primare sunt numeroase vezicule mici pline cu exudat clar, care se tulbură ulterior. Vezicula se sparge, se formează o crustă și după vindecare rămâne o cicatrice pentru tot restul vieții. Primele încercări de vaccinare antivariolice au constat în infectarea voită a persoanelor sănătoase, în folosirea obiectelor foștilor bolnavi sau chiar în prizarea prin inhalare a maceratului de cruste uscate. Aceste procedee de variolizare prezentau riscul unei infecții cu gravitate necontrolată, condiționată de cantitatea de inocul, de virulența agentului, care puteau depăși capacitatea de apărare a organismului.

În 1418, procedeul variolizării a fost introdus în Anglia de Mary Wortley Montagu și practicat o perioadă, cu toate riscurile unei îmbolnăviri grave, chiar cu sfârșit letal.

Vaccinarea antivariolică a fost introdusă în practică de către medicul veterinar englez E. Jenner (1796). Vaccinul este un virus infecțios pentru bovine (cowpox).

El a pornit de la observația, că în cursul marilor epidemii de variolă, mulgătorii care fuseseră anterior infectați cu virusul vaccinal sunt imuni. Virusul variolei (smallpox) și virusul vaccinal (cowpox) sunt înrudite biochimic și induc o stare de imunitate încrucișată. Probabil, ele au origine comună, dar s-au adaptat la gazde diferite.

Debutul imunologiei ca știință este greu de precizat. N. K. Jerne (1977) propune următoarele etape:

1) **Perioada aplicațiilor practice** este premergătoare stabilirii cadrului conceptual al Imunologiei. Etapa este ilustrată de descoperirile lui Pasteur cu aplicație practică fundamentală. Este perioada marilor descoperiri ale vaccinurilor. Denumirea de „vaccin” a fost dată de Pasteur în amintirea produsului recoltat de Jenner din leziunile de pe ugerul vacii și s-a păstrat pentru toate produsele utilizate în scopul creării unei stări de rezistență preventivă față de eventualul contact cu agentul patogen. Pasteur a fundamentat științific practica producerii și utilizării vaccinurilor. El a demonstrat că proprietățile biologice (patogenitatea și virulența) agenților infecțioși nu sunt fixe, ci se pot modifica în anumite condiții: pot fi diminuate prin anumite artificii de tehnică, astfel încât virulența unui agent care determină infecții grave poate fi atenuată și agentul poate să producă o infecție ușoară, fără semne clinice, dar care creează o rezistență foarte solidă. Pasteur a realizat atenuarea virulenței bacteriilor prin două metode: prin îmbătrânirea culturilor și prin cultivarea la temperaturi ridicate.

Etapa descriptivă corespunde perioadei 1890–1930 și este marcată de descoperirea fagocitozei de către Metchnikoff (1890–1910) și de punerea bazelor imunității celulare. În același timp, Behring și Kitasato (1890) au evidențiat existența anticorpilor și au pus bazele conceptului de imunitate humorală. Ehrlich (1900) a formulat **teoria lanțurilor laterale** cu privire la anticorpo-geneză, anticipând descoperirea fenomenelor de recunoaștere a substanțelor nonself și a receptorilor celulari și a evidențiat faptul că organismele nu produc anticorpi față de constituienții celulari proprii (horror autotoxicus). Landsteiner (1914) a descris existența sistemului grupelor sanguine ABO și implicațiile lui în practica transfuziilor.

Ramon (1925) a demonstrat că unii agenți patogeni (difteric, tetanic) produc toxine foarte puternice. În anumite condiții, toxinele își pierd proprietățile toxice și pot fi injectate fără să determine stări patologice, dar își păstrează capacitatea de a imuniza.

În 1894, Pfeiffer a descris fenomenul de bacterioliză, mediată de anticorpii specifici și de complementul din serul normal de cobai.

Etapa elucidării structurii moleculare a antigenelor și anticorpilor este dominată de un spectru larg al cercetărilor de biochimie. Studiile cu ajutorul antigenelor artificiale au clarificat proprietățile substanțelor imunogene și au demonstrat capacitatea organismului de a produce anticorpi față de substanțe chimice care nu se găsesc în natură.

Etapa descoperirii mecanismelor celulare (1950–1970) este marcată de progresele biologiei moleculare și de interferența cu Virologia, Biologia celulară, Biofizica, Biochimia, Genetica. S-a evidențiat rolul esențial al limfocitului în fenomenele imunitare, precum și mecanismele sintezei și secreției anticorpilor de către plasmocit. McFarlane Burnet (1958) a elaborat teoria selecției clonale, ca mecanism celular fundamental al elaborării răspunsului imun specific. J.F.A.P. Miller (1960) a stabilit rolul esențial al timusului în procesul de maturare a sistemului imunitar. Timusul este un organ imunocompetent care condiționează diferențierea și maturarea funcțională a limfocitelor T. Miller și Good (1961) au evidențiat rolul bursei lui Fabricius în geneza sistemului imunitar la păsări.

J. Dausset (1958) a demonstrat că pe suprafața celulelor oricărui organism se găsesc o serie de molecule (antigene), care conferă fiecărui organism o „personalitate antigenică” unică. Datorită acestor molecule, grefa evoluează spre respingere, cu atât mai rapid cu cât, între organismul donor al grefei și cel receptor, diferențele genetice sunt mai accentuate. Antigenele suprafeței celulare, denumite antigene de histocompatibilitate conferă individualitate biochimică inconfundabilă fiecărui organism.

Etapa sistemică (după 1970) corespunde unei abordări integratoare, de analiză structurală a întregului sistem imunitar. După opinia lui Jerne (1985) „imunologia și-a pierdut statutul de disciplină izolată, fiind pe cale de a fi absorbită de biologia clasică”. Realizările acestei etape sunt extrem de numeroase:

- cunoașterea amănunțită a celulelor sistemului imunitar (morfologie, origine, dezvoltare ontogenetică, distribuția tisulară, recircularea etc.);*
- heterogenitatea funcțională a diferitelor tipuri de limfocite T: Th, Tc, Ts, Ta, T_{DH};*
- identificarea markerilor fenotipici de suprafață;*
- interacțiunile dintre diferitele tipuri și subpopulații celulare;*
- bazele moleculare ale fenomenelor de recunoaștere;*
- descoperirea receptorului de antigen al celulelor T și a fenomenului de recunoaștere asociată;*

- mecanismul activării limfocitelor T și B;
- structura genetică a complexului major de histocompatibilitate (CMH), cu rol esențial în elaborarea răspunsului imun;
- descrierea structurii chimice a antigenelor de histocompatibilitate;
- stabilirea bazelor genetice ale enormei diversități a anticorpilor;
- descrierea nivelelor de heterogenitate a anticorpilor;
- realizarea tehnologiei hibridomului și producerea anticorpilor monoclonali, cu uniformitate perfectă pentru un singur antigen;
- descoperirea interleukinelor, leucotrienelor și a rolului lor;

Această ultimă etapă corespunde, în planul nivelului de abordare, **imunologiei moleculare**.

Spectrul cercetării imunologice s-a extins și s-a aprofundat, dar în același timp domeniul imunologiei este mai unificat, sub imperativul comun al explicațiilor la nivel molecular.

După ce vor fi mai bine înțelese aspectele legate de determinismul genetic al răspunsului imun, diferențierea limfocitelor, mecanismele moleculare ale funcțiilor lor va fi posibilă utilizarea cunoștințelor în prevenirea bolilor cu substrat imun, în prevenirea respingerii grefturilor și în controlul imunologic al malignităților.

Imunologia este o știință de sine stătătoare și dispune de numeroase date de ordin experimental, cu privire la structura, funcția și reglarea activității constituenților săi. Descoperirile din sfera Imunologiei au restructurat multe concepte ale disciplinelor biologice clasice: histologia, citologia.

DIVIZIUNILE IMUNOLOGIEI

Imunologia s-a născut ca un domeniu al Microbiologiei și s-a dezvoltat în acest cadru, fiind un domeniu al Bacteriologiei medicale, până aproape de 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 stătătoare. Mai mult decât atât, din domeniul diversificat al Imunologiei s-au desprins ramuri, care la rândul lor tind să aibă o existență autonomă. Cea mai cuprinzătoare dintre ramuri este *Imunibiologia*, care abordează aspectele imunitare ca manifestări ale unei funcții biologice esențiale – funcția de apărare. Imunobiologia studiază *substratul biologic* al răspunsului imun (celulele sistemului imunitar, originea și mecanismele diferențierii lor, factorii celulari și humoralii ce asigură diferențierea lor), mecanismele celulare și moleculare ale *biosintezei anticorpilor*, explică fenomenele imunitare legate de *implantarea celulelor tumorale* și geneza cancerului. Studiază deasemenea, mecanismele imunitare ale *respingerii grefelor de țesuturi și organe*, mecanismele *răspunsului imun în filogenie și ontogenie*, precum și bazele celulare și moleculare ale *manifestărilor de hipersensibilitate* și ale *maladiilor autoimune*.

Imunochimia studiază procesele imunitare din punct de vedere biochimic. Preocuparea principală și primordială a imunochimiei a constat în studiul chimiei antigenelor și anticorpilor și al mecanismului lor de interacțiune. Ulterior, imunochimia și-a lărgit sfera de activitate. Ea se ocupă de studiul factorilor și moleculelor care intervin în răspunsul imun (în special în răspunsul imun mediat celular): limfokine, antigenele de histocompatibilitate, receptorii de antigen ai celulelor limfoide, precum și cu studiul biochimic al componentelor complementului.

Imunogenetica studiază determinismul genetic al răspunsului imun, mecanismele genetice ce asigură biosinteza anticorpilor și cele ce asigură diversitatea antigenelor de histocompatibilitate.

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

Imunologia medicală umană și veterinară s-a dezvoltat în 3 direcții:

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

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

- direcția *diagnosticului* studiază posibilitatea identificării agenților etiologici ai diverselor maladii infecțioase, cu ajutorul reacțiilor imunologice (seruri și antigene).

Imunopatologia studiază fenomenele imunitare în relație cu diferite maladii. În multe situații patologice, răspunsul imun (activarea funcției imunitare) are efecte defavorabile, prejudiciante asupra organismului. Răspunsul imun se instituie drept cauză și mecanism pentru producerea unor manifestări patologice. Afecțiunile generate de activarea sistemului imunitar (imunopatiile) se grupează în 3 categorii: 1) *imunodeficiențe primare* (înăscute) și *secundare* (dobândite); 2) stările de *hipersensibilitate*; 3) maladiile *autoimune*. *Imunopatologia* studiază, de asemenea, *imunitatea de transplant* și *imunitatea antitumorală*, răspunsul imun în maladiile infecțioase virale și bacteriene, precum și în maladiile parazitare.

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

C a p i t o l u l I

CARACTERIZAREA GENERALĂ A ANTIGENELOR

Convențional și operațional, antigenele se definesc ca fiind substanțe străine care, introduse în organismul uman sau animal pe o cale parenterală declanșază producerea de anticorpi, cu care se combină în mod specific.

Definiția este incompletă din următoarele motive:

1) calea de administrare digestivă nu exclude întotdeauna posibilitatea declanșării răspunsului imun, ci asigură o bună imunizare în cazul unor agenți infecțioși care se multiplică în tubul digestiv (vaccinul polio se administrează oral, deși calea parenterală este mai eficientă);

2) unele substanțe sunt fals considerate ca neantigene, pentru că nu induc reacții vizibile antigen-anticorp *in vitro*;

3) față de unele antigene nu se declanșază răspuns imun, ci se manifestă o stare de toleranță;

4) unele molecule, ca atare, nu induc un răspuns imun. Ele activează răspunsul imun numai dacă sunt cuplate covalent cu un suport molecular. Molecula nativă are proprietatea de a se combina specific cu anticorpii astfel formați. Acestea se numesc *haptene*.

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

MODELUL GENERAL DE STRUCTURĂ AL UNUI ANTIGEN

Un antigen este alcătuit dintr-o componentă denumită „purtător” (*carrier*), care corespunde celei mai mari părți a moleculei, pe suprafața căreia se găsesc subunități mici formate din secvențe specifice de monomeri care se numesc grupări determinante de specificitate. Ele conferă individualitatea chimică și

specificitatea antigenică a moleculei respective. Grupările determinante de specificitate (gds) sunt echivalenții moleculari ai *haptenei*.

PROPRIETĂȚILE ESENȚIALE ALE ANTIGENELOR

Utilizând moleculele sintetice, M. Sela (1969) a descris două proprietăți esențiale ale antigenelor:

1) *Imunogenitatea* (antigenitatea) este proprietatea unui antigen complet, format din gruparea *carrier* și *epitopi*, de a declanșa un răspuns imun ori de câte ori pătrunde în organism. Această proprietate este asociată cu gruparea *carrier* a moleculei, grupare care influențează într-o oarecare măsură specificitatea anticorpile sintetizate;

2) *Specificitatea* este definită de capacitatea antigenului (sau a unor mici regiuni ale moleculei sale) de a se combina în mod strict specific cu anticorpii sau cu receptorii celulari a căror sinteză a indus-o, ori de câte ori vine în contact cu aceștia. Specificitatea este dependentă, în primul rând, de epitopi (g d s), dar este influențată într-o oarecare măsură de gruparea *carrier*.

CLASIFICAREA ANTIGENELOR

După originea lor, antigenele sunt *exogene* și *endogene*.

Antigenele exogene sunt cele mai numeroase și pot fi împărțite în 3 categorii:

1) *naturale*; 2) *artificiale*; 3) *sintetice*.

Antigene naturale

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

După dimensiuni se disting:

1) Antigene *moleculare* (solubile); proteine, polizaharide, lipide, acizi nucleici;

2) Antigene *corpulare* (insolubile): virusuri, celule (bacterii, celule eucariote).

Antigenele *proteice* sunt cele mai numeroase și cele mai importante. Fiecare moleculă proteică are o structură tridimensională unică determinată de secvența de aminoacizi. Antigenitatea este o proprietate comună atât proteinelor structurale (mioglobina, albumina, proteine ale capsidului virale etc.), cât și celor funcționale: enzime și hormoni. Toate proteinele și polipeptidele cu o g m mai mare de 1000 D sunt imunogene într-o măsură mai mare sau mai mică.

În cazul antigenelor proteice nu se poate delimita componenta moleculară *carrier* de grupările inductoare ale răspunsului imun (epitopi). Există posibilitatea

ca o anumită regiune a moleculei, în anumite condiții experimentale, să aibă rolul de purtător, iar altele să se comporte ca epitop. De aceea M. Sela a recomandat utilizarea termenului de *grupare imunodominantă*.

După intensitatea răspunsului imun pe care-l declanșază, se disting antigene *puternice* și *slabe*.

Imunogenitatea proteinelor se modifică sub acțiunea unor factori fizici (căldura) sau chimici (care-determină schimbări conformaționale). Hidroliza enzimatică modifică imunogenitatea proteinelor în diferite grade. Formaldehida nu modifică imunogenitatea, dar anulează activitatea biologică a proteinelor (toxinele își pierd proprietățile toxice, dar rămân imunogene).

Enzimele sunt antigenice indiferent de originea lor. După combinarea cu anticorpului specifici față de situsul activ, enzima își pierde activitatea datorită modificării conformaționale a moleculei. Dacă gds sunt situate în afara situsului catalitic, activitatea enzimei este parțial inhibată sau rămâne intactă. Foarte rar, complexul enzimă-anticorp are un efect catalitic superior.

Hormonii sunt molecule slab imunogene, datorită uniformității relative a structurii lor chimice în regnul animal. Anticorpului specifici se obțin prin asocierea lor prealabilă cu adjuvantul Freund.

Polizaharidele sunt molecule slab imunogene. Antigenitatea lor este conferită de succesiunea unităților componente și de configurația spațială a moleculei. 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) cele ce nu au o catenă centrală, iar ramificațiile sunt dispuse fără nici-o simetrie. Rolul catenelor centrale în imunogenitate este controversat, dar ramificațiile au o deosebită importanță pentru determinarea specificității antigenice a polizaharidelor.

De cele mai multe ori, polizaharidele se comportă ca *haptene*, adică devin antigenice după cuplarea cu un purtător *proteic*, dar au proprietatea de specificitate, adică se combină cu anticorpului complementari față de complexul glicoproteic.

Se cunosc determinanții antigenici ai glicoproteinelor cu specificitate de grup sanguin în sistemul ABO. Aceste glicoproteine se găsesc nu numai pe suprafața hematiilor și în țesuturi, dar și în secrețiile exocrine (salivă, suc gastric) la 75% dintre indivizi. Sunt molecule hidrosolubile și studiul lor a fost mult mai ușor decât al moleculelor de pe suprafața hematiilor.

Carbhidrații glicoproteinelor eritrocitare au rol dominant în determinarea specificității de grup sanguin, așa cum a reieșit din studiile de digestie enzimatică controlată. Specificitatea antigenică de grup A este conferită de N-acetilgalactozamină. Cea de grup B este datorată galactozei, iar specificitatea de grup O(H) este o funcție a fucozei.



Polizaharidele structurale ale capsulei celulei bacteriene sunt antigenice.

Dextranii sunt polimeri de glucoză sintetizați extracelular de unele bacterii lactice. Au greutatea moleculară foarte diferite, în funcție de gradul lor de polimerizare. Nu sunt imunogeni și de aceea se folosesc ca înlocuitori ai plasmiei. Prin transfuzii repetate cu soluții de dextran, la om s-au obținut anticorpi antidextran. Modul de legare a unităților de glucoză ($1 \rightarrow 2$, $1 \rightarrow 3$, $1 \rightarrow 4$, $1 \rightarrow 6$) creează diferențe de ordin chimic între diferitele tipuri de dextrani. Acestea pot genera diferențe de specificitate antigenică.

Acizii nucleici, în stare purificată sunt molecule neimunogene datorită uniformității lor structurale în lumea vie. Asocierea lor cu proteine de legare (în ribosomi, sau legarea ADN fagic cu proteinele capsidale) sau cu polizaharide le conferă imunogenitate. Anticorpilor sintetizați sub acțiunea conjugatelor se combină cu acidul nucleic pur. Acidul nucleic se comportă ca haptentă, iar anticorpilor sunt lipsiți de specificitate. De exemplu, serurile imune anti-ARN reacționează cu orice preparat de ARN pur, indiferent de originea sa. Acizii nucleici, *in vitro* și *in vivo* interacționează nespecific cu numeroase proteine și le conferă o nouă specificitate antigenică.

Lipidele sunt neimunogene, dar se pot cupla cu proteinele și se comportă ca haptene. O haptentă lipidică cu o importanță practică deosebită este *cardiolipina* din cordul mamiferelor. În serul indivizilor infectați cu *Treponema pallidum* se găsesc anticorpi, care, *in vitro* se combină cu cardiolipina (reacție încrucișată) înalt purificată, extrasă din cordul bovin.

Antigenele corpusculare. Proteinele și glicoproteinele învelișurilor *virale*, ca și cele expuse pe suprafața celulelor infectate sunt imunogene și au rol în declanșarea răspunsului imun al gazdei.

Antigenele *bacteriene* sunt fie *solubile* (eliminate în mediul extracelular), fie *corpusculare* (legate de corpul celulei). Din prima categorie fac parte *exotoxinele*, iar din cea de a II-a, antigenul somatic (care corespunde endotoxinei bacteriilor Gram negative), antigenul polizaharidic capsulăr, flagelina, pilina, mureina etc.

Antigenele *eritrocitare*, sunt glicoproteine ale suprafeței eritrocitelor, cu determinism biochimic bine cunoscut. Ele conferă specificitatea de grup în sistemul ABO (ABH) și condiționează regulile generale ale transfuziei de sânge. Se numesc și antigene ABH, deoarece antigenul H se găsește pe eritrocitele de grup O și în cantitate progresiv descrescândă pe hematii de grup A, B și AB.

Antigenele de *histocompatibilitate* (descrise de J. Dausset, 1958) se găsesc pe suprafața celulelor din majoritatea țesuturilor fiecărui organism și conferă individualitate chimică proprie fiecărui individ uman și animal. Se numesc și antigene de *transplantare*, deoarece, antigenele respective, după transplantarea

celulelor la un organism receptor se comportă ca antigene și sunt răspunzătoare de respingerea grefelor, prin declanșarea răspunsului imun. Antigenele de histocompatibilitate se evidențiază prin reacția de respingere a grefelor tisulare. 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. Antigenele de histocompatibilitate sunt molecule cu caracter strict individual. Sub acțiunea unor factori fizici și chimici se modifică, devin antigene și generează maladiile autoimune;

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

3) aloantigenele (alos = altul) includ moleculele celulare, care, după injectare declanșază răspunsul imun la organisme ale aceleiași specii, dar neidentice genetic cu 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 celule provenite de la organisme ale aceleiași specii, dar aparținând unui alotip diferit;

4) heteroantigenele (xenoantigene, xenos = străin) includ molecule care se găsesc în/pe celulele tuturor indivizilor unei specii și care se comportă ca antigene față de organismele altei specii. Aceste antigene se evidențiază prin imunizarea unui organism, cu celule provenite de la un organism al unei specii diferite. Un astfel de preparat aduce în organismul receptor, nu numai heteroantigene, ci și aloantigene și chiar autoantigene. Injectarea unui astfel de preparat este una dintre cele mai utilizate metode pentru a induce experimental sinteza autoanticorpilor.

Antigenele de organ sunt rezultatul particularităților biochimice ale diferitelor categorii de celule din alcătuirea unui organ. Antigenele cu specificitate tisulară conferă o anumită marcă biochimică diferitelor organe. De exemplu, proteinele din glanda mamară diferă de proteinele țesutului renal al aceluiași organism.

Antigenele tumorale sunt antigene de transplantare, anormale, cu imunogenitate redusă. Orice structură chimică a celulei maligne, absentă în/pe celulele sănătoase ale țesutului de origine a tumorii, susceptibilă de a induce o reacție imunitară, fie la gazdă, fie la un alt organism poate fi considerată antigen tumoral.

După malignizare, suprafața celulară este cea mai modificată. Semnalele reglatoare de control al creșterii și multiplicării, care acționează în primul rând la nivelul membranei, nu-și găsesc țința structurală și comportamentul celular se schimbă. Lipsa inhibiției de contact este cea mai evidentă dintre modificările celulei maligne.

Se disting 4 clase de antigene tumorale.

1) antigenele *oncofetale* se găsesc pe suprafața celulelor tumorale, dar și a celulelor normale în timpul unei faze de diferențiere embrionară. Nu se găsesc pe suprafața celulelor organismului adult, sau se găsesc în cantități foarte mici. Antigenele de suprafață ale celulei tumorale, descrise ca antigene de transplantare specific tumorale (TSTA = *tumour specific transplantation antigen*) sunt, probabil, sintetizate în interiorul celulei și transportate la periferie, ca și antigenele normale de transplantare. Ele se găsesc pe suprafața celulelor maligne, dar pot trece și în fluidele organismului, devenind astfel foarte importante pentru serodiagnosticul stărilor neoplazice.

Aceste antigene au fost purificate și s-au obținut antiseruri specifice.

Antigenul *carcinoembrionar* (CEA) a fost izolat de la un pacient cu tumoră de colon. CEA este o glicoproteină de suprafață a celulelor normale ale tractului digestiv al fătului. Se găsește pe celulele maligne ale tractului digestiv uman (intestin subțire, pancreas, ficat, stomac, colon) și pe celulele normale ale organelor fetale. CEA apare nu numai în țesutul neoplazic, ci și în sângele a 60–80% dintre pacienții cu tumoră de colon, precum și la pacienții cu ciroză alcoolică a ficatului sau cu insuficiență renală.

Alfa fetoproteina (AFP) este o α -globulină normală a sângelui fetal uman și dispare la o săptămână după naștere. La adult crește semnificativ în cazul carcinomului hepatic, dar și a unor tumori cu alte localizări.

Anticorpilor specifici anti-CEA și anti-AFP, marcați radioactiv pot permite, *in vivo*, depistarea și localizarea tumorilor și chiar a metastazelor.

Antigenul *sulfo-glicoproteic* (o glicoproteină cu sulf) se găsește în țesuturile fetale și s-a izolat din tumori gastrice.

2) Antigenele de *transplantare* (TATA = *tumour associated transplantation antigen*) sunt detectabile pe suprafața celulelor tumorilor induse de carcinogenii chimici. Ele sunt prezente la numeroase tumori experimentale, dar în unele cazuri lipsesc. Demonstrarea prezenței și a imunogenității lor necesită studiul imunologic al tumorilor induse la aceeași linie înbred. Toate organisme ale unei linii înbred au antigene de transplantare normale, identice. Demonstrarea indirectă a antigenelor tumorale de transplantare echivalează cu evidențierea reacției de respingere a grefei de țesut tumoral, de către un organism al aceleiași linii înbred, cu cel donor de țesut tumoral.

Antigenele de transplantare ale tumorilor induse chimic sunt *individuale* pentru fiecare tumoră. Chiar tumorile multiple, induse de același agent chimic

(metilcolantrenul) în același țesut (tegument) al unui organism sunt diferite în ceea ce privește antigenele de transplantare. Faptul este explicabil prin diversitatea genelor declanșatoare ale malignizării, care suferă mutație sub acțiunea agentului chimic.

Diversitatea antigenică a tumorilor induse chimic este demonstrată experimental: ficcare tumoră stimulează funcția imunitară a organismului, față de antigenele proprii, dar nu față de antigenele altei tumori.

Antigenele tumorale de transplantare, ca și cele normale sunt complexe glicoproteice sintetizate în celulă și inserate în membrana citoplasmatică. Antigenele tumorilor induse chimic sunt *slabe* sau *puternice*. Tumorile care apar natural sunt slab sau deloc antigenice, ceea ce explică lipsa răspunsului imun și imposibilitatea detectării lor de către efectorii reacțiilor imunitare.

Nu se știe dacă antigenele tumorale sunt prezente pe toate tumorile, și nici dacă celula devine malignă înainte de a da dobândi acești markeri distinctivi.

Antigenele tumorale pot fi stabile și se transmit de la o generație celulară la alta. Majoritatea tumorilor trebuie însă considerate heterogene, genetic instabile și supuse modificărilor calitative și cantitative ale antigenelor exprimate pe suprafața lor.

3) Antigenele celulelor transformate cu *virusuri oncogene ADN* sunt comune tuturor tumorilor, indiferent de natura țesutului și de specia organismului gazdă. Toate tumorile induse de un virus dat au antigenes comune, chiar dacă țesutul de origine sau specia purtătoare a tumorii este alta.

Ca localizare, antigenes acestor tumori se găsesc pe suprafața celulelor (sunt cele mai importante, deoarece sunt expuse acțiunii efectorilor răspunsului imun) și în interiorul celulelor (în nucleu sau în citoplasmă). Aceste antigenes se disting de antigenesle capsidiei virale. Ele nu apar în celula transformată, deoarece replicarea virală este blocată.

4) Antigenes asociate celulelor transformate cu *virusuri oncogene ARN* sunt, ca și cele de mai sus, aceleași pentru un virus dat, indiferent de celula gazdă. Majoritatea lor sunt glicoproteine virale care intră în alcătuirea peplosului, ceea ce le deosebește net de antigenesle induse de virusurile oncogene ADN. Antigenesle glicoproteice sunt codificate de gena *env* (envelope). Tumorile induse de virusurile oncogene ARN pot avea antigenes comune, a căror sinteză este indusă de un *grup* de virusuri înrudite (antigenes specifice de grup) sau antigenes specifice de *tip*, codificate de un număr restrâns de virusuri foarte înrudite.

Tumorile induse de virusurile oncogene (ADN și ARN) se pot transplanta în serie, la organisme inbred sau outbred. Imunizarea prealabilă a organismului cu virusul ARN inactivat inhibă evoluția grefei tumorale. Țesutul tumoral grefat este respins ca orice grefă de țesut normal.

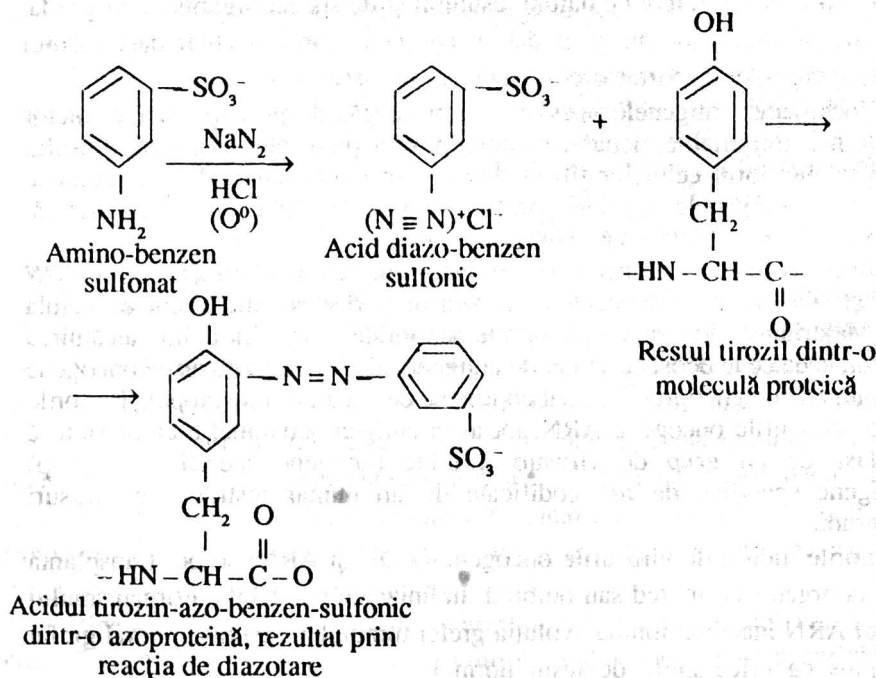
Antigene artificiale

Antigenele artificiale sunt, la origine, antigene naturale, modificate chimic, prin cuplarea – cel mai adesea covalentă – a uneia sau mai multor molecule mici, care le conferă o nouă individualitate antigenică și o nouă specificitate de combinare cu anticorpii, în raport cu molecula de origine. S-au obținut 3 tipuri de antigene artificiale, derivate din antigenele proteice, după legarea lor cu diferite haptene:

- conjugate *haptena-proteină*;
- conjugate *proteină-proteină*, prin intermediul unor agenți bifuncționali de legare (diizocianații și carbodiimidele);
- proteine legate de suporturi insolubile*, prin reacția de diazotare sau prin intermediul carbodiimidelor.

Conjugatele *haptena-proteină* au fost folosite de Landsteiner în studiile experimentale referitoare la mecanismele răspunsului imun. Haptenele, în moleculele conjugate îndeplinesc rolul de epitopi (grupări determinante de specificitate), iar moleculele proteice au rol de carrier (purător).

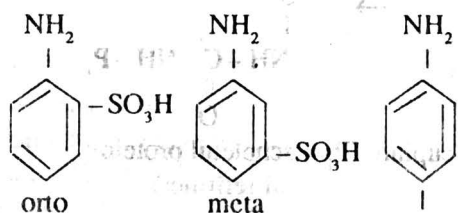
Conjugatele *haptena-proteină* sunt alcătuite dintr-o haptena, cuplată covalent cu o proteină. Landsteiner a cuplat amino-benzen-sulfonatul, de molecule proteice, prin reacția de *diazotare* și a obținut *azoproteine*:



După cuplarea haptenei cu tirozina, histidina sau lizina din structura unei proteine rezultă un antigen artificial, care induce formarea a 3 categorii de anticorpi, cu specificități diferite, după cum reacționează cu haptena, cu molecula purtător sau cu întregul complex azoproteic.

O altă modalitate de a obține conjugate haptenă-proteină este *iodurarea*. Proteinele puternic iodurate dobândesc o nouă specificitate antigenică. Ele induc formarea anticorpilor care precipită proteinele iodurate heterologe. Aceasta denotă că anticorpul are specificitate față de o grupare iodurată, în special față de tirozina iodurată, indiferent de gruparea purtător.

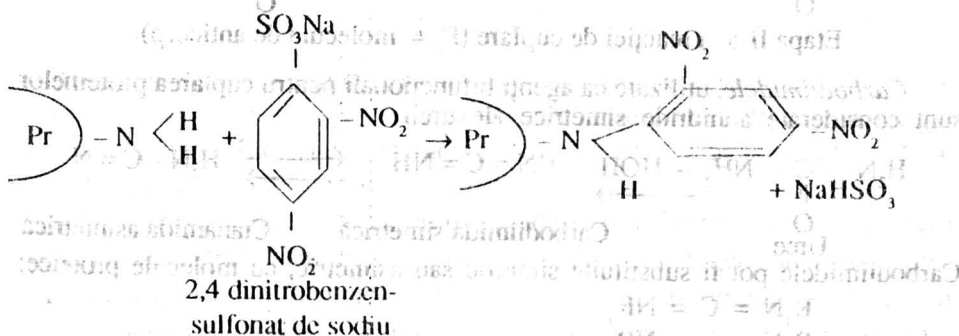
Conjugatele haptenă-proteină au permis studiul influenței aranjamentului spațial al haptenei asupra specificității antigenice. În acest sens, gruparea sulfonat a haptenei este legată în poziția orto-, meta- sau para- amino-benzenului. Antiserurile obținute au specificitate pentru ficcare din derivați. Haptenele creează noi grupări determinante de specificitate, după cuplarea cu molecula purtător.



Izomerul sulfonat meta-, al haptenei conjugată cu proteina păstrează capacitatea de a precipita cu anticorpii obținuți față de proteina nativă, în timp ce izomerii orto- și para- au afinitate foarte scăzută. Izomerii induc modificări conformaționale sterice ale grupărilor determinante de specificitate ale antigenului.

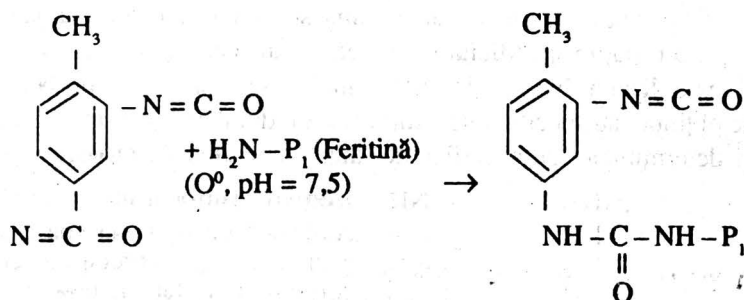
O altă reacție de obținere a conjugatului haptenă-proteină este cea de *substituție nucleofilă*. Cele mai folosite haptene sunt 2,4 dinitrofenil (DNP) și 2,4, 6-trinitrofenil (TNP).

Mecanismul molecular al cuplării este următorul: un atom de H din gruparea OH, NH_2^+ sau S - SH a proteinei, este înlocuit de gruparea haptenică prin eliminarea apei:

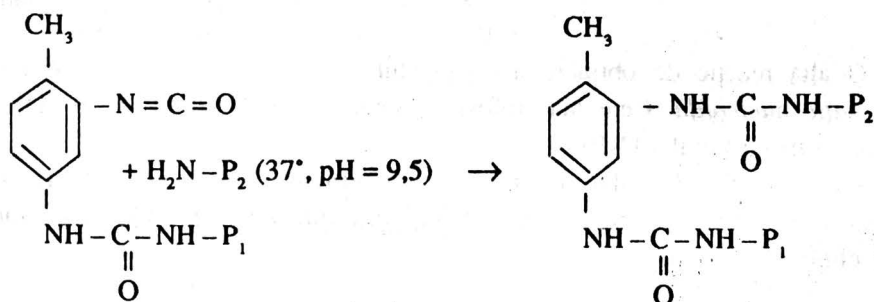


Reacția dintre proteină și 2,4 dinitro-benzen-sulfonatul de sodiu ilustrează mecanismul atacului nucleofilic, reacție în care proteina cedează electroni, iar nucleul benzenic îi acceptă.

Conjugatele *proteină-proteină* se obțin cu ajutorul agenților bifuncționali de legare: diizocianații și carbodiimidele. Deoarece grupările ciano au reactivitate diferită, reacția de cuplare se realizează în trepte. De exemplu, gruparea din poziția 4 a toluien-diizocianatului este mai reactivă decât gruparea din poziția 2. Acest fapt permite ca mai întâi, în poziția 4 să se cupleze una dintre proteine, iar ulterior, cuplarea celeilalte în poziția 2:

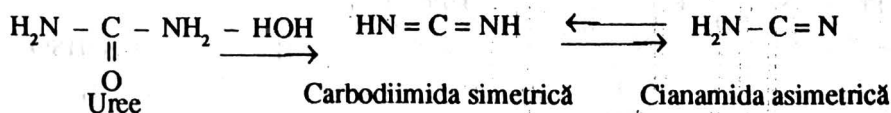


Etapa I a reacției de cuplare (P_1 = scheletul proteic al feritinei)

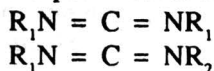


Etapa II-a a reacției de cuplare (P_2 = molecula de anticorp)

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



Carbodiimidele pot fi substituite simetric sau asimetric, cu molecule proteice:



Cu ajutorul agenților bifuncționali de cuplare se pot obține conjugate proteice cum sunt Ac- feritină, insulină-albumină sau se folosesc ca mediatori ai legării diferitelor molecule proteice de eritrocite.

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

Conjugatele anticorpi-suport insolubil (imunosorbenți) sunt folosite cu o eficiență deosebită pentru purificarea proteinelor, datorită specificității lor de combinare cu anticorpii corespunzători, fixați într-o coloană de material inert.

Antigene sintetice

Antigenele sintetice sunt polimeri de aminoacizi, cu secvență cunoscută, obținuți *in vitro*. M. Sela a studiat proprietățile antigenice ale homopolimerilor (poli-lizină, poli-acid glutamic, poli-prolină) și ale heteropolimerilor (copolimeri). Avantajul utilizării lor constă în faptul că se poate modifica compoziția lor chimică, poziția spațială a aminoacizilor, greutatea moleculară a polimerilor, facilitând astfel studiul imunochimic al grupărilor determinante de specificitate antigenică. Catenele pot fi lineare sau ramificate. Cele ramificate rezolvă prin atașarea polimerilor lineari la un miez polifuncțional. Ramificarea se obține mai ușor cu aminoacizii aromatici.

Homopolimerii nu sunt imunogeni decât cu rare excepții (poli L-pro, poli L-glu, poli L-arg, poli L-lys). Copolimerii formați din doi aminoacizi nu sunt totdeauna imunogeni, iar cei rezultați prin polymerizarea a 3 aminoacizi diferiți sunt imunogeni fără excepție. Cu cât sunt mai heterogeni în ceea ce privește compoziția lor, cu atât sunt mai imunogeni.

Haptene

Haptenele (haptein = a apuca) sunt substanțe chimice naturale sau de sinteză, cu moleculă mică, a căror imunogenitate este condiționată de cuplarea cu o moleculă purtător. Ele au proprietatea de specificitate, adică reacționează cu anticorpii specifici, dar nu sunt imunogene.

Denumirea de *haptene* a fost introdusă de Landsteiner pentru a caracteriza funcțional un extract alcoolic de rinichi de cal, neimunogen ca atare pentru iepure, dar capabil să se combine cu anticorpii obținuți prin imunizarea iepurelui cu extractul de rinichi, cuplat cu o moleculă purtător. El a propus ca în categoria

haptanelor să fie cuprinsă orice substanță care, în forma sa nativă nu poate să inducă un răspuns imun detectabil, dar care dobândește capacitatea imunogenă după cuplarea sa *in vivo* sau *in vitro* cu o moleculă purtător cu greutate moleculară mare. Deoarece sunt neimunogene, dar au specificitate antigenică, haptenele s-au numit *jumătăți de antigene*.

În general, haptenele sunt molecule mici, deși uneori macromoleculele pot funcționa ca haptene. Extractul alcoolic de rinichi este o haptенă complexă. Haptenele simple sunt polinucleotidele, alcoolii, formaldehida etc. Cu ajutorul haptanelor simple, prin reacții de cuplare s-au obținut antigenele artificiale. Haptena din complexul molecular are rolul grupării determinante de specificitate. Utilizarea haptanelor a permis determinarea mărimii grupărilor antigenice și indirect, a mărimii situsului de combinare al anticorpilor.

Cuplarea haptенă-purtător necesită existența unei grupări reactive a haptenei, care să se lege covalent cu grupările funcționale ale purtătorului, dar cu păstrarea integrității funcționale a celor doi reactanți. Haptenele se pot cupla de purtători foarte diverși: proteinele naturale (albumina, globulina) care se obțin ușor, sunt solubile, rezistente la denaturare și imunogene, iar conjugatele haptенă-proteină sunt imunogene. Anticorpii formați sunt heterogeni ca specificitate și reacționează cu complexul imunogen, cu haptena și cu determinanții antigenici ai moleculei purtător. Haptenele se pot cupla, deasemenea, cu copolimerii sintetici de aminoacizi, cu celule (hematii), virusuri (fagi) etc.

Haptenele *autocuplante* sunt substanțe cu greutate moleculară mică, a căror particularitate constă în faptul că, după injectare se combină spontan cu proteinele tisulare și formează complexe haptенă-proteină, *in vivo*. Ele induc sinteza anticorpilor și inițiază maladiile autoimune sau determină procese de hipersensibilitate. Astfel se comportă derivații dinitrofenolului substituiți cu Cl sau F, unii produși de degradare a peniciliei etc.

Efectul de carrier. Antigenele prezintă o dualitate funcțională evidentă, conferită de faptul că specificitatea răspunsului imun este orientată predominant față de grupările determinante de specificitate. La rândul său, suportul macromolecular (carrier) conferă o anumită specificitate a răspunsului imun. Experiențele cu conjugate haptенă-proteină (DNP-proteină) au evidențiat că suportul carrier, în cazul în care este nonsell intensifică răspunsul imun. Antigenul artificial s-a obținut prin cuplarea DNP cu albumina de șoarece. Injectarea sa la șoarecele izogen (al aceleiași linii inbred) induce un răspuns imun foarte slab. Conjugatul DNP-albumină serică bovină, injectat la șoarece stimulează intens răspunsul imun antihaptенă. Răspunsul imun nu este orientat numai față de g d s, ci are specificitate și față de gruparea carrier. Fenomenul este foarte important, deoarece modulează proprietățile de antigen ale unei molecule și se numește *efect de carrier*.

Antigene endogene

Antigenele endogene au originea în componentele celulare și tisulare-propriei organismului și sunt de două categorii: 1) antigene *sechestrare* (mascate) și 2) antigene *alterate*.

Antigenele sechestrare sunt substanțe cu localizare intracelulară și prin urmare, inaccesibile sistemului imunitar pentru a fi recunoscute în cursul dezvoltării sale ontogenetice. În momentul eliberării lor din celulă sub acțiunea diferiților factori (fizici, chimici, biologici) substanțele respective se comportă ca nonsell pentru sistemul imunitar al organismului. Alteori există bariere anatomice care separă unele componente chimice ale organismului, de contactul cu sistemul imunitar:

- proteinele cristalinului, în cursul intervențiilor chirurgicale, după traumatismele care sparg capsula, sau după afecțiunile care permeabilizează cristaloida se compartă ca antigene și declanșază un răspuns imun anticristalin (pot fi afectate irisul, procesele ciliare și coroida);

- proteinele spermatice (în situații de spermatază) induc sinteza locală de anticorpi în structurile epididimului, care reacționează cu un antigen al spermatozoizilor și produc sterilitate de natură autoimună;

- caseina din lapte poate deveni antigen endogen.

Antigenele alterate sunt substanțe normale ale suprafeței celulare, legate de membrană, care din diferite cauze (uzură fiziologică, acțiunea diferiților factori) își modifică structura chimică și devin nonsell:

- unele medicamente, după fixarea pe anumite structuri chimice proprii se comportă ca haptene;

- virusurile induc sinteza în celula gazdă, a unor antigene virale, precum și modificarea componentelor self.

În condiții normale, aceste antigene sunt neutralizate și eliminate din organism (Ehrlich în 1900 a formulat conceptul „horror autotoxicus“). În condiții anormale, activarea răspunsului imun față de aceste componente chimice poate avea drept consecință maladii severe autoimune, care sunt considerate ca expresia patologică a funcției imunitare.

Determinanții antigenici

Cel mai adesea, antigenele sunt macromolecule complexe sau chiar celule întregi, dar răspunsul imun (după injectarea lor într-un organism) este orientat predominant față de porțiuni discrete, strict limitate ale antigenului numite *grupări determinate de specificitate* (gds), *situsuri antigenice*, *determinanți antigenici*, *epitopi*.

Epitopul este regiunea limitată a antigenului care se combină cu situsul activ al moleculei de anticorp și determină specificitatea reacției antigen-anticorp. Epitopii se corelează cu o mobilitate înaltă a atomilor în molecula proteică. Studiile de cristalografie cu raze X permit identificarea atomilor individuali și determinarea mobilității lor, exprimată în *factori de temperatură atomică*. Factorii de temperatură ridicată se corelează cu regiuni de *mobilitate moleculară înaltă*, (regiuni calde), care necesită cantități mici de energie, la temperatura biologică, pentru a trece de la o conformație la alta. Invers, regiunile moleculare cu mobilitate atomică redusă au factori termici de valoare mică (regiuni reci) și necesită o cantitate mai mare de energie pentru schimbarea conformației. Mulți determinanți antigenici sunt localizați în regiunile calde ale moleculei.

Capacitatea unei regiuni a moleculei de antigen de a funcționa ca epitop și de a induce formarea anticorpilor specifici de numește *imunopotență*.

Mărimea gds s-a apreciat indirect prin determinarea mărimii haptenei capabilă să „umplă” complet situsul de combinare al anticorpului. Reacția de precipitare a sistemului dextran-antidextran este revelatoare în acest sens. Peste o greutate moleculară prag, dextranul este imunogen și se obține ser imun antidextran. În laborator se prepară ușor oligozaharide, cu dimensiuni mici, controlabile. Reacția de precipitare dextran-antidextran este inhibată progresiv de oligozaharidul de glucoză și atinge valoarea maximă în prezența hexazaharidului. Oligomerul cu 6 resturi de glucoză ar corespunde celui mai bun *ligand* care se cuplează cu anticorpii (ligandul este orice moleculă capabilă să formeze un complex cu o altă moleculă). Heptazaharidul ca și oligazaharidele cu mai puțin de 6 unități de glucoză inhibă mai puțin eficient reacția de precipitare a sistemului folosit. Aceasta semnifică faptul că epitopul este format la rândul său, din subunități, fiecare contribuind la afinitatea (energia) de legare în complexul antigen-anticorp.



Fig. 1. Reprezentarea schematică a mărimii epitopilor antigenelor polizaharidice. În sistemul dextran-antidextran, oligozaharidul format din 6 resturi de glucoză umple situsul de combinare al anticorpilor specifici. Oligozaharidele mai mici sau mai mari nu se combină eficient cu anticorpii corespunzători (după Goodman, 1984).

Cercetări similare s-au făcut cu homopolimeri de aminoacizi (poli-lys, poli-ala) legați de proteine purtător. Serul imun obținut pe iepure, față de aceste conjugate se pune în contact cu haptene de diferite mărimi. Pentamerul de alanină ($25 \times 11 \times 6,5 \text{ \AA}$) se leagă cu cea mai mare afinitate de situsul de combinare al anticorpilor. Pentamerul corespunde epitopului antigenic și reflectă (indirect) dimensiunile situsului de combinare al anticorpilor specifici.

În concluzie, mărimea unui epitop este apreciată la 6–8 *subunități* pentru polizaharide și la 4–6 *aminoacizi* pentru antigenele proteice.

Valența antigenului s-a definit convențional prin numărul de epitopi prezenți pe un antigen sau prin numărul moleculelor de anticorpi care pot reacționa cu o moleculă de antigen. Numărul gds ale unei molecule de antigen variază în raport cu mărimea și complexitatea sa structurală. Valența antigenului se apreciază prin măsurarea cantității de antigen și anticorp dintr-un complex. Studiile *in vitro* l-au condus pe Barret (1974) la concluzia existenței a două tipuri de valențe ale antigenului:

– *valențele funcționale* sunt conferite de gds așezate la suprafața moleculei de antigen. Numărul lor este proporțional cu greutatea sa moleculară și se apreciază prin determinarea numărului de molecule de anticorp ce se leagă de antigen. Un situs de valență s-ar găsi la fiecare câteva mii de D;

– *valențele nefuncționale* sunt conferite de gds interne ale moleculei native. Ele pot deveni funcționale *in vivo*, după degradarea parțială a moleculei. Numărul total al gds pentru o moleculă nu se cunoaște. Se pot identifica după degradarea enzimatică parțială a antigenului. Albumina serică bovină nativă are 6 situsuri de valență. După scindarea enzimatică se eliberează 9 fragmente peptidice, fiecare din ele precipitând cu serul anti-albumină nativă. Reacția de precipitare necesită cel puțin două gds, ceea ce înseamnă că molecula nativă conține cel puțin 18 gds, care *in vivo* devin funcționale după degradarea parțială a moleculei și toate induc sinteza de anticorpi specifici.

În evaluarea experimentală a numărului de valențe ale unui antigen trebuie ținut seamă de faptul că molecula de anticorp este bivalentă și că un antiser nu conține totdeauna anticorpi față de toți determinanții antigenului.

Antigene heterofile

Antigenele heterofile sunt substanțe neidentice, înrudite chimic, prezente la numeroase specii de animale și plante. Aceste antigene dau reacții încrucișate: anticorpii induși de un antigen al grupului heterofil reacționează cu oricare din antigenele grupului.

Prototipul antigenelor heterofile este antigenul *Forssman* (descoperit în 1911) din țesuturile de cobai, dar prezent și în țesuturile de cal, pisică, șoarece, balenă, păsări domestice, broască țestoasă, precum și pe suprafața hematiilor de ovine. Lipsește la iepure și de aceea serul imun anti-antigen Forssman se obține prin imunizarea acestor animale. Anticorpii față de antigenul Forssman aglutinează hematiile de berbec și în prezența complementului le lizează. Antigenul

Forssman s-a găsit în celulele unor bacterii patogene (*Streptococcus pneumoniae*, *Shigella* sp., *Salmonella* sp.) și chiar în celulele microbiotei din tractul digestiv, ceea ce explică prezența anticorpilor naturali anti-hematie de berbec, în serul uman.

Cele mai multe antigene heterofile sunt *polizaharide*, cu funcția de haptene în moleculele glicoproteice. Componentele polizaharidice ale antigenelor heterofile sunt foarte asemănătoare în ceea ce privește structura lor chimică, chiar dacă aparțin unor organisme foarte diferite: microorganisme, plante, animale. Asemănările structurii chimice a acestor substanțe explică reacțiile imunologice încrucișate. Polizaharidele antigenelor tip Forssman, în stare purificată nu induc formarea anticorpilor. Sunt rezistente la fierbere și autoclavare.

Antigene timodependente și timoindependente

Cele mai multe antigene stimulează producerea anticorpilor printr-un mecanism de cooperare dintre limfocitele T și B: proteinele heterologe, polipeptidele sintetice formate din L-aminoacizi, hematiile heterologe, flagelina monomeră. Acestea sunt antigene *timodependente*. Ele trebuie să aibă cel puțin două tipuri de epitopi, deoarece studiile cu antigene sintetice au evidențiat că limfocitele T și B interacționează cu epitopi diferiți ai moleculei de antigen. Antigenele timodependente au un număr mic de epitopi de același fel și din această cauză nu pot stimula eficient celulele B, necesitând cooperarea celor două feluri de celule.

Antigenele *timoindependente* declanșează răspunsul imun prin activarea directă a celulelor B, fără cooperarea limfocitelor T helper. Ele determină sinteza de anticorpi la fel de intens, la șoarecele normal ca și la șoarecele nud (cu aplazie timică congenitală, fără celule T): polizaharidul de pneumococ, lipopolizaharidele bacteriene, dextranii, levanii, flagelina polimerizată, polivinilpirolidona.

Antigenele timoindependente au 3 proprietăți: 1) prezintă în structura lor chimică secvențe repetitive, dar această condiție nu este suficientă pentru calitatea de antigen timoindependent, deoarece polimerii sintetici ai L-aminoacizilor, cu secvențe repetitive sunt antigene timodependente; 2) au o structură tridimensională care ar favoriza interacțiunea directă cu receptorii celulelor B și ar declanșa răspunsul imun; 3) rezistența la acțiunea enzimelor degradative și persistența îndelungată în organism.

Cele două categorii de antigene nu sunt strict delimitate în ceea ce privește mecanismul activării răspunsului imun. Antigenele timoindependente, după degradarea structurilor repetitive devin timodependente; glucagonul (antigen timodependent) după scindare cu tripsină eliberează doi determinanți

antigenici; cel de la capătul N-terminal activează celulele B, iar cel de la capătul C-terminal stimulează celulele T.

FACTORI CARE CONDIȚIONEAZĂ IMUNOGENITATEA

Definiția dată antigenelor nu este satisfăcătoare deoarece se referă la acțiunea lor (declanșază sinteza anticorpilor și se combină cu ei). Definiția completă a unui antigen rezultă din însumarea unui șir de proprietăți care condiționează imunogenitatea, deduse în cea mai mare parte prin studii experimentale folosind antigene artificiale și sintetice. Imunogenitatea este condiționată de următorii factori:

1) *Caracterul străin* al moleculei. O macromoleculă este cu atât mai imunogenă, cu cât este mai diferită de componentele omologe ale organismului receptor. Caracterul străin nu se referă în primul rând la poziția taxonomică a celor două organisme (donor și receptor de antigen), ci în special la structura moleculară a antigenului. De exemplu, hemoglobina de cal este foarte asemănătoare cu cea de iepure și nu este imunogenă, dar celelalte proteine de cal sunt imunogene pentru iepure.

Caracterul străin (nonsell) nu implică existența unor molecule cu totul noi, nef întâlnite în organismul receptor, ci presupune numai modificări minime ale moleculei generate de prezența unuia sau câtorva aminoacizi diferiți în anumite poziții ale secvenței de aminoacizi ai unei proteine, care în rest este similară sau chiar identică cu proteinele proprii.

Majoritatea proteinelor unei specii sunt nonsell pentru alte specii, dar adeseori, la specii diferite se găsește proteine înrudite chimic.

De regulă, proteinele apărute primele în evoluție, au un grad superior de asemănare chimică și sunt slab imunogene pentru speciile înrudite (de exemplu albumina serică), iar cele apărute mai târziu sunt mult mai imunogene (globulinele serice). După modificare chimică, proteinele proprii devin imunogenice (albumina serică de iepure, după acetilare *in vitro* devine antigenică pentru organismul donor).

2) *Mărimea moleculei*. Nu există o limită inferioară netă a mărimii pentru antigenitatea unei molecule, dar imunogenele bune sunt mai mari de 10.000 D. Cu cât o moleculă este mai mare, cu atât numărul epitopilor săi este mai mare. Secvențele de aminoacizi cu rol de epitopi se repetă de un număr mai mare de ori într-o moleculă mai mare. Proteinele mari (ovalbumina – 40 kD, albumina serică – 70 kD, hemocianina – 6000 kD) sunt foarte imunogene. Proteinele cu moleculă mică (insulina – 5,7 kD, histonele – 6 kD, glucagonul – 3485 D) sunt mai puțin imunogene. Polipeptidele sintetice sunt imunogene dacă au

4,5 kD. Glucagonul este cea mai mică moleculă naturală față de care s-au obținut anticorpi, iar cea mai mică moleculă sintetică imunogenă este un polipeptid de 1400 D.

Un polizaharid, pentru a fi imunogen trebuie să aibă anumite dimensiuni limită. Dextranii sunt antigenici dacă au peste 50 kD, deși există mari variații de răspuns de la o specie la alta (omul și șoarecele răspund bine, cobaiul – foarte puțin). La mărimi egale, polizaharidele naturale alcătuite dintr-un număr mic de monoglucide sunt antigene slabe față de proteine, care au o mare diversitate de monomeri.

Moleculele mici neantigenice, sau slab imunogene pot deveni antigene foarte bune după adsorbția pe particule de colodiu, caolin, cărbune, deoarece le asigură creșterea taliei moleculare.

3) *Complexitatea moleculară.* Dimensiunile mari ale unei molecule nonself nu sunt suficiente pentru a-i conferi calitatea imunogenă. De exemplu, poli-acril-amida, nylonul sunt molecule foarte mari, (polimeri sintetici) formate dintr-un număr mare de monomeri legați repetitiv, dar nu au complexitate moleculară.

Cele mai multe macromolecule naturale, în special proteinele sunt complexe deoarece posedă grupări moleculare diverse. De exemplu, mioglobina (proteină globulară cu 153 aminoacizi) are cel puțin 4 epitopi, deoarece după hidroliză cu tripsină rezultă 4 peptide și fiecare dintre ele inhibă reacția de precipitare dintre proteina nativă și antiserul complementar (omolog). Lizozimul (o catenă de 129 aminoacizi) are doi epitopi majori. După scindarea enzimatică a albuminei serice umane rezultă câteva fragmente peptidice care dau, (fiecare în parte) reacție de precipitare cu antiserul homolog față de proteina nativă. În cazul proteinelor globulare (albumina), cea mai mare parte a suprafeței moleculare accesibile este potențial imunogenă și constă dintr-un continuum de epitopi multipli care se suprapun.

Diferențele de specificitate antigenică ale unor proteine înrudite, cu aceeași structură peptidică și care îndeplinesc aceleași funcții sunt date de micile deosebiri de secvență a aminoacizilor, care se comportă ca epitopi imunodominanți.

Homopolimerii sintetici, de regulă, nu sunt imunogeni. Copolimerii formați din doi aminoacizi pot fi imunogeni pentru unele specii (iepure), dar nu pentru altele (om, șoarece). Polipeptidele formate din 3–4 aminoacizi diferiți sunt imunogene pentru toate speciile, ceea ce denotă necesitatea unui grad minim de complexitate chimică pentru manifestarea proprietății de imunogenitate. Complexitatea unei molecule nu depinde numai de diversitatea monomerilor, ci și de secvența lor și de efectul acesteia asupra structurii secundare, terțiare

și quaternare. Așa se explică antigenitatea mult mai accentuată a proteinelor în raport cu a polizaharidelor naturale, a lipidelor sau a acizilor nucleici.

4) *Starea fizică a antigenului.* Imunogenitatea este condiționată de o anumită rigiditate a structurii epitopilor. Lipsa ei ar explica imunogenitatea redusă a gelatinei, o proteină denaturată bogată în glicocol (21–35%), derivată din hidroliza collagenului. Rotația liberă a peptidelor apare numai între C α și gruparea peptidică. Glicocolul nu are ramificații (în poziția α) ceea ce face ca molecula de gelatină să aibă rotații libere în jurul axului longitudinal, fără să aibă o configurație fixă. Are foarte puțini aminoacizi aromatici (tir, his) și lipsesc cisteina și triptofanul.

Legarea L-tir (în proporție de 2%) îi mărește imunogenitatea și induce formarea anticorpilor, care precipită gelatina nativă. Legarea L-tir în proporție de 10% determină sinteza anticorpilor specifici față de gruparea tirozil, pentru care gelatina se comportă ca lanț purtător. Se consideră că polipeptidul L-tir mărește rigiditatea moleculei de gelatină. Dar nu totdeauna prezența aminoacizilor aromatici într-o moleculă și nici configurația sa stabilă nu sunt condiții suficiente pentru imunogenitate.

5) *Solubilitatea.* Necesitatea solubilității unui antigen este sugerată de următoarele observații:

- polimerii macromoleculari sintetici, care nu pot fi solubilizați sunt lipsiți de imunogenitate;

- organismele cu echipamente enzimatice hidrolitice mai active (șoarece) elaborează un răspuns imun mai amplu față de antigenele greu solubile (polizaharidul de pneumococ), în raport cu organismele care hidrolizează mai greu (iepure);

- copolimerii D-aminoacizilor nenaturali se degradează lent și nu sunt antigenici;

- antigenele corpusculare (virusuri, celule) devin antigenice după solubilizarea și eliberarea componentelor imunogene în macrofage, unde are loc degradarea menajată a antigenului;

- serul imun anti-albumină scrică bovină precipită cu fiecare din cele 9 fragmente peptidice rezultate din hidroliza sa, ceea ce denotă că molecula, *in vivo* este scindată și se relevă epitopi interni față de care se sintetizează anticorpi.

Hidroliza enzimatică a moleculei nonself nu este totdeauna o condiție prealabilă a imunogenezei sale. Studiile cu antigene sintetice au arătat că în momentul recunoașterii de către celulele sistemului imunitar, epitopii sunt intacti, identici cu aceia ai moleculei native. Epitopii de suprafață ai moleculei sunt foarte imunogeni, iar cei interni sunt puțin imunogeni. Dacă macromolecula ar fi hidrolizată înainte de etapa recunoașterii, epitopii interni ar avea o imunogenitate superioară.

Hidroliza este o precondiție a imunogenității în cazul antigenelor corpusculare. Pentru antigenele macromoleculare, epitopii imunogeni par a fi în primul rând, cei expuși pe suprafața moleculei (epitopi funcționali), dar uneori, după hidroliză, unii epitopi interni devin imunogeni fiind accesibili recunoașterii imunitare.

6) *Accesibilitatea determinanților antigenici.* Studiul antigenelor sintetice sugerează faptul că, pentru ca un epitop să fie imunogen, trebuie să fie expus la suprafața moleculei pentru a fi accesibil sistemului imunitar. De exemplu, un polimer de L-lys, cu rol de carier pentru tripeptidul ala-tir-glu este imunogen. După mascarea epitopilor tripeptidici, cu mai multe lanțuri de poli-ala, molecula este lipsită de imunogenitate. Forma globală a moleculei pare a nu fi un factor critic pentru imunogeneză, dar epitopii trebuie să fie accesibili celulelor care îi recunosc.

7) *Configurația spațială a moleculei.* Plierea spațială a moleculei de antigen are rol important în determinarea specificității sale. Proteinele denaturate reacționează puțin sau de loc cu anticorpii obținuți față de forma lor nativă. De exemplu, anticorpii față de RN-aza pancreatică bovină nativă nu reacționează cu molecula oxidată cu acid performic căreia îi lipsesc legăturile S-S. Invers, anticorpii față de RN-aza oxidată nu reacționează cu proteina nativă. Modificarea conformației moleculare prin suprimarea legăturilor S-S determină pierderea epitopilor conformaționali. Conformația spațială presupune o aranjare particulară a atomilor săi.

Numeroase experiențe sugerează că cel puțin uneori, anticorpii recunosc forma globală, tridimensională a unui determinant antigenic, și nu o anumită secvență chimică din structura sa. Acest fapt a reieșit din studiul răspunsului

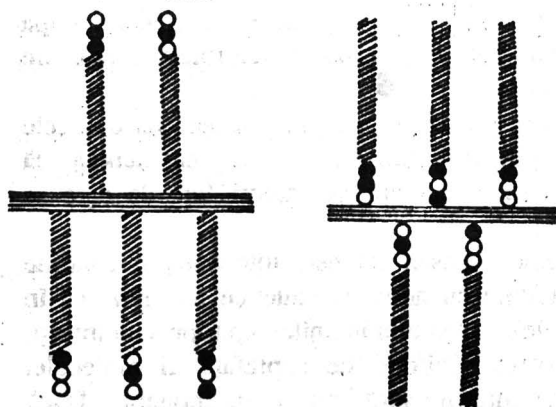
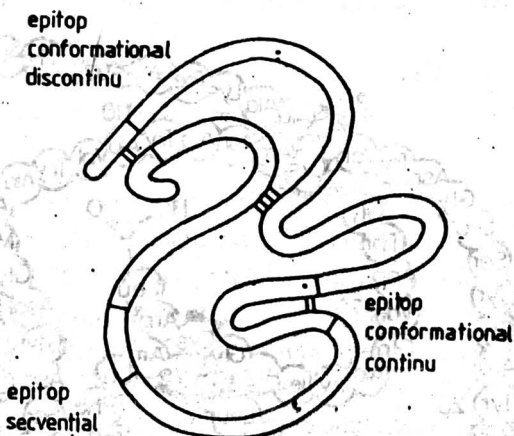


Fig. 2. Imunogenitatea este condiționată de accesibilitatea epitopilor. A. Resturile de tirozină și acid glutamic, legate la catenele laterale de poli-D, L-alanină-poli-L-lizină formează un epitop accesibil și inductor al răspunsului imun. B. Același tripeptid, mascat de poli-L-alanină, legat de poli-L-lizină nu este imunogen (== poli-L-lizină; /// = poli-D, L-alanină; = L-tirozină; o = L-acid glutamic, după M. Sela, 1969).

Fig. 3. Epitopi secvențiali și conformaționali (continui și discontinui) ai antigenelor proteice (după Male, 1987).



imun față de două peptide sintetice, având epitopi cu aceeași compoziție chimică, dar cu conformații spațiale diferite. În primul caz, determinantul antigenic este tripeptidul tir-ala-glu inclus într-un polimer sintetic ramificat, multicatenar. Se obțin anticorpi anti-tripeptid. Dacă tripeptidul este polimerizat se obține o moleculă cu structură periodică tir-ala-glu care dobândește formă α -helică. După injectarea la iepure se obțin anticorpi care precipită molecula cu structură spațială α -helix, dar nu precipită tripeptidul simplu. Pe baza acestor observații, M. Sela recunoaște existența a două tipuri de determinanți antigenici:

a) determinanți antigenici *secvențiali* a căror specificitate este dată de secvența subunităților componente (aminoacizi, monozaharide), indiferent de structura lor spațială. Acești epitopi sunt comuni pentru toate polipeptidele care au o secvență identică și sunt o sursă a reacțiilor încrucișate;

b) determinanți antigenici *conformaționali*, a căror specificitate derivă din configurația sterică a macromoleculei. Epitopii conformaționali sunt de două tipuri; *continui* și *discontinui*. Cei discontinui sunt formați din regiuni distincte ale moleculei, care se apropie când molecula se pliază în conformația sa nativă. Menținerea integrității lor este condiționată de legăturile S-S. După fragmentarea moleculei, epitopii conformaționali discontinui își pierd totdeauna integritatea. Epitopii continui au o soartă variabilă: pot să-și păstreze sau să piardă configurația avută în molecula nativă.

Importanța epitopilor conformaționali a fost evidențiată pentru molecula de lizozim din albușul de ou de găină. Bucla formată de aminoacizii 64–80 este închisă de o legătură S-S între două resturi de cisteină. Secvența buclei a fost sintetizată și legată de polimerul ala-lys. Complexul format, după injectarea

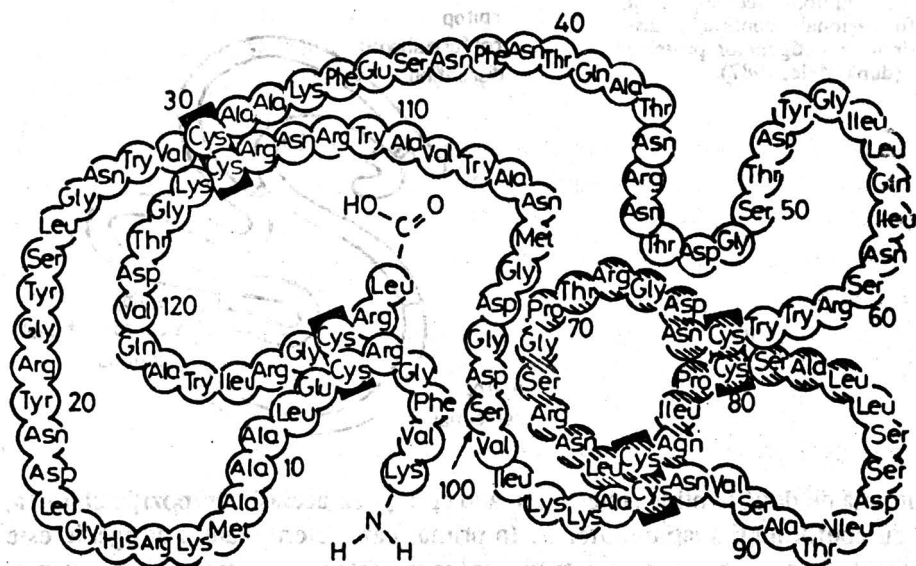


Fig. 4. Secvența aminoacizilor în molecula de lizozim din albușul de ou găină, cu evidențierea buclei peptidice (secvența 64–80), care are rol de epitop.

la iepure induce formarea anticorpilor care reacționează exclusiv cu această secvență, care în proteina nativă are rol de epitop.

În general, anticorpilor formați față de proteinele native sunt specifici, în primul rând față de epitopii conformaționali și mai rar față de cei secvențiali.

8) *Rata metabolizării și cantitatea de antigen administrată.* Rata metabolizării controlează raportul între cantitatea de antigen intact și cel parțial degradat, care se găsește la un moment oarecare după administrare, capabil să stimuleze producerea de anticorpi.

O cantitate prea mare de antigen produce „inundarea” organismului cu substanțe nonself și răspunsul este paradoxal (paralizie imunologică). Este o reacție de apărare a organismului, care fși blochează toate modalitățile de răspuns imun. Paralizia poate surveni atât după injectarea unei cantități prea mari de antigen, cât și după injectarea unei cantități moderate a unui antigen care se metabolizează greu. În organism ar exista, pentru fiecare antigen, un echilibru între paralizie și stimulare, controlat genetic. Antigenele „bune” sunt rapid degradate

menajat și stimulează răspunsul imun, iar antigenele „rele“ induc paralizia imunologică deoarece sunt rezistente la degradare.

Cantitatea optimă necesară obținerii unui răspuns imun optim este diferită de la un antigen la altul și se determină experimental pentru fiecare caz în parte.

9) *Modul de administrare a antigenului influențează imunogenitatea sa.* Administrarea multor substanțe nonsell în asociație cu adjuvanții le mărește gradul de imunogenitate, iar pentru altele, asocierea cu un adjuvant este o condiție obligatorie a imunogenității. Acest fapt este foarte important pentru proteinele ușor degradabile enzimatic, care, administrate ca atare dispar repede din organism, dar în asociație cu un adjuvant sunt eliberate treptat, stimulând organismul o perioadă mai îndelungată de timp. Administrarea intravenoasă anulează efectele adjuvanților.

Mai presus de condițiile de imunogenitate ale antigenelor naturale sau sintetice, esențială rămâne existența unui *control genetic* din partea organismului, asupra potențialului antigenic al unei substanțe nonsell. O moleculă oarecare poate fi un bun antigen pentru unele specii, dar neantigenică pentru altele. De exemplu, hemoglobina umană este slab antigenică pentru iepure, dar induce un răspuns imun intens la cobai și la puiul de găină. Albumina serică bovină este imunogenă pentru iepure, dar slab imunogenă pentru om. Unele proteine străine nu sunt antigenice datorită unei omologii accentuate a secvenței lor de aminoacizi, cu proteinele omologe ale gazdei. Uneori se înregistrează diferențe mari de imunogenitate ale unei molecule nonsell, la organisme ale aceleiași specii.

Concluzii asupra condițiilor de antigenitate. Rezultatele experimentale referitoare la antigenitatea macromoleculelor naturale au evidențiat faptul că polizaharidele sunt slab antigenice, deoarece nu au complexitatea moleculară necesară. ADN, ARN și lipidele sunt neimunogene în stare nativă, dar după cuplarea lor cu un suport proteic îndeplinesc rolul de haptene și sunt foarte imunogene. Din această cauză, nucleoproteinele și lipoproteinele sunt antigene foarte eficiente.

Proteinele naturale sunt imunogene, dar pentru exprimarea la un nivel superior a acestei calități trebuie să îndeplinească condițiile enumerate mai sus. Acestea, luate în parte sunt necesare dar nu suficiente. O bună antigenitate este rezultatul cumulării unui număr cât mai mare de condiții.

Studiul antigenelor sintetice a facilitat alegerea unor antigene ideale. Ele trebuie să fie greu degradabile, să fie timoindpendente și să aibă un număr suficient de semnale imunogene (epitopi) conectate într-un ansamblu, denumit *imunon*.

ADJUVANȚII

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

Punctul de plecare al introducerii adjuvanților în practica imunologică a fost un fapt de observație: după asocierea unui vaccin bacterian celular cu un vaccin macromolecular (anatoxină), răspunsul imun antitoxină este mult mai intens decât atunci când cele două vaccinuri se administrează separat. După asocierea vaccinului antiîfoparatific *A* și *B* cu anatoxina tetanică (TAB), titrul anticorpilor față de anatoxina tetanică este de 20–30 ori mai mare decât în cazul injectării separate a anatoxinei tetanice. Explicația acestui fenomen a fost dată mai târziu: corpii celulari bacterieni determină un proces inflamator la

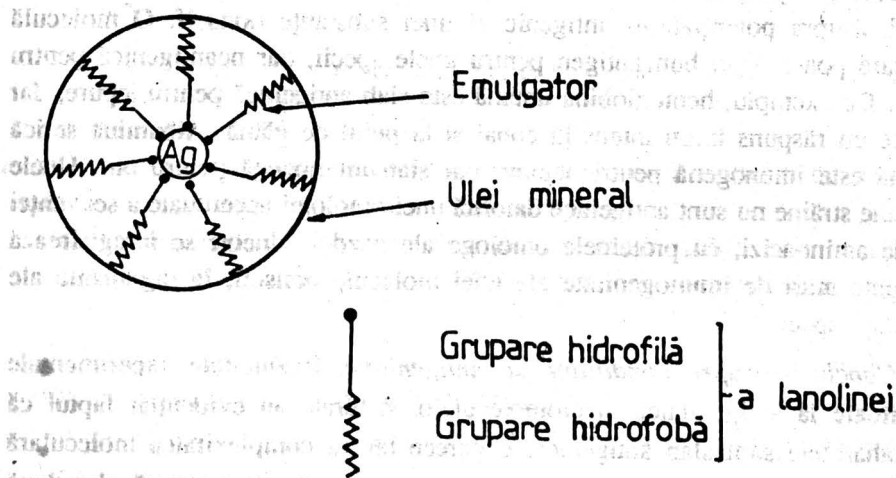


Fig. 5. Reprezentare schematică a interacțiunii moleculelor componente ale adjuvantului Freund.

locul introducerii vaccinului, care induce un aflux local de celule efectoare ale răspunsului imun (limfocite, macrofage). Acestea captează și fixează anatoxina într-un stoc, de unde este eliberată treptat și prelungesc durata de stimulare a sistemului imunitar.

Cel mai cunoscut și folosit este adjuvantul *Freund*, o emulsie de apă în ulei mineral de parafină. Antigenul se suspendă în apă. Emulsia de apă în ulei

se realizează cu un emulgator care conține grupări lipofile și hidrofile (lanolina, arlacei A). Acesta este adjuvantul *Freund incomplet*. Prin adăugarea celulelor omorâte de *M. tuberculosis* rezultă adjuvantul *Freund complet*. Principiul activ al celulelor de *M. tuberculosis* este reprezentat de *ceruri* (glicolipide și glicolipoptide). Glicolipoptidele sunt formate din *acizi micolici* esterificați cu un polizaharid (care conține D și L-alanină, acid D-glutamic, acid diaminopimelic).

Modul de acțiune al adjuvanților. Adjuvanții determină următoarele efecte:

1) *persistența* antigenului în organism (întârzierea degradării sale) și eliberarea treptată în circulație; 2) picăturile de emulsie *vehiculează* antigenul pe cale limfatică, în tot organismul și spre ganglionii limfatici unde se va declanșa răspunsul imun; 3) adjuvantul Freund complet și incomplet măresc semnificativ titrul de anticorpi față de un antigen și fac imunogene doze mici care altfel nu ar fi imunogene.

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

Efectul adjuvantului Freund este foarte spectaculos pentru dozele mici de antigen. Este foarte eficient în asociație cu antigenele proteice, bacteriene și virale. Stimulează răspunsul imun față de antigenele timodependente și favorizează producerea IgG.

Endotoxinele bacteriene au efect adjuvant. Ele sunt în același timp adjuvanți, antigene, toxine și factori pirogeni. Sunt lipopolizaharide produse de bacteriile Gram negative (*Salmonella*, *Brucella*, *Bordetella* etc.). Efectul maxim se obține numai dacă endotoxina este administrată în același timp sau la mai puțin de 6 ore după injectarea antigenului.

C a p i t o l u l I I

IMUNOGLOBULINELE

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

Heidelberger (1930) a purificat anticorpul din ser și a evidențiat, că aparțin fracției proteice.

Tiselius și Kabat (1938) au demonstrat experimental că, de cele mai multe ori, funcția de anticorp este asociată cu fracția gama a proteinelor serice și le-au dat denumirea de γ -globuline.

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

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

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

Moleculele de anticorpi au cea mai mică mobilitate electroforetică. Deși sunt similare ca structură, moleculele de imunoglobuline formează o familie cu 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. În 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, deoarece diferă prin sarcina electrică.

Molecule de anticorpi sunt extrem de heterogene din punctul de vedere al specificității lor față de epitopii antigenici inductori, deoarece antigenele corpusculare (virusuri, microorganisme) prezintă o foarte mare diversitate de epitopi. La rândul lor, antigenele moleculare, oricât de simple, sunt un *mozaic de epitopi*. Din această cauză moleculele de anticorpi au specificități de combinare foarte diferite, corespunzătoare epitopilor față de care s-au format. Diversitatea uriașă a specificității de combinare a anticorpilor generează o heterogenitate biochimică corespunzătoare, 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*. Se pune problema găsirii unei surse de molecule omogene de anticorpi, care să aibă aceeași specificitate, nu față de un antigen dat (care este un mozaic de epitopi), ci cu specificitate față de un singur epitop.

Sursa naturală de imunoglobuline omogene, identice din punct de vedere biochimic este mielomul multiplu (plasmocitonul) o afecțiune tumorală malignă înfrânată în măduva osoasă. Tumora se induce experimental la șoarecii sensibili (liniile NZB și BALB/c) prin injectarea intraperitoneală a uleiului mineral. Tumora este transplantabilă în serie. Plasmocitonul produce molecule de imunoglobuline identice din punct de vedere biochimic, *monoclonale*, denumite *proteine de mielom*, pentru că toate celulele tumorii sunt descendente ale unei singure celule producătoare de anticorpi. Imunoglobulinele de mielom se mai numesc *proteine M* (mielom) sau *paraproteine* și reprezintă până la 95% din imunoglobulinele serice. Astfel de tumori apar spontan cu o frecvență mică la om, câine, cal, șobolan, șoarece.

Proteinele M au aceeași secvență de aminoacizi ca și imunoglobulinele normale. Uneori leagă specific determinanți antigenici cunoscuți: 5% din proteinele mielomului unei linii înbred de șoarece leagă determinanți genetici ai suprafeței celulelor bacteriene enterice. Probabil tumorile de mielom își au originea în limfocite B care proliferază ca răspuns la antigene specifice ale bacteriilor enterice.

În cazurile de mielom, în plasmă se acumulează nu numai molecule întregi de imunoglobuline: se pot acumula lanțuri ușoare (proteinele Bence-Jones, lanțuri grele ale izotipurilor α , γ , μ (boala lanțurilor grele) sau molecule întregi de IgM (în cazul macroglobulinemiei Waldenström).

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 imunoglobulină este *monomerul*. Acesta este o unitate tetrapeptidică formată prin asocierea a două lanțuri grele (H, Heavy = greu), fiecare având circa 450 aminoacizi și o greutate moleculară cuprinsă între 50–76 kD (D = Dalton; kD = kilodalton) și două lanțuri ușoare (L, Light = ușor), fiecare având circa 216 aminoacizi și o greutate moleculară de 25 kD. Cele 4 lanțuri polipeptidice sunt legate între ele prin punți S–S. Ele se răsucesc în spirală – atât unul față de altul, dar și fiecare separat -- față de propria-i axă, rezultând o configurație tridimensională. Configurația tridimensională a monomerului este stabilizată prin 16–24 legături covalente S–S și prin alte interacțiuni necovalente, dobândind o formă de T sau de Y.

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

- *regiunea variabilă* (V) situată la extremitatea N-terminală a fiecărui lanț. Cele două regiuni variabile formează situsurile de combinare ale moleculei de imunoglobulină care conferă specificitatea de legare cu antigenul;

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

Aproape de mijlocul lanțurilor H se găsește o secvență de circa 15 aminoacizi, în care sunt grupate toate moleculele de cisteină, ce formează punți S–S intercatenare. Se numește regiunea *balama*.

Cele 16–24 legături S–S ale monomerului tetrapeptidic sunt constante ca număr și localizare pentru diferite clase de imunoglobuline. Sunt 3 categorii de punți S–S;

- legături *intercatenare* H–H sau L–H (legăturile L–L s-au descris la IgA₂ și la proteinele Bence-Jones, care sunt dimeri de lanțuri L);

- legături *intercatenare* între lanțurile H ce aparțin unor monomeri diferiți (la IgA₂ și IgM unde formează complexe moleculare polimerice);

- legături *intracatenare* care definesc structura terțiară a fiecărui lanț

Regiunea variabilă a celor două tipuri de lanțuri (H și L) cuprinde o secvență de circa 110 aminoacizi în jumătatea N-terminală a celor 4 lanțuri polipeptidice. Mărimea sa nu este fixă: intervin inserții sau deleții de 3–6 aminoacizi.

Variabilitatea lanțului L se concentrează în 3 segmente corespunzătoare aminoacizilor din pozițiile 24–34, 50–55, 89–97, iar a lanțului H se concentrează

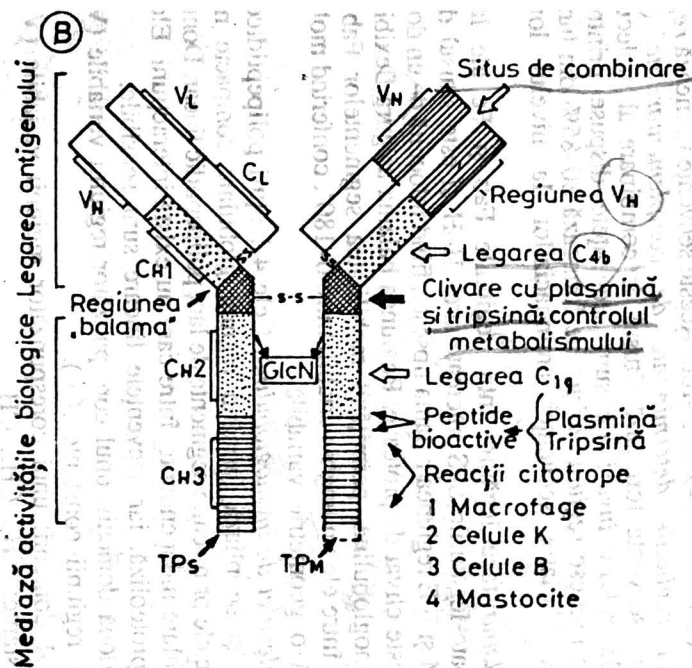
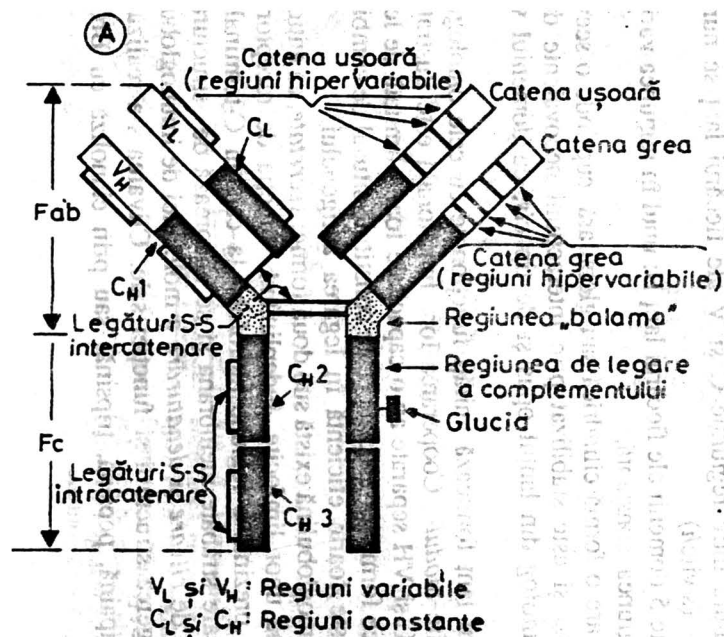


Fig. 6. Modele generale de structură a imunoglobulinelor, bazate pe IgG, umană. A. Structura pe domenii a catenelor L și H, poziția regiunilor variabile și hipervariabile și a regiunii „balama”. B. Localizarea diferitelor funcții ale moleculei de anticorp (după Putnam și colab., 1985).

în 4 segmente: 30–36, 50–56, 86–91, 95–100. Aceste secvențe formează *regiunile hipervariabile* sau *regiunile determinante de complementaritate* (RDC). Aminoacizii acestor secvențe formează situsul de combinare al moleculei de anticorp. Regiunile *relativ invariante* sunt secvențele dispuse printre cele hipervariabile și se numesc *regiuni cadru*. Ele formează 80–85% din lungimea regiunii variabile. Variația secvenței aminoacizilor la nivelul lor este limitată (5%).

Regiunea balama face legătura între regiunile Fab și Fc ale lanțului H. Ea cuprinde toate legăturile S–S intercatenare H–H și este situsul de atac al papainii. La IgM și IgE regiunea balama lipsește, fiind înlocuită de un domeniu suplimentar, care este clivat de proteaze. Regiunea balama asigură flexibilitatea moleculei de imunoglobulină, permițând mobilitatea segmentelor Fab, care teoretic pot forma între ele un unghi variabil, între 0–180°, conferind moleculei de imunoglobulină o geometrie variabilă.

Domeniile moleculei de imunoglobulină. Cele 4 lanțuri polipeptidice sunt răsucite în spirală și se pliază formând regiuni globulare compacte numite *domenii*, legate între ele prin scurte segmente de lanț polipeptidic linear. Domeniile sunt regiuni moleculare independente, între care nu există interacțiuni. Ele sunt mai rezistente la proteoliză, iar secvențele lineare sunt sensibile.

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

Lanțul H are 4 domenii: unul corespunzător regiunii variabile (VH) și 3 ale regiunii constante: CH₁, CH₂, CH₃.

Secvența de legătură între regiunile C și V ale fiecărui lanț se numește *zonă de comutare* (s) (switch).

IgM și IgE au câte 5 domenii ale fiecărui lanț H: unul în regiunea variabilă și 4(CH₁–CH₄) în regiunea constantă.

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

Domeniile fiecărui lanț formează unități funcționale cu cele omologe ale lanțului opus, 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 combinare al imunoglobulinei) este foarte eficientă în legarea antigenului.

Moleculele de imunoglobulină există sub două forme: *secrete*, ca anticorpi și *legate* de membrana unor limfocite, îndeplinind funcția de receptori de antigen. Forma legată prezintă o regiune hidrofobă la capătul C-terminal, de circa 30 aminoacizi, care străbate membrana și se ancorează de structura ei.

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

Fig. 7. Reprezentarea schematică a domeniilor pliate și stabilizate prin legături S-S, ale moleculei de IgG₁.

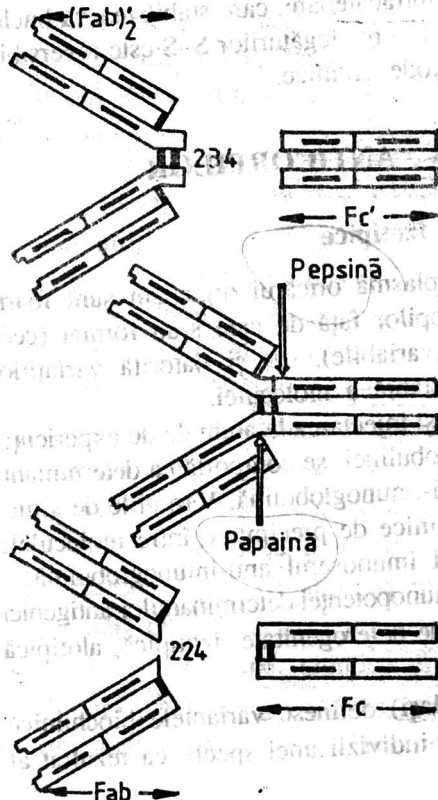
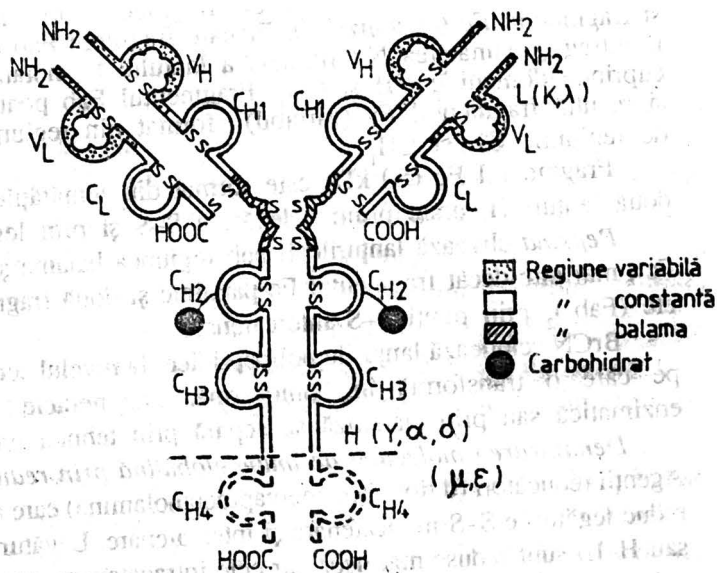


Fig. 8. Fragmentele rezultate din clivarea enzimatică, cu papaină și tripsină a moleculei de IgG₁. Pepsina clivează catenele H și eliberează fragmentele (Fab')₂ și Fc'. Papaina clivează în regiunea balama și eliberează două fragmente Fab și un fragment Fc (Fab = fragment antigen binding; Fc = fragment cristalizabil).

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

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

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

BrCN scindează lanțurile polipeptidice la nivelul secvențelor cu metionină, pe care o transformă în homoserină. Fragmentele rezultate prin clivare enzimatică sau prin cianoliză se separă prin tehnici cromatografice.

Denaturarea moleculei de imunoglobulină prin reducerea legăturilor S-S. Agenții reducători (ditiotreitol, mercaptoetanolamina) care au o grupare SH liberă, reduc legăturile S-S intracatenare și intercatenare. Legăturile intercatenare (H-H sau H-L) sunt reduse mai ușor, iar cele intracatenare, care stabilizează buclele polipeptidice sunt disociate mai greu. Reducerea legăturilor S-S este reversibilă, dar se poate stabiliza prin diferite metode chimice.

HETEROGENITATEA ANTICORPILOR

Variantele izotipice

Moleculele de imunoglobulină din plasma oricărui organism sunt foarte heterogene, atât datorită diversității epitopilor față de care s-au format (ceea ce induce variații ale secvențelor hipervariabile), cât și datorită variațiilor secvenței aminoacizilor în regiunea constantă a moleculei.

După asocierea cu adjuvantul Freund și injectarea la animale de experiență, variațiile de structură chimică ale imunoglobulinei se comportă ca determinanți antigenici și induc sinteza anticorpilor anti-imunoglobulină. Variațiile de structură se evidențiază prin metode imunochimice de precipitare între moleculele de imunoglobulină (cu rol de antigen) și imunoserul anti-imunoglobulină.

Din punctul de vedere al manifestării imunopotenței determinanților antigenici ai imunoglobulinei, s-au definit 3 nivele de heterogenitate: izotipică, alotipică și idiotipică.

Heterogenitatea izotipică (izos = același) definesc variantele biochimice ale imunoglobulinelor, comune pentru toți indivizii unei specii, ca rezultat al

variațiilor de structură a regiunilor *constante* ale lanțurilor H și L, care se comportă ca antigene după injectarea lor în organismul *altei specii*.

Variantele antigenice izotipice s-au identificat inițial pe lanțul H. Există 5 tipuri antigenice distincte ale lanțurilor H, notate cu γ , μ , α , δ , ϵ , corespunzătoare celor 5 clase de imunoglobuline: **IgG, IgM, IgA, IgD, IgE.**

Lanțurile H ale diferitelor clase de imunoglobuline prezintă diferențe mari de ordin chimic între domeniile echivalente (60% din totalul aminoacizilor).

Determinanții antigenici ai unei clase de imunoglobuline sunt comuni tuturor indivizilor unei specii. Ei se relevă în serul imun heterolog, obținut prin imunizarea altei specii. Un antiser față de lanțul uman γ , preparat pe iepure, va recunoaște numai IgG din serul uman, cu care va precipita *in vitro*.

Determinanții antigenici de izotip, ulterior s-au identificat și în regiunile constante ale lanțurilor L.

Izotipurile lanțurilor L. Lanțul L are două variante antigenice, notate cu k și respectiv λ , care se găsesc la toate cele 5 clase de imunoglobuline. Cele două tipuri de lanțuri (k și λ) prezintă deosebiri structurale în regiunea constantă, care se reflectă în deosebiri antigenice.

O moleculă de imunoglobulină are două lanțuri L de tip k , ori două lanțuri λ . Formula generală a diferitelor clase de imunoglobuline va fi: $\gamma_2 k_2$ (sau $\gamma_2 \lambda_2$), $\mu_2 k_2$ ($\mu_2 \lambda_2$), $\alpha_2 k_2$ ($\alpha_2 \lambda_2$). Serul imun anti-lanț k uman, preparat pe iepure va da reacție de precipitare cu toate moleculele de imunoglobulină care conțin lanțuri L de tip k , indiferent de clasă.

Lanțurile L de tip k și λ determină *tipurile și subtipurile* moleculelor de imunoglobuline. La om raportul Ig k/λ este 7/3, iar la șoarece 19/1. Izotipurile lanțurilor L nu influențează funcția de legare a antigenului: același antigen poate fi legat de oricare din cele 5 clase de imunoglobuline.

Markeri izotipici. Pe lanțul λ există doi markeri antigenici cu originea în permutații punctiforme ale aminoacizilor;

- factorul Kern⁺ - cu glicina în poziția 154;
- factorul Kern⁻ - cu serina în poziția 154;
- factorul Oz⁺ - cu lizina în poziția 190;
- factorul Oz⁻ - cu arginina în poziția 190.

În afară de variantele menționate - clase și tipuri s-au evidențiat diferențe ale proprietăților fizice, chimice și biologice ale moleculelor în interiorul claselor IgG, IgM și IgA și care corespund *subclaselor* antigenice. Pe lângă determinanții antigenici de clasă prezenți pe fiecare lanț H, există și alte

variante antigenice ale imunoglobulinelor, corespunzătoare subclaselor. Ele se găsesc în serul normal și se notează cu litera clasei, urmată de un număr: IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, IgA₂.

Imunoglobulinele dintr-o subclasă au în comun determinanți antigenici specifici clasei, cărora li se adaugă determinanți antigenici proprii fiecărei subclase, aducând un nivel superior de heterogenitate a lanțurilor H.

Diferențele în secvența aminoacizilor între diferitele subclase sunt mici: 24 aminoacizi între IgG₁ și IgG₄. Moleculele diferitelor subclase sunt produse de celule diferite.

Variantele alotipice

Descoperirea alotipiei (alos = altul) a pornit de la următorul fapt de observație: în serul pacienților cu artrită cronică reumatoidă se găsesc molecule de tip special denumite factor reumatoid (FR). FR este ~~IgM anti-IgG (auto-anticorp)~~.

FR se evidențiază prin capacitatea sa de a determina aglutinarea eritrocitelor învelite cu anticorpi antieritrocitari (IgG), într-o doză subaglutinantă.

Grubb (1956) a observat că FR seric aglutinează hematiile învelite cu anticorpi incompleți (care apar în anemia hemolitică autoimună), ale unor pacienți, iar alteori reacția de hemaglutinare nu se produce, testul evidențierii FR fiind fals negativ.

Concluzia a fost că anticorpii incompleți de pe suprafața eritrocitelor unor indivizi posedă determinanți antigenici pe care FR nu-i recunoaște. S-a dedus astfel că imunoglobulinele de la diferiți indivizi sunt diferite din punct de vedere antigenic. În consecință, imunizarea unui organism cu imunoglobuline provenite de la un organism al aceleiași specii determină apariția anticorpilor față de determinanții antigenici ai moleculelor de imunoglobulină ale donorului.

Imunoglobulinele sunt aloantigene inefficiente dacă sunt injectate ca proteine solubile, la om și la iepure. De aceea transfuziile de sânge total, plasmă sau injectarea imunoglobulinelor solubile nu induc formarea anticorpilor antiimunoglobuline ale donorului. Moleculele de imunoglobuline devin antigenice după asocierea lor cu adjuvantul Freund.

Semnificația variantelor antigenice alotipice ale moleculei de imunoglobulină este analogă celei a antigenelor de grup sanguin. Fenomenul este general, adică orice moleculă provenită de la un organism poate fi imunogenă pentru alte organisme ale aceleiași specii, la care se comportă ca aloantigen.

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

Variantele alotipice sunt rezultatul existenței genelor alele (perechi), o caracteristică generală a organismelor diploide. Când mutația se produce de mai multe ori în același locus, apar mai multe alele (o serie polialelică) $a_1, a_2, a_3, \dots, a_n$. Genele alele ocupă același locus pe cromosomii omologi, pe care l-a avut gena normală A. Fiecare individ va avea o anumită combinație de gene alele: Aa_1, Aa_2, \dots, Aa_n , cu variante antigenice distincte.

Alotipurile imunoglobulinelor sunt rezultatul variațiilor secvenței aminoacizilor în regiunile constante ale lanțurilor H și L, ceea ce le conferă un grad superior de heterogenitate.

La om s-au descris 3 categorii de markeri alotipici:

- factorii Gm (gama marker), numerotați 1-25, pe lanțul H al subclaselor de IgG;

- factorii $A_2m(1)$ și $A_2m(2)$ pe lanțurile $H\alpha_2$ ale subclasei IgA_2 ;

- factorii Km(Inv) pe lanțurile Lk.

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

Variantele idiotipice ale imunoglobulinelor

Idiotipul (idios = individ) este reprezentat de o populație omogenă de molecule de anticorpi, produse de descendenții unei clone celulare, care recunosc un singur determinant antigenic (epitop).

Specificitatea idiotipică a unei populații de anticorpi s-a dedus astfel:

- Antigenul (*S. typhi*) s-a injectat la organisme A și B (iepuri). S-au sintetizat anticorpi aglutinanți 1 și 2, anti *S. typhi*.

- Anticorpii aglutinanți 1 (produși de organismul A) s-au injectat în organismul C (iepure). Se sintetizează anticorpi anti-anticorpi 1, evidențiați într-o reacție de precipitare, dar care nu precipită anticorpii 2, deși anticorpii 1 și 2 au aceeași specificitate (sunt anti *S. typhi*), iar organismele A, B și C aparțin aceluiași alotip.

Concluzia: Anticorpii 1 și 2 deși au aceeași specificitate față de antigen, la rândul lor au determinanți antigenici proprii și, de aceea anticorpii anti-anticorpi 1 nu recunosc anticorpii 2, produși de alt organism. Moleculele de anticorpi, cu aceeași specificitate față de un antigen, produse de organisme diferite au individualitate antigenică distinctă, denumită specificitate *idiotipică*.

Determinanții idiotipici sunt localizați în regiunile hipervariabile ale lanțurilor H și L. Specificitatea idiotipică a moleculelor de anticorpi sintetizați de o clonă de celule, este conferită de particularitatea structurală a *situsurilor lor de combinare*. Aici se găsesc epitopii cu caracter individual numiți *idiotopi*.

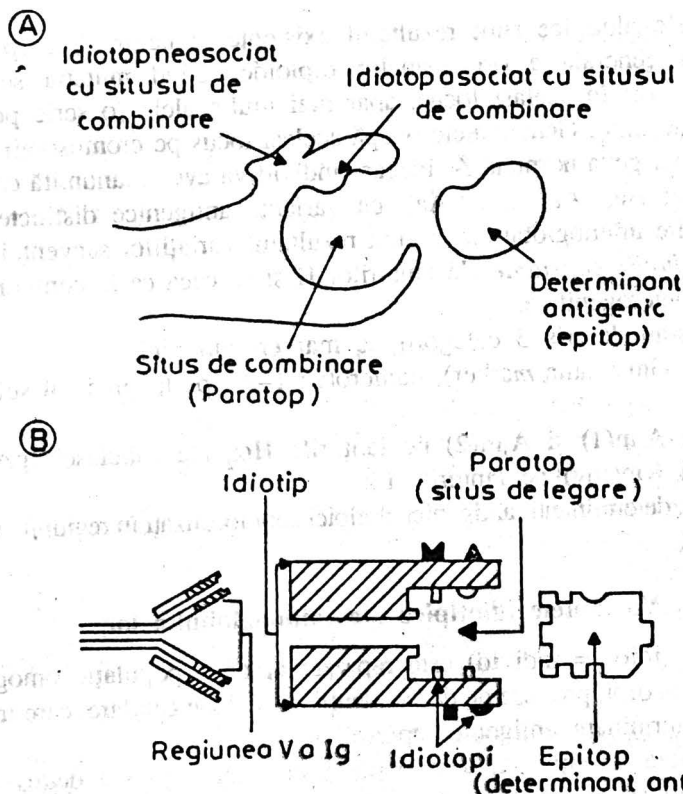


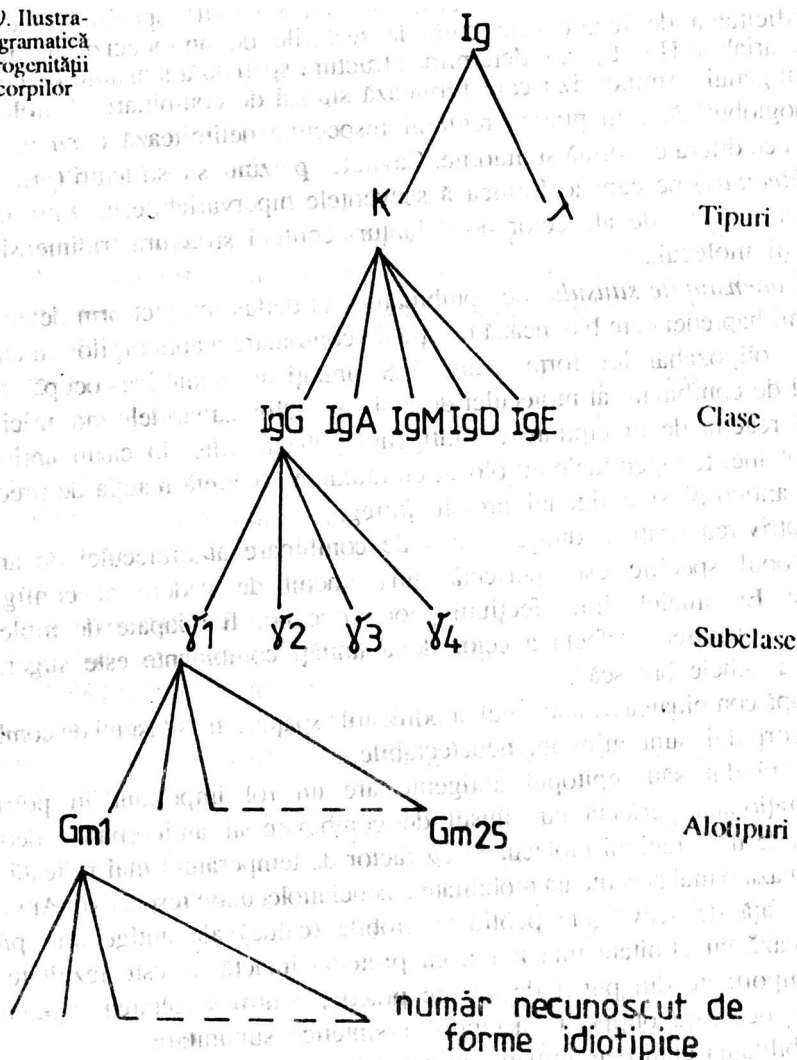
Fig. 9. Reprezentarea schematică a structurii regiunii variabile a imunoglobulinei, evidențiind localizarea idiotopilor și a paratopilor (A) (după Paul, 1984) și relația lor cu epitopul (B) (după Roitt și colab., 1985).

Colecția de *idiotopi* a situsului de combinare al unei molecule de imunoglobulină formează *idiotipul* ei. Unii idiotopi sunt localizați foarte aproape de situsul de combinare sau chiar în interiorul său. Dovada o constituie faptul că legarea antigenului de situsul de combinare blochează într-o măsură mai mare sau mai mică legarea anticorpilor antiidiotipici.

Idiotipul este rezultatul configurației spațiale unice a regiunilor hipervariabile a lanțurilor H și L, conferită de o secvență unică a aminoacizilor. Repertoriul idiotipurilor este de același ordin de mărime cu acela al situsurilor de combinare. Pentru situsul de combinare al moleculei de imunoglobulină s-a propus denumirea de *paratop*.

La constituirea idiotipului participă ambele lanțuri (H și L). Cele două lanțuri dissociate nu pot să lege antiidiotipul, sau îl leagă cu o eficiență foarte scăzută.

Fig. 10. Ilustra-
rea diagramatică
a heterogenității
anticorpilor



FUNCȚIILE MOLECULEI DE IMUNIGLOBULINĂ

În ansamblul sistemului imunitar, moleculele de imunoglobulină îndeplinesc două categorii de funcții: de *specificitate* și *activități biologice efectoare*.

1) *Specificitatea* față de un antigen este exprimată prin capacitatea de recunoaștere fină a epitopului complementar al antigenului și de combinare cu acesta. Specificitatea moleculei de imunoglobulină este conferită de situsul său de combinare. Marea diversitate a moleculelor de anticorpi asigură o diversitate de

uriază a situsurilor de combinare, de ordinul a 10^8 – 10^9 specificități de legare. Specificitatea de legare este dată de resturile de aminoacizi ale regiunilor hipervariabile H și L, care determină structura spațială a situsului de combinare cu antigenul. Aminoacizii care formează situsul de combinare al moleculei de imunoglobulină, prin plierea regiunii respective delimitează o *cavitate moleculară* ce diferă ca formă și mărime. Cavitatea prezintă substructuri (*proeminențe și adâncituri*) pe care le formează secvențele hipervariabile, în timp ce restul regiunilor variabile ale celor două lanțuri conferă structura tridimensională a cavității moleculare.

Dimensiunile situsului de combinare s-au dedus indirect prin determinarea mărimii haptenei care blochează reacția de combinare a anticorpilor cu antigenul întreg: oligozaharidul format din 6–8 unități monomerice ocupă complet situsul de combinare al moleculei de anticorp. Oligozaharidele mai mici inhibă parțial reacția de precipitare cu antigenul polizaharidic. În cazul anticorpilor antiproteine, tetrapeptidele au blocat cu maximă eficiență reacția de precipitare dintre anticorpi și antigenul proteic întreg.

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

După combinarea cu antigenul, modificările spațiale ale situsului de combinare al anticorpului sunt minime, nedetectabile.

La rândul său, epitopul antigenic are un rol important în potrivirea conformațională perfectă cu situsul de combinare al anticorpului, deoarece corespunde unei regiuni moleculare cu factor de temperatură mai ridicată, ceea ce sugerează o mai accentuată mobilitate a zonei moleculare respective. Anticorpii obținuiți față de secvențele peptidice mobile (calde) ale antigenului proteic reacționează cu afinitate mai mare, cu proteina intactă. Aceste rezultate sunt foarte importante din punct de vedere practic, pentru selectarea segmentelor peptidice necesare obținerii vaccinurilor sintetice subunitare.

Mobilitatea unui determinant antigenic îi permite să se adapteze mai ușor într-un situs de legare preexistent al moleculei de anticorp, chiar în situațiile în care epitopul antigenic nu se potrivește exact geometriei unei molecule proteice. Flexibilitatea epitopului îi permite să se adapteze configurației situsului de combinare al anticorpului. Din acest motiv, unirea antigenului cu anticorpul seamănă cu întâlnirea a doi nori și nu cu aceea a două pietre.

2) *Funcțiile biologice efectoare* sunt amorsate de reacția antigen–anticorp. Numărul lor este mai mic și sunt dependente de regiunile constante ale moleculei de imunoglobulină.

Ficcare domeniu al regiunii constante a moleculei de imunoglobulină realizează anumite funcții:

- legarea antigenului pe imunoglobulinele de suprafață care funcționează ca receptori pe celulele B declanșază proliferarea și diferențierea lor: în cazul imunoglobulinelor citotrope față de mastocite, legarea antigenului declanșază degranularea lor;

- după cuplarea cu antigenul, moleculele de imunoglobulină expun segmentul Fc, recunoscut ulterior de receptori specifici pentru Fc de pe suprafața monocitelor, macrofagelor și polimorfonuclearelor. Se stimulează astfel procesul de fagocitoză;

- celulele K, prin intermediul receptorilor pentru Fc interacționează cu celulele străine acoperite cu IgG și realizează liza de contact prin procesul de citotoxicitate;

- interacțiunea antigen-anticorp generează un semnal, care se transmite regiunii Fc. Aceasta își modifică configurația spațială și expune un situs de recunoaștere (situat între gly 316 și lys 340) de care se leagă Clq;

- regiunea balama este transductoare de semnale și are rol important în flexibilitatea moleculei de imunoglobulină, permițând variația unghiului dintre segmentele Fab: ele ar trece reversibil de la forma T la Y. Geometria variabilă a imunoglobulinei mărește eficiența de legare a antigenului, deoarece ajustează poziția celor două situsuri de combinare ale anticorpului în funcție de distanța la care se găsesc determinanții antigenici, pe suprafața unui virus sau a unei celule;

- regiunea balama a moleculelor de IgG și IgD este sensibilă la acțiunea enzimelor proteolitice, iar la IgA este rezistentă.

Componenta glucidică a imunoglobulinei îndeplinește următoarele funcții:

- realizează și menține o conformație esențială a moleculei de imunoglobulină pentru secreție;

- mărește solubilitatea moleculelor de imunoglobulină;

- are rol structural de spațiator între domeniile unui lanț și între catenele moleculei;

- participă la funcțiile citotrope ale moleculei de imunoglobulină;

- are rol în legarea Clq, componentă a sistemului complement.

IMUNOGLOBULINA G

IgG este cea mai heterogenă dintre imunoglobuline în ceea ce privește sarcina electrică. În câmpul electroforetic, IgG se distribuie în fracțiile $\gamma 1$ și $\gamma 2$ ale serului. IgG este majoritară în serul uman normal, reprezentând 70-75%

din cantitatea totală de imunoglobuline. Concentrația sa medie în ser este de 1250 mg/100 ml, cu variații individuale între 800 și 2000 mg/100 ml.

IgG este un monomer cu g m de 150 kD și cu constanta de sedimentare 7 S. IgG₃ este mai grea, datorită lanțului γ3. Componenta glucidică reprezintă, în medie, 3% din greutatea moleculară a IgG.

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

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

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

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

Timpul de înjumătățire al IgG este de 21 zile.

IMUNOGLOBULINA A

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

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

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, lacrimi, secreția vaginală, gastrică, intestinală, biliară, pancreatică, lăcrată.

Pe baza unor diferențe de structură moleculară (numărul punților S–S, secvența aminoacizilor în regiunea balama), au fost descrise două subclase de IgA: IgA₁ și IgA₂.

IgA serică este reprezentată în primul rând de IgA₁ (90%) și este monomerică în proporție de 80%. Catenele L și H sunt reunite prin două punți S–S.

Subclasa IgA₂ reprezintă numai 10% din IgA serică. Pe baza markerilor alotipici ai catenei H se subdivide în două variante alotipice: A₂m₁ (tip caucazian) și A₂m₂ (tip mongoloid-negroid), datorită incidenței sale la diferite rase umane.

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

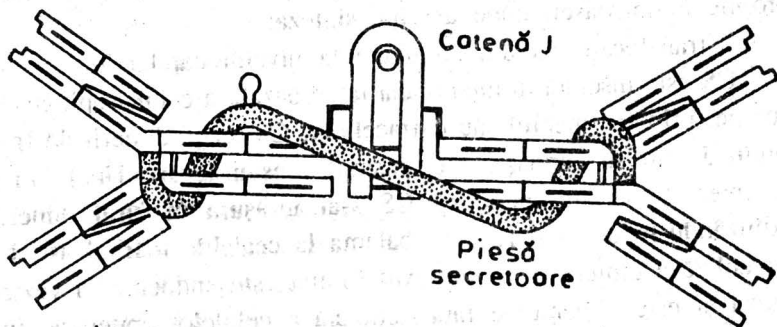
IgA din secreții se găsește în produsele de secreție ale mucoaselor, ca și în secreția biliară și pancreatică. De aici derivă și denumirea sa improprie, **IgA secretoare** (slgA), deși mai corectă ar fi **IgA din secreții**. Se găsește în special în formă dimerică (80%), iar restul ca monomer sau alt tip de polimer.

slgA este produsă de structurile limfoide ale mucoaselor. În mucoasa nazală, a antrului piloric, a intestinului subțire, în lamina proprie a epitelului acinilor secretori ai glandelor salivare și mamare, în glandele lacrimale se găsesc numeroase plasmocite și precursorii lor. Imunizarea orală stimulează în primul rând producerea de IgA.

Molecula de slgA dimeră este alcătuită din doi monomeri de IgA, la care se adaugă catena J (joining) și un lanț suplimentar denumit componenta secretoare (CS). Formula generală a slgA dimer este (IgA)₂ J CS. Întreaga moleculă are g m de 385 kD, iar constanta de sedimentare este 10 S.

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

Fig. 11. Structura IgA₁ secretoare (slgA₁) umană. Componenta secretoare este, probabil, înfășurată în jurul dimerului de IgA și legată prin punte S-S de domeniul C α2 al fiecărui monomer. Catena J participă la legarea celor două subunități (după Roux și colab., 1985).



Catena J este un glicopeptid cu 129 aminoacizi ($g\ m = 15\ kD$), bogat în acizi glutamic și aspartic și un oligozaharid care se leagă de asparagina din poziția 43. Conține 7–8 resturi de cisteină. Lanțul J se leagă prin punți S–S de penultima cisteină a octapeptidului terminal al fiecărui lanț H. În complexele moleculare cu un grad superior de polimerizare, numai două molecule de IgA sunt legate prin intermediul lanțului J, celelalte fiind legate direct una de alta. Polimerizarea moleculelor de IgA este esențială pentru transportul lor la suprafața mucoasei.

Componenta secretoare a sIgA este o glicoproteină din categoria betaglobulinelor, neînrudită cu imunoglobulinele, bogată în glucide (8,7%). Conține circa 750 aminoacizi, distribuiți în 3 domenii: citoplasmatic (103 aminoacizi), transmembranar (23 aminoacizi) și extracelular (circa 625 aminoacizi), la care se adaugă o secvență semnal de 18 aminoacizi.

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

Funcțiile componentei secretoare. CS este receptor pentru moleculele dimere și polimere de IgA și IgM, care au legat lanțul J. Legarea lanțului J pare să determine o schimbare conformațională a acestor molecule. Moleculele de IgA secretate ca monomeri, ca și polimerii care nu au legat lanțul J nu se pot complexa cu CS și trec în circulație.

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

- difuzia IgA prin țesutul conjunctiv adiacent plasmocitelor din lamina proprie a mucoasei, unde are loc sinteza;
- translocarea sa din circulație la nivelul capilarelor mucoasei.

CS este inserată în membrana laterobazală a celulei epiteliale. Din această poziție, prin fragmentul său extracelular, CS leagă dimerii de IgA care conțin lanțul J. Nu se cunoaște mecanismul acestei legări. Unul din mecanismele de interacțiune presupune că CS s-ar înfășura în jurul dimerului de IgA, extinzându-se de la o regiune balama la cealaltă, mărin­d astfel rezistența la protecoliză a dimerului. Complexul format este endocitat în vezicule de pinocitoză și este eliberat pe fața luminală a celulelor epiteliale, în secreția lor externă. Un astfel de transport are loc în celulele epiteliale ale mucoasei tubului

digestiv, ale mucoasei bronșice, la nivelul epitelului vezicii biliare și ale ductului biliar, ale acinilor glandelor mamare, pancreatice și salivare.

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

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

FUNCȚIILE EFECTOARE ALE sIgA

Funcția biologică esențială a sIgA este apărarea organismului față de antigenele moleculare care ar putea fi înglobate la nivelul mucoaselor (în principal cea digestivă) și de a asigura protecția față de agenții patogeni care tind să pătrundă de la exterior pe calea mucoaselor digestive, respiratorie, genito-urinară.

sIgA formează complexe cu antigenele adsorbite la suprafața mucoaselor, având rol în *excluderea imună* a acestora.

sIgA se pare că nu recunoaște specific antigenele celulare bacteriene, dar realizează imobilizarea și aglutinarea lor, oprind pătrunderea lor în organism. sIgA se leagă cu glicoproteinele de suprafață ale celulei bacteriene și diminuează aderența ei, împiedicând colonizarea mucoaselor.

sIgA blochează legarea virusurilor de receptori celulari și neutralizează efectul toxinelor produse de microorganisme (botulinică, icterică, holerică).

Prezența sIgA în colostru și în lichidul amniotic sugerează rolul său foarte important în conferirea imunității pasive a noului născut, atât la om cât și la animale. Rezistența noilor născuți hrăniți natural este mult superioară comparativ cu a celor hrăniți artificial. Concentrația IgA în colostrul uman este foarte înaltă 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 IgA 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 IgA în secreția mamară are două surse: o sinteză locală foarte intensă în plasmocitele din țesutul conjunctiv subiacent epitelului acinilor glandulari, sau transportul IgA din sânge.

IgA din secreția mamară nu este transportată, la nivelul mucoasei digestive, în circulația noului născut, decât într-o mică măsură în primele ore de viață. Efectul protector, antiinfecțios al IgA se realizează prin faptul că rămâne legată de celulele epitelului mucoasei digestive și blochează aderența

microorganismelor și virusurilor. La alte specii de mamifere, IgA din secreția lăctată este transportată foarte activ în circulația noului născut.

IgA nu este transferată prin placentă. Sângele noului născut nu conține IgA. Nivelul IgA al adultului este atins la 9–10 luni.

IMUNOGLOBULINA M

IgM este produsă sub două forme: *monomerică*, legată de membrane și *polimeră*, liberă în ser

Caracteristica sa moleculară este prezența unui lanț greu al izotipului μ , alcătuit din 576 aminoacizi (452 în regiunea C). IgM conține 5 grupări prostetice oligozaharidice. Lanțul μ are 5 domenii: unul variabil și 4 constante ($\text{CH}_1\text{--CH}_4$).

IgM legat de membrană are în plus, o secvență COOH terminală, hidrofobă formată din 41 aminoacizi, care întrerupe transportul lanțului μ prin membrană și ancorează molecula în structura plasmalemei.

IgM serică are structura unui pentamer $(\text{L}_2\mu_2)_5$, cu greutatea moleculară de 950 kD. Lanțul μ al IgM serice prezintă o secvență C-terminală de 20 aminoacizi, care facilitează traversarea membranei în cursul sintezei.

Fiecare pentamer conține un lanț polipeptidic J, bogat în cisteină, foarte acid, cu rol în polimerizarea monomerilor. Cele 5 unități monomere sunt așezate radiar, cu regiunile Fc orientate spre centru și regiunile Fab spre exterior, unite prin punți S–S formate între domeniile CH_3 și prin lanțul J. La microscopul electronic, pentamerul IgM are aspect de stea cu 5 brațe, dispuse în jurul unui disc central. Fiecare braț are forma literei Y. Brațele pot lua poziții diferite, ceea ce denotă existența unei zone mobile pentru fiecare subunitate. Fiecare unitate monomerică este mobilă la nivelul articulației de discul central.

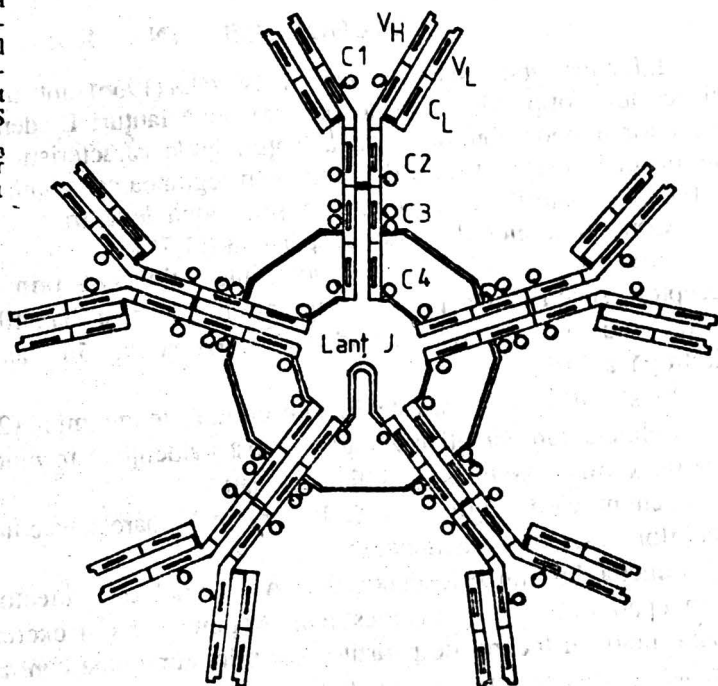
Funcțiile IgM. IgM este receptor major de antigen pe suprafața limfocitelor B mature;

IgM seric (polimer) are funcții aglutinante, fiind de 1000 de ori mai eficient decât monomerii bivalenți de imunoglobulină. Reprezintă 5–10% din cantitatea totală de anticorpi (84–170mg%);

IgM activează complementul, efect urmat de distrugerea litică a antigenului celular și ingestia sa de către macrofage. De aceea IgM este foarte eficient în apărarea față de bacteriemii și față de toxine (difterică, tetanică, botulinică, toxina din veninul de șarpe);

IgM sunt anticorpi opsonizanți.

Fig. 12. Structura pentamerică a moleculei de IgM. Lanțul J leagă doi monomeri. Catenele H sunt unite prin punți S-S între domeniile CH₂ ale monomerilor adiacenți (după Roitt și colab., 1985).



Afinitatea IgM (forța de legare dintre un epitop și un paratop al fiecărui situs activ al polimerului) poate să fie slabă, dar *aviditatea* globală (energia medie a interacțiunii de legare a IgM cu un antigen care posedă epitopi multipli și diferiți) este foarte mare față de antigenele solubile complexe și față de celule, ambele categorii având epitopi repetitivi. Aviditatea condiționează eficiența maximă a IgM în legarea antigenului.

IgM apare foarte precoce la noul născut și este primul care se sintetizează în răspunsul imun primar: apare la 3 zile după administrarea antigenului, atinge concentrația maximă la 5-6 zile și este înlocuit în ziua a 10-a de IgG. Trece greu sau nu trece în lichidele interstițiale și nici prin bariera placentară.

IgM reprezintă forma sub care se găsesc anticorpii naturali ai grupelor sanguine (aglutininele α și β). Nivelul IgM seric al adultului este atins la 10 luni.

Se pare că IgM este clasa de imunoglobuline cea mai bine păstrată în evoluție.

IMUNOGLOBULINA E

IgE a fost izolată și caracterizată de Ishizaka (1966) dintr-un mielom producător al acestui izotip. Molecula de IgE are două lanțuri L identice cu lanțurile L ale altor imunoglobuline și două lanțuri grele caracteristice (He) cu câte 550 aminoacizi, distribuiți în 5 domenii: 4 în regiunea constantă și unul în regiunea variabilă. Lanțurile H sunt reunite prin două legături S-S, în domeniul C₂.

Conținutul glucidic este de până la 11,7%.

IgE este o moleculă *citotropă*: interacționează prin segmentul Fc cu receptori specifici de pe suprafața mastocitelor și bazofilelor ale aceleiași specii sau ale speciilor înrudite. Încălzirea la 56° anulează activitatea citotropă a IgE.

În sânge IgE se găsește în concentrații foarte mici (250 ng/ml).

Celulele care sintetizează IgE au fost evidențiate în mucoasa respiratorie, gastrointestinală și în ganglionii regionali.

Denumirea de „IgE” vine de la „eritem” deoarece este unul din mediatorii reacțiilor vasculare eritematoase.

Funcția IgE nu este cunoscută. Ar fi unul din efectorii mecanismelor de îndepărtare a paraziților intestinali. Acțiunea sa s-ar exercita prin atragerea eozinofilelor în focarul de parazitoză și prin stimularea contracțiilor prelungite și rapide ale mușculaturii netede. IgE crește permeabilitatea vasculară și permite anticorpilor serici și celulelor albe să pătrundă în mucoasa și să participe la reacțiile de apărare.

Mastocitele și bazofilele care leagă IgE se activează. Activarea ar fi rezultatul formării unor punți între două molecule de IgE adiacente, care au legat un antigen multivalent. IgE ar avea numai rolul de a reuni receptorii segmentului Fc. Reunirea ar fi sursa efectivă a semnalului de activare, a cărei consecință este eliberarea histaminei și serotoninice, SRSA (un factor chemotactic pentru eozinofile). Eozinofilele lizează parazitul.

Concentrația serică a IgE crește în parazitoză și alergii (în astmul alergic, la 1500 ng/ml). IgE este implicată în reacțiile de hipersensibilitate imediată, de tip anafilactic, inclusiv la om.

IgE nu este transferată prin placenta. Nivelul seric de la adult este atins la 10-15 ani.

IMUNOGLOBULINA D

IgD se găsește în cantitate foarte mică în sânge (0,2% din cantitatea totală de imunoglobuline). Este monomeră. Lanțurile L nu au deosebiri față de ale altor imunoglobuline, iar lanțurile H aparțin izotipului δ. Lanțul H are 4 domenii: 3 în regiunea constantă și unul în regiunea variabilă.

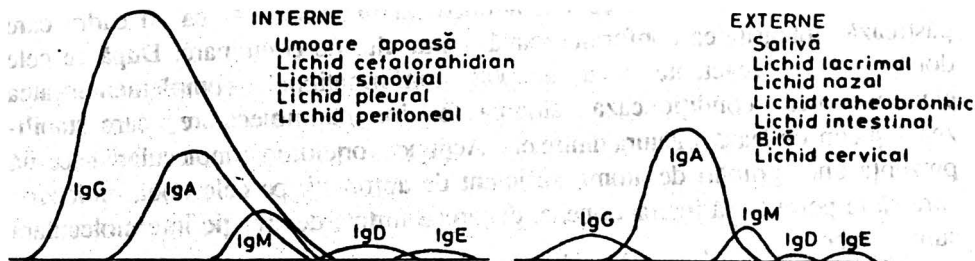


Fig. 13. Distribuția cantitativă a claselor de imunoglobuline în secrețiile interne și externe ale organismului uman (după Tomasi jr., 1984).

Funcții. IgD are rol de receptor de antigen pe suprafața limfocitelor B mature. Nu are funcție de anticorp. După stimularea limfocitelor B, diferențierea izotipurilor nu urmează o cale din care să rezulte celule angajate în secreția IgD. Excepția o constituie sistemul imunitar al mucoaselor, unde există un număr mic dar semnificativ de descendenți ai celulelor B, angajate în secreția de IgD: în tonsile, în glandele lacrimale, glandele salivare, glandele nazale. La pacienții cu deficit al sintezei de IgA, în glandele lacrimale, parotide și nazale, plasmocitele producătoare de IgA sunt înlocuite cu celule producătoare de IgD, iar în mucoasa intestinală, cu celule producătoare de IgG și IgM.

IgD nu este o imunoglobulină a secrețiilor. Nu este mai concentrată în secreții decât în ser. Nu se cunoaște mecanismul său de transport.

La noul născut se găsește în concentrație mai mare în ser. La adult ar putea să aibă origine fetală.

INTERACȚIUNEA ANTIGEN-ANTICORP

Interacțiunile antigen-anticorp sunt totdeauna reversibile și sunt prototipul interacțiunilor dintre macromolecule.

Factorii care condiționează interacțiunea antigen-anticorp sunt:

- **complementaritatea structurală** dintre determinantul antigenic și situsul de combinare al anticorpului. Cele două structuri trebuie să se adapteze tridimensional. Complementaritatea a fost gândită în termeni structurali, pe principiul cheie-broască:

- **complementaritatea electrochimică**, a grupărilor reactante.

Epitopul antigenului se combină cu paratopul, de fapt cu aminoacizii din regiunea hipervariabilă, iar ceilalți aminoacizi funcționează ca un cadru care păstrează integritatea conformațională a situsului de combinare. După ce cele două situsuri reactante s-au adaptat conformațional, complementaritatea electrochimică condiționează valoarea forțelor intermoleculare care stabilizează și consolidează legătura dintre ele. Acțiunea forțelor intermoleculare necesită prezența unor grupări de atomi, suficient de apropiați, pe cele două molecule, care să le permită să interacționeze, deoarece forțele de atracție intermoleculară sunt slabe.

La interacțiunea antigen-anticorp participă următoarele tipuri de legături necovalente: *legături de H*, *legături hidrofobe*, *forțe Van der Waals* și *forțe electrostatice*. Luate separat, fiecare are o energie de legare inferioară legăturii covalente, dar datorită numărului lor mare, împreună implică o rezultantă suficient de mare a energiei de legare. Forțele interacțiunii antigen-anticorp nu sunt specifice. Ele nu diferă de cele care mediază interacțiunea dintre proteine sau dintre proteinele enzime și substratul lor.

Interacțiunea grupărilor reactante ale reacției antigen anticorp este definită de doi parametri: *afinitatea* și *aviditatea*.

Afinitatea anticorpilor măsoară forța de legare dintre un determinant antigenic și situsul complementar de legare al unui anticorp specific. Afinitatea reprezintă rezultanta forțelor de atracție și de respingere care mediază interacțiunea celor doi reactanți. Forța acestor interacțiuni se măsoară într-o reacție a unui antigen monovalent neprecipitant (a unei haptene) cu anticorpii specifici. O afinitate înaltă implică structuri complementare perfecte, în timp ce complementaritatea

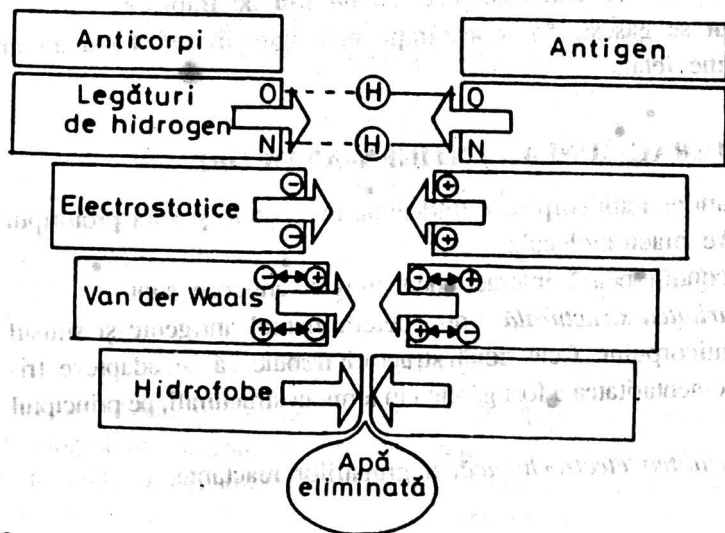


Fig. 14. Reprezentarea schematică a forțelor de atracție intermoleculare, implicate în legarea antigenului de anticorp (după Roitt și colab., 1985).

imperfectă a grupărilor reactante determină o afinitate scăzută, deoarece forțele de atracție sunt diminuate de forțele de respingere.

Metoda de măsurare a afinității anticorpilor este *dializa la echilibru*. Ea se bazează pe proprietatea haptenelor mici, monovalente, de a traversa membrana de dializă, impermeabilă pentru anticorpi, ca și pentru complexele haptenă-anticorpi.

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

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

Aviditatea este un parametru care rezultă din multivalența antigenului. Cele mai multe antigene posedă mai mult decât un determinant antigenic. De exemplu, celulele bacteriene au pe suprafață un număr de determinanți antigenici repetitivi, iar antigenele proteice au totdeauna un număr necunoscut de determinanți antigenici diferiți. Polizaharidele au determinanți antigenici repetitivi. Un astfel de antigen multivalent se combină cu mai multe situsuri ale anticorpilor corespunzători. Energia de legare a epitopilor multipli cu situsurile anticorpilor specifici este mult superioară comparativ cu energia separată a fiecărui situs de combinare. Aviditatea caracterizează energia medie de legare a unui antigen multivalent cu anticorpii corespunzători. Aviditatea măsoară *forța rezultantă* a afinității dintre epitopii multipli și paratopi. Disocierea complexelor antigen-anticorp, formate de antigenele multivalente este dificilă deoarece este necesară ruperea tuturor legăturilor existente.

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

Afinitatea și aviditatea condiționează proprietățile fiziologice ale anticorpilor. Cei cu afinitate mare sunt mai eficienți în reacțiile biologice: în protecția antibacteriană, în reacția de precipitare. Complexele antigen-anticorp, cu afinitate mică a anticorpilor persistă în circulație și se depun pe membrana bazală a glomerulului renal. Cele ce conțin anticorpi cu afinitate mare se elimină rapid, fără efect notabil asupra funcției renale.

BAZELE MOLECULARE ALE REACȚIILOR IMUNE ÎNCRUCIȘATE

Trăsătura dominantă a reacțiilor antigen-anticorp este *specificitatea*. În general, anticorpul reacționează numai cu antigenul *homolog* (folosit la imunizare), dar există și excepții, în cazul cărora anticorpul unui ser imun reacționează și cu antigene *heterologe*, altele decât cel folosit la imunizare, dar înrudite chimic cu acesta.

Molecula de imunoglobulină, cu o structură tridimensională unică poate să lege un număr de determinanți antigenici *diferiți*, similari ca structură chimică cu antigenul declanșator, sau cu structură chimică distinctă. Energia interacțiunii anticorpilor cu antigenele heterologe este mai mică. Această posibilitate de legare stă la baza *multispecificității* imunoglobulinelor sub aspect *molecular* și a reacțiilor *încrucișate* sub aspect *serologic*.

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

O altă explicație de ordin molecular a reacțiilor încrucișate o constituie *heterogenitatea* configurației spațiale a situsului de combinare a anticorpilor unui ser imun. Aceasta decurge din faptul că nu există nici un antigen care să aibă un singur epitop. Cea mai simplă haptenă poate induce sinteza câtorva tipuri conformaționale de situsuri de combinare, fiecare cu o altă specificitate. Heterogenitatea specificității de combinare a anticorpilor unui ser mărește șansa unei reacții cu antigene heterologe.

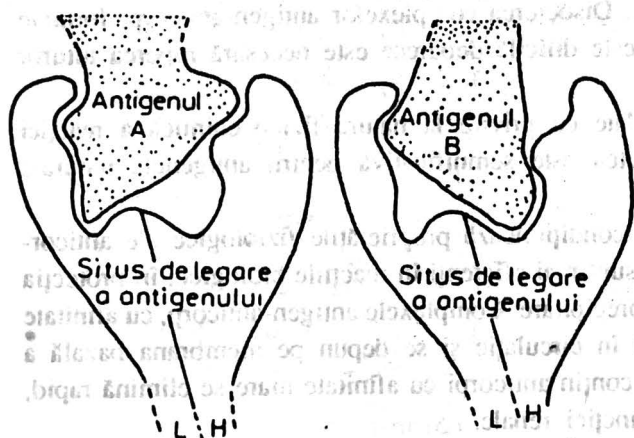


Fig. 15. Reprezentarea schematică a fenomenului de multispecificitate a moleculei de anticorp (după Hood și colab., 1984).

Din punct de vedere serologic, reactivitatea încrucișată este de două tipuri:
 – reactivitate încrucișată *adevărată*, sau de tip I, corespunde capacității unui situs de combinare al unei molecule de anticorp, de a lega două antigene diferite, cu afinități diferite. Pentru proteine, reactivitatea încrucișată este determinată de mici modificări ale secvenței aminoacizilor, care induc ușoare modificări conformaționale;

– reactivitate încrucișată de tip II este caracteristică antiserurilor cu o populație foarte heterogenă de anticorpi și depinde de capacitatea unui antigen înrudit cu cel homolog de a se combina cu o subpopulație de anticorpi a amestecului heterogen din ser.

Reacțiile încrucișate au fost inițial observate în cazul antigenelor celulare bacteriene, datorită complexității lor antigenice. Oricare celulă bacteriană conține un număr mare de antigene distincte (flagelare, somatice, capsulare etc). Antiserul specific va conține un amestec de anticorpi față de diferiții săi constituenți antigenici, unii dintre ei fiind comuni mai multor linii bacteriene.

Raționamentul este valabil și pentru moleculele mari. Ele conțin mai mulți determinanți antigenici, care pot fi comuni organismelor diferitelor specii.

Reacțiile încrucișate sunt mai comune pentru antigenele care au epitopi de natură glucidică. De exemplu antigenele de grup sanguin A și polizaharidul de *Streptococcus pneumoniae* reacționează cu antiserul față de oricare dintre ele, iar antigenele sanguine de grup B reacționează cu anticorpii obținuți față de unele tulpini de *E. coli*. Bumbacul este înrudit structural cu polizaharidul de *S. pneumoniae*, tipurile 3 și 8 (în virtutea conținutului comun de acid celobiuronic). Antiserurile lor dau reacții încrucișate reciproce.

Antigenele proteice din surse taxonomice înrudite dau reacții încrucișate. De exemplu, antiserul față de albumina de ou de găină precipită albumina din oul de rață. Reacții încrucișate dau albumina serică bovină și equină sau fibrinogenul uman și cel bovin. Sunt cunoscute reacțiile încrucișate ale anticorpilor față de insulina bovină, cu insulina de porc, oaie, om, balenă. Moleculele de insulină de la diferite specii prezintă diferențe structurale foarte mici (la secvențele 8, 9, 10);

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

Reacțiile încrucișate reciproce sunt frecvente dar nu obligatorii. De exemplu, serul imun de iepure anti-albumină serică bovină precipită ovalbumina, dar reacția inversă nu se produce.

BAZELE GENETICE ALE DIVERSITĂȚII ANTICORPILOR

Sistemul imunitar al vertebratelor produce anticorpi cu o mare diversitate a specificității situsului de combinare (10^8 – 10^9), tipuri diferite care leagă tot atâția epitopi antigenici. Înțelegerea determinismului genetic al acestei diversități a întârziat mult față de alte aspecte ale funcționalității sistemului imunitar.

Prima teorie modernă asupra specificității anticorpilor a fost teoria „lanțurilor laterale” a lui Ehrlich (1900). Lanțurile laterale sunt receptori preformați situați pe membrana limfocitelor. Legarea antigenului pe receptorul limfocitului, va stimula celula să sintetizeze molecule identice cu receptorul de antigen, care trec în ser ca anticorpi. Teoria lui Ehrlich a anticipat teoria selecției clonale, precum și ideea că sistemul imunitar poate genera receptori cu mult înainte de a veni în contact cu antigenul, care stau în așteptarea acestuia și au structură comună cu aceea a anticorpilor. Ehrlich consideră, însă, în mod eronat, că o celulă posedă receptori pentru mai multe antigene. Teoria sa a fost abandonată când Landsteiner a arătat că formarea anticorpilor are loc și față de antigenele artificiale (conjugate haptene-proteină) și astfel specificitatea anticorpilor a fost explicată prin *teoriile instructive* (Brenn și Haurowitz, 1930). Teoriile atribuiau rol important grupărilor determinante de specificitate. Acestea ar pătrunde în celula formatoare de anticorpi și ar acționa ca *matriță* pentru a imprima polipeptidelor în curs de sinteză, o configurație spațială complementară.

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

În 1959, Mc Farlane Burnet a formulat *teoria selecției clonale*. Teoria postulează că sistemul imunitar este reprezentat de un număr uriaș de *clone de limfocite*, carespunzătoare unui număr egal de epitopi. Clona este o populație de celule, genetic identice, descendente ale unei singure celule de origine. Diversitatea clonelor este reflectată în specificitatea fiecăreia de a recunoaște un anumit epitop și este generată în timpul diferențierii celulelor limfoide din celulele de origine. Toate celulele unei clone poartă pe suprafața lor, molecule identice de imunoglobulină, care funcționează ca receptori specifici de antigen. După interacțiunea cu antigenul, receptorul va fi produs și secretat ca anticorp. Epitopii antigenelor complexe *selecționează* din această colecție imensă, clonele

de limfocite care au receptori complementari din punctul de vedere al configurației spațiale și determină proliferarea și diferențierea lor în celule producătoare de anticorpi. Toate celulele clonei au aceeași specificitate pentru antigen. Sistemul imunitar funcționează pe principiul „gata făcut”, astfel încât problema diversității anticorpilor devine de ordin genetic.

Teoria selecției clonale este argumentată de câteva dovezi experimentale:

- pe suprafața celulelor imunocompetente există receptori pentru diferite antigene: numai 1–2% din limfocite leagă albumina serică bovină (sau alte antigene). Numărul celulelor care leagă un anumit antigen crește semnificativ după imunizarea cu antigenul respectiv;

- un limfocit produce anticorpi cu o *singură specificitate*, față de un singur epitop. Faptul că inițial se produce IgM și ulterior IgG nu este un contraargument, deoarece anticorpii celor două clase au regiuni variabile identice și aceeași specificitate de legare cu epitopul;

- clona de celule cu specificitate pentru un antigen se poate elimina selectiv prin pasajul celulelor pe o coloană de afinitate, de bile de sticlă tapetate cu antigen. Cele care au receptori pentru antigen aderă de coloană, iar celelalte trec, ceea ce denotă că limfocitele sunt programate să răspundă la un antigen, înainte de a se întâlni cu el, prin receptorii lor specifici preformați;

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

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

- *teoria liniei germinale* consideră că genele care codifică sinteza regiunilor VL și VH se găsesc în celula germinală. În genomul fiecărui individ s-ar găsi un număr imens de cistroni, care s-ar transmite ereditar. Pentru cele 10^8 – 10^9 specificități de legare ale moleculelor de anticorpi, ar exista tot atâtea gene codificatoare. Teoria nu explică modalitățile de păstrare în evoluție, a acestui număr de gene și nici posibilitatea sintezei anticorpilor cu specificitate față de antigenele sintetice;

- *teoria recombinărilor somatice* presupune existența unui număr limitat de cistroni codificatori ai regiunilor V ale moleculei de anticorpi, în linia germinală. Diversificarea tipurilor de anticorpi s-ar realiza prin recombinări somatice între

un număr limitat de cistroni, asociate cu diviziunile celulare în cursul diferențierii limfocitelor;

– *teoria mutațiilor somatice* consideră că repertoriul genelor pentru sinteza imunoglobulinelor este construit de novo în cursul dezvoltării sistemului imunitar, pornind de la un număr mic de gene ale liniei germinale, prin mutații la nivelul celulelor somatice. Selecția pozitivă (păstrarea viabilității clonelor cu receptori pentru antigenele exogene) s-ar face sub influența antigenelor care selecționează și stimulează proliferarea celulelor mutante, ce 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 V în celulele liniei germinale. Diversificarea imensă a potențialului de codificare și sinteză s-ar face prin recombinări somatice între acești cistroni, în timpul diviziunilor celulare, declanșate de recunoașterea și stimularea antigenică.

Ipoteza lui Dreyer și Bennett (1965) explică diversitatea anticorpilor prin însăși particularitățile lor de structură. Existența unei singure gene codificatoare pentru regiunile V și C ale moleculei de imunoglobulină este improbabilă, deoarece nu este posibil ca o genă să sufere atâtea variații genetice corespunzătoare extremității NH_2 a catenei polipeptidice și să rămână constantă pentru zona codificatoare a extremității COOH . Nu se cunoaște nici o situație în care segmentul ADN corespunzător regiunii constante a unei proteine să fi rămas nemodificat, iar cel codificator al regiunii variabile să fie expus mutației cu o frecvență atât de mare.

Singura modalitate logică este să presupunem că molecula de imunoglobulină este codificată de *mai multe gene* separate – *cel puțin două* – una pentru regiunea variabilă și una pentru regiunea constantă. În celulele embrionare limfoide 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 de imunoglobulină funcțională s-ar forma 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, corespunzătoare celor două lanțuri.

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

- o genă codifică un polipeptid;
- constanța genomului pe toată perioada de dezvoltare a unui organism;
- imposibilitatea rearanjării genelor într-o celulă somatică;
- continuitatea informației genetice. Din aceste motive, ipoteza nu a fost acceptată.

Teoria genelor multiple codificatoare pentru o moleculă de imunoglobulină a fost confirmată prin tehnica cineticii de hibridare (Leder și Swan, 1971). Autorii au arătat că atât în *celulele limfoide embrionare* cât și în *celulele tumorii de mielom*, regiunea *constantă* a fiecărei catene a moleculei de imunoglobulină este codificată de *o singură genă*, iar regiunea *variabilă* este codificată de *mai multe gene*.

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

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

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

Fragmentele codificatoare ale lanțului *k* au fost identificate prin hibridare cu ADNc (complementar), obținut prin transcrierea inversă a ARNm al lanțului *k*. S-au folosit două fragmente de ARNm ale lanțului *k*;

- un fragment pentru lanțul *k* întreg (cu domeniile *V_k* și *C_k*);
- un fragment corespunzător jumătății 3' a ARNm pentru domeniul *C_k*.

În proba cu ADN obținut din limfocitele embrionare, ADNc pentru fragmentul *C_k* a hibridat cu un fragment ce conține gena *C_k*, iar ADNc pentru întregul lanț *k* a hibridat atât cu fragmentul genei *C_k*, cât și cu un alt fragment de ADN rezultat prin clivarea cu enzimele de restricție, care conține, probabil, gena *V_k*. În celulele embrionare, cele două gene codificatoare ale lanțului *k* se găsesc situate la distanță, în fragmente de restricție diferite.

În proba cu ADN obținut din celulele de mielom, ambele probe de ADNc, corespunzătoare domeniului *C_k* și lanțului întreg *V_k* și *C_k* au hibridat într-un singur fragment. În limfocitele mature, cele două gene codificatoare ale lanțului *k* se găsesc în imediată vecinătate, în același fragment de restricție.

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

Mecanismele genetice de tranlocare, generatoare ale uriașei diversități a specificității de combinare a anticorpilor au deschis o nouă cale a înțelegerii modului în care informația genetică poate să fie amplificată. Ele sunt active în limfocitele B, dar și în limfocitele liniei T, în care codifică o diversitate asemănătoare a receptorului de antigen al acestor celule, însă nu au fost

au fost identificate pentru alte gene. Singurul mecanism care aduce genele într-o structură genică coerentă, funcțională este reunirea (*translocafia*) prin recombinare genetică a celor două secvențe ADN, pentru a forma o genă activă *L* și o genă activă *H*.

Poli-peptidele *L* și *H* sunt codificate de 3 grupuri de gene nelincate:

- grupul genelor *H* pentru sinteza lanțurilor γ , μ , α , δ , ϵ (situate pe cromosomul 14 la om și 12 la șoarece);
- grupul genelor *k* pentru sinteza lanțului *Lk* (situate pe cromosomul 2 și respectiv 6);
- familia genelor λ pentru sinteza lanțului *L* λ (situate pe cromosomul 22 și respectiv 16).

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

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

Gena 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 aminoacizi ai secvenței leader de la extremitatea N-terminală a lanțului polipeptidic. Această secvență este clivată pe măsură 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* codifică restul regiunii variabile, adică aminoacizii între pozițiile 98–110 (*J λ* = joining – legare).

Segmentul genic *C λ* codifică regiunea constantă a lanțului *L*, între pozițiile 111–214.

Familia de gene codificatoare ale lanțului *Lk* este organizată asemănător cu a genelor *L λ* : secvențe leader *Lk*, așezate în tandem cu cele circa 250 segmente genice *Vk*, 5 segmente *Jk* strâns legate între ele (din care unul este defectiv) și la o distanță de 1000 pb se găsește un singur segment genic *Ck*.

Genele pentru catena H a imunoglobulinelor au o organizare similară celei a genelor lanțului *L*. Segmentele genice ale lanțului *H* sunt mai numeroase și au o organizare mai complexă, deoarece conțin în plus, regiuni codificatoare notate cu *D* (diversity), intercalate între *VH* și *JH*. Ele amplifică diversitatea

biochimică a anticorpilor. Sunt circa 12 segmente genice D, fiecare codificând 5–15 aminoacizi. Ele conferă cea mai amplă variație biochimică a lanțului H.

Segmentele genice VH par a fi în număr de câteva sute. Fiecare segment VH este asociat cu segmentul LH, codificator al secvenței leader. La șoarece sunt 200–300 segmente genice VH, 10–20 D, 4 gene JH și 10 gene CH.

Genele CH, codificatoare ale regiunii constante ale claselor și subclaselor de catene H se găsesc în ordinea: μ , δ , γ_3 , γ_1 , $\epsilon\phi$, α_1 , γ_2 , γ_4 , ϵ , α_2 . $\epsilon\phi$ este nefuncțională.

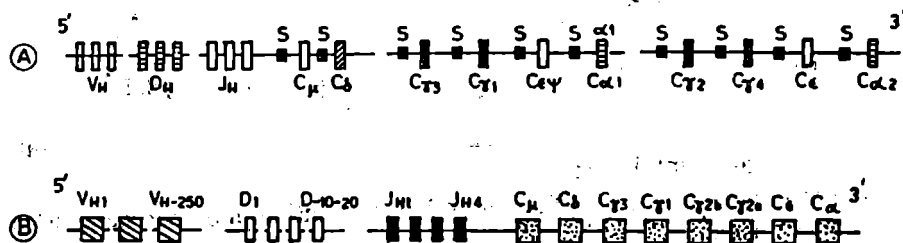


Fig. 16. Reprezentarea schematică a ordinii genelor în limfocitele embrionare, pentru regiunea constantă a catenei H la șoarece (A) și la om (B). Regiunile încadrate în dreptunghiuri corespund exonilor. Discontinuitățile linii care îi leagă marchează distanțe nucleotidice nedeterminate. S = regiune de comutare (switch) (după Korsmeyer și Waldmann, 1984).

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

Asamblarea genei active pentru catena L. Pentru a rezulta o genă funcțională, unul din cele circa 250 segmente genice V κ se unește cu unul din cele 4 segmente genice funcționale J κ , printr-un proces de recombinare probabilistică. Împreună cu gena C κ , ele formează ansamblul VIC, codificator al catenei L κ , transcris ulterior în ARN-premesager. Prin procesul de clivare și îndalare, intronii sunt eliminați și rezultă ARN pentru catena L κ . Se sintetizează lanțul polipeptidic, iar secvența leader este clivată în cursul transferului prin membrana reticulului endoplasmic.

Asamblarea genei active pentru catena H este similară asamblării genei active pentru catena L, dar mai complexă deoarece implică recombinarea a 3 regiuni distincte ale domeniului variabil: VH, D și JH. Inițial s-ar realiza legarea segmentelor D și JH, urmată de translocarea uneia din genele VH în vecinătatea complexului D–JH. 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.

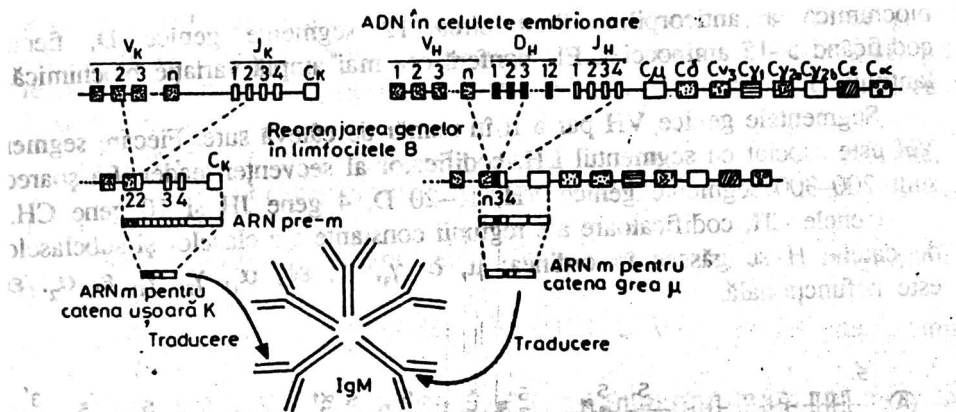


Fig. 17. Reprezentare schematică a rearanjărilor segmentelor genice, în limfocitele B, pentru sinteza IgM (după Rottgein, 1985).

La complexul VH-D-JH este tranlocată una din genele CH, care codifică clasa și subclasa lanțului H.

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

- 1) Diversitatea combinațiilor posibile prin asamblarea întâmplătoare a segmentelor genice. Cele circa 250 segmente genice V_k și cele 4 segmente funcționale J_k produc circa 1000 (250×4) combinații V_k-J_k . Pentru gena H există posibilitatea unui număr superior de combinații VH-D-JH: circa 250 segmente VH, 12 segmente D și 4 segmente JH ($250 \times 12 \times 4$).
- 2) Flexibilitatea joncțională a segmentelor genice. În momentul formării complexelor VH-D-JH sau VL-JL se produc deleții, adiții, substituții de baze, care modifică 3 aminoacizi la fiecare joncțiune. Numărul variantelor biochimice crește de 3 ori pentru lanțul L (1000×3) și de 9 ori pentru lanțul H ($12000 \times 3 \times 3$).
- 3) Adiții de nucleotide în regiunea N. Cea mai variabilă regiune a moleculei de anticorp este cea de a III-a regiune determinantă de complementaritate a

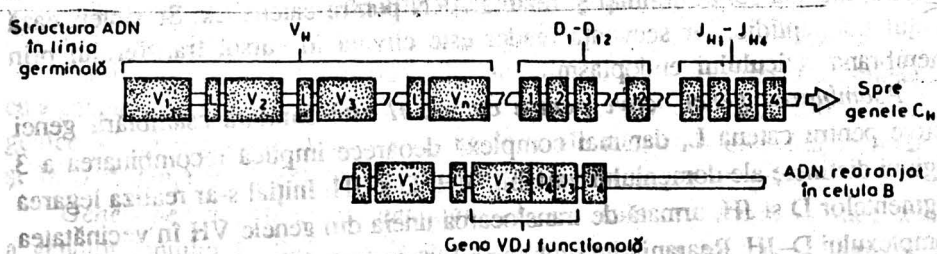


Fig. 18. Recombinarea segmentelor genice VDJ la șoarece și formarea complexului genic funcțional VDJ în limfocitele B. Schema prezintă una din miile de alternative posibile de legare a unui segment VH, din cele câteva sute existente, cu un segment DH (din 12) și un segment JH (din 4) (după Roitt și colab., 1985).

lanțului H (aminoacizii 86–91), locul de unire a segmentelor genice VH–D și D–JH. Aceste regiuni conțin secvențe scurte variabile de aminoacizi denumite regiuni N. Ele sunt codificate de secvențe de nucleotide adăugate de enzima terminal-transferază, activă în celulele limfoide imature, capabilă să adăuge nucleotide la capătul 3' al catenei de ADN în curs de sinteză, fără să necesite matriță.

4) Conversia genică este implicată în generarea diversității lanțurilor L ale anticorpilor de pui de găină. În mod surprinzător, regiunile variabile ale tuturor lanțurilor L sunt codificate de un singur segment genic (V λ). Toate celelalte numeroase segmente genice V λ sunt nefuncționale (gene defective). Din genele defective, secvențe de 20–30 nucleotide se găsesc în gena V λ funcțională. Transferul acestor nucleotide din genele inactice, în gena activă unică nu se cunoaște. Ar putea fi un proces de *transpoziție*. Aceste secvențe asigură marea diversitate a secvenței regiunii variabile a lanțului L.

5) Diversitatea combinatorială prin împerecherea întâmplătoare a lanțurilor H și L. Dacă orice lanț L poate fi împerecheat cu orice lanț H vor rezulta peste 10^8 variante de imunoglobuline ($100000\text{ H} \times 3000\text{ L}$).

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

Adițiile și delețiile care însoțesc legarea segmentelor genice trebuie să se facă astfel încât să păstreze cadrul de citire al tripletelor. Dacă legarea introduce sau pierde 1 sau 2 nucleotide (sau alt număr nedivizibil cu 3), secvența în aval nu va putea fi citită. Aceasta este o rearanjare neproductivă.

Rearanjările apar inițial la nivelul genei pentru lanțul H, care apare primul în citoplasma limfocitelor. Ulterior are loc rearanjarea segmentelor genice ale catenei L.

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

Mecanismele de variabilitate enumerate permit ca în contextul existenței a mai puțin de 1000 de gene în linia germinală, organismul să producă o mare diversitate de anticorpi: câteva miliarde de specificități diferite, sau *repertoriul* imunoglobulinelor.

Rearanjarea genelor se desfășoară continuu în limfocitele B din *măduva hematogenă a oaselor*. Aici se assemblează o genă unică a lanțului H și o alta a lanțului L, din familiile segmentelor genice funcționale VH, D, JH, și respectiv VL, JL.

PRODUCEREA ANTICORPILOR MONOCLONALI PRIN TEHNOLOGIA HIBRIDOMULUI

Metoda clasică de obținere a anticorpilor necesari studiilor clinice și de diagnostic constă în stimularea repetată, prin injectarea antigenului, într-un organism cu reactivitate imunitară optimă. Când cantitatea de anticorpi specifici este maximă, animalul este sângerat și se obține *serul imun* (antiserul), care este folosit ca atare, ori este utilizat pentru purificarea anticorpilor. Această metodă are câteva dezavantaje:

- cantitatea și calitatea anticorpilor față de un antigen variază de la un organism la altul și chiar între sângerrările succesive ale aceluiași animal;
- serul imun este un amestec foarte heterogen de molecule de anticorpi, chiar și în cazul în care imunizarea se face cu un antigen înalt purificat;
- oricât de simplu ca structură moleculară, un antigen are mai mulți epitopi care stimulează mai multe *clone de limfocite*, ce produc anticorpi cu specificități și afinități diferite;
- antigenele înalt purificate conțin impurități care determină formarea anticorpilor specifici în cantități disproporționat de mari;
- chiar după purificare (procedeu costisitor), antiserurile conțin anticorpi cu afinități diferite și cu reactivitate încrucișată;
- obținerea unor cantități mari de anticorpi cu aceeași specificitate de legare față de un epitop este practic imposibilă.

În concluzie, antiserurile sunt *amestecuri de anticorpi policlonali*, în cantități variabile de la un organism la altul.

Tehnologia modernă de obținere a anticorpilor omogeni, denumită *hibridoma* (*hibrid + mieloma*) a fost propusă de Köhler și Milstein (1975) și se bazează pe următoarele principii metodologice:

- 1) Antigenul purificat se injectează animalelor de experiență;
- 2) Când titrul anticorpilor specifici în sânge este maxim, din splină sau din ganglionii limfatici se separă limfocitele. Fiecare limfocit și plasmocitele generate prin diviziuni succesive sintetizează molecule omogene de anticorpi, cu specificitate unică de combinare pentru un singur epitop, denumiți *anticorpi monoclonali* (AMC);
- 3) Limfocitele B, ca oricare alte celule normale trăiesc puțin în afara organismului, iar plasmocitele, care sintetizează cea mai mare cantitate de anticorpi nu supraviețuiesc în culturi;

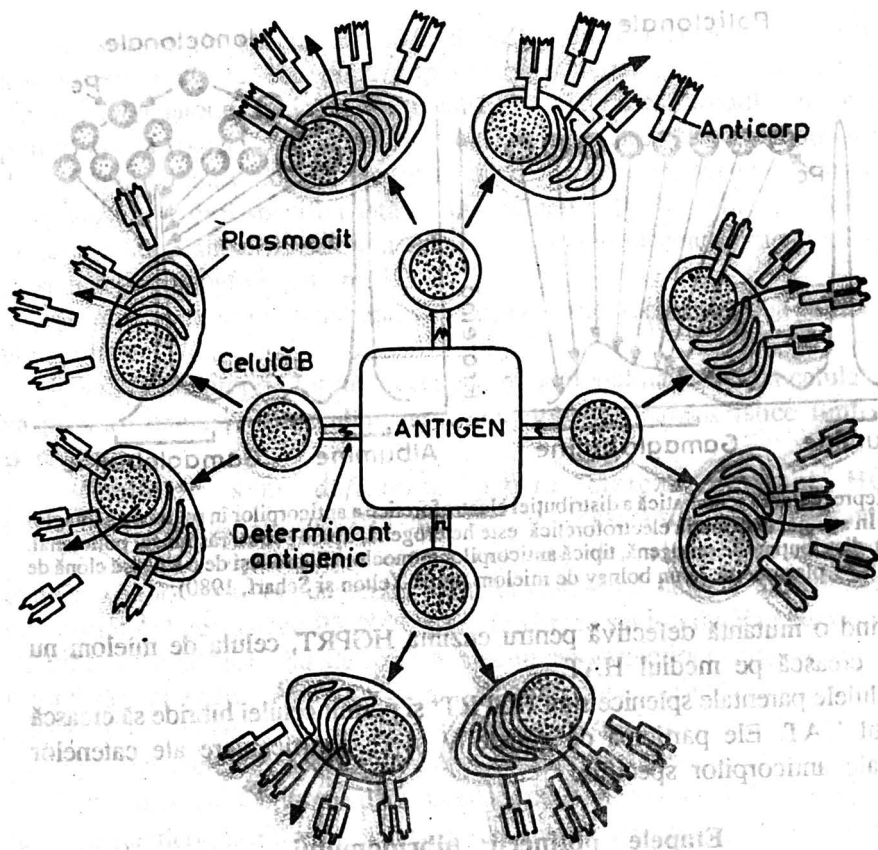


Fig. 19. Heterogenitatea specificității anticorpilor ce se sintetizează în răspunsul imn. O moleculă de antigen care poartă 4 epitopi diferiți stimulează tot atâtea clone de limfocite B, care se diferențiază în plasmocite și produc 4 tipuri de anticorpi, fiecare având specificitate față de un epitop (după Kennedy și colab., 1985).

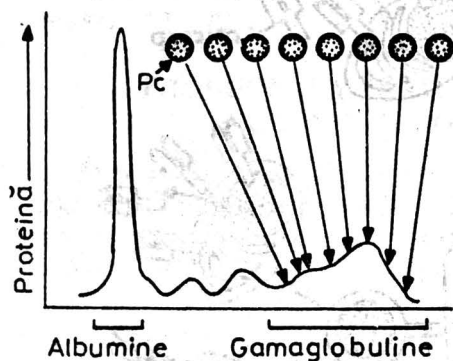
4) Celulele de mielom sunt nemuritoare datorită capacității lor de a se menține, practic, un timp nelimitat în culturi. Fuziunea lor cu limfocitele B *in vitro*, le conferă celor din urmă proprietatea de *nemurire*.

Obținerea unor hibrizi dintre o celulă de mielom de șoarece și o celulă normală producătoare de anticorpi, de la aceeași specie, pentru producerea continuă a AMC a introdus un nou concept – al *imortalizării funcțiilor specifice diferențiate*.

Caracteristicile esențiale ale hibridoamelor producătoare de anticorpi sunt următoarele:

- celula de mielom participă la fenotipul hibrid nemuritor, cu capacitatea sa de a crește permanent în cultură;

Policlonale



Monoclonale

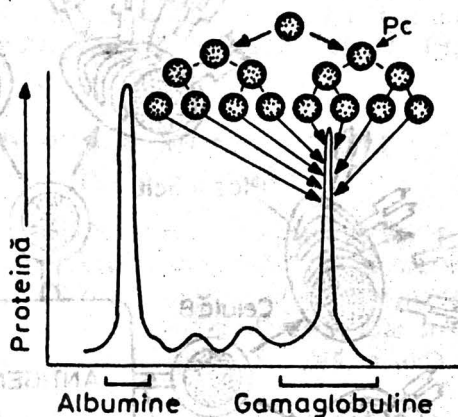


Fig. 20. Reprezentarea schematică a distribuției electroforetice a anticorpilor în regiunea gamaglobulinelor. În stânga, distribuția electroforetică este heterogenă, tipică pentru răspunsul policlonal. În dreapta, distribuția este omogenă, tipică anticorpilor monoclonali, produși de o singură clonă de plasmocite, la un bolnav de mielom (după Yelton și Scharf, 1980).

– fiind o mutantă defectivă pentru enzima HGPRT, celula de mielom nu poate să crească pe mediul HAT;

– celulele parentale splenice sunt HGPRT⁺ și permit celei hibride să crească pe mediul HAT. Ele participă cu genele V și C, codificatoare ale catenelor H și L ale anticorpilor specifici.

Etapele obținerii hibridomului

Metodologia obținerii unei linii celulare hibride, nemuritoare, producătoare de anticorpi monoclonali (AMC) parcurge următoarele faze:

1) *Obținerea celulelor de mielom*. Mielomul (plasmocitomul) este rezultatul diviziunilor necontrolate ale unui singur plasmoblast sau ale unui precursor al său din linia limfocitară B. Proliferarea necontrolată este însoțită de producerea unor cantități mari de molecule de imunoglobuline omogene, cu proprietăți uniforme, deosebirea fiind legată de faptul că aceste molecule nu mai au specificitatea de legare a moleculelor produse de celula normală. În sânge se acumulează o cantitate mare de *proteine de mielom* (proteine M sau paraproteine). În laboratorul clinic, diagnosticul de mielom se pune după detectarea în ser, a unei cantități mari de molecule din clasa imunoglobulinelor, (circa 50 mg/ml), omogene la electroforeză.

Tumorele de mielom apar spontan la multe mamifere, iar la om, 1% din tumori sunt mioame. Experimental, tumorele de mielom se induc la mai multe

linii de șoareci (în special BALB/c și NZB), după injectarea intraperitoneală a uleiurilor minerale, sau după implantarea materialelor plastice care produc o reacție inflamatorie cronică și apar după 120–130 de zile. Tumorile sunt menținute prin pasaje la șoareci din aceeași linie, sau *in vitro* și produc cantități suficiente de imunoglobulină omogenă pentru analiză. Nu s-au obținut mieloame care să sintetizeze anticorpi specifici față de un antigen dat. Tumorile de mielom sunt în același timp, surse de ARN și ADN pentru studiul determinismului genetic al sintezei imunoglobulinelor.

Hibridoamele se obțin din linii speciale de mielom, care au două particularități mutaționale:

- nu produc propria lor moleculă de imunoglobulină, astfel că celula hibridă va produce exclusiv moleculele de imunoglobulină caracteristice limfocitului B normal;

- celulele sunt *deficiente* pentru sinteza enzimei HGPRT (hipoxantin–guanozin–fosforibozil–transferază) necesară sintezei acizilor nucleici.

Una dintre cele mai cunoscute linii celulare de mielom, foarte utilă pentru obținerea hibridoamelor, deoarece prezintă cele două defecte mutaționale este plasmocitomul de șoarece P3–X63–Ag8. Deoarece sunt deficiente pentru sinteza HGPRT, celulele sale nu detoxifică efectul aminopterinei care se adaugă în mediul de creștere. Aminopterina blochează calea normală a sintezei ADN, prin inhibiția sintezei de novo a purinelor și pirimidinelor. În mediul cu aminopterină, celulele acestui mielom nu supraviețuiesc.

2) *Imunizarea*. Obținerea unei populații cât mai mari de limfocite B angajate în sinteza anticorpilor specifici față de un anumit epitop (expansiunea clonală) se realizează prin imunizare. Diviziunile repetate produc creșterea numărului de limfocite B ale clonelor stimulate.

3) *Fuziunea* se realizează în scopul „imortalizării” celulelor producătoare de anticorpi. Imortalizarea este capacitatea celulelor de a crește indefinit *in vitro*, fără senescență, ca o consecință a transformării indusă prin fuziune cu alte celule deja transformate (cu ajutorul substanțelor chimice sau al virusurilor oncogene).

Cele mai folosite pentru fuziune sunt limfocitele B din splina de șoarece din linia BALB/c (din aceeași linie provin și celulele de mielom), pentru a evita manifestările fenomenelor de incompatibilitate, ulterior când celulele de hibridoma sunt cultivate ca tumori pe aceeași linie BALB/c. Proporția limfocitelor producătoare de anticorpi în splină, este mică: $1/10^3$ – $1/10^5$.

Fuziunea limfocitelor viabile din splină (obținute prin dezagregare mecanică) cu celulele de mielom HGPRT⁻ se realizează prin amestecul lor în proporție de circa 5 celule splenice/ o celulă de mielom. Procesul fuziunii este stimulat

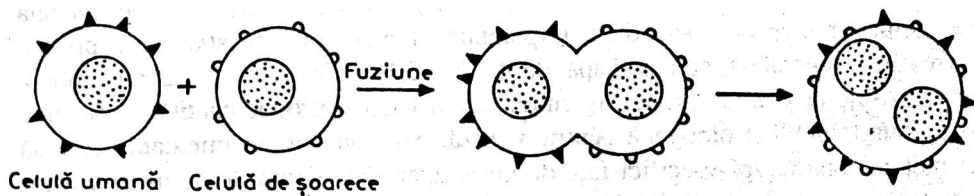


Fig. 21. Fuziunea celulelor umane și murine produce un heterocarion binucleat, pe suprafața căruia cele două tipuri de antigen rămân localizate pe zona de membrană corespunzătoare. După 40 min., la 37°C, antigenele migrează în planul membranei fluide și se amestecă pe suprafața celei hibride (după Raff, 1976).

pe mai multe căi, dar cel mai adesea se folosește PEG cu greutatea moleculară până la 4000 D. Amestecul de celule se menține 3–8 min în 0,2–0,5 ml PEG 40%, la 37°, pH = 7,5–8.

4) *Selecția celulelor de hibridom*. Amestecul de fuziune conține celule splenice și de mielom nefuzionate, celule splenice fuzionate între ele, celule de mielom fuzionate între ele și celule *hibridom* (fuzionate splenice x mielom). Selecția are ca scop, separarea celulelor de hibridom și eliminarea celorlalte tipuri (nefuzionate sau hibride neutilizabile). În acest scop, amestecul de celule se cultivă pe *mediul selectiv HAT* (hipoxantină, aminopterină, timidină) în care splenocitele normale (nefuzionate) și fuzionații splenici x splenocit mor în 1–2 săptămâni, copleșite fiind numeric de celulele de hibridom, care se divid la ficcare 17–24 ore. Mediul selectiv HAT permite, numai supraviețuirea produselor de fuziune *mielom x splenocit* și este inhibitor pentru celulele de mielom, ca și pentru fuzionații mielom x mielom. Acțiunea sa selectivă se bazează pe următoarele condiții experimentale:

a) Aminopterina (analog al acidului folic) prezintă în mediul HAT blochează sinteza purinelor și pirimidinelor și pe această cale, sinteza acizilor nucleici. În acest mediu, celulele devin dependente de surse externe de purine și timidină. Hipoxantina din mediul HAT poate fi convertită la inozin-monofosfat, (din care derivă adenzin-monofosfat și guanozin-monofosfat) de către enzima HGPRT. Timidina poate fi fosforilată la timidin-monofosfat și timidin-trifosfat, de către enzima timidin-kinază (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 și nici fuzionații mielom x 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

produce prin diviziune, o colonie (*clonă*). Operația de clonare se repetă pentru a garanta o descendență omogenă. Dintre sutele de hibridoame clonate este necesară alegerea celor cu capacitate de sinteză a anticorpilor specifici față de antigenul cu care s-a făcut imunizarea. Hibridoamele producătoare de anticorpi cu specificitatea dorită se cultivă *in vitro*, în culturi cu perfuzie continuă cu mediu proaspăt, sau în bioreactoare cu capacitate mare. Cea mai simplă tehnică de cultivare este *in vivo* și constă în inocularea intraperitoneală a circa 2×10^6 celule hibridoma, la organisme ale aceleiași linii genetice (pentru evitarea fenomenelor de incompatibilitate). Tumora se dezvoltă intraabdominal și lichidul de ascită care o însoțește conține anticorpi în proporție de 50% din totalul proteinelor sale. Randamentul producției de anticorpi monoclonali *in vivo* este de 100–1000 ori mai mare decât *in vitro*. Anticorpul din lichidul ascitic se purifică prin fracționare cu sulfat de amoniu sau prin metoda cromatografiei cu schimb de ioni.

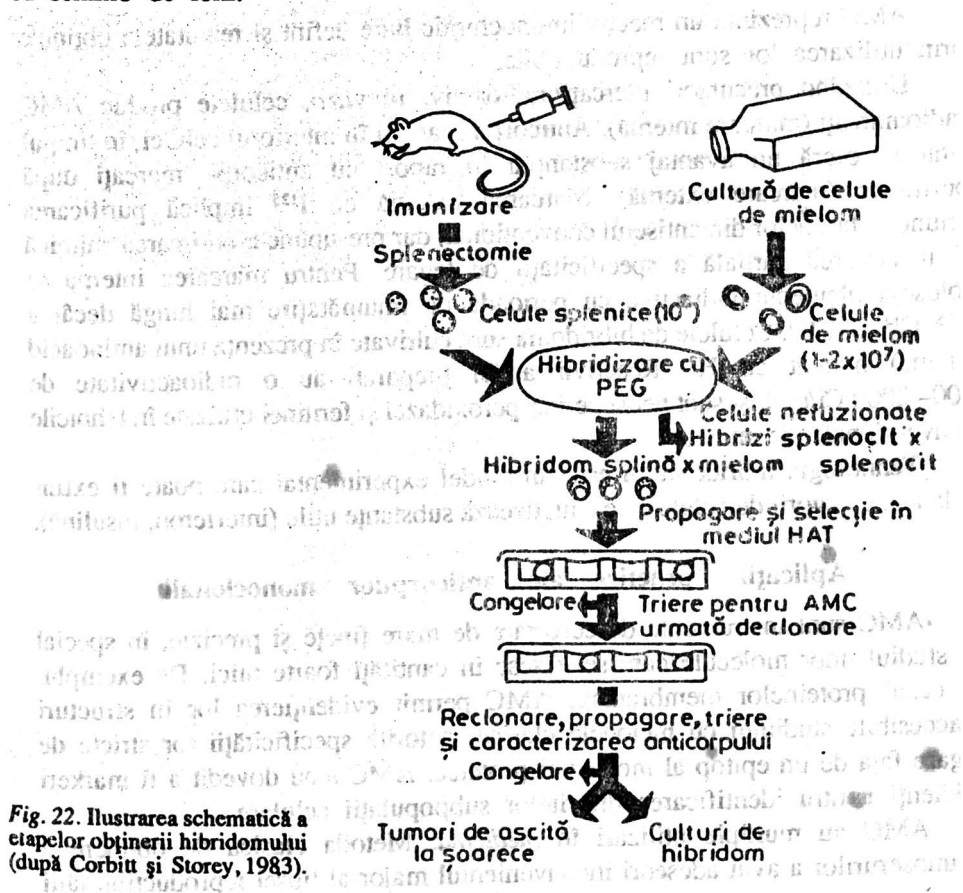


Fig. 22. Ilustrarea schematică a etapelor obținerii hibridomului (după Corbitt și Storey, 1983).

Avantajele biotehnologiei hibridomului

Producerea AMC are un avantaj foarte mare față de metoda convențională a serului imun, care, datorită heterogenității antigenelor conține anticorpi cu specificități multiple. Fiecare specificitate de anticorpi a unui amestec heterogen natural poate fi produs de câte un hibridom, deoarece celulele de hibridoma se clonează individual și fiecare clonă celulară rezultată secretă anticorpi cu specificitate unică față de un singur epitop al unui antigen.

Celulele de hibridoma proliferază rapid, ceea ce scurtează timpul necesar obținerii AMC.

Hibridoamele produc cantități mari de anticorpi, care depășesc de câteva ori concentrația anticorpilor din serul animalelor imunizate.

Clonele celulare individuale se mențin indefinit prin cultivare *in vitro* sau *in vivo*.

AMC reprezintă un reactiv imunochimic bine definit și rezultatele obținute prin utilizarea lor sunt reproductibile.

Utilizând precursori marcați radioactiv, *in vitro*, celulele produc AMC radiomarcați (marcare internă). Anticorpilor marcați în interiorul celulei, în timpul sintezei oferă un avantaj substanțial în raport cu anticorpilor marcați după purificare (marcare externă). Marcarea externă cu I^{125} implică purificarea imunoglobulinelor din antisera convențional, dar presupune modificarea chimică și inactivarea parțială a specificității de legare. Pentru marcarea internă se folosesc elemente radioactive cu perioada de înjumătățire mai lungă decât a I^{125} , C^{14} , S^{35} , H^3 . Celulele de hibridoma sunt cultivate în prezența unui aminoacid (lizina) marcat cu H^3 . Reactivii astfel preparați au o radioactivitate de 300–2000 Ci/mol. și sunt net superiori peroxidazei și feritinei utilizate în tehnicile convenționale de marcare.

Tehnologia hibridomului este un model experimental care poate fi extins și la alte categorii de celule care sintetizează substanțe utile (interferon, insulină).

Aplicații practice ale anticorpilor monoclonali

AMC sunt instrumente de cercetare de mare funcție și precizie, în special în studiul unor molecule care se găsesc în cantități foarte mici. De exemplu, în cazul proteinelor membranare, AMC permit evidențierea lor în structuri inaccesibile studiului cu metodele clasice, datorită specificității lor stricte de legare față de un epitop al moleculei proteice. AMC s-au dovedit a fi markeri eficienți pentru identificarea diferitelor subpopulații celulare.

AMC au multiple utilizări în *medicină*. Metoda clasică de obținere a imunoserurilor a avut adeseori inconvenientul major al lipsei reproductibilității

rezultatelor. AMC sunt însă, tipuri moleculare definite și se folosesc ca reactivi imunologici de mare specificitate în diagnosticul rabiei pe secțiunile de țesut nervos al animalelor infectate, în diagnosticul hepatitei B, prin determinarea antigenului HBs în ser, al maladiilor venerice, al sarcinii, al infarctului miocardic, prin metoda radio-imuno-dozării.

AMC se folosesc în *farmacologie* în scop terapeutic și profilactic:

- în scopul imunizării pasive sau al terapiei virozelor și bacteriozelor;
- utilizarea AMC față de antigenele CMH ale grefei, ca imunosupresori, în cazul transplantului de organe;

- cuplarea AMC cu substanțe toxice (imunotoxine), în scopul orientării moleculelor toxice (toxina difterică, de ricin sau veninul de cobra) spre celulele bolnave din organism (în special AMC față de antigenele tumorale).

În *imunocitochimie*, AMC se folosesc pentru identificarea moleculelor neurotransmițătoare, a receptorilor lor, a enzimelor de biosinteză. S-au obținut AMC față de receptorul de acetilcolină, dar dificultățile sunt mari deoarece neurotransmițătorii sunt antigene slabe.

AMC se folosesc în scopul *purificării proteinelor*, sub forma coloanelor imunoabsorbante. AMC sunt imobilizați pe suporturi în coloane solide, prin care este trecut amestecul de proteine. În colonă sunt reținute moleculele care se leagă specific de AMC. Astfel se purifică proteinele care se găsesc în concentrații mici (interferonul), dar și celelalte proteine serice. Interferonul produs de o tumoră de hibridoma este purificat de circa 5000 de ori printr-o singură trecere pe coloană.

C a p i t o l u l I I I

ANTIGENELE COMPLEXULUI MAJOR DE HISTOCOMPATIBILITATE (CMH)

Existența antigenelor de histocompatibilitate a fost dedusă din faptul că greșele de piele sau de organe nu sunt viabile în organismul receptor. După 7–10 zile, țesutul transplantat se inflamăază și cărând greșea este respinsă. Respingerea este de natură imună: sistemul imunitar al receptorului de greșă recunoaște ca nonsell, anumite molecule ale suprafeței celulelor greșei și se activează. Moleculele recunoscute ca nonsell sunt *denumite antigene de histocompatibilitate*. Ele conferă individualitate biochimică țesuturilor fiecărui individ.

Antigenele de histocompatibilitate se definesc ca molecule ale suprafeței celulare și care, datorită diferențelor biochimice individuale sunt recunoscute de sistemul imunitar al receptorului de greșă. Diversitatea biochimică de nivel individual a acestor molecule stă la baza unicității biochimice a fiecărui individ uman și este determinată de o diversitate genetică corespunzătoare.

Antigenele CMH se numesc și antigene de *transplantare*, deoarece se comportă ca antigene majore în organismul receptor de greșă.

Antigenele CMH diferă în privința capacității lor de a stimula răspunsul imun de respingere a greșei: sunt antigene *tari* și *slabe*.

Antigenele tari reprezintă principala barieră în calea transplantului de țesuturi și organe. La șoarece, ele aparțin sistemului H-2. Greșele de țesuturi și organe între organisme care diferă prin antigenele H-2 pe celulele lor sunt invariabil respinse în 10–14 zile. *Antigenele slabe* (ușoare) sunt codificate de sistemul *minor de histocompatibilitate* și determină respingerea lentă a greșei de piele, în circa 200 de zile.

La om, corespondentul sistemului antigenic H-2 de la șoarece este complexul antigenic al sistemului *HLA* (*human leucocyte antigen*). Denumirea derivă din

faptul că moleculele sistemului HLA au fost detectate inițial (J. Dausset, 1954) pe suprafața leucocitelor.

Antigenele complexelor H-2 și HLA au multe variante genetice. De aceea, natura lor se poate studia numai în populații genetic pure (înbred) de șoareci, obținute prin împerecheri multiple, succesive, frate-soră.

Antigenele de transplantare se identifică și se clasifică după capacitatea lor de a se lega specific cu anticorpii care se sintetizează după ce o suspensie celulară a unui organism donor este injectată la un organism receptor din aceeași specie, dar genetic diferit. Unele dintre moleculele celulelor injectate sunt identice cu acelea ale receptorului, altele sunt diferite. Organismul receptor produce anticorpi față de moleculele diferite. Anticorpii formați definesc specificitățile antigenice ale celulelor injectate. Fiecare organism are o specificitate antigenică unică.

Specificitatea antigenică a unui organism dat poate reflecta prezența unei molecule antigenice pe celulele sale (ca donor de grefă), care nu există pe celulele receptorului sau poate reflecta diferențe structurale fine de histocompatibilitate antigenică ale unei molecule, prezentă atât la donor cât și la receptor, în variante genetice diferite.

Antigenele de histocompatibilitate sunt codificate de mai multe gene, care alcătuiesc împreună, *complexul major de histocompatibilitate (CMH)*.

Calificativul „*complex*” este justificat de numărul mare de gene componente, iar cel de „*major*” semnifică importanța deosebită a moleculelor codificate de aceste gene în realizarea unor funcții imunitare importante:

- respingerea rapidă a grefelor de țesuturi și organe;
- reacția limfocitară mixtă (RLM);
- reacția grefă contra gazdă.

Genele CMH participă la elaborarea răspunsului imun normal. În raport cu tipul de proteine pe care le codifică, genele aparțin clasei I-a și a II-a.

Genele CMH la șoarece care codifică complexul antigenic H-2 sunt localizate pe cromosomul 17, într-un fragment de 2000–4000 kb perechi, suficient de mare pentru a codifica circa 200 proteine de dimensiuni medii. În acest complex cartează 4 tipuri de gene descoperite independent:

- primul grup de gene (descoperit în anii '40) codifică *antigenele tari* de transplantare, care induc respingerea rapidă a grefelor de piele și organe între indivizii neidentici genetic. Acestea sunt genele CMH clasa I, care codifică moleculele antigenice clasa I;
- al II-lea grup, denumite *genele răspunsului imun (IR)* codifică sinteza unor molecule care condiționează intensitatea răspunsului imun al

organismului, slab sau puternic, față de un antigen. Genele IR codifică proteinele clasei a II-a ale CMH, denumite încă și molecule *Ia* (I asociat).

Moleculele CMH clasa I și a II-a au rol esențial în procesele de *recunoaștere specifică a antigenului*. Pentru a induce un răspuns imun, antigenul trebuie să interacționeze cu proteinele CMH clasa I sau a II-a. Cele care nu interacționează cu aceste molecule nu induc un răspuns imun.

– al III-lea set de gene care cartează la locusul CMH codifică sinteza unor componente ale sistemului complement;

– al IV-lea grup sunt genele *Tla* (*Thymus leukemia antigen*). Ele codifică proteine antigenice de suprafață ale limfocitelor. Aceste molecule sunt similare ca structură, cu moleculele CMH clasa I și de aceea genele *Tla* sunt atribuite clasei I.

Moleculele CMH clasa I sunt codificate de gene situate la extremitățile complexului genic H-2, notate *K* și *D*. Cele două gene prezintă numeroase variante alele (peste 100). Fiecare variantă codifică proteine distincte.

La om, genele CMH codifică antigenele HLA și sunt localizate pe cromosomul 6. Anticorpii anti-HLA se obțin mai greu prin injectarea suspensiei celulare umane la animale, dar se găsesc în serul femeilor multipare, ca rezultat al stimulărilor antigenice HLA paterne, exprimate pe celulele fătului, absente pe celulele organismului matern. Acești anticorpi aparțin clasei IgG și se formează prin stimularea antigenică produsă de leucocitele fătului, care străbat bariera placentară și trec în circulația maternă. Anticorpii persistă în circulație perioade lungi de timp.

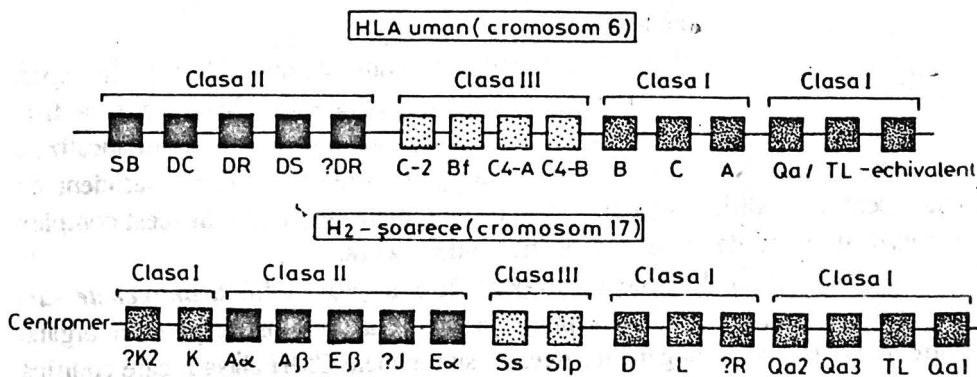


Fig. 23. Reprezentarea schematică a complexului major de histocompatibilitate HLA-uman și H-2 la șoarece, cu indicarea topografiei genelor din clasele I, II, III.

O altă sursă de ser imun anti-HLA sunt pacienții politransfuzai, expuși astfel antigenelor HLA de pe suprafața leucocitelor donatorilor de sânge. Antiserurile HLA se pot prepara prin imunizarea voluntarilor.

Antigenele HLA la om, sunt codificate de 3 gene ale CMH: HLA-A, HLA-B, HLA-C. Ele sunt omologe genelor H-2D și H-2K de la șoarece, aparținând clasei I.

Gena HLA-D (comparabilă cu regiunea I de la șoarece) aparține clasei a II-a.

C4, C2, Bf sunt genele clasei a III-a a CMH.

Structura moleculară a antigenelor CMH clasa I

Antigenele codificate de genele CMH clasa I sunt glicoproteine de membrană, a căror regiune C-terminală se găsește în citoplasmă, iar cea N-terminală este expusă extracelular.

O moleculă CMH clasa I este alcătuită dintr-un lanț H (heavy) polipeptidic (45 kD) glicozilat, în asociație strânsă necovalentă cu β_2 -microglobulina (12 kD), un polipeptid care se găsește și în ser. Catena H, alcătuită din 339 aminoacizi prezintă următoarele 5 domenii (regiuni); distribuite astfel:

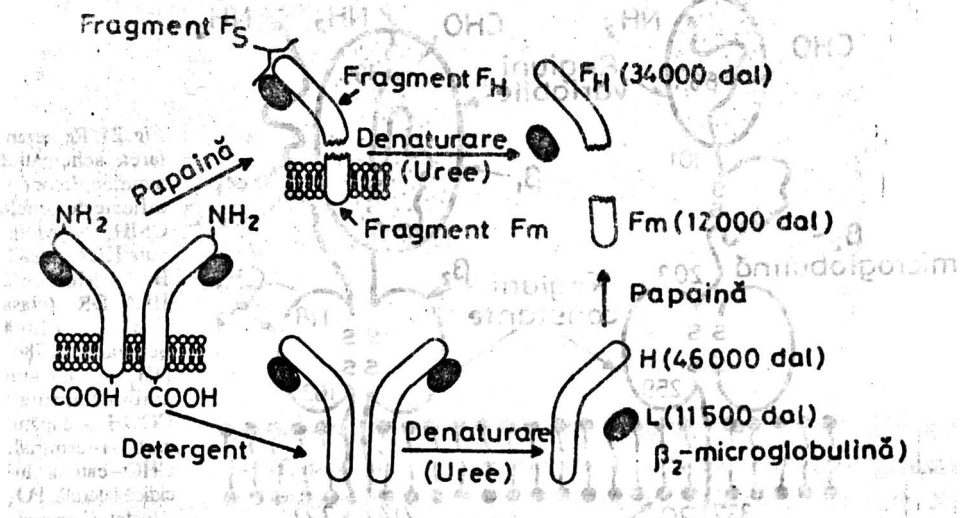


Fig. 24. Structura moleculelor CMH clasa I (K, D la șoarece sau HLA-A, B, C la om), determinată prin solubilizare cu detergenți, clivare enzimatică cu papaină și denaturare cu uree (după Gotze și Burger, 1986).

– 3 domenii *extracelulare* în regiunea N-terminală, notate cu α_1 , α_2 , α_3 , fiecare cu câte 90 aminoacizi. Sub acțiunea papainei pot fi scindate de restul moleculei. Domeniile α_2 și α_3 prezintă legături S-S intracatenare și formează bucle de 63 și respectiv 86 aminoacizi;

– domeniul *transmembrantar* conține 25 de resturi de aminoacizi hidrofobi, care traversează membrana. Imediat deasupra acestei zone se găsesc 5 aminoacizi bazici (arg, leu), tipici pentru proteinele legate de membrană, cu rolul de a ancora lanțul polipeptidic în membrană;

– domeniul *hidrofil* citoplasmatic (30 aminoacizi la om, 40 la șoarece) conține în special serină, unele resturi fiind fosforilate. Grupările fosforice sunt implicate în transmiterea semnalului de la domeniile extracelulare, la mediatorii citoplasmatici. Acest domeniu conține resturi de cisteină, implicate în legarea (prin punți S-S), de alte catene H sau de proteine citoplasmatiche.

Componenta glucidică este alcătuită din două grupări, fiecare fiind formată din 12–15 resturi de zahăr, atașate la α_1 și α_2 . Sunt oligozaharide care conțin manoză, de care se leagă lanțuri laterale de glucozamină și acid sialic.

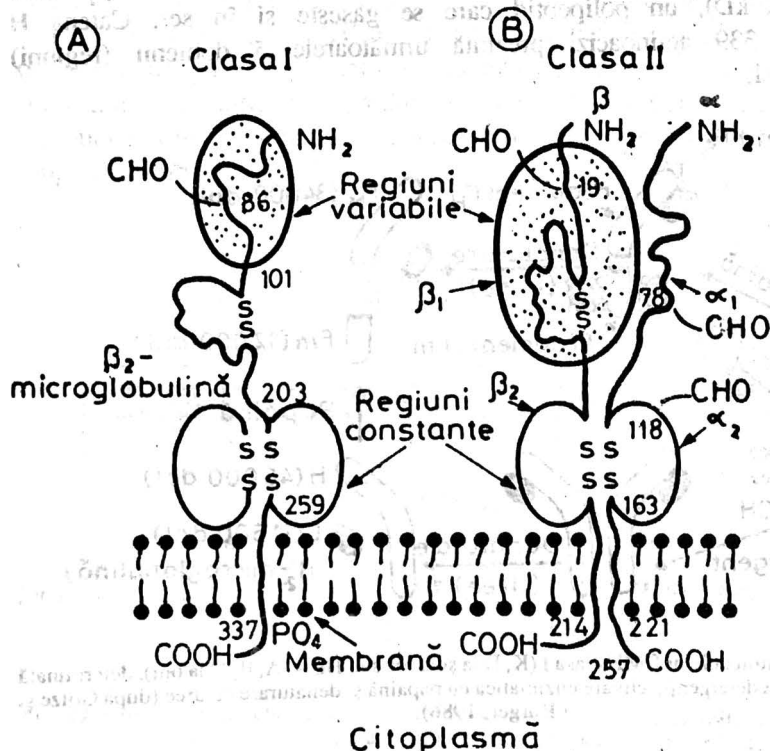
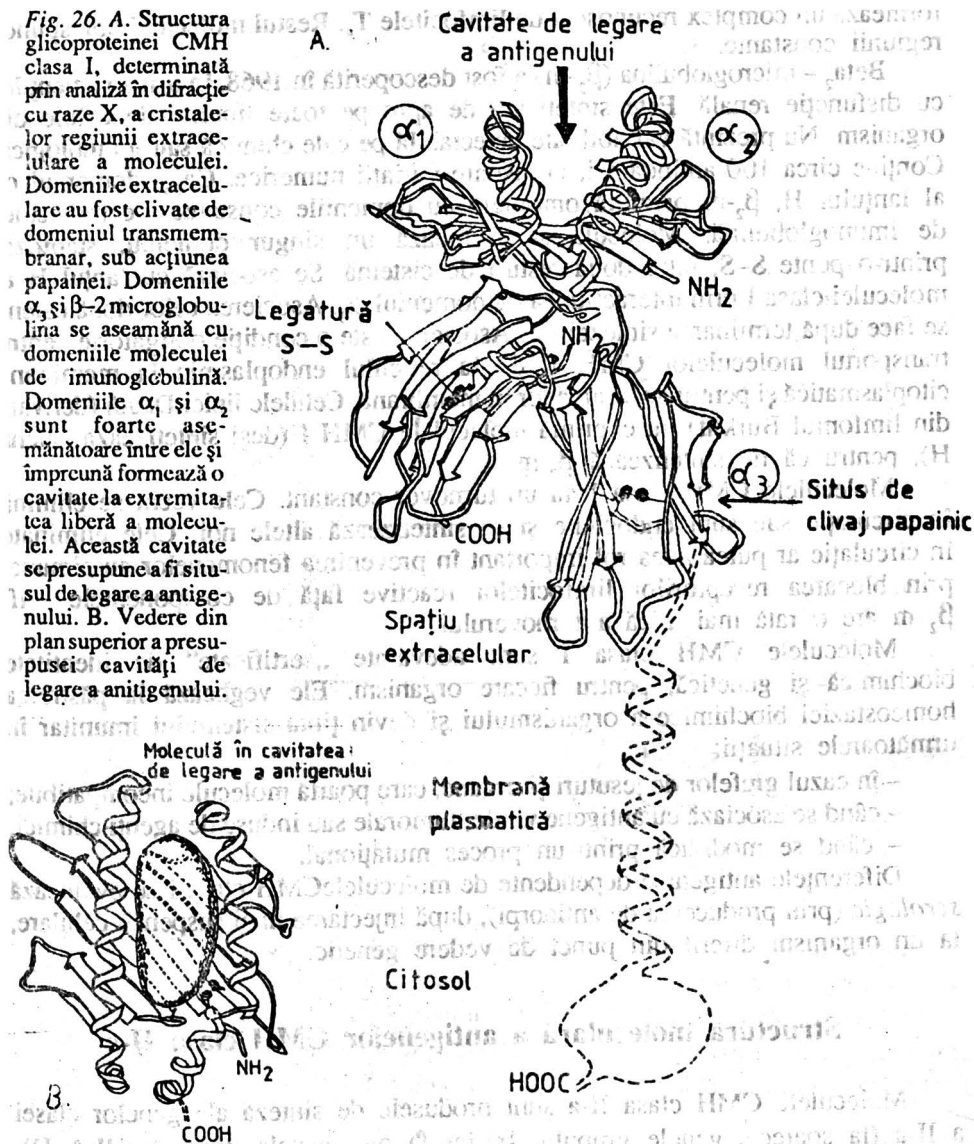


Fig. 25. Reprezentarea schematică a moleculelor codificate de genele CMH. A. Molecula HLA clasă I. B. Moleculă HLA-DR (clasa II-a) (după Schwartz, 1984) NH₂ – capătul amino-terminal; COOH – capătul carboxi-terminal; CHO – catenă glucidică laterală, PO₄ – fosfat. Numerele indică poziția resturilor de aminoacizi cu anumite semnificații funcționale.

Fig. 26. A. Structura glicoproteinei CMH clasa I, determinată prin analiză în difracție cu raze X, a cristalelor regiunii extracelulare a moleculei. Domeniile extracelulare au fost clivate de domeniul transmembranar, sub acțiunea papainii. Domeniile α_1 și β -2-microglobulina se aseamănă cu domeniile moleculei de imunoglobulină. Domeniile α_1 și α_2 sunt foarte asemănătoare între ele și împreună formează o cavitate la extremitatea liberă a moleculei. Această cavitate se presupune a fi situsul de legare a antigenului. B. Vedere din plan superior a presupusei cavități de legare a antigenului.



Catena H are o regiune variabilă la capătul N-terminal, cu două subzone hipervariabile, care diferă prin mai mult de 60% din aminoacizi, de la un organism la altul, localizate în domeniile α_1 și α_2 . Studiile prin difracție cu raze X, ale domeniilor extracelulare, cristalizate după clivarea cu papaină arată că domeniile α_1 și α_2 sunt foarte asemănătoare și împreună formează o cavitate, presupusă a fi situsul de legare al antigenului. Acest situs, împreună cu antigenul

formează un complex recunoscut de limfocitele T_h . Restul moleculei corespunde regiunii constante.

Beta₂ – microglobulina (β_2 -m) a fost descoperită în 1968, în urina pacienților cu disfuncție renală. Este sintetizată de aproape toate tipurile de celule din organism. Nu prezintă variabilitate detectabilă pe cale chimică sau imunologică. Conține circa 100 aminoacizi, cu ușoare variații numerice. Ca și domeniul α_3 al lanțului H, β_2 -m prezintă omologie cu domeniile constante ale moleculei de imunoglobulină. Molecula sa formează un singur domeniu, stabilizat printr-o punte S-S, între două resturi de cisteină. Se asociază cu lanțul H al moleculei clasa I prin interacțiunea cu domeniul α_3 . Asocierea celor două catene se face după terminarea sintezei lor. Asocierea este o condiție obligatorie pentru transportul moleculelor CMH I, de la reticulul endoplasmic la membrana citoplasmatică și pentru ancorarea lor în membrană. Celulele liniei Daudi (derivată din limfomul Burkitt) nu exprimă moleculele CMH I (deși sintetizează catena H), pentru că nu sintetizează β_2 -m.

Moleculele CMH clasa I au un turnover constant. Cele vechi se elimină în circulație sau sunt endocitate și se sintetizează altele noi. Cele eliminate în circulație ar putea avea rol important în prevenirea fenomenelor autoimune, prin blocarea receptorilor limfocitelor reactive față de componentele self. β_2 -m are o rată mai mică a turnoverului.

Moleculele CMH clasa I sunt adevărate „certificate” de identitate biochimică și genetică, pentru fiecare organism. Ele veghează la păstrarea homeostaziei biochimice a organismului și devin ținta sistemului imunitar în următoarele situații:

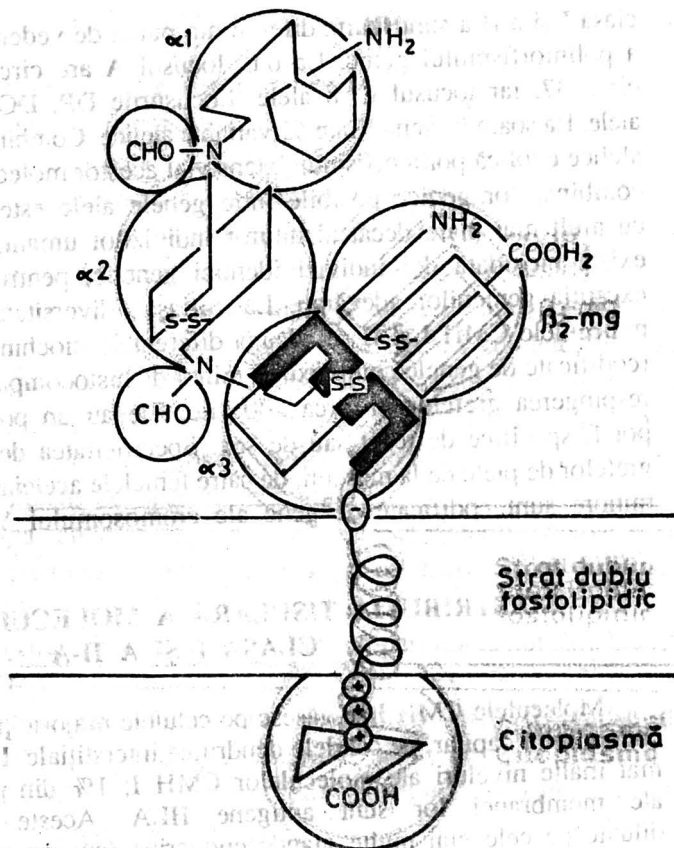
- în cazul grefelor de țesuturi și organe, care poartă molecule incompatibile;
- când se asociază cu antigene virale, tumorale sau induse de agenți chimici;
- când se modifică printr-un proces mutațional.

Diferențele antigenice dependente de moleculele CMH clasa I se evaluează *serologic* (prin producerea de anticorpi), după injectarea unei suspensii celulare, la un organism diferit din punct de vedere genetic.

Structura moleculară a antigenelor CMH clasa II-a

Moleculele CMH clasa II-a sunt produsele de sinteză ale genelor clasei a II-a (la șoarece, genele grupului Ir, iar la om, genele grupului HLA-D). Aceste gene codifică glicoproteine heterodimere de membrană, formate din două lanțuri diferite, notate α și β . Prin solubilizare cu detergent, aceste molecule se eliberează întregi. Lanțul α are 30–34 kD, iar lanțul β – 26–29 kD. Fiecare lanț este format din 4 domenii: două extracelulare, cu circa 90 aminoacizi) fiecare, notate α_1 , α_2 , respectiv β_1 , β_2 , un domeniu transmembranar (circa 30 aminoacizi) și un domeniu citoplasmatic (10–15 aminoacizi).

Fig. 27. Reprezentarea schematică a modului de asociere a moleculei CMH clasa I, cu β -2 microglobulina. Regiunile negre din domeniul α_2 indică poziția aminoacizilor 199-222 și 254-273, care înconjură cele două resturi de cisteină ale β -2 microglobulinei, implicate în formarea punții S-S (după Hood și colab., 1984).



Domeniile α_2 și β_2 prezintă omologie cu domeniile moleculei de imunoglobulină. Domeniile α_2 , β_1 și β_2 sunt stabilizate prin legături S-S.

Moleculele CMH clasa II-a sunt glicozilate în domeniile α_1 , α_2 și β_1 . Gruparea glucidică conține manoză, galactoză, fucoză, glucozamină. Diferențele greutatei moleculare a celor două catene se datorează conținutului diferit de carbohidrați.

Diferențele antigenice dintre doi indivizi, determinate de moleculele CMH clasa II-a se evaluează prin capacitatea lor de a iniția reacția limfocitară mixtă (RLM). Limfocitele de la indivizi ce poartă alele diferite la locusul HLA-D sunt cocultivate *in vitro*. Condiția reacției limfocitare *in vitro* este diferența unei singure alele la locusul HLA-D. Indivizii care au molecule CMH clasa I identice, nu reacționează serologic, dar dacă celulele lor diferă prin alele ale locusului HLA-D, produc în răspuns intens în RLM. Moleculele CMH

clasa I și a II-a sunt foarte diferite din punct de vedere biochimic, ca o expresie a polimorfismului genic. La om, locusul A are circa 15 alele, locusul B are circa 37, iar locusul C, 8 alele. Locusurile DP, DQ, DR au fiecare circa 12 alele. La șoarece, gena K are 55 variante alelice. Combinarea aleatorie a variantelor alelice explică polimorfismul extensiv al acestor molecule de suprafață. Numărul combinațiilor genice posibile între genele alele este apreciat la 10^{90} , număr, cu mult mai mare decât al tuturor indivizilor umani. Nu au existat și nu vor exista niciodată doi indivizi identici genetic, pentru toate alelele CMH, cu excepția gemenilor adevărați. La uriașa diversitate antigenică conferită de moleculele CMH I și II se adaugă diferențele biochimice ale antigenelor slabe (codificate de genele complexului minor de histocompatibilitate), care determină respingerea grefelor în circa 200 zile. Ele au un polimorfism mai limitat și pot fi specifice de țesut sau de sex. Specificitatea de sex explică respingerea grefelor de piele de la masculi, de către femelele aceleiași linii înbred. Antigenele minore sunt codificate de gene ale cromosomului Y.

DISTRIBUȚIA TISULARĂ A MOLECULELOR CMH CLASA I ȘI A II-A

Moleculele CMH I se găsesc pe celulele majorității țesuturilor, pe celulele endoteliului capilar, pe celulele dendritice interstițiale. Leucocitele exprimă cele mai înalte niveluri ale moleculelor CMH I: 1% din moleculele de suprafață ale membranei lor sunt antigene HLA. Aceste molecule sunt foarte diluate pe cele mai multe glande endocrine (cu excepția glandelor adrenale). Lipsesc pe eritrocite, pe celulele endoteliului cornean, pe componenta exocrină a pancreasului, pe celulele acinare ale glandelor parotide, pe neuronii SNC.

Moleculele CMH II sunt exprimate predominant pe limfocitele B și pe toate celulele care prelucrează și expun antigenul pe suprafața lor: celulele endoteliale ale capilarelor sanguine și limfatice, celulele Kupffer, celulele dendritice, eozinofile, microglia din SNC, celulele reticuloendoteliale ale stomei timice. Capilarele creierului uman și placenta nu exprimă moleculele CMH II, ambele fiind organe privilegiate imunologic.

Intensitatea exprimării moleculelor CMH II este variabilă, fiind controlată de diferiți factori: interferonul γ , IL-2 și alte produse de sinteză a celulelor T amplifică nivelul de exprimare a moleculelor CMH II, iar PGE_2 , glucocorticoizii, alfafetoproteina, lipopolizaharidele bacteriilor Gram negative diminuează gradul exprimării acestor molecule. Limfocitele B și celulele tumorale eliberează molecule CMH II.

Privită în context evolutiv, existența moleculelor CMH nu semnifică respingerea grefelor, deoarece acestea nu se realizează în mod natural, ci au fost introduse în practica medicală a ultimilor 25 de ani. Prezența lor ar putea fi atribuită, în sens evolutiv, necesității organismului de a elimina rapid celulele care prezintă molecule străine pe suprafața lor: cele infectate de un virus și cele transformate malign. În aceste situații, citoliza trebuie să fie rapidă, înainte ca virusul să fie eliberat și înainte ca celula malignă să se dividă și să formeze o microtumoră. În fapt așa se întâmplă: celulele Tc lizează celulele infectate cu virus, înainte ca acesta să fie eliberat. În cazul virusurilor care se replică fără să lizeze celula, limfocitele Tc distrug celula infectată și stopează replicarea virală. Probele de transfer *in vivo* a imunității dobândite denotă că citoliza este un mecanism foarte eficient de apărare antivirală.

Pentru ca intervenția celulelor Tc să fie eficientă este necesar ca moleculele CMH să fie prezente pe oricare celulă ce poate fi infectată de un virus sau poate să fie transformată malign. Pe de altă parte, moleculele CMH asociate cu moleculele nonself (virale sau tumorale) trebuie să permită acțiunea eficientă și rapidă a celulelor Tc.

Celulele infectate cu bacterii nu pot fi eliminate prin fenomene de citotoxicitate. Rezultatul ar fi eliminarea bacteriilor și diseminarea infecției în alte celule. Moleculele CMH II au rol de receptori ai semnalelor care activează capacitatea funcțională a fagocitelor.

C a p i t o l u l I V

SISTEMUL IMUNITAR (SISTEMUL IMUNOCITAR, SAU LIMFOID)

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

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

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

- fenomenele de *restricție* mediate de prezența unor sisteme enzimatic specifice (enzime de restricție) care recunosc moleculele străine de ADN, le secționează la nivelul unor situsuri specifice, rezultând fragmente mai mici sensibile la acțiunea exo- și endonucleazelor;

- fenomenele de *reparație* genetică dependente de activitatea unor sisteme enzimatic care recunosc modificările ADN induse de mutații sau de lipsa de fidelitate a mecanismelor de replicare, transcriere și traducere genetică, corectându-le fie complet (sistemele error free) sau minimalizând erorile în cazul sistemelor reparatorii predispușe la erori (error prone systems).

La plantele superioare, mijloacele de recunoaștere specifică lipsesc în aparență, dar există o gamă largă de modalități de apărare:

- continuitatea și integritatea țesuturilor epidermice, acoperite sau impregnate cu substanțe impermeabile pentru virusuri și microorganisme;

- rezistența fiziologică conferită de conținutul înalt de zaharuri reducătoare, prezența taninurilor, a diferiților acizi organici, a pseudoanticorpilor în sucurile vegetale cu activitate hemaglutinantă;

La protozoare, procesele de recunoaștere asigură selecția hranei, identificarea partenerilor pentru conjugare, iar la organismele parazite, procesele de recunoaștere mediază recunoașterea gazdei.

La organismele superioare, coexistența, în cursul evoluției, cu microorganismele a determinat apariția unor mecanisme complicate de rezistență și imunitate. Coexistența cu microorganismele are un rol hotărâtor în funcționalitatea sistemului imunitar. Dovada o constituie faptul că la animalele axenice (germ free) numărul limfocitelor B și titrul anticorpilor serici naturali sunt de 5–10 ori mai mici decât la organismele convenționale. Evoluția a generat tipuri celulare specializate, tot mai eficiente funcțional care neutralizează, sechestrează, omoară sau îndepărtează agenții infecțioși. Dincolo de un anumit grad de complexitate, reacțiile de apărare implică participarea unor *factori humoral*i (anticorpi și factori nespecfici-complementul, substanțe bactericide – din umori) și *celular*i (fagocite și imunocite).

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

În concepția restrictivă a lui Jerne, sistemul imunitar ar fi reprezentat în exclusivitate de *limfocite*, iar într-o accepțiune mai largă, pe lângă limfocite, în alcătuirea sistemului imunitar intră o serie de celule accesorii care au un rol esențial în declanșarea răspunsului imun: macrofagele și o serie de celule fixate (celulele Langerhans din piele, celulele dendritice, interdigitate).

Jerne apreciază numărul limfocitelor, la adultul normal la circa 2×10^{12} , iar al moleculelor de imunoglobuline, la 10^{20} . Împreună, aceste componente formează *organul imunitar difuz* cu o greutate de circa 910 g, a cărui existență este adesea ignorată datorită dispersării sale în tot organismul. Celulele și moleculele sistemului imunitar sunt prezente în toate țesuturile, dar în unele organe (splina, ganglionii limfatici, plăcile Peyer, amigdale, timus), componentele sale celulare sunt mai dense.

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

- existența unui compartiment al rezistenței *nespecifice* și *neadaptative* (înăscută) și a unui compartiment cu acțiune *specifică* și *adaptativă* (sistemul imunitar);

- prezența a două tipuri 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 humoral;

- existența organelor *limfoide centrale* (primare) și a celor *periferice* (secundare);

- existența unui *răspuns imun primar* și a unui *răspuns imun secundar*;
- dualitatea structurală (două perechi de lanțuri polipeptidice) și *funcțională* (molecula de anticorp este bivalentă) a moleculelor de imunoglobulină.
- *comportamentul dublu* al moleculelor de anticorpi: recunosc epitopii corespunzători și la rândul lor sunt recunoscute de molecule receptori.

Sistemul imunitar este *esențial* pentru supraviețuirea organismului uman și animal, datorită agresiunii permanente a virusurilor și microorganismelor. Omul adult poartă pe suprafața mucoaselor și a pielii, un număr uriaș (10^{14}) de celule bacteriene, mai multe decât propriile celule (10^{13}).

Numărul celulelor sistemului imunitar (cu un ordin de mărime superior neuronilor) și al moleculelor sale nu reflectă fidel potențialul de apărare al organismului, deoarece în cursul răspunsului imun are loc *proliferarea și amplificarea* populației de limfocite, precum și a potențialului lor de biosinteză. La aceasta se adaugă o rată înaltă de *reânnoire și refacere* a rezervelor sale celulare. La om se produc zilnic 10 miliarde de limfocite care 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 străine pentru a le elimina.

LIMFOCITELE

Sistemul imunitar este unul dintre cele mai complexe sisteme ale organismului. Complexitatea sa derivă din *structura de rețea* complicată de comunicații intercelulare, din *ubiquitatea* sa în organism și din *efectele* multiple pe care le determină un număr mic de categorii celulare.

Sistemul imunitar este reprezentat de țesuturi derivate din mezoderm, a căror principală componentă celulară este *limfocitul*. De aici derivă denumirea de *țesut limfoid*. În ultimul timp se utilizează denumirea de „*limfon*”, care semnifică totalitatea organelor limfoide – primare și secundare precum și celulele componente corespunzătoare, care au funcția de a recunoaște antigenul și de a păstra memoria lui la nivel celular și molecular.

Sistemul limfoid cuprinde celulele, care în cursul elaborării răspunsului imun reacționează *specific* cu antigenul și de aceea se mai numesc *imunocite*. O denumire echivalentă pentru *sistemul limfoid* este aceea de *sistem imunitar*. Toate celulele acestui sistem poartă pe suprafața lor, molecule cu rol de *receptor*, capabile să recunoască specific, determinanții antigenici străini. Sistemul imunitar funcționează pe baza interacțiunii specifice dintre semnal (antigen) și receptorul limfocitar.

În concepția modernă, limfocitul este celula cheie a sistemului imunitar. Limfocitul nu este „celulă cap de serie” (așa cum considerau vechii histologi), ci prezintă o extraordinară capacitate de reactivitate și diferențiere.

Numărul limfocitelor. Copiii au un număr mai mare de limfocite și de aceea vârsta trebuie considerată ca un parametru de variație, în evaluarea numerică a acestor celule. Ele reprezintă 25–33% dintre leucocite, adică circa 2100 celule/ml sânge la adult.

Până în anii '50, limfocitele erau distinse numai după dimensiuni: mari, mijlocii și mici. Astăzi, imunologia are la bază conceptul unei *heterogenități funcționale nelimitate* a limfocitelor, care derivă din diversitatea receptorilor existenți pe suprafața lor.

Populația de limfocite care are receptori identici și recunoaște un singur epitop (sau câțiva înrudiți) formează o *clonă*. Ele 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 dintre receptori limfocitari și epitopii antigenici asigură posibilitatea elaborării unui *răspuns imun specific*, după contactul limfocitelor cu oricare dintre epitopi.

Cele mai multe limfocite circulante au dimensiuni mici: 7–10 μm diametru.

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

- limfocite T, diferențiate și maturate în timus;
- limfocite B, diferențiate și maturate în bursa lui Fabricius la păsări și în echivalenții ei la mamifere.

În mod obișnuit, limfocitele T reprezintă 65–80 % dintre limfocitele circulante. Valorile normale în sânge, pentru limfocitele T sunt 1620–4320/ml, până la 18 luni de viață și 590–3090/ml, după 18 luni.

Valori totale sub 1500 limfocite/ml caracterizează starea de *limfocitopenie* și cel mai adesea semnifică un deficit numeric al limfocitelor T.

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

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

- *incompetente* (cele care nu interacționează cu antigenul);
- *competente* (cele care recunosc și interacționează cu antigenul).

Starea de *competență* este condiționată de prezența receptorilor prin care antigenele sunt recunoscute. Pe suprafața unui receptor pot fi până la 100.000 molecule receptoare identice care așteaptă întâlnirea cu substanțele nonsell corespunzătoare. După ce limfocitul și-a dobândit competența în unul din organele limfoide primare, poate să rămână în repaus, fără contact cu antigenul, dacă organismul nu a recepționat semnalul antigenic corespunzător. Aceste limfocite sunt *neangajate* (neinformate). Cele care au venit în contact cu antigenul sunt limfocite *angajate*. Ele constituie substratul material al *memoriei imune* și ori de câte ori se vor reîntâlni cu antigenul, vor produce un răspuns imun amplificat și rapid.

După durata vieții, limfocitele sunt:

- cu viață scurtă (efectoare ale răspunsului imun);
- cu viață lungă (de memorie). Ele recirculă în organism perioade îndelungate (chiar tot restul vieții). La om, unele limfocite ar supraviețui circa 10 ani fără să se dividă.

În raport cu funcția pe care o îndeplinesc, limfocitele sunt:

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

LIMFOCITELE T

Limfocitele T sunt celule care îndeplinesc funcții complexe, atât *efectoare* ale răspunsului imun *mediat celular* (RIMC), cât și *reglatoare*, prin intermediul unor factori humoral denumiți limfokine. Limfocitele T realizează următoarele categorii de funcții:

- liza celulelor care exprimă molecule nonsell pe suprafața lor;
- reglarea răspunsului imun;
- sunt mediatore ale reacțiilor de hipersensibilitate întârziată.

Aceste funcții sunt rezultatul activării unor subpopulații distincte de limfocite T:

— limfocite T_C sau T_{CL} (citotoxice sau citolitice) care exprimă pe suprafața lor markerul T_8 (CD_8);

— limfocite T_H (T helper, to help = a ajuta), care au pe suprafața lor markerul T_4 (CD_4);

— limfocite T_s (supressor), purtătoare ale markerului T_6 ;

— limfocite T_D sau T_{DH} (delayed hypersensitivity) exprimă markerul T_6 .

Limfocitele T_4 (T helper) reprezintă 65% din limfocitele T ale sângelui uman.

Prin intermediul limfokinelor pe care le secretă, limfocitele T helper realizează următoarele funcții:

- stimulează diferențierea limfocitelor B spre plasmocit (T_{H-B});
- stimulează funcția litică limfocitelor Tc asupra celulelor țintă T_{HC} ;
- stimulează acțiunea litică a limfocitelor NK;
- stimulează activitatea macrofagelor.

Prin aceste efecte, limfocitele T helper sunt amplificatoare ale răspunsului imun.

Pe baza limfokinelor pe care le secretă *in vitro*, prin cultivare îndelungată, limfocitele T helper (T_H) pot fi împărțite în două seturi:

- Setul de limfocite T_{H-2} secretă IL-3, IL-4 și IL-5. Efectul lor principal constă în stimularea producerii de IgA. Sub acțiunea IL-4, producția de IgM a unei celule B este comutată la IgE. Comutarea la sinteza altui izotip reflectă acțiunea specifică a inducției recombinației asupra secvențelor VDJ, la nivelul locusului codificator la lanțului H. Aceste limfocite favorizează proliferarea și maturarea măstocitelor (prin IL-3 și IL-4 și a cozinofililor (prin IL-5). Aceasta sugerează că limfocitele T_{H-2} ar avea în esență rolul de a stimula răspunsul imun față de paraziți;

- Setul de limfocite T_{H-1} secretă IL-2 și interferon γ . Ele au rolul de a favoriza reacția inflamatorie asociată cu reacția de hipersensibilitate întârziată și de aceea se numesc și T_{int} . Prin interferonul γ , limfocitele T_{H-1} stimulează exprimarea, pe suprafața macrofagelor, a receptorilor pentru segmentul Fc al imunoglobulinelor, astfel încât este stimulată activitatea lor citolitică mediată de anticorpi (ADCC).

Limfocitele T_8 (CD_8) reprezintă 35% dintre limfocitele T circulante. Ele îndeplinesc următoarele funcții:

- au efect litic față de celulele infectate cu virusuri, malignizate sau străine, prin contact celular direct. Acestea sunt limfocite Tc;

- au rol esențial în modulara răspunsului imun mediat celular și humoral, menținând în limite fiziologice intensitatea reacțiilor imunitare. Ele sunt limfocite T_S ;

- sunt implicate în manifestarea reacțiilor de hipersensibilitate întârziată de tip tuberculinic, prin intermediul limfokinelor pe care le secretă, cu efecte locale asupra macrofagelor și limfocitelor din focar. Acestea sunt limfocite T_D ;

Limfocitele Tc umane sunt capabile să exercite efect letal asupra celulelor care exprimă antigene străine pe suprafața lor. Capacitatea citotoxică a limfocitelor Tc se testează, *in vitro*, prin eliberarea izotopului din celulele țintă, marcate cu Cr^{51} .

Limfocitele Tc omoară celulele țintă alogene, care exprimă molecule CMH diferite și au stârnit un interes deosebit, datorită rolului lor posibil în respingerea grevelor de țesuturi și organe.

Limfocitele Tc pot să inducă efecte letale asupra celulelor proprii, dacă acestea exprimă antigenul viral pe membrana citoplasmatică. Probabil, aceasta este funcția lor esențială, deoarece transplantarea de țesuturi este artificială.

Limfocitele Tc exprimă markerul CD_4 , cu excepția celor reactive față de moleculele CMH II alogene, care au markerul CD_4 .

În condiții naturale, limfocitele Tc sunt celule efectoare foarte importante în controlul infecțiilor virale. Acțiunea citotoxică a limfocitelor Tc este restrictivă în raport cu moleculele CMH clasa I.

Limfocitele *T supresoare* (Ts) au rolul de a diminua intensitatea răspunsului imun. Ele poartă pe suprafața lor markerul CD_4 , ca și limfocitele Tc. Se pare că își exercită rolul supresor asupra răspunsului imun, prin inhibarea activității limfocitelor T_H , dar au și efect supresor direct asupra limfocitelor T și B efectoare.

Limfocitele Ts au rol important în inducerea stării de toleranță față de antigenele exogene, ca și față de moleculele self. Deficiența funcțională a acestor limfocite crează predispoziții pentru maladiile autoimune.

Limfocitele Ts nu se pot distinge cu certitudine, prin markeri de suprafață, de limfocitele Tc. Probabil că reprezintă o populație distinctă funcțional de limfocitele Tc.

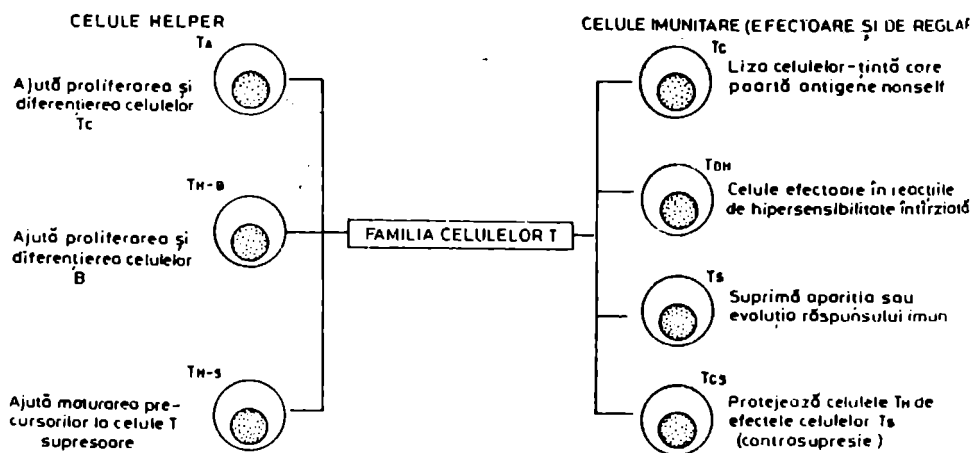


Fig. 28. Familia limfocitelor T (modificat, după Hood și colab., 1987).

Markerii de suprafață ai celulelor T umane s-au identificat cu dificultate datorită naturii outbred a populației. S-au caracterizat parțial markerii T1, T2, T3, T4, T5, T6, T8, T10, T11, T12 T25, T38 etc. AMC au constituit instrumentul esențial de lucru, dar utilizarea lor este limitată deoarece heteroanticorpii de șoarece anti-molecule umane nu detectează diferențele alelice ale moleculei-antigen studiate. Cel mai cunoscut este markerul T4 (CD4) deoarece funcționează ca receptor pentru HIV. Este un glicopeptid cu o regiune extracelulară formată din 4 domenii, un domeniu transmembrantar și unul citoplasmatic.

Celulele T recunosc antigenul numai dacă acesta este prezentat pe suprafața unei celule în strânsă asociație cu moleculele proprii celulei respective:

- celulele T8⁺ recunosc antigenele în asociație cu moleculele CMH I;
- celulele T4⁺ recunosc antigenele în asociație cu moleculele CMH II.

Recunoașterea antigenului este restrictivă, deoarece necesită identitatea moleculelor CMH pe celula care prezintă antigenul și pe celula care îl recunoaște.

LIMFOCITELE

Limfocitele B reprezintă cea de a II-a diviziune funcțională majoră a populației limfocitare. Împreună cu descendenții lor diferențiați (limfoblast, plasmocit), limfocitele B sintetizează anticorpi, efectorii răspunsului imun mediat humoral (RIMH).

Limfocitul B imunocompetent, în repaus, sintetizează cantități mici ale unui anumit tip de imunoglobuline, care rămân legate de membrana limfocitului ca molecule receptor, adevărate „antene” de detectare a antigenului specific. Sub aspectul specificității de legare a antigenului, în fiecare organism există milioane de clone de limfocite B, adică mici populații care recunosc și leagă același antigen, descendente din aceeași celulă mamă, care produc anticorpi cu aceeași configurație spațială a situsului de combinare. Markerii de suprafață ai limfocitelor B sunt CD₉, CD₁₉, CD₂₀, CD₂₁, CD₂₂, CD₂₃, CD₂₄ etc.

Celulele NK, K și LAK

Celulele NK (natural killer) formează o subpopulație de celule limfoide neaderente *in vitro* și nefagocitare. Nu au receptori de antigen caracteristici limfocitelor T și B (sunt celule „nule”). Din punct de vedere morfologic sunt limfocite granulare mari (*large granular lymphocytes = LGL*), având citoplasmă mai bogată decât celelalte limfocite, cu granulații azurofile. Celulele NK au pe suprafața lor unii markeri caracteristici limfocitelor (receptor pentru Fcγ, formează rozete E) și produc IL-2, dar și receptori ai seriei mieloide. Celulele

Celulele NK nu sunt dependente de timus în dezvoltarea lor. Se pare că se diferențiază dintr-un precursor comun cu al limfocitelor T. Ar putea fi celule *T* *premitice*. Sunt celule cu viață scurtă și reprezintă o linie importantă, primordială în evoluție, cu rol esențial în apărarea organismului: sunt active în respingerea grefelor și a celulelor modificate sub raport antigenic. Acțiunea lor definitorie este citotoxicitatea pentru un spectru larg de celule țintă, mai ales maligne. Celulele NK lizează fără restricție CMH, celulele tumorale sau pe cele infectate cu virusuri. Au activitate foarte înaltă la șoarecele nud sau timectomizat neonatal.

Celulele K (killer) sunt limfocite granulare mari, dar exprimă foarte net receptorul pentru Fc. Celulele K ar fi celule NK, monocite, promonocite sau o linie separată derivată din măduva oaselor. Unii autori nu fac distincție între celulele NK și K, deoarece ambele categorii au receptori pentru Fc. Acțiunea lor principală este citotoxicitatea mediată de anticorpi (ADCC) față de celulele modificate antigenic.

Celulele LAK (lymphokine activated killer = ucigașe activate de limfokine) sunt celule efectoare ale citotoxicității *in vitro*, activate de IL-2 sau de interferonul α . Limfocitele din sângele periferic, cultivate *in vitro* în prezența IL-2 și a antigenului tumoral devin intens citotoxice față de celulele tumorale omologe.

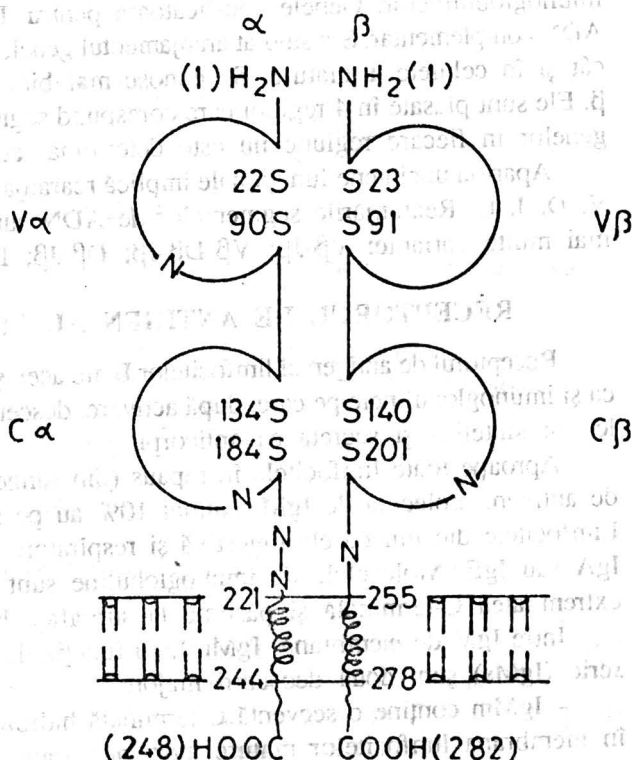
RECEPTORUL DE ANTIGEN AL CELULELOR T (RCT)

Deși moleculele de anticorpi au fost printre primele a căror structură a fost cunoscută, receptorul de antigen al celulelor T s-a identificat biochimic foarte greu, deoarece nu a existat un echivalent celular T al tumorilor de mielom. Proteina receptor de antigen a celulelor T s-a identificat recent după ce a fost posibilă cultivarea liniilor de hibridom de celule T și după producerea AMC față de moleculele de suprafață ale celulelor T. RCT are o largă variație biochimică, corespunzătoare specificității de legare a antigenelor.

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

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

Fig. 29. Reprezentare schematică a structurii receptorului de antigen al limfocitelor T, bazată pe date de biochimie și de clonare a ADNc (după John și Owen, 1985).



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

Fiecare lanț are 4 domenii: variabil ($V\alpha$, $V\beta$), constant ($C\alpha$, $C\beta$), transmembranar și intracitoplasmatic. Astfel construită, molecula RCT face parte din suprafamilia moleculelor de imunoglobuline. Se aseamănă cu lanțul L al imunoglobulinii, prin dimensiuni: domeniul variabil al fiecărui lanț are 110 aminoacizi, dar pentru că se ancorează în membrană, se aseamănă cu lanțul H.

Domeniile variabile (α și β) sunt extrem de variabile (asemenea regiunii V a imunoglobulinelor) și sunt cele care determină specificitatea de legare cu antigenul.

La om, RCT heterodimer este asociat cu molecula T3, o grupare de 3 peptide asociate necovalent. Probabil funcționează ca transductori de semnal de la Ti la citoplasmă, constituind un canal pentru trecerea ionilor de Ca^{2+} prin membrană.

Mecanismele genetice de generare a unei mari diversități a specificității de legare a Ti sunt similare cu acelea prezentate la generarea diversității

imunoglobulinelor. Genele codificatoare pentru Ti s-au studiat după clonarea ADN complementar. S-a studiat aranjamentul genelor atât în celulele T embrionare cât și în celulele T mature. Se cunosc mai bine genele care codifică catena β . Ele sunt plasate în 4 regiuni care corespund segmentelor V, D, J, C. Numărul genelor în fiecare regiune nu este determinat cu certitudine.

Apariția unei gene funcționale implică rearanjarea celor 4 segmente separate V, D, J, C. Rearanjările segmentelor de ADN sunt mai versatile și se fac în mai multe variante: $V\beta-J\beta$; $V\beta-D\beta-J\beta$; $D\beta-J\beta$; $D\beta-D\beta$.

RECEPTORUL DE ANTIGEN AL LIMFOCITELOR B

Receptorul de antigen al limfocitelor B are aceeași specificitate pentru antigen, ca și imunoglobulinele pe care, după activare, descendenții limfocitului respectiv le vor sintetiza și secreta ca anticorpi.

Aproape toate limfocitele în repaus (din sânge și țesuturi) au ca receptor de antigen, molecula de IgM. Numai 10% au pe suprafață molecula de IgG. Limfocitele din mucoasele digestivă și respiratorie au ca receptori de antigen IgA sau IgE. Moleculele de imunoglobuline sunt inclavate în membrană cu extremitatea C-terminală și păstrate la suprafața limfocitului.

Între IgM de membrană (IgMm), cu funcția de receptor de antigen și IgM seric (IgMs) sunt două deosebiri majore:

- IgMm conține o secvență C-terminală hidrofobă, prin care se ancorează în membrana limfocitelor mature „virgine”, care nu au venit în contact cu antigenul specific. După stimulare, IgM nou sintetizat nu va mai fi ancorat în membrană, ci va fi secretat;

- IgMm este un monomer (H_2L_2), iar IgMs este pentamer (H_2L_2)₅.

Schimbară de la forma IgMm la IgMs este rezultatul unor diferențe ale modului de prelucrare a ARN premesager. Consecința lor este o secvență diferită de aminoacizi la capătul C-terminal al lanțului μ al IgMm și IgMs.

Copia de ARN premesager a genei rearanjate a lanțului μ are două situsuri potențiale de clivaj și atașare a resturilor poliadenilate, ce marchează capătul ARNm.

Secvența C-terminală a IgMm cuprinde 25 de aminoacizi hidrofobi, ce formează domeniul membranal, urmată de o secvență cationică lys-val-lys. Acest domeniu, ca la toate proteinele ancorate în membrană, formează un α -helix cu o lungime suficientă pentru a străbate membrana. Fiind hidrofobă asigură interacțiuni strânse cu lipidele membranei. Secvența cationică (cu sarcini pozitive) se extinde în citoplasmă și ancorează ferm polipeptidul de membrana celulară.

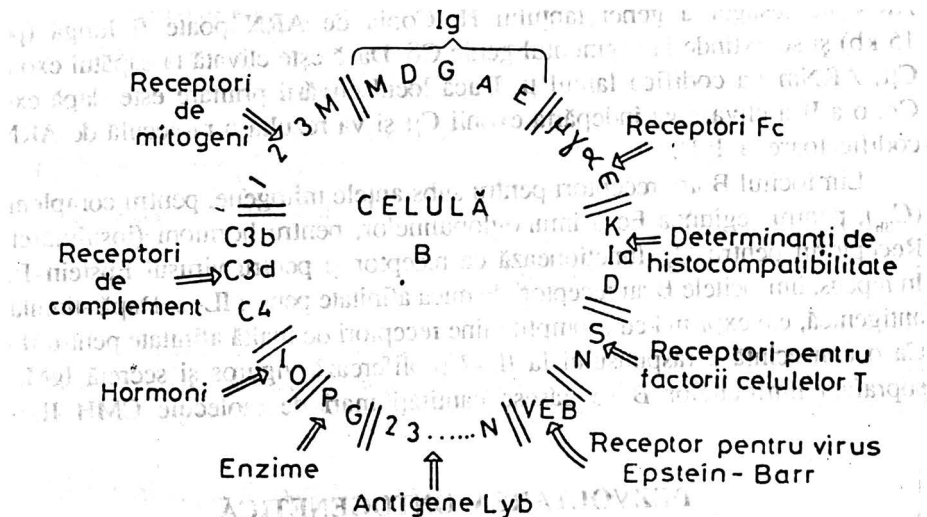


Fig. 30. Reprezentare schematică a diferitelor molecule membranare ale limfocitelor B (după Cooper și colab., 1984).

După stimularea antigenică, copia de ARN premesager a genelor lanțului H este clivată la alt situs și sunt îndepărtate secvențele codificatoare ale domeniului membranar. Se sintetizează IgM care nu mai are secvența C-terminală pentru ancorarea lanțului μ în membrana citoplasmatică. Noua secvență C-terminală, de 19 aminoacizi conține un rest de cisteină la poziția penultimă, ce formează legăturile S-S dintre unitățile monomere ale pentamerului secretat.

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

După stimularea antigenică, celula B comută sinteza de la IgMm la IgMs și începe să producă lanțurile J necesare stabilizării IgMs pentamere.

Mecanismele diferite de prelucrare a ARN premesager sunt responsabile pentru sinteza IgM și IgD în aceeași celulă. Multe limfocite B mature de memorie, pe lângă IgM exprimă pe suprafața lor molecule de IgD. Prezența simultană pe suprafața unui limfocit a lanțurilor μ și δ , cu domenii V identice nu încalcă regula specificității unice a anticorpilor sintetizați de un limfocit. Având lanțul L comun și domeniile VH identice, cele două izotipuri de anticorpi au aceeași specificitate de legare (același idiotip). Ele diferă numai la nivelul domeniilor constante ale lanțurilor H.

Prezența pe suprafața unui limfocit a lanțurilor μ și δ , cu domenii V identice se explică prin variația mecanismelor de prelucrare a copiei de

ARN-premesager a genei lanțului H. Copia de ARN poate fi lungă (peste 15 kb) și se extinde la segmentul genic C δ . Dacă este clivată la capătul exonilor C μ , ARNm va codifica lanțul μ . Dacă locul clivării primare este după exonii C δ , o a II-a clivare va îndepărta exonii C μ și va rezulta o moleculă de ARNm, codificatoare a IgD.

Limfocitul B are receptori pentru substanțele mitogene, pentru complement (C $_{3b}$), pentru regiunea Fc a imunoglobulinelor, pentru hormoni (insulină etc.). Receptorul pentru C $_{3b}$ funcționează ca receptor și pentru virusul Epstein-Barr. În repaus, limfocitele B au receptori de mică afinitate pentru IL-2. După stimularea antigenică, ele exprimă cu promptitudine receptori de înaltă afinitate pentru IL-2. Ca o consecință a răspunsului la IL-2 proliferează viguros și secretă IgM. Pe suprafața limfocitelor B se găsesc cantități mari de molecule CMH II.

DEZVOLTAREA ONTOGENETICĂ A SISTEMULUI IMUNOCITAR

Limfocitele T și B se diferențiază dintr-o celulă stem (celulă mamă, tulpină, de origine) care nu a fost identificată deoarece nu are caractere distinctive. Celula stem este pluripotentă, cu potențial înalt de *diviziune și diferențiere* multiplă, chiar *totipotentă*, deoarece generează toate categoriile de celule sanguine: eritrocite, granulocite, monocite, limfocite, mastocite și megacariocite. Diferențierea inițială este pe linia eritroidă și mieloidă, iar cea pe linia limfoidă este ulterioară și simultană cu procesul de maturare. Maturarea implică dobândirea imunocompetenței, adică a capacității de a recunoaște specific antigenul și de a se activa.

Celula stem este de origine mezenhimală. La păsări și mamifere celulele stem limfoide apar în *mezenhimul paraaortic* al embrionului. De aici ele migrează în *sacul vitelin*, unde se desfășoară un timp activitatea hematopoetică, preluată ulterior în viața embrionară de *ficat și splină*. Târziu în viața embrionară și ulterior (după naștere și ecloziune) *măduva osoasă* funcționează ca organ hematopoetic, chiar dacă ficatul și splina păstrează, la organisme foarte tinere, o activitate hematopoetică foarte limitată.

Sacul vitelin este sediul esențial al diferențierii celulelor stem, înainte de migrarea lor în ficat, splină, măduva oaselor. Prin cultivarea embrionului total de șoarece, fără sacul vitelin, înainte de migrarea celulelor stem limfoide, nu s-a evidențiat diferențierea celulară pe cale hematopoetică. La păsări, în ficat și splină, celulele stem se divid cu o rată înaltă și se diferențiază pe linie eritocitară, mieloidă (granulocitară), monocitară și limfoidă. După ecloziune, această etapă

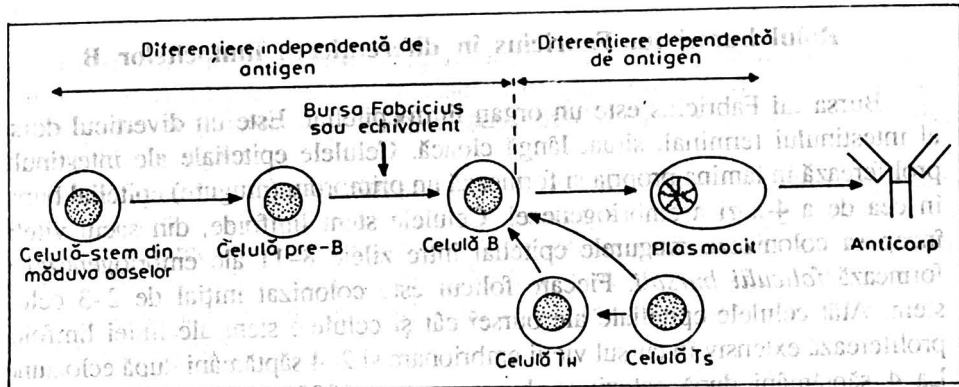


Fig. 31. Maturarea limfocitelor B. Inducția diferențierii într-un mediu lipsit de antigen este urmată de diferențierea și maturarea periferică, în plasmocite și celule B cu memorie, în prezența antigenelor (după Haenney 1985).

a diferențierii se desfășoară în măduva oaselor. Când măduva va prelua funcția hematopoetică, celulele limfoide rezultate aici vor migra inițial în splină și ficat, iar de aici în organele *limfoide centrale* (timus și bursa lui Fabricius).

La mamifere, din sacul vitelin, iar după naștere din măduva osoasă, celulele limfoide migrează în ficat și splină. De aici unele migrează în timus, iar altele își dobândesc competența imună în țesuturile de origine (ficat, splină, măduva osoasă) care îndeplinesc funcțiile bursei la păsări. Acesta este *circuitul primar* al limfocitelor, în care se produce, diferențierea *independentă de antigen*, în cursul căreia limfocitele devin *imunocompetente*. Circuitul primar se desfășoară în *organele limfoide primare* (timus, bursa lui Fabricius și echivalenții bursali ai mamiferelor). În cursul lui, limfocitele dobândesc receptori specifici de antigen.

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 prin intermediul limfei se reîntorc în sânge. În circuitul secundar, limfocitele întâlnesc antigenul specific receptorului lor, se activează, proliferază și se diferențiază spre stadiile de *celule efectoare* și *celule cu memorie*.

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

Bursa lui Fabricius este un organ limfoepitelial. Este un diverticul dorsal al intestinului terminal, situat lângă cloacă. Celulele epiteliale ale intestinului proliferază în lamina propria și formează un primordiu (mugure) epitelial bursal în cea de a 4-a zi a embriogenezei. Celulele stem limfoide, din sacul vitelin încep să colonizeze mugurele epitelial între zilele 8–11 ale embriogenezei și formează *foliculii bursali*. Fiecare folicul este colonizat inițial de 2–3 celule stem. Atât celulele epiteliale ale bursei cât și celulele stem ale liniei limfoide proliferază extensiv în cursul vieții embrionare și 2–4 săptămâni după ecloziune. La 4 săptămâni după ecloziune, bursa conține 10000 foliculi, fiecare având circa 10^5 limfocite. Bursa se menține până la 4–6 luni, când începe să involueze și se atrofiază la maturitatea sexuală.

Între celulele epiteliale ale bursei lui Fabricius și celulele liniei limfoide se stabilesc interacțiuni foarte strânse, esențiale pentru generarea diversității specificității antigenice a limfocitelor B circulante. Efectul său este mediat de factori humoral, ca de exemplu *bursopoetina*, un polipeptid mic, capabil să inducă diferențierea limfocitelor B *in vitro*.

Îndepărtarea primordului bursal în cea de a 5-a zi de dezvoltare embrionară, sau ablația chimică a epitelinului bursal prin tratament cu testosteron nu influențează numărul de limfocite B circulante la pasărea adultă, dar anticorpii pe care îi sintetizează au o diversitate foarte restrânsă. Reiese deci, că bursa lui Fabricius nu este strict necesară pentru rearanjarea funcțională a genelor codificatoare ale sintezei imunoglobulinelor și nici pentru diferențierea limfocitelor B, dar are rol decisiv pentru producerea diversității clonale a limfocitelor B.

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

Spre deosebire de mamifere, la care generarea diversității celor circa 10^9 molecule diferite de anticorpi se face prin legarea combinatorială a segmentelor genice V–D–J (pentru lanțul H) și V–J (pentru lanțul L), linia aviană de evoluție a vertebratelor a exploatat altă strategie pentru producerea diversității moleculelor de anticorpi. În timpul dezvoltării embrionare a puiului de găină, potențialul generării diversității genetice prin procese de recombinare genică este limitat, deoarece regiunea variabilă a lanțului H și a lanțului L este codificată de regiuni funcționale unice V și J. Ca urmare, rearanjarea genelor în celulele liniei limfoide precursorare bursocitelor va produce o diversitate foarte limitată a moleculelor de anticorpi.

Bursa lui Fabricius este mediul prielnic pentru *expansiunea clonală* a limfocitelor B care au suferit procesul rearanjării productive a genelor (prin recombinare) pentru sinteza anticorpilor și pentru *diversificarea somatică* extensivă a genelor rearanjate.

Diversificarea genetică a limfocitelor B se produce prin mecanismul *conversiei genice intracromosomale*. Acesta este un proces de recombinare, care implică transferul unidirecțional al unor secvențe de nucleotide, din pseudogenele regiunilor variabile H și L, în genele funcționale VH și respectiv VL. Astfel are loc diversificarea somatică a genelor codificatoare ale domeniilor variabile ale moleculei de imunoglobulină.

DIFERENȚIEREA LIMFOCITELOR B LA MAMIFERE

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

La mamifere, primul organ în care are loc diferențierea celulelor B este *ficatul fetal* în care se desfășoară funcția hematopoetică. Acciași funcție ar avea-o *splina fetală* și chiar sângele circulant embrionar, care, străbătând diferite organe dobândește capacitatea de a induce maturarea limfocitelor B. Studiul diferențierii celulelor B în ficatul mamiferelor este foarte dificil, deoarece ficatul nu se poate extirpa (așa cum se procedează cu timusul și cu bursa lui Fabricius), iar numărul limfocitelor este mic față de al celulelor liniei eritrocitare. Este greu de obținut o populație omogenă de celule aflate în fazele preliminare ale maturării.

Celulele precursorare ale liniei B, generate în ficat și în măduva osoasă nu au imunoglobuline de suprafață. În genomul lor are loc rearanjarea genelor V, D, J ale lanțului H. Odată cu aceasta suferă tranziție rapidă și devin limfoblaste mari, care se divid. Se formează celule pre-B mici, care au lanțul μ intracitoplasmatic, dar nu exprimă imunoglobuline de membrană (μ cit⁺, L⁺, IgM⁻). Ulterior sunt rearanjate genele lanțului L și după sinteza lanțului L, pe suprafața limfocitului B se exprimă moleculele imunoglobulinice. Prima imunoglobulină de suprafață a limfocitelor B este IgM, ca proteină integrală, cu o densitate de peste 200 000 molecule/celulă. Celulele B care exprimă numai IgM pe suprafața lor sunt imature. Alături de IgM poate să existe IgA sau IgG. Pe măsură ce diferențierea celulelor B progresează, alături de IgM apare IgD, care ulterior devine dominantă. Celulele B mature în repaus au nivele mai înalte de IgD pe suprafața lor, decât IgM. Acestea sunt celulele imnocompetente.

Celulele care nu reușesc să genereze o rearanjare funcțională a genelor pentru sinteza lanțurilor H și L sunt eliminate într-un stadiu timpuriu al

diferențierii lor. Celulele B purtătoare de IgM și IgD pe suprafața lor, după stimularea antigenică vor secreta fie IgM, fie IgG (una din subclase), fie IgA, fie IgE. Nu există diferențiere izotipică a unei linii celulare care să sintetizeze IgD.

TIMUSUL LA MAMIFERE

Timusul este un organ limfoid voluminos așezat în partea superioară a mediastinului anterior. Timusul are origine epitelială: derivă din ectodermul perechii a III-a de pungi branhiale și din endodermul celei de a III-a pungi faringiene. Cele două primordii epiteliale fuzionează și formează primordiul timic epitelial, care pierde legătura cu faringele și lumenul dispare. Timusul este primul organ limfoid care apare la păsări și mamifere. Primordiul timic este străpuns de celule

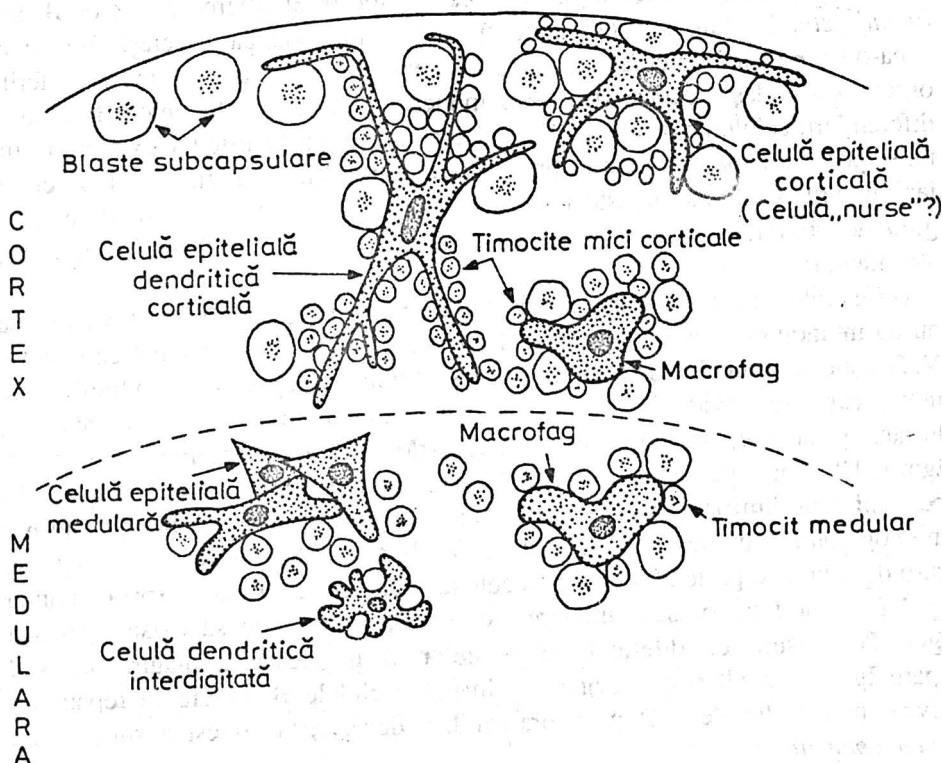


Fig. 32. Reprezentare schematică a principalelor tipuri de celule prezente în cortexul și în medulara timusului de șoarece (după Butscher și Weissman, 1984).

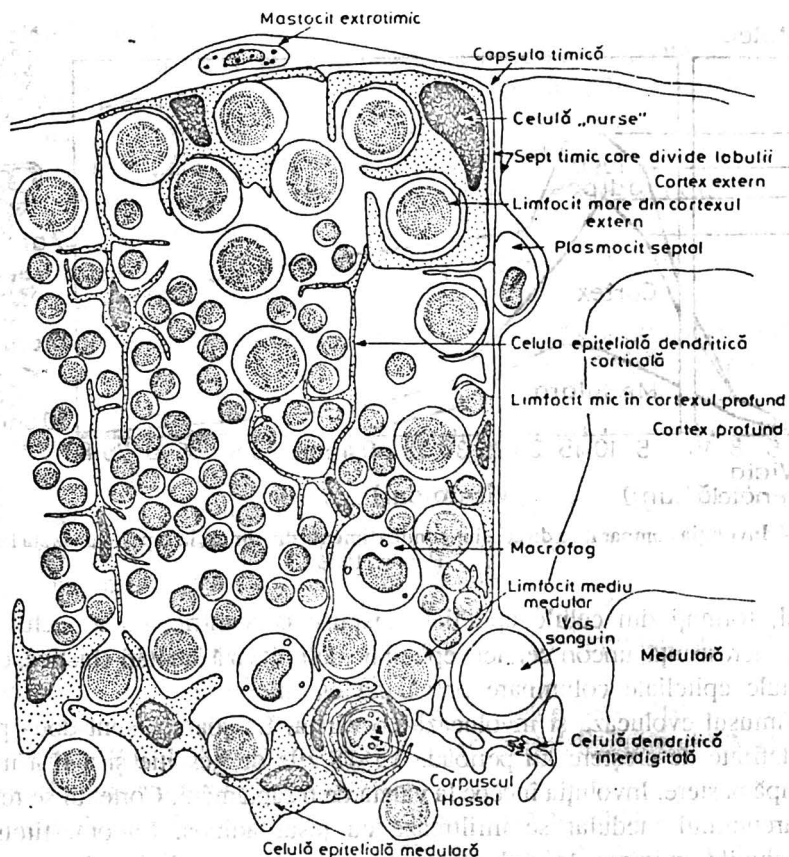


Fig. 33. Reprezentare schematică a arhitecturii generale a timusului. Subregiunile timusului sunt prezentate în dreapta figurii, iar constituienții lor celulari, în stânga (după Hood și colab., 1984).

stem limfoide cu originea în sacul vitelin (la șoarece în ziua a 11-a de dezvoltare embrionară). Apoi, celulele vin din ficat și mai târziu, din măduva osoasă. La om, la 20 săptămâni de sarcină timusul este complet dezvoltat.

Arhitectura timusului. Timusul este alcătuit din doi lobi. Fiecare lob este împărțit incomplet, de septuri conjunctive, în lobuli. Lobulii conțin o rețea de celule epiteliale, printre care sunt diseminate numeroase celule limfoide (timocite). Epiteliul timic este diferențiat zonal: cortical și medular. În zona corticală predomină celulele epiteliale stelate, cu numeroase prelungiri fine care se interconectează. În zona medulară celulele epiteliale sunt mai mari, de formă ovală, cu prelungiri citoplasmice scurte, bogate în organite secretoare. În zona medulară apar două tipuri de aglomerări ale celulelor epiteliale: corpusculii

Greutatea

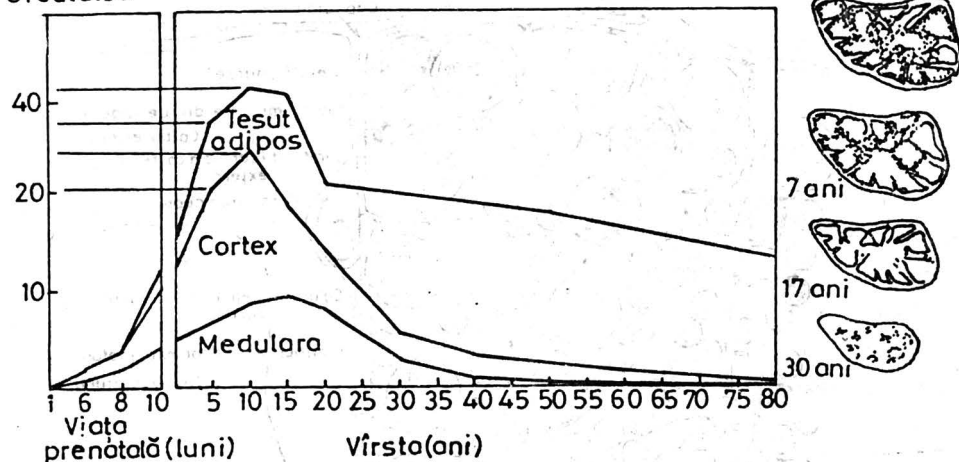


Fig. 34. Involuția comparată a diferitelor compartimente din timus, în raport cu vârsta la om (după Hamar, 1936).

Hassal, formați din celule epiteliale dispuse concentric, cu aspectul general de degenerescență; uneori celulele epiteliale delimitează cavități chistice, căptușite de celule epiteliale columnare prevăzute cu microvili.

Timusul evoluează și involuează cu vârsta. La șoarece sunt două perioade bine definite de creștere: în perioada 13–18 zile de gestație și a II-a între 3–6 zile după naștere. Involuția începe la vârsta de 6 săptămâni. Cortexul se restrânge, iar parenhimul medular se infiltrează cu țesut adipos. La om, timusul are dimensiunile maxime la pubertate. Apoi începe involuția, dar nu dispăre niciodată complet.

ROLUL TIMUSULUI ÎN DIFERENȚIEREA LIMFOCITELOR T

În zona corticală predomină limfocitele față de celulele epiteliale, iar în zona medulară raportul este invers. În timus, limfocitele T își dobândesc competența imună. Din punctul de vedere al distribuției limfocitelor, în timus se disting 4 regiuni funcționale:

- regiunea *subcapsulară* conține predominant limfocite imature, abia intrate în timus;
- *cortexul*, foarte bogat în limfocite care *proliferează* intens;
- joncțiunea *corticomedulară* funcționează ca o *sită* celulară;

– regiunea *medulară* conține relativ puține limfocite, cu markeri de suprafață ai limfocitelor mature.

Generarea celulelor T imunocompetente necesită influența micromediului timic. Limfocitele T au relații strânse cu celulele stromale epiteliale în diferite compartimente, acestea furnizând „semnale educaționale” care orientează maturarea (diferențierea) limfocitelor în două direcții:

- „educarea” celulelor T în sensul recunoașterii antigenelor exogene asociate cu molecule CMH și tolerarea moleculelor self;
- eliminarea celulelor T self-reactive, ca și a celor care nu generează combinația genică a unui receptor funcțional.

Contribuția celulelor stromei timice în acest proces complex multistadial e puțin înțeleasă, dar pare a fi esențială, argumentată de următoarele rezultate experimentale și fapte de observație:

- creșterea și diferențierea *in vitro*, a precursorilor celulelor T necesită prezența micromediului timic intact;
- tratamentul cu anumite substanțe chimice sau cu raze ionizante avariază micromediul timic și întrerupe procesul diferențierii celulelor T, care este reluat numai după restabilirea funcției micromediului;
- din timus se izolează complexe limfostromale;
- șoarecii nuzi cărora le lipsesc celulele T funcționale au mediu timic nefuncțional;
- micromediul timic exprimă puternic antigenele CMH;
- tratamentul *in vivo* și *in vitro* cu AMC anti-determinanți CMH interferează cu dezvoltarea celulelor T funcționale.

Interacțiunea dintre timocite și celulele stromei epiteliale a timusului este esențială pentru maturarea celulelor T. Celulele stromei exprimă molecule CMH II la densitate foarte înaltă și într-o măsură mai mică, moleculele CMH I. Contactul celulelor epiteliale cu limfocitele conferă acestora imunocompetența sau capacitatea de a răspunde la antigene, de a produce limfokine, de a exercita funcții reglatoare și citotoxice. Se poate admite existența unor diferențe ale micromediului care asigură maturarea celulelor T4 și T8: probabil că celulele T4 se maturează la contactul cu suprafața bogată în molecule CMH II a celulelor epiteliale, iar celulele T8 se maturează în raport cu moleculele CMH I ale celulelor epiteliului timic.

Apariția receptorului T_i pe limfocitele intratimice

Rearanjarea genelor pentru RCT se produce în cortexul timic, astfel că moleculele RCT se exprimă pe limfocitele intratimice în zona corticală, înainte de momentul ajungerii lor în zona medulară. Cu ajutorul AMC anti T_i marcați

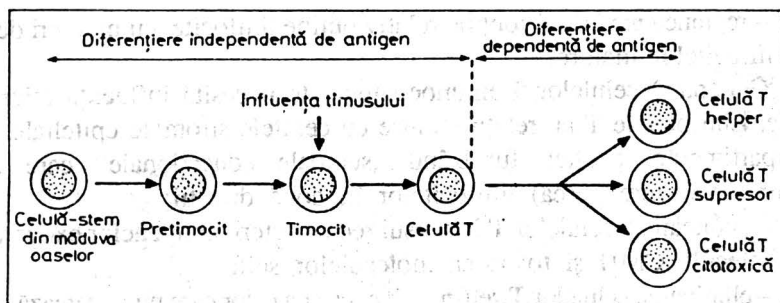


Fig. 35. Reprezentarea schematică a căilor de maturare a limfocitelor T. Diferențierea în timus, independentă de antigen produce o populație de celule T specifice pentru antigen, imunocompetente, cu viață scurtă. În prezența antigenului specific, ele se diferențiază în celule efectoare (după Haenney, 1984).

cu fluorocromi s-a evidențiat că moleculele RCT apar în zona perinucleară a limfocitului din zona corticală. Ulterior, moleculele RCT migrează la suprafața celulei. Limfocitele care au raporturi strânse cu celulele reticulare epiteliale ale timusului evidențiază o polarizare netă a colorației anti-Ti spre membrana

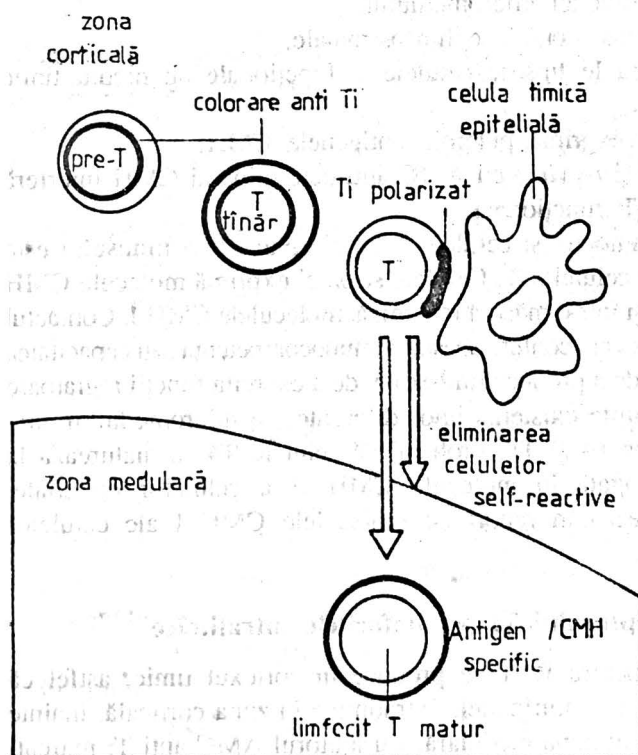


Fig. 36. Apariția receptorului de antigen pe limfocitul T, detectabilă pe secțiunile de timus, colorate cu AMC anti-Ti, marcați cu substanțe fluorescente. Moleculele receptor apar, inițial, în regiunea perinucleară. Ulterior moleculele Ti apar și la nivelul membranei citoplasmice a limfocitelor din zona corticală a timusului. Limfocitele aflate în strânsă asociație cu celulele epiteliale au receptori polarizați spre celula epitelială. Limfocitele din zona medulară au receptori de antigen distribuiți uniform pe membrana citoplasmatică (după Male și colab., 1987).

celulei epiteliale. S-a dedus că „educarea” limfocitelor T are loc în cursul interacțiunii cu celulele epiteliale prin intermediul moleculelor CMH, la care se adaugă un factor neidentificat al celulelor reticulare. În această etapă se dezvoltă toleranța limfocitelor T față de moleculele self și sunt eliminate cele self-reactive, la trecerea joncțiunii cortico-medulare, care se comportă ca o sită celulară.

FACTORII HUMORALI AI DIFERENȚIERII LIMFOCITELOR

Pe baza datelor experimentale acumulate se poate deduce existența a cel puțin două mecanisme care acționează în organele limfoide centrale, asupra diferențierii limfocitelor. 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 fost făcute asupra factorilor de diferențiere ai timusului, dar rezultatele pot fi principal extrapolate asupra factorilor bursali ai diferențierii limfocitelor B la păsări.

S-au conturat două ipoteze referitoare la factorii de diferențiere ai limfocitelor: 1) ipoteza *celulară* și 2) ipoteza *hormonală* (humorală).

În acord cu ipoteza *celulară* a micromediului epitelial al timusului, diferențierea limfocitelor T s-ar realiza prin contactul direct al prethimocitelor 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 maturarea imunității mediate celular. Extirparea timusului la animalele nou născute este urmată de instalarea „sindromului de epuizare” ale cărui simptome se manifestă progresiv mai intens, și în esență reflectă incapacitatea organismului de a se apăra de infecțiile virale și fungice. Grefa timusului (de la organisme singenice) le restabilește treptat starea normală. Experiențele de *extirpare* a timusului la organisme mature au evidențiat că absența timusului este compatibilă cu viața, fără manifestarea unor deficiențe evidente. S-a dedus astfel, că *mecanismele* celulare de contact al limfocitelor cu celulele epiteliului timic ar fi active numai în primele faze ale maturării limfocitelor T, dar absolut necesare pentru diferențierea lor.

După datele actuale, *mecanismul* celular al influenței timice nu este suficient pentru diferențierea celulelor T. S-a emis ipoteza *hormonală*, care consideră că procesul de diferențiere și maturare imunitară ar continua după ce timocitele părăsesc timusul. Efectul factorilor humorali s-ar exercita asupra celulelor limfoide circulante, sau asupra celor localizate în organele limfoide secundare. Hormonul secretat de celulele epiteliului timic ar exercita o acțiune stimulatorie asupra

diferențierii limfocitelor, atât intratimic cât și la distanță, după trecerea sa în circulație, continuând astfel influența directă a epiteliului timic.

În favoarea existenței unui factor hormonal timic s-au adus argumente experimentale care pot fi grupate în 2 categorii:

1) Experiențe de *restabilire* a funcției timice numai sub acțiunea factorilor timici: îndepărtarea timusului la șoarecele nou născut este urmată de pierderea imunității mediate celular. Introducerea sub piele, la animalele timectomizate, a unei grefe de timus, plasată într-o cameră specială cu pereți poroși, permeabilă pentru molecule dar impermeabilă pentru celule restabilește imunocompetența, ceea ce demonstrează că nu este strict necesar contactul limfocitelor cu celulele epiteliului timic. Este suficient ca mediatorul (mediatori) chimic secretat de timus să fie prezent în organism, pentru ca maturarea limfocitelor T să aibă loc. Pe de altă parte, șoarecii femele timectomizate la naștere își recapătă competența imunitară în timpul sarcinii sub influența hormonilor timici fetalii, care trec în circulația maternă;

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

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

Timozinele (evidențiate de Goldstein 1977) din cea de a 5-a fracție proteică de extract timic de vițel reprezintă un grup de polipeptide cu g m cuprinse între 1000 și 15000 D, stabile la 80°. Prin combinarea cromatografiei schimbătoare de ioni și gel-filtrare, din această fracție s-au izolat 16 polipeptide. Ele induc sinteza MIF (factor inhibitor al microfagelor) de către limfocite, precum și diferențierea celulelor formatoare de anticorpi. De asemenea, reconstituie anumite funcții imunitare la animalele timectomizate, cât și în cazul hipofuncției timice la persoanele vârstnice, la care competența imunitară diminuează datorită involuției timusului. Din acest amestec polipeptidic, cel mai activ este un polipeptid de 108 aminoacizi (de 12 kD), căruia i s-a determinat secvența aminoacizilor. În mod obișnuit se izolează din timusul de vițel.

Timopoetina este un hormon polipeptidic al timusului, evidențiat în primul rând datorită efectelor sale asupra transmiterii neuromusculare și mai puțin prin acțiunea 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. Timopoeina este un polipeptid format din 49 aminoacizi, izolat din extractele de timus. Sunt două variante de timopoeină, care diferă prin doi aminoacizi și stimulează activitatea limfocitelor T.

Factorul timic seric (FTS) lipsește în serul șoarecelui nud, iar la animalele sănătoase dispare după timectomie dar re apare după grefa timică. Este un peptid cu g m 900, cu următoarea secvență a celor 9 aminoacizi: glu-ala-lys-ser-gln-gly-gly-ser-asn. Concentrația FTS depinde de vârstă și scade odată cu scăderea greutatei timusului (20 ani la om și 6 luni la șoarece).

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

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

ORGANELE LIMFOIDE SECUNDARE (PERIFERICE)

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

Organele limfoide *secundare* reprezintă sediul structural al răspunsului imun și sunt de două categorii:

- unele sunt *entități anatomice* distincte și organizate (ganglionii limfatici, splina, plăcile Peyer, amigdale);

- altele sunt *formațiuni limfoide difuze*, neorganizate ca entități structurale, dar sunt populate cu diferite categorii de celule, în care predomină limfocitele (țesuturi limfoide asociate mucoasei gastrointestinale – gut associated lymphoid tissue, (GALT) și respiratorii (bronchus associated lymphoid tissue (BALT)).

Organele limfoide secundare au următoarele particularități funcționale:

- sunt populate tardiv cu limfocite maturate în organele limfoide primare;
- la nivelul lor, limfopoieza este diminuată sau inexistentă;
- la nivelul lor, limfocitele părăsesc fluxul sanguin;
- extirparea lor totală este imposibilă
- conțin proporția covârșitoare a limfocitelor;
- în prezența stimulului antigenic, limfocitele proliferază și se diferențiază, rezultând celule efectoare și „de memorie“.

Ganglionii limfatici

Ganglionii limfatici sunt organe limfoide secundare situate pe traseul vaselor limfatice. La suprafață prezintă o capsulă conjunctivă din care pornesc numeroase trabecule. În structura ganglionului limfatic se distinge *stroma*, formată din fibre și celule reticulare, în ochiurile căreia se găsesc celule limfoide, macrofage, vase limfatice și sanguine.

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

Zona corticală este divizată în două zone: corticala *externă*, foarte bogată în limfocite B și corticala *profundă* (paracorticală), populată de limfocite T (la șoarecele nud – atimic – corticala profundă este atrofiată).

În subzona corticală externă se găsesc numeroase aglomerări de limfocite, denumite *foliculi limfoizi primari*, cu diametrul de circa 1 mm, așezați printre limfocitele dispersate uniform. Ei conțin, în special, limfocite mici. După stimularea antigenică, în timpul elaborării răspunsului imun, ei devin foliculi *limfoizi secundari*, datorită proliferării celulare intense, cu o zonă de mare densitate celulară denumită *centru germinativ*.

Zona medulară conține țesut limfoid dens, sub forma unor cordoane așezate printre sinusurile medulare. Predomină limfocitele B, asociate cu macrofage, celule T. Sinusurile limfatice sunt căptușite cu celule a căror suprafață apicală prezintă denivelări care încetinesc percolarea limfei prin ganglion.

Sângele circulă în direcție opusă limfei. *Artera aferentă* pătrunde în ganglion la nivelul hilului și se continuă cu *arteriolele*, care formează un bogat *plex*

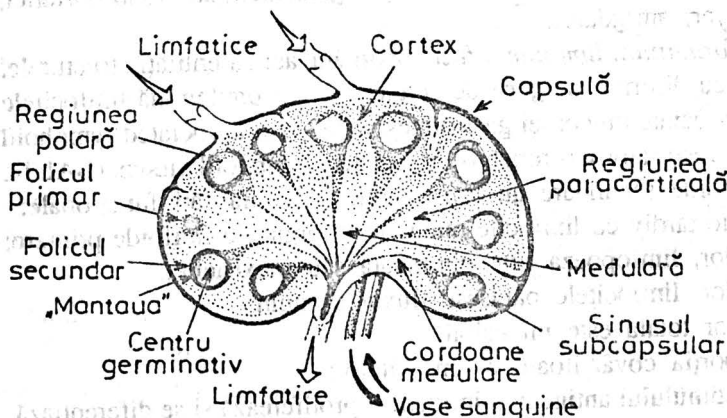


Fig. 37. Reprezentare schematică a arhitecturii unui ganglion limfatic (după Zola, 1985).

capilar. La nivelul cortexului profund, din plexul capilar se formează *venulele postcapilare cu endoteliu înalt*. La acest nivel, limfocitele *părăsesc* circulația sanguină prin celulele endoteliale și se distribuie în zonele caracteristice: *celulele B în cortexul extern, iar celulele T în paracortex* (cortexul profund). După ce străbat lent teritoriile ganglionare specifice, limfocitele trec în zona medulară. Aici se colectează *sinusurile limfatice medulare*, care drenează limfa spre vasele limfatice eferente. Limfocitele părăsesc ganglionul prin *vasele limfatice eferente*.

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

Funcțiile ganglionului limfatic sunt următoarele:

- filtrarea limfei și reținerea componentelor nonsell (celule bacteriene, toxine etc.) de către fagocitele ganglionare;

- este suportul material al proliferării limfocitelor după stimularea antigenică. Limfa aferentă este filtrată și îmbogățită în anticorpi și în limfocite.

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

Splina

Splina este cel mai mare organ limfoid, cu rol important în funcția imunitară. Este un filtru sangvin, legat pe o derivație a mării circulații.

Splina este acoperită de o capsulă conjunctivă, de unde pornește o rețea de trabecule conjunctive, ce împart țesutul splenic în compartimente comunicante. În fiecare compartiment se găsesc *pulpa albă și pulpa roșie*.

În trabeculele conjunctive se găsesc arterele trabeculare (ramificații ale arterei splenice). Când ating diametrul de circa 200 μm, arterele părăsesc trabeculele conjunctive și pătrund în parenhimul splenic. Ele dau ramificații laterale (arteriole), fiecare fiind acoperită de un manșon dens de țesut limfoid. Arteriola are o poziție centrală în manșonul limfoid. În jurul ei se găsesc limfocite distribuite într-o stromă conjunctivă, care constituie *tecii limfoide periarteriolare* (PALS = *periarteriolar lymphoid sheaths*) sau manșoane coaxiale de limfocite, în jurul arteriolelor. Totalitatea tecilor periarteriolare formează *pulpa albă* a splinei. Manșoanele au o zonă internă, bogată în limfocite T și o zonă externă, bogată în limfocite B, și plasmocite grupate în aglomerări denumite *foliculi*.

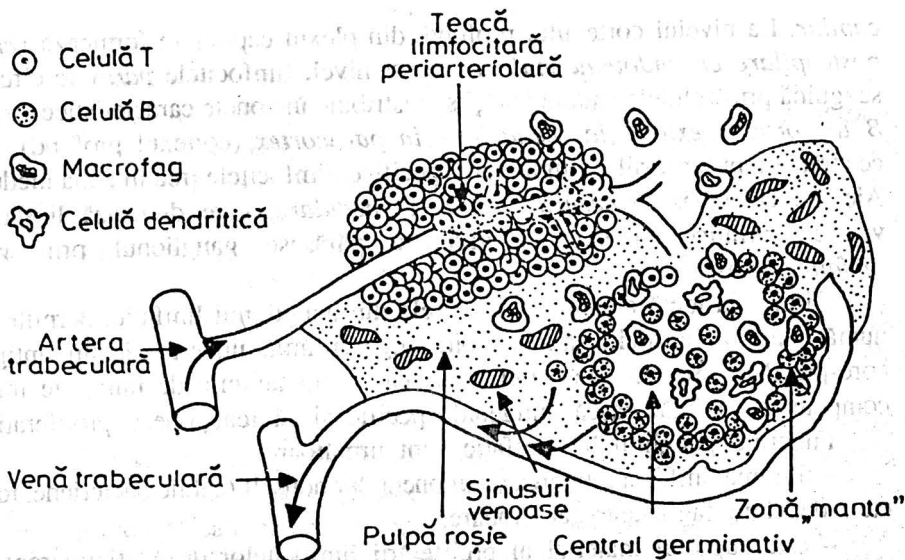


Fig. 38. Topografia regiunilor timus-dependente (TD) și timus-independente (TI) în splină. Teacă limfocitară periarterioară constituie regiunea TD, în timp ce foliculii limfoizi și țesutul limfoid adiacent reprezintă zona TI (după Cradock și colab., 1971).

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

Pulpa roșie înconjură pulpa albă și este formată din cordoane de țesut splenic (cordoane Bilioth) și sinusuri venoase (capilarele arteriolelor „în perie”). Majoritatea arteriolelor penicilate se deschid în cordoanele Bilioth (circulație deschisă). 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 libere cu funcție fagocitară (macrofage). Cordoanele Bilioth comunică cu sistemul venos al splinei.

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 neuniform, tapetate cu celule din seria macrofagelor, care au rolul de a fagocita antigenele particulare. La acest nivel sunt captate și hematiile îmbătrânite. În sinusuri se deschid o parte din arteriolele penicilate („circulația închisă”).

Alte arteriole, după ieșirea din manșonul limfoid se termină în capilarele zonei marginale, al căror perete este foarte permeabil și permite trecerea limfocitelor din sânge în pulpa albă (în teacă periarterioară). Capilarele zonei marginale formează granița dintre pulpa albă și pulpa roșie și reprezintă zona de schimb dintre cele două compartimente. Din pulpa albă, limfocitele trec în capilarele marginale, apoi în sinusurile pulpei roșii și de aici în sistemul venos al splinei.

În splină se găsesc *foliculii limfoizi primari*. Ei sunt localizați la periferia tecii limfoide periarteriolare, sau în imediata ei vecinătate.

Splina nu are circulație limfatică. La nivelul ei limfocitele ies din sânge prin perețele capilarelor zonei marginale, care este foarte permeabil și se distribuie în pulpa albă, iar de aici străbat drumul invers și ajung în pulpa roșie, în sinusurile venoase. Acestea comunică atât cu capilarele zonei marginale, cât și cu sistemul venos al splinei.

Limfocitele părăsesc splina prin vena splenică.

Formațiuni limfoide asociate mucoaselor

Mucoasele (digestivă, respiratorie, genitală, urinară) constituie, din punctul de vedere al contactului cu antigenele, structurile cele mai vulnerabile ale organismului uman și animal. La nivelul lor, contactul permanent cu microorganismele creează condițiile pătrunderii acestora în mediul intern. Mucoasele reprezintă nu numai o enităte anatomică, ci și o enităte *imunologică*, conturată în anii '60, cu particularități structurale și funcționale care tind să o delimiteze tot mai mult de aparatul imunitar sistemic. Mucoasele au un mod particular de recirculare a limfocitelor, care permite celulelor stimulate și blastelor generate în structurile imunitare locale să revină cu o mare probabilitate în aceste zone. Mastocitele din structura mucoasei, prin mediatorii lor, permit modificarea condițiilor locale ale circulației.

Fundamental, sistemul imunitar al mucoaselor are o funcționalitate precisă, destinată să excludă antigenele exogene, înainte ca ele să pătrundă în mediul intern și să evite sau să minimalizeze expunerea aparatului imunitar sistemic la antigenele (moleculare sau celulare) care tind să pătrundă în mediul intern, dar să rămână insensibil la microbiota normală a mucoaselor. Prin calitatea sa de „zonă de control” a organismului cu antigenele, sistemul imunitar al mucoaselor are și un rol regulator asupra funcției aparatului imunitar sistemic. Deficiențele sale funcționale expun organismul și aparatul imunitar sistemic, unei permanente stări de activare, care depășește limitele fiziologice, consecința finală fiind instalarea stărilor de autoimunitate.

În mucoasa intestinală se află un mare număr de celule care reacționează la antigenele din lumenul intestinal: macrofage, limfocite, plasmocite. Aceste celule sunt distribuite fie *difuz*, fie organizate în *structuri* distincte: foliculii limfoizi, plăcile Peyer, amigdalele.

Structurile limfoide asociate intestinului sunt lipsite de învelișul capsular și de vasele limfatice aferente. Epiteliul intestinal care le acoperă se deosebește de restul epitelului, fiind o barieră pentru antigenelor particulare mari, dar având o mare permeabilitate care permite pătrunderea antigenelor solubile și chiar a celor particulare mici. În lipsa vaselor limfatice, lichidul care scaldă structurile limfoide îndeplinește funcția limfei aferente.

Structurile limfoide asociate tractului digestiv (GALT = gut associated lymphoid tissue) includ amigdalele (tonsilele palatine), plăcile Peyer, apendicele, plăcile limfoide ale colonului.

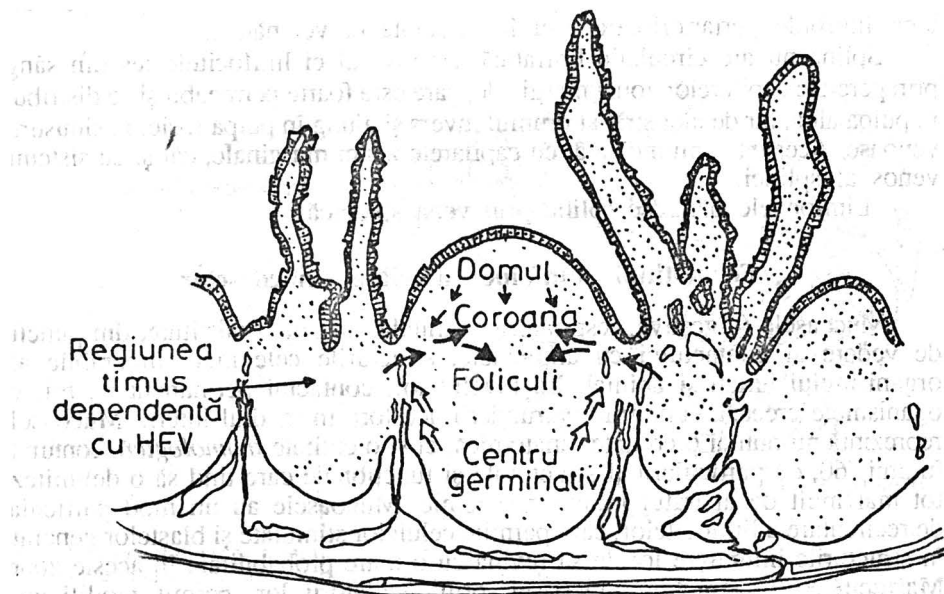


Fig. 39. Schema unei secțiuni printr-o placă Peyer. Săgețile mici indică direcția de scurgere a lichidului și a antigenului, pe calea epitelului care acoperă domul, spre plexul limfatic al nodulului. Săgețile mari arată căile de migrare a limfocitelor din venulele cu endoteliu înalt (HEV), localizate în regiunile timus-dependente, prin domul și „coroana” nodulului. Săgețile duble indică direcția probabilă de migrare a celulelor mitotice, din centrul germinativ, spre plexul limfatic (după Phillips-Quagliata și Lamm, 1987).

Amigdalele se găsesc așezate în unghiurile mandibulare. Dimensiunile unei amigdale măsoară 2,5 cm lungime, 1,5 cm lățime și 2 cm grosime. Sunt singurele structuri limfoide asociate tractului digestiv, acoperite de o capsulă, care aderă intim de țesutul limfoid subiacent. Pe fața internă, care privește spre vestibulul faringian se găsesc deschiderile criptelor tonsilare. Criptele pătrund adânc în masa limfoidă a tonsilei, facilitând contactul celulelor reactive (macrofage și limfocite) cu antigenele pătrunse pe cale digestivă. Limfocitele care au pe suprafața lor Ig G sunt mult mai numeroase decât cele cu Ig A.

Foliculii limfoizi sunt structuri asociate caracteristice intestinului. Se găsesc fie ca foliculi solitari, de 0,5–2 mm, foarte numeroși în partea terminală a ileonului, fie ca foliculi agregați denumiți plăcile Peyer. Sunt situați în corionul mucoasei, dar pătrund și în submucoasă. Au formă circulară sau alungită (eliptică) cu axul mare în lungul intestinului. Lungimea este variabilă între 1 și 12 cm, iar lățimea între 0,8–1 cm. O placă Peyer conține 20–30 foliculi agregați. Se găsesc în ileonul terminal și ocupă marginea liberă a intestinului (niciodată marginea mezenterică). La nivelul lor vilozitățile intestinale sunt reduse.

Fiecare folicul al plăcii Peyer conține o aglomerare de macrofage, limfocite, plasmocite. Ariile interfoliculare sunt bogate în limfocite T. Structura foliculară individualizată este separată de lumenul intestinal prin structuri specializate denumite *domuri*: domul epitelial alcătuit din celule epiteliale turtite ale mucoasei intestinale și domul conjunctiv subepitelial. La nivelul domului, epiteliul intestinal prezintă puține celule mucoase și puțini microvili, dar există în schimb, o categorie de celule specializate funcțional denumite *celule M* (*microfold*). Celulele M din epiteliul cubic captează antigenele solubile din lumenul intestinal prin pinocitoză. Nu se știe dacă ele prelucrează materialul antigenic, înainte de a-l prezenta celulelor limfoide foliculare, cu care au raporturi structurale și funcționale strânse. Este posibil ca celulele M să îndeplinească numai rolul de transfer al antigenelor din lumenul intestinal, la structurile limfoide.

Accesul microorganismelor la epiteliul folicular are, în primul rând, consecințe benefice deoarece pe această cale se inițiază stimularea imunitară protectoare față de microorganismele luminale. Efectul nefavorabil este consecința faptului că epiteliul folicular al plăcii Peyer poate fi o cale de acces a microorganismelor patogene în organism (*Salmonella typhi*).

În foliculii limfatici din plăcile Peyer predomină celulele B, iar în zonele interfoliculare se găsesc preponderent celule T (subpopulația T_H). O proporție importantă a limfocitelor nu are nici-un marker. Ariile T, la animalele timectomizate și la cele congenital atimice sunt sărace în limfocite. La organismele germ free, plăcile Peyer sunt puțin dezvoltate. Pentru completa lor dezvoltare sunt necesare atât influențele stimulatoare ale timusului, cât și contactul cu microorganismele intestinale.

Structurile limfoide asociate intestinului (GALT) și cele asociate aparatului respirator (BALT) au o bogată populație de limfocite IgA' ca marker de suprafață. În plăcile Peyer, dintre limfocitele IgA, majoritatea sunt IgM' și numai foarte puține sunt IgG'. Celulele IgD' sunt restrânse ca distribuție, la periferia foliculilor limfoizi.

Limfocitele B din foliculii limfoizi se află într-o stare de proliferare activă. Totuși, numărul plasmocitelor este mic, ceea ce reflectă posibilitatea limfocitelor B din structurile GALT, de a migra în alte zone ale mucoasei, înainte de a se diferenția în plasmocite.

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 conectează cu capilarele situate sub criptele adiacente foliculilor și se continuă cu venulele postcapilare din ariile interfoliculare T-dependente.

A doua categorie de formațiuni limfoide ale tractului digestiv sunt cele cu distribuție *difuză*. Ele se găsesc în lamina propria și în stratul epitelial al mucoasei. Celulele cu funcție imunitară sunt foarte heterogene din punct de vedere funcțional. În lamina propria se găsesc limfocite T și B în proporții egale și un număr mare de plasmocite. Cele din stratul epitelial (limfocite intraepiteliale) sunt mai ales limfocite T citotoxice și limfocite B cu markerul IgA⁺. O proporție mică de celule sunt IgM⁺. Raportul celulelor IgA⁺/IgM⁺ este de 10–20/1. Cea mai mare parte a limfocitelor B sunt în curs de diferențiere spre plasmocite.

În mucoasa intestinală se găsesc celule IgE⁺, numărul lor fiind crescut la persoanele cu alergii alimentare.

Tabel comparativ privind principalele caracteristici ale organelor limfoide primare și secundare

Caracteristici	Organe limfoide primare	Organe limfoide secundare
<i>Originea</i>	La zona de trecere între ectoderm și endoderm. Conțin celule derivate din ectoderm și din mezoderm (limfocite).	În mezoderm
<i>Momentul dezvoltării</i>	Foarte precoce în viața embrionară.	Tardivă în cursul vieții fetale sau după naștere.
<i>Rolul</i>	Sunt populate timpuriu de celule precursorale ale limfocitelor și au rol în dobândirea competenței imunitare a acestora. Migrarea celulelor în organele limfoide primare nu ar fi alcătuitoare, ci ar avea înscrisă în genomul lor evoluția într-un sens sau altul (celule pre-B și pre-T).	Sunt populate numai de limfocite complet diferențiate (maturate) la nivelul organelor limfoide primare.
<i>Durata activității lor</i>	La adult suferă o involuție progresivă, care la vârstele înaintate este însoțită de o deficiență a funcțiilor specifice imunitare.	Persistă toată durata vieții organismului.
<i>Activitatea mitotică</i>	Este intensă și este independentă de stimularea antigenică	Absentă în lipsa stimulului antigenic.
<i>Formarea centrilor germinali de reacție după stimularea antigenică</i>	Absentă	Foarte intensă
<i>Efectele extirpării precoce</i>	Reducerea numărului de limfocite și diminuarea rapidă a reactivității imunitare	Nu este posibilă. Activitatea lor se poate bloca experimental. Reactivitatea imunitară diminuează, dar totdeauna rămân celule imuno-competente
<i>Efectele extirpării tardive</i>	Reducerea numărului de limfocite și limitarea reactivității imunitare	Imposibilă
<i>Funcția esențială</i>	Centre de proliferare, maturare și diseminare a limfocitelor	Focare ale răspunsului imun

(cuv. difuzie)
(celulele difuzate)
cale eferentă
Al
cale eferentă

C a p i t o l u l V

RĂSPUNSUL IMUN

Funcționalitatea sistemului imunitar se suprapune modelului general al arcului reflex: presupune un flux informațional care cuprinde un *excitant* specific (antigenul) față de un receptor (limfocitele), o *cale aferentă* (celulele care înglobează și prelucrează antigenul), un *organ central* (celulele limfoide dintr-un organ limfoid periferic), o *cale eferentă* (amplificarea mitotică și diferențierea limfocitelor) și *efectorii* răspunsului imun (anticorpi, celule efectoare).

Asemănările dintre sistemul imunitar și sistemul nervos se extind și asupra altor particularități:

- sistemul imunitar este dotat, ca și sistemul nervos cu „inteligență” (capacitatea sa de a recunoaște un număr mare de determinanți antigenici diferiți). „Inteligența” sistemului imunitar se manifestă *discontinuu* în funcție de agresiunile externe asupra organismului;

- „educația” sistemului imunitar (informația primită prin stimulări antigenice), ca și în cazul sistemului nervos, începe după naștere;

- ambele sisteme „învață” prin experiență, ambele sunt dotate cu „memorie” care poate fi consolidată prin repetarea stimulului. Memoria ambelor sisteme este înscrisă prin modificări persistente ale rețelei, dar nu poate fi transmisă la descendenți;

- ambele sisteme sunt organizate după modelul unei complexe rețele celulare și moleculare.

Între cele două sisteme există și deosebiri: sistemul nervos recepționează stimuli de orice natură, care acționează la nivelul întregului organism, iar sistemul imunitar recunoaște și reacționează numai la stimulii de natură moleculară, care tind să perturbe echilibrul organismului.

Organismul ca sistem funcțional este echilibrat atâta timp cât informația pe care o primește este identică cu cea proprie. Față de moleculele străine care

se abat de la modelul informațional propriu, sistemul imunitar răspunde prin activarea mecanismelor de recunoaștere pentru a le îndepărta.

PARTICULARITĂȚILE GENERALE ALE RĂSPUNSULUI IMUN

Ansamblul fenomenelor complexe, în cascadă, declanșate de interacțiunea specifică a sistemului imunitar cu antigenul, în cursul cărora celulele imuno-competente se activează, proliferează și se diferențiază în celule efectoare și celule cu memorie constituie răspunsul imun.

Elaborarea răspunsului imun față de o substanță nonself este un proces fiziologic ce se caracterizează printr-o mare eficiență și suplețe și prezintă următoarele trăsături generale:

- funcția sistemului imunitar are caracter *adaptativ*, care decurge din orientarea specifică a reacțiilor sale față de o anumită substanță nonself. Caracterul adaptativ al răspunsului imun implică mobilizarea unor celule *pre-programate*, care așteaptă să fie activate de un anumit antigen, corespunzător specificității lor;

- caracterul foarte *economic* al activității sistemului imunitar derivă din specificitatea acțiunii sale. În timpul răspunsului imun se selecționează și se activează numai subpopulațiile celulare care au recunoscut specific substanța nonself, toate celelalte clone celulare rămânând disponibile pentru alte interacțiuni;

- *eficiența* funcției imunitare derivă din caracterul foarte economic al mijloacelor celulare și moleculare pe care le mobilizează și din capacitatea de a *amplifica* efectorii săi, pe două căi: a) proliferarea masivă (circa 8 generații celulare) a celulelor selecționate sub acțiunea stimulatoră a substanței nonself. În timpul activării 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. Eficiența răspunsului imun este condiționată de eliberarea mediatorilor cu rol stimulator al diferitelor interacțiuni celulare (interleukine și interferoni);

- celulele sistemului imunitar *cooperează* stimulator cu numeroase alte celule, capabile să confere la rândul lor, rezistența organismului. Cooperarea are loc inclusiv cu factori nespecifici (neadaptativi) ai imunității naturale (fagocitele, sistemul complement, molecule bactericide sau bacteriolitice din ser);

– intrarea în acțiune a sistemului imunitar adaptativ necesită o perioadă de timp pentru activarea și proliferarea limfocitelor care au recunoscut antigenul, în timp ce reacțiile neadaptative sunt prompte (imEDIATE);

– reacțiile adaptative asigură protecția organismului și a descendenților săi, prin transferul placentar al anticorpilor și prin secreția lăctată;

– reacțiile adaptative au o proprietate fundamentală unică – memoria imună, consecință a experienței antigenice individuale, netransmisibilă la descendenți.

Răspunsul imun este rezultatul cooperării unui număr restrâns de tipuri celulare și moleculare. În funcție de predominanța componentei humorale sau celulare se disting două tipuri de răspuns imun:

1) Răspunsul imun mediat humoral (RIMH) se caracterizează, în esență, prin producerea anticorpilor. Efectul său constă în inactivarea virusurilor, neutralizarea toxinelor, opsonizarea (sensibilizarea) bacteriilor. Imunitatea mediată humoral este transferabilă de la un organism la altul prin intermediul serului. RIMH este protector față de infecțiile bacteriene (în special piogene), față de reinfecțiile virale și față de antigenele solubile (proteine), pe care le neutralizează.

2) Răspunsul imun mediat celular (RIMC) se caracterizează prin faptul că după contactul cu antigenul, celulele efectoare se sensibilizează și atacă antigenul țintă, care de regulă este celular. Atacul se realizează, fie prin contact celular direct (între celula T efectoare și celula țintă), fie prin mediatori moleculari. RIMC este declanșat de antigene care se exprimă pe suprafața celulelor (antigene virale pe celulele infectate – în special după infecția virală primară), de antigene fungice, de bacteriile cu localizare intracelulară (*M. tuberculosis*, *M. leprae*, *Listeria* sp., *Brucella* sp.), de antigenele tumorale, de greșelile de țesuturi și organe alogene.

Dualitatea răspunsului imun este argumentată de rezultatele experimentale, dar în special de observațiile clinice, adevărate experiențe ale naturii, asupra unor indivizi cu afecțiuni determinate de incapacitatea RIMH sau RIMC:

– sindromul Di George se caracterizează prin aplazia timusului și paratiroidelor. Bolnavilor le lipsește reactivitatea față de antigenele care în mod obișnuit induc reacții de hipersensibilitate întârziată. Sinteza imunoglobulinelor este normală. Sunt sensibili la infecțiile virale, fungice și cu bacterii intracelulare;

– hipo- și agamaglobulinemia congenitală de tip Bruton este o afecțiune ereditară determinată de gene situate pe cromosomul X, care afectează diferențierea celulelor pe linia limfoidă B. Lipsesc limfocitele B mature (numărul limfocitelor pre-B este normal) din sângele circulant. Scade accentuat titrul imunoglobu-

linelor serice. Timusul este normal, ca și IMC. Deficiența clinică constă în incapacitatea de a sintetiza anticorpi și din această cauză, copiii după 3-6 luni de viață fac infecții repetate și recurente cu bacterii Gram pozitive, maladii autoimune. Rezistența față de infecțiile virale și față de bacteriile Gram negative este neafectată.

Separarea celor două compartimente ale răspunsului imun, humoral și celular este artificială. Între ele este o condiționare reciprocă și profundă: anticorpii au funcție opsonizantă, favorizând astfel RIMC, iar pe de altă parte, la RIMC participă numeroși factori solubili. Cele două compartimente interacționează sinergic pentru producerea unui răspuns imun eficient. Separarea este menținută deoarece reflectă diferențele fundamentale ale mecanismelor de acțiune ale celor două linii de limfocite implicate: limfocitele B pentru RIMH și limfocitele T pentru RIMC. Nici un antigen nu induce un răspuns imun pur, humoral sau celular. Totdeauna răspunsul imun este mixt, cu predominanța unuia sau a celuilalt dintre compartimente.

ETAPELE RĂSPUNSULUI IMUN

Răspunsul imun este rezultatul succesiunii următoarelor etape:

- pătrunderea antigenului în organism și înglobarea lui de către celulele accesorii;
- prelucrarea antigenului și prezentarea epitopilor pe suprafața celulelor accesorii;
- recunoașterea specifică a componentelor nonself și activarea celulelor efectoare;
- producerea efectorilor răspunsului imun.

Pătrunderea antigenului în organism se realizează pe diferite căi: prin tegument, pe calea circulației sanguine, pe calea mucoaselor (respiratorie și gastrointestinală).

Elaborarea răspunsului imun este, în esență, rezultatul cooperării a două categorii de celule: celulele accesorii ale răspunsului imun și celulele limfoide.

Celulele accesorii au rol esențial în desfășurarea răspunsului imun, datorită capacității lor de a îngloba substanțele străine, de a le prelucra și de a le prezenta limfocitelor, de a fagocita celule opsonizate și de a sintetiza substanțe imunomodulatoare.

Inițial s-a considerat că macrofagele sunt singurele celule accesorii ale răspunsului imun, dar, de fapt, orice celulă care poartă pe suprafața sa molecule CMH poate să participe la elaborarea răspunsului imun.

Pentru declanșarea răspunsului imun față de antigenele exogene, cele mai active celule prezentatoare de antigene (CPA) sunt macrofagele, celulele dendritice și limfocitele B.

Celulele *dendritice* constituie un sistem de celule esențiale pentru inițierea răspunsului imun față de antigenele timodependente, ce pătrund pe cale tegumentară sau sanguină. Ele au funcția de a prezenta antigenul și se găsesc în organele limfoide secundare. Din acest sistem fac parte:

- celulele *Langerhans* din stratul bazal al epidermei;
- celulele cu „voal” (vâl) din limfa aferentă și celulele *dendritice* din sânge;

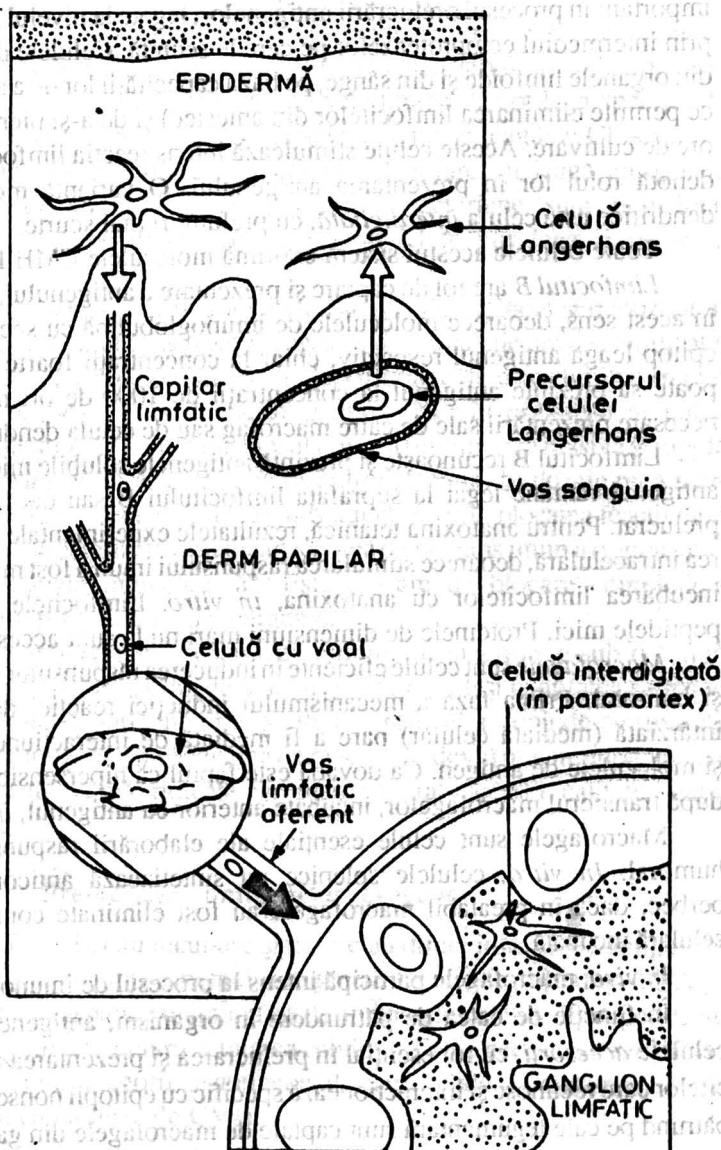


Fig. 40. Circulația celulelor Langerhans din piele, în ganglionii limfatici regionali. Ele părăsesc sediul tegumentar, „încărcate” cu antigen, pentru a trece în limfaticile aferente, unde apar sub forma celulelor cu „voal” și ajung în regiunea paracorticală a ganglionilor limfatici, unde formează celulele interdigitate (după Male și colab., 1987).

– celulele dendritice și *interdigitate* din organele limfoide secundare.

Originea acestor celule nu este certă, dar se admite următoarea filiație: monocitul sanguin → celula Langerhans din epidermă → celula cu vâl din limfa aferentă ganglionului limfatic → celula dendritică din ganglionii limfatici (zona paracoticală) și din sânge.

Celulele acestui sistem nu au proprietăți *fagocitare*. Totuși, li se atribuie rol important în procesul prelucrării antigenelor, legate la nivelul membranei celulare, prin intermediul ectoproteazelor pe care le secretă. Celulele dendritice s-au izolat din organele limfoide și din sânge, pe baza capacității lor de a adera de suport (ceea ce permite eliminarea limfocitelor din amestec) și de a-și pierde aderența după 24 ore de cultivare. Aceste celule stimulează intens reacția limfocitară mixtă, ceea ce denotă rolul lor în prezentarea antigenului. O variantă morfologică a celulei dendritice este celula *interdigitată*, cu prelungiri mai scurte.

Toate celulele acestui sistem exprimă moleculele CMH II.

Limfocitul B are rol de captare și prezentare a antigenului, fiind foarte eficient în acest sens, deoarece moleculele de imunoglobulină cu specificitate față de un epitop leagă antigenul respectiv, chiar la concentrații foarte mici. Limfocitul B poate să prezinte antigenul la concentrații de 1000 de ori mai mici decât cele necesare prezentării sale de către macrofag sau de celula dendritică.

Limfocitul B recunoaște și prezintă antigenele solubile mici. Nu este cert dacă antigenul rămâne legat la suprafața limfocitului B sau dacă este internalizat și prelucrat. Pentru anatoxina tetanică, rezultatele experimentale sugerează prelucrarea intracelulară, deoarece stimularea răspunsului imun a fost mult mai intensă după incubarea limfocitelor cu anatoxina, *in vitro*. Limfocitele B captează numai peptidele mici. Proteinele de dimensiuni mari nu le sunt accesibile.

Macrofagele sunt celule eficiente în inducerea răspunsului imun mediat celular și humoral. Prima fază a mecanismului inducției reacției de hipersensibilitate întârziată (mediată celular) pare a fi mediată de interacțiunea dintre macrofag și moleculele de antigen. Ca dovadă este faptul că hipersensibilitatea este indusă după transferul macrofagelor, incubate anterior cu antigenul, *in vitro*.

Macrofagele sunt celule esențiale ale elaborării răspunsului imun mediat humoral. *In vitro*, celulele splenice nu sintetizează anticorpi antihematii de berbec, dacă în prealabil macrofagele au fost eliminate complet din populația celulară incubată.

In vivo, macrofagele participă intens la procesul de imunogeneză.

În funcție de calea de pătrundere în organism, antigenele sunt captate de celulele *accesorii*, cu rol esențial în prelucrarea și prezentarea antigenelor, limfocitelor care recunosc și interacționează specific cu epitopii nonself. Antigenele care pătrund pe cale tegumentară sunt captate de macrofagele din ganglionii regionali.

Cele care pătrund pe cale digestivă sunt captate de macrofagele din plăcile Peyer și din amigdale. Cele care pătrund pe calea circulației sanguine sunt captate de macrofagele și celulele dendritice din splină. Cea mai mare parte a antigenelor circulante sunt eliminate înainte de a declanșa răspunsul imun, în primul rând de celulele Kupffer, care căpтуșesc capilarele sinusoidale din ficat. Aici se elimină cea mai mare parte (90%) a antigenelor circulante (bacterii care străbat bariera mucoasei digestive, endotoxine absorbite la nivelul intestinului gros).

Prima treaptă a interacțiunii antigenului exogen cu CPA este legarea nespecifică prin interacțiuni necovalente ale antigenului, cu structuri nedeterminate ale suprafeței celulare. Antigenele din complexe imune se pot lega specific de CPA, prin receptorii pentru Fc și C3. Antigenele care nu se leagă de CPA nu vor induce răspuns imun. De exemplu, macrofagele alveolare nu leagă antigenele bacteriei *Listeria monocytogenes*. Dacă celulele bacteriene sunt mai întâi opsonizate cu anticorpi specifici, macrofagele alveolare vor lega și prezenta aceste antigene.

După ce a pătruns în organism, antigenul este repede înglobat și depozitat în interiorul macrofagelor. Faptul că antigenul este scos din circulație are o semnificație funcțională deosebită, deoarece constituie un depozit din care este eliminat treptat și stimulează imunogeneza. Persistența antigenului liber în organism ar putea induce două stări defavorabile pentru răspunsul imun: a) eliminarea masivă și rapidă a antigenului din organism, fără stimularea răspunsului imun; b) dozele prea mari de antigen sunt de asemenea defavorabile răspunsului imun, prin blocarea reactivității 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”.

O mică parte a antigenului injectat este reținută în macrofage sub o formă rezistentă la degradare, pentru perioade mai lungi de timp, deși cantitatea sa scade progresiv. Imunogenitatea antigenelor asociate macrofagelor depinde de tipul de antigen. Cele slab imunogene, după legarea de macrofag, devin mai imunogene, iar cele cu imunogenitate nativă ridicată își pierd parțial această calitate, după legarea de macrofag.

Prelucrarea antigenelor exogene

Limfocitele T (Th și Tc) nu recunosc și nu preiau direct informația antigenică solubilă. Limfocitele T recunosc numai antigenele legate de suprafața CPA și participă la declanșarea răspunsului imun față de antigenele solubile T-dependente și față de antigenele celulare. Pentru activarea celulelor T este necesară o prealabilă prelucrare a acestor două categorii de antigene, de către celule specializate, care le prezintă în asociație cu moleculele CMH.

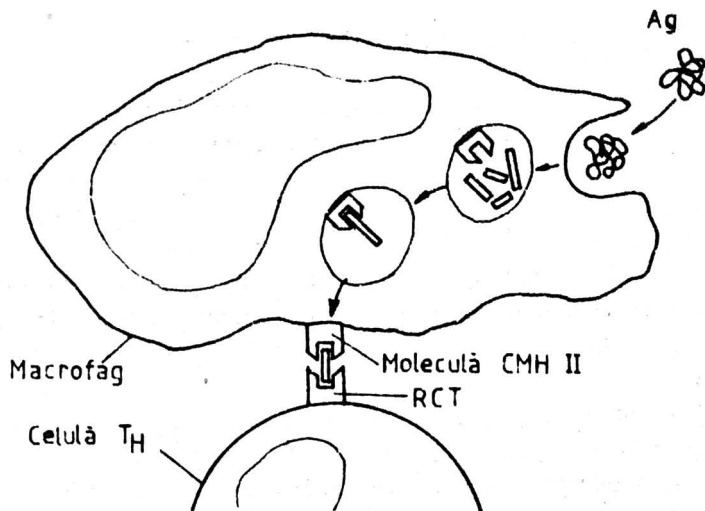


Fig. 41. Majoritatea antigenelor exogene sunt prelucrate și prezentate de macrofage, în asociație cu moleculele CMH clasa II-a (după Grey și colab., 1989).

Evenimentele metabolice ale prelucrării antigenelor sunt puțin cunoscute. În macrofage se produce o *digestie selectivă* a antigenelor, în urma căreia o parte din epitopi se păstrează, iar cea mai mare parte a antigenului este complet degradată.

Între momentul legării antigenului de CPA și recunoașterea sa de către celulele T, există o perioadă de lag de 45–60 min. Durata sa s-a determinat prin inactivarea metabolică a macrofagelor cu paraformaldehidă, la diferite intervale de timp după contactul cu antigenul. Acest interval este cel mai mic necesar, pentru ca antigenul să fie prelucrat și prezentat. Macrofagele inactivate după intervalul de 45–60 min stimulează activarea celulelor T.

Experiențele cu antigen marcat au evidențiat că în CPA, materialul imunogen are două destinații: o parte este expusă pe suprafața celulei și este recunoscută de celulele T, iar o altă parte este sechestrată în celulă de unde este eliminată activ în mediul extracelular și este preluată de alte CPA.

Principalul mecanism degradativ care are loc în CPA este *proteoliza lizosomală*. Concluzia a fost dedusă din faptul că amoniacul și cloroquina, care se localizează în lizosomi, blochează degradarea proteinelor prin creșterea pH lizosomal. Macrofagele astfel tratate sunt incapabile să prezinte antigenele proteice sau bacteriene. Cloroquina blochează numai etapa prelucrării antigenului, dar nu și recunoașterea sa de către limfocitele T, deoarece administrarea ei după o oră de la contactul macrofagelor cu antigenul a rămas fără efect. Cloroquina a blocat prezentarea antigenului de către celulele dendritice, deși ele nu sunt fagocitare în

vitro și au un sistem lizosomal puțin dezvoltat. S-a dedus că ele prelucurează antigenul la suprafață, cu ajutorul ectoproteazelor de membrană, deși nu există dovezi directe în acest sens.

Proteinazele cisteinice (fac parte din grupul enzimelor care funcționează prin intermediari covalenți enzimă-substrat) sunt importante în prelucrarea antigenelor, așa cum au dovedit rezultatele experiențelor cu antigene sintetice. Proteoliza rapidă și extensivă este cauza slabei imunogenității a unor antigene (sau chiar a absenței imunogenității). Unele antigene sintetice (copolimerul L-acid glutamic-L-alanină) sunt mult mai imunogene după inhibarea acțiunii proteinazelor cisteinice.

Nu toate antigenele necesită proteoliza (fragmentarea) prealabilă recunoașterii de către celulele T. Uneori denaturarea (deplierea) proteinelor este suficientă pentru ca antigenul să fie prezentat de CPA, chiar tratate cu clorochină.

Antigenele peptidice mici (insulina, angiotensina) pot fi recunoscute în formă intactă (nativă) de unele subpopulații de limfocite T, în timp ce alte subpopulații recunosc formele prelucrate ale aceluiași antigen.

Klein și colab. (1985) afirmă că evenimentele prelucrării nu sunt esențiale pentru ca antigenul să fie prezentat limfocitelor T. Totdeauna este însă necesară, conversia sa la o formă care să-i permită să interacționeze cu moleculele CMH II ale CPA și cu receptorii celulelor T. În acest scop s-au preparat liposomi cu molecule CMH II inserate în stratul lipidic, la care s-au cuplat covalent o varietate de antigene proteice. Liposomii cu complexele CMH II-antigen, legate la suprafață au stimulat clonele de limfocite T, *in vitro*, în absența completă a CPA.

Forma sub care limfocitele T recunosc antigenul depinde atât de natura CPA, dar în special de natura antigenului. Cele mai multe proteine solubile sunt rapid endocitate și prelucrate, iar altele sunt legate de membrana celulei și prezentate direct, fără o prelucrare prealabilă. Dimensiunea și configurația moleculei de antigen sunt hotărâtoare în ceea ce privește gradul prelucrării sale, înainte de a fi prezentat. De regulă, moleculele mari necesită prelucrarea prealabilă, iar cele mici sunt prezentate în formă nativă. Forma chimică a antigenului, după prelucrare nu este cunoscută. Probabil este un polipeptid de dimensiuni mici.

Rolul moleculelor CMH în prezentarea și recunoașterea antigenului

Moleculele CMH sunt molecule de recunoaștere a antigenului și au rol esențial în declanșarea răspunsului imun. Răspunsul imun este rezultatul interacțiunilor complexe între celulele care prezintă antigenul și limfocitele T și B. Limfocitele T nu recunosc antigenul ca atare, ci numai după ce acesta a fost prelucrat și prezentat pe suprafața unei celule. Antigenele sunt prezentate în asociație cu moleculele CMH clasa I sau a II-a și numai în această formă sunt recunoscute de limfocitele T.

Acest fapt a fost demonstrat de Zinckernagel și Doherty (1974) în experiențe de genul următor:

- se inoculează șoareci ai liniei inbred D, cu suspensia virală A, pentru a stimula proliferarea limfocitelor T citotoxice (T_C), față de celulele infectate cu acest virus;

- culturile de fibroblaste de la embrionii liniilor D și K se infectează cu virusul A;

- limfocitele T recoltate de la organisme ale liniei D, stimulate cu virusul A recunosc și lizează *in vitro*, fibroblastele liniei D, infectate cu virusul A;

- limfocitele T_C nu recunosc și nu lizează, *in vitro*, fibroblastele liniei D, infectate cu virusul B și nici fibroblastele liniei K, infectate cu virusul A.

Concluzia este că recunoașterea antigenelor sintetizate *în celule* este posibilă numai în cazul în care antigenele sunt prezentate în asociație cu determinanții moleculari (moleculele CMH clasa I) ai suprafeței celulelor infectate.

Recunoașterea asociată a antigenului, cu moleculele CMH I sau II are două semnificații majore:

- celulele sistemului imunitar interacționează cu proteinele proprii, numai în cazul în care acestea sunt asociate cu un determinant antigenic nonsell, de origine virală, tumorală, sau indus de agenți chimici;

- recunoașterea antigenului este condiționată de existența histocompatibilității, adică celulele care *prezintă antigenul* și celulele care *îl recunosc* (limfocite T_C , T_H) trebuie să poarte pe suprafața lor molecule CMH I și II identice. Celulele care interacționează trebuie să aparțină aceluiași organism sau unor organisme identice genetic. Acesta este fenomenul de *restricție* (limitare) a interacțiunilor celulare prin moleculele CMH (sau prin antigenele de histocompatibilitate).

Grefele de țesuturi și organe de la organisme diferite genetic sunt respinse rapid, deoarece antigenele CMH clasa I și a II-a sunt antigene foarte puternice. La rândul lor, antigenele exogene, precum și cele sintetizate în interiorul celulei (antigene virale, tumorale sau induse de agenți chimici) sunt recunoscute de limfocite numai dacă sunt prezentate pe suprafața celulelor, în ambianța moleculelor CMH.

Prezentarea antigenelor exogene și activarea limfocitelor. Prezentarea antigenelor este o etapă obligatorie a elaborării răspunsului imun, care derivă din faptul că limfocitele T nu interacționează direct cu antigenele. Capacitatea sistemului imunitar de a recunoaște diversitatea structurilor antigenice din natură este funcția unor molecule specializate ale suprafeței limfocitelor (receptorii de antigen). Pentru a deveni disponibile interacțiunii cu receptorii specifici, epitopii antigenici sunt legați intracelular cu moleculele CMH I și II și sunt transportați la suprafața CPA, ca fragmente peptidice sau ca proteine intacte. Moleculele CMH I și II au capacitatea de a lega și de a expune pe suprafața celulei, un număr nelimitat de peptide diferite ca structură. Antigenele proteice solubile, antigemele bacteriene

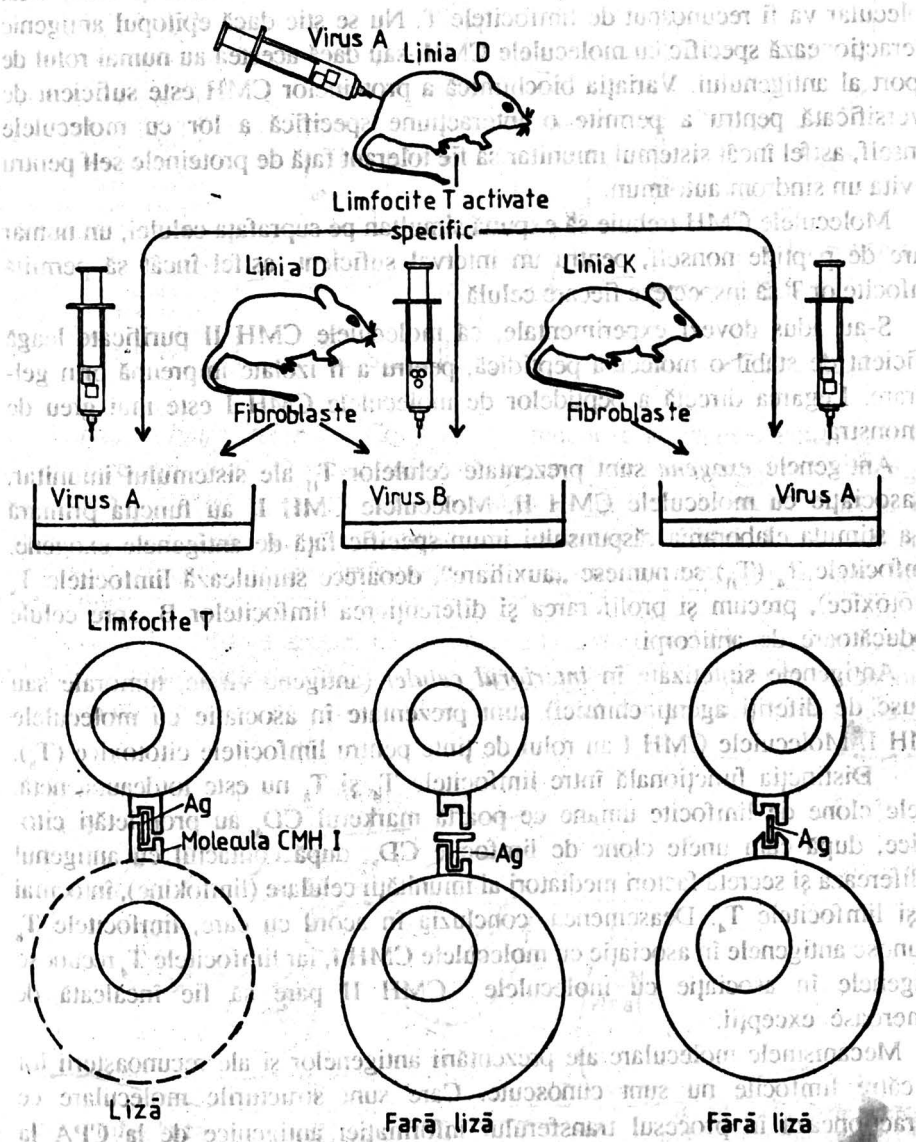


Fig. 42. Acțiunea limfocitelor T citotoxice (T_c) este restrictivă în raport cu moleculele CMH clasa I, deoarece celula T_c recunoaște atât antigenul specific cât și molecula CMH clasa I. Zinkernagel și Doherty (1974) au infectat șoarecii liniei D (cu o anumită specificitate a moleculelor CMH), cu virusul liniei A și au izolat limfocite T_c cu acțiune citotoxică specifică. *In vitro*, aceste limfocite vor liza fibroblastele embrionare de la organisme ale aceleiași linii (D), infectate cu același virus (placa din stânga), dar nu vor liza celulele liniei D infectate cu virusul B (placa din mijloc), și nici celulele liniei K (purtoare ale unor molecule CMH cu specificitate diferită), infectate cu virusul A (placa din dreapta) după Grey și colab., 1989)

sau virale sunt expuse în asociație cu moleculele CMH I sau II și complexul molecular va fi recunoscut de limfocitele T. Nu se știe dacă epitopul antigenic interacționează specific cu moleculele CMH, sau dacă acestea au numai rolul de suport al antigenului. Variația biochimică a proteinelor CMH este suficient de diversificată pentru a permite o interacțiune specifică a lor cu moleculele nonsell, astfel încât sistemul imunitar să fie tolerant față de proteinele self pentru a evita un sindrom autoimun.

Moleculele CMH trebuie să expună simultan pe suprafața celulei, un număr mare de peptide nonsell, pentru un interval suficient, astfel încât să permită limfocitelor T să inspecteze fiecare celulă.

S-au adus dovezi experimentale, că moleculele CMH II purificate leagă suficient de stabil o moleculă peptidică, pentru a fi izolate împreună prin gel-filtrare. Legarea directă a peptidelor de moleculele CMH I este mai greu de demonstrat.

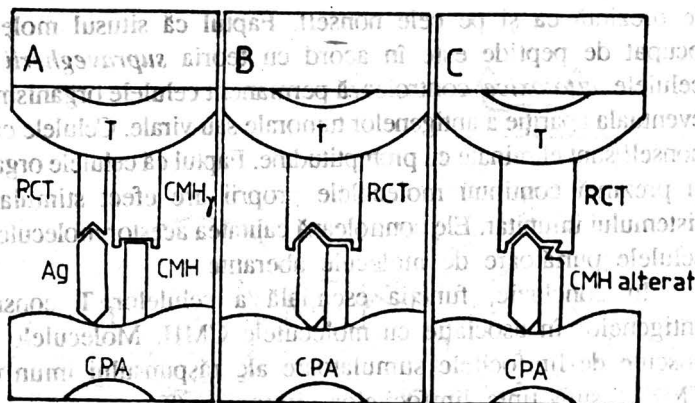
Antigenele exogene sunt prezentate celulelor T_H ale sistemului imunitar, în asociație cu moleculele CMH II. Moleculele CMH II au funcția primară de a stimula elaborarea răspunsului imun specific față de antigenele exogene. Limfocitele T_4 (T_H) se numesc „auxiliare”, deoarece stimulează limfocitele T_8 (citotoxice), precum și proliferarea și diferențierea limfocitelor B_1 spre celule producătoare de anticorpi.

Antigenele sintetizate în interiorul celulei (antigene virale, tumorale sau induse de diferiți agenți chimici) sunt prezentate în asociație cu moleculele CMH I. Moleculele CMH I au rolul de jinte pentru limfocitele citotoxice (T_8).

Distincția funcțională între limfocitele T_4 și T_8 nu este totdeauna netă. Unele clone de limfocite umane ce poartă markerul CD_4 au proprietăți citotoxice, după cum unele clone de limfocite CD_8 , după contactul cu antigenul proliferază și secretă factori mediatori ai imunității celulare (limfokine), întocmai ca și limfocitele T_4 . Deasemenea, concluzia în acord cu care, limfocitele T_4 recunosc antigenele în asociație cu moleculele CMH I, iar limfocitele T_8 recunosc antigenele în asociație cu moleculele CMH II pare să fie încălcată de numeroase excepții.

Mecanismele moleculare ale prezentării antigenelor și ale recunoașterii lor de către limfocite nu sunt cunoscute. Care sunt structurile moleculare ce interacționează în procesul transferului informației antigenice de la CPA la limfocitul T? Receptorul de antigen al celulei T recunoaște numai antigenul prezentat pe suprafața CPA sau recunoaște asociația complexă epitop-moleculă CMH? Molecula CMH leagă specific epitopul antigenic sau este numai un suport pentru acesta? Aceste întrebări, ca și altele nu au primit răspunsuri satisfăcătoare.

Fig. 43. Reprezentare schematică a modalităților posibile de interacțiune dintre celula care prezintă antigenul (CPA) și limfocitul T. A. Modelul recunoașterii duble (celula T are receptori separați pentru molecula CMH și pentru antigen). B. Modelul recunoașterii asociate (limfocitul T are un singur receptor, care recunoaște atât antigenul cât și molecula CMH). C. Modelul recunoașterii selfului alterat (după asocierea cu antigenul, molecula CMH se modifică) (după Roitt și colab., 1985).



Activarea limfocitelor T_c. Celulele T_c recunosc antigenele sintetizate în interiorul celulei țintă. O celulă infectată cu un virus sau transformată malign sintetizează antigene specific virale sau tumorale pe care le prelucrează și le expune la suprafața sa, în asociație cu moleculele CMH I. În această formă sunt recunoscute de limfocitele T_c și rezultatul interacțiunii este liza celulei țintă.

Dovada în favoarea acestei ipoteze este adusă de faptul că, *in vivo*, situsul de legare al moleculelor CMH I este ocupat de peptide. Acestea sunt fragmente ale proteinelor proprii, pe care celulele le captează din spațiile interstițiale și

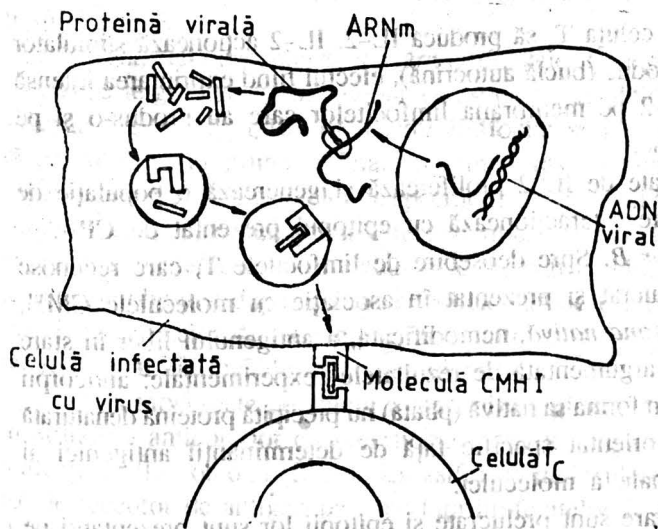


Fig. 44. Antigenele sintetizate în interiorul celulei (de origine virală tumorală sau sub acțiunea unor agenți chimici) sunt prezentate în asociație cu moleculele CMH I și sunt recunoscute de limfocitele T_c (după Grey și colab., 1989).

le prezintă ca și pe cele nonself. Faptul că situsul moleculelor CMH I este ocupat de peptide este în acord cu teoria *supravegherii imune*, după care, celulele *citotoxice* controlează permanent celulele organismului pentru a detecta eventuala apariție a antigenelor tumorale sau virale. Celulele care exprimă molecule nonself sunt eliminate cu promptitudine. Faptul că celulele organismului prelucreză și prezintă continuu moleculele proprii are efect stimulator asupra celulelor sistemului imunitar. Ele controlează calitatea acestor molecule expuse și detectează celulele purtătoare de molecule aberante.

În concluzie, funcția esențială a celulelor T constă în recunoașterea antigenelor în asociație cu moleculele CMH. Moleculele CMH II sunt recunoscute de limfocitele stimulatorie ale răspunsului imun (T_H), iar moleculele CMH I sunt înta limfocitelor citotoxice (T_c).

Răspunsul limfocitelor T (activarea lor) este *restrictivă* în raport cu aceste molecule. Aceasta semnifică faptul că antigenul va fi detectat și eliminat numai în contextul asocierii cu moleculele CMH.

Mecanismul molecular al *activării limfocitelor* nu este cunoscut. În general, activarea lor este consecința interacțiunii cu celula prezentatoare de antigen.

Activarea limfocitelor T_H are loc după recunoașterea epitopului specific prezentat de CPA și decurge în 3 etape:

1) După legarea celei T_H de CPA, un factor neidentificat, cu originea posibilă în celula T_H stimulează CPA să producă IL-1. Sinteza IL-1 ar putea fi declanșată de un semnal care ia naștere după interacțiunea CPA cu limfocitul T;

2) IL-1 stimulează celula T_H să producă IL-2. IL-2 acționează stimulator asupra celulelor care o produc (bucă autocrină), efectul fiind exprimarea intensă a receptorilor pentru IL-2 pe membrana limfocitelor care au produs-o și pe limfocitele aceleiași clone;

3) Limfocitele activate de IL-2 proliferează și generează o populație de celule imunoreactive, care interacționează cu epitopul prezentat de CPA.

Activarea limfocitelor B. Spre deosebire de limfocitele T, care recunosc antigenul modificat, prelucrat și prezentat în asociație cu moleculele CMH, limfocitele B recunosc forma nativă, nemodificată, a antigenului liber în stare solubilă. Afirmția este argumentată de rezultatele experimentale: anticorpii obținuți față de o proteină în forma sa nativă (pliată) nu precipită proteina denaturată și scindată. RIMH este orientat specific față de determinanții antigenici ai conformației tridimensionale a moleculei.

Antigenele corpusculare sunt prelucrate și epitopii lor sunt prezenți pe suprafața macrofagului. Aceștia vor fi recunoscuți de limfocitele B și T_H .

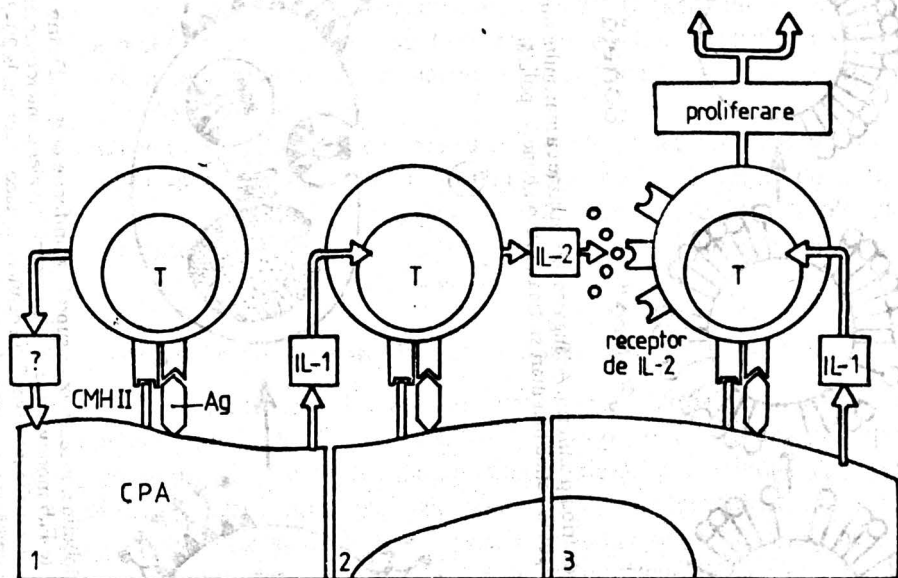


Fig. 45. Activarea limfocitelor T_H are loc în 3 etape. 1) După ce limfocitul T_H recunoaște antigenul, CPA sintetizează IL-1. 2) IL-1 stimulează limfocitul T_H să sintetizeze IL-2. 3. Limfocitele T_H activate de IL-2 proliferază și astfel are loc expansiunea lor clonală (după Roitt și colab., 1985).

Ultimele sintetizează IL-2, cu efect stimulator asupra proliferării și diferențierii limfocitelor B.

Mecanismul molecular al activării limfocitelor B, după stimularea cu antigenul specific este greu de studiat, deoarece proporția celulelor stimulate de antigenul specific este mică: $1/10^4$ – 10^5 dintre limfocite sunt stimulate pentru inițierea răspunsului imun primar. Chiar în cursul răspunsului imun secundar, după expansiunea clonală a celulelor cu specificitate față de un anumit antigen, proporția celulelor care leagă antigenul este mai mică de 1%. Din acest motiv, pentru explicarea mecanismului molecular al activării celulelor B s-au extrapolat rezultatele obținute după activarea policlonală nespecifică, *in vitro* consecutivă legării moleculelor de lectine, cu efect mitogen asupra celulelor B. Receptorii de lectine ai limfocitelor nu s-au identificat.

A II-a modalitate de studiu a mecanismului activării celulelor B a constatat în utilizarea anticorpilor cu specificitate față de imunoglobulina de membrană, marcați cu fluorocromi. S-a dedus astfel că moleculele de imunoglobulină cu rol de receptor de antigen pe suprafața limfocitelor B prezintă un grad ridicat de mobilitate. După cuplarea cu anticorpii specifici (sau cu antigenul bivalent),

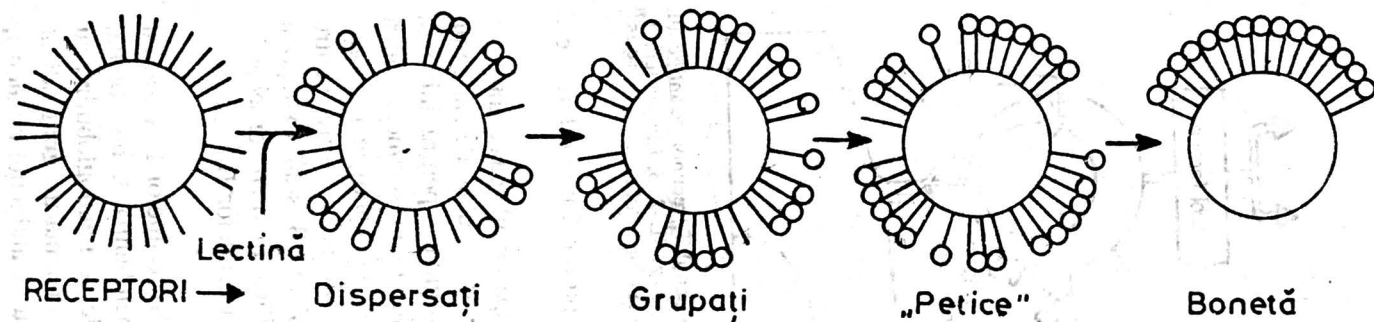


Fig. 46. Pe suprafața celulelor normale sau maligne, receptori de lectine sunt distribuiți uniform. Adăugarea unei lectine cu mai multe situsuri de legare interconectează receptori, agregându-i inițial în grupuri, apoi în petice mai mari și, final, într-o „bonetă” polară.

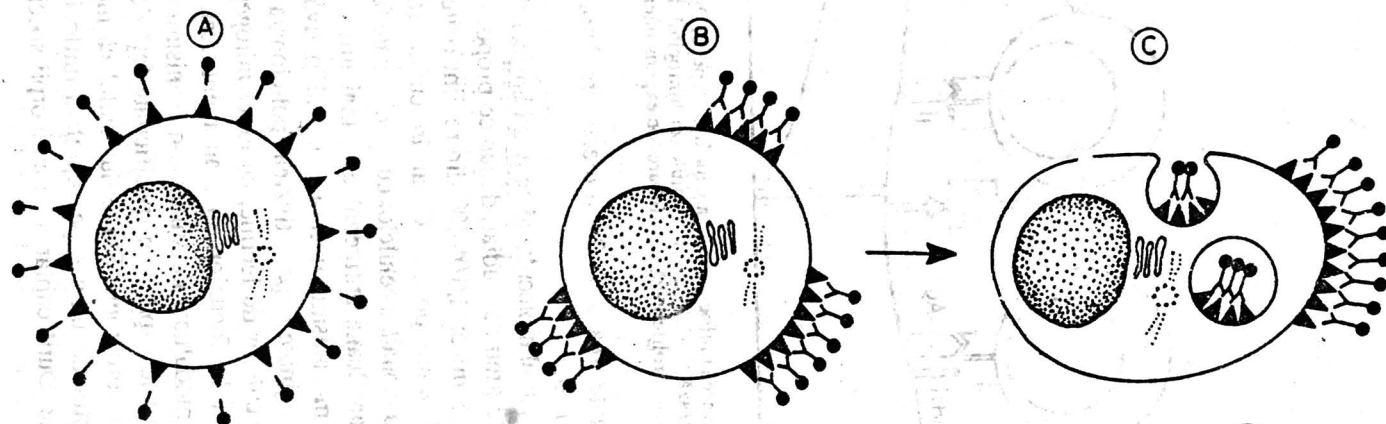


Fig. 47. Rolul anticorpilor bivalenți în inducția modificării distribuției imunoglobulinelor-receptor pe suprafața limfocitelor B. A. Distribuția uniformă a imunoglobulinelor-receptor, evidențiată prin marcarea cu fragmente Fab monovalente. B. Anticorpii bivalenți interconectează moleculele de antigen (Ig-receptor) și le grupează în „petice”, chiar în celulele metabolice inactive. C. În celulele metabolice active, la 20–37°, „peticele” se grupează și formează o „bonetă” polară, urmată de pinocitoză (după Raff, 1976).

moleculele receptor se grupează în zone discontinue („petice”) și ulterior confluează într-o regiune delimitată a membranei denumită „bonetă” (fenomenul de „capping”). Moleculele receptor astfel grupate sunt eliberate în mediul extracelular sau sunt endocitate. Legarea încrucișată a moleculelor de suprafață declanșează procesul activării celulelor B.

Antigenele timoindpendente ar activa celulele B după un mecanism similar. Ele au epitopi repetitivi care leagă simultan mai mulți receptori de antigen de pe suprafața membranei și realizează punți moleculare între moleculele receptoare. Consecutiv legării antigenului, se declanșează un semnal care se transmite celulei și inițiază proliferarea sa.

Cooperări limfocitare în timpul elaborării răspunsului imun

De cele mai multe ori, sinteza anticorpilor este rezultatul interacțiunilor stimulatorie ale limfocitelor B cu limfocitele T_H . Cooperarea celulară este impusă de natura antigenelor, de complexitatea lor moleculară, de existența epitopilor conformaționali și secvențiali etc. Din punct de vedere funcțional, antigenele sunt *timo-independente* și *timo-dependente*. Cele două tipuri de antigene sunt recunoscute, probabil, de subpopulații distincte de limfocite B, care se activează prin mecanisme moleculare diferite.

Antigenele *timo-independente* sunt molecule mari, neproteice (de exemplu, polizaharidul capsular de pneumococ, ficolul – polimer de sucroză, dextran-sulfatul, lipopolizaharidele bacteriilor Gram negative), cu epitopi repetitivi. Limfocitele B recunosc direct această categorie de antigene și se activează, fără să necesite cooperarea limfocitelor T. Stimularea limfocitelor B pare a fi determinată de legarea multivalentă a acestor antigene, de moleculele de imunoglobulină

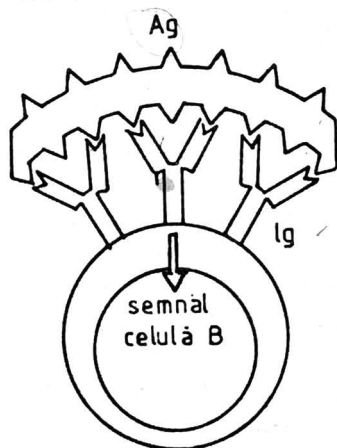


Fig. 48. Antigenele timo-independente stimulează direct limfocitele B, fără să necesite cooperarea celulelor T. Ele au epitopi repetitivi și stabilesc punți de legătură între receptori imunoglobulinici. Se declanșează un semnal activator al proliferării și diferențierii limfocitelor B.

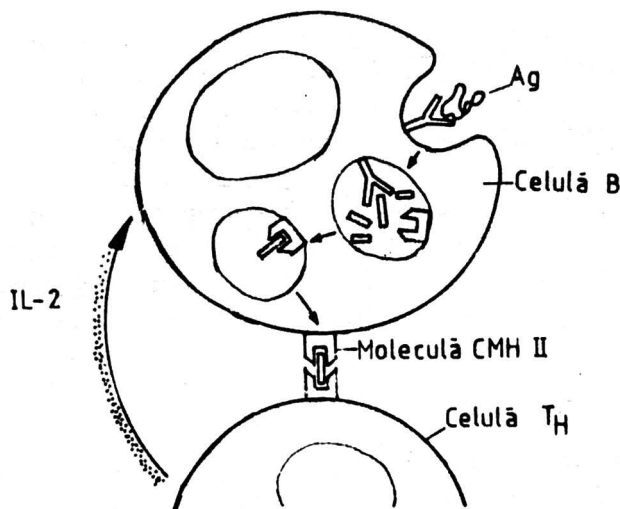


Fig. 49. Antigenele exogene solubile pot fi recunoscute și prezentate de limfocitele B, în asociație cu moleculele CMH II. Limfocitul T_H activat specific sintetizează IL-2, cu efect stimulator asupra proliferării limfocitelor B.

de pe suprafața unei celule B. Legarea încrucișată a receptorilor și formarea unor punți intermoleculare declanșază semnalul activator care se transmite nucleului. Limfocitul proliferază și se diferențiază spre plasmocit. Antigenele polizaharidice activează și alte clone celulare (activare *policlonală*), care nu au receptori specifici pentru epitopii lor.

Limfocitele T_H nu răspund la antigenele polizaharidice, deoarece acestea sunt molecule rezistente la procesele degradative (celulele nu au echipamentul enzimatic necesar). Fragmentele moleculare polizaharidice, eventual rezultate au afinitate mică față de proteine și din această cauză nu se asociază cu moleculele CMH II.

Cele mai multe antigene solubile sunt *timodependente* (în special cele de natură proteică). Pentru inițierea RIMH față de aceste antigene este necesară cooperarea limfocitelor T_H și B, supusă restricției CMH.

Modelul cel mai acceptat al cooperării limfocitelor T și B este acela al cooperării directe, ca răspuns la antigene *solubile*, când ambele tipuri de limfocite recunosc același tip de epitop al unei molecule. Celula B leagă specific antigenul prin receptorii imunoglobulinici de membrană și îl încorporează sub forma complexului antigen-anticorp. De aceea, limfocitele B sunt foarte eficiente în procesul captării și prezentării unui antigen, administrat în concentrație foarte mică (de 1 000 de ori mai mică decât cea necesară prezentării aceluiași antigen de către macrofage sau celulele dendritice). Antigenul este prelucrat de limfocitele B și epitopii sunt prezentați pe suprafața lor în asociație cu moleculele CMH II. Limfocitul T_4 (T_H) recunoaște asociația moleculară epitop-CMH II, prin receptorul

său specific de antigen (RCT) și eliberează IL-2, cu rol de semnal inductor al activării limfocitului B.

De cele mai multe ori, limfocitele T_H și B cooperante recunosc epitopi diferiți ai aceleiași molecule de antigen solubil, *nativ*, neprelucrat de limfocitele B. Limfocitele B recunosc epitopi *conformaționali* ai moleculei proteice, iar celulele T_H recunosc epitopi *secvențiali*, de 10–20 aminoacizi. Cele două celule cooperante aderă una de alta. Celula T_H este stimulată să secrete IL-2, în spațiul intercelular îngust, cu rol declanșator al activității limfocitului B.

Clona de limfocite B, cu receptori specifici pentru epitopii antigenici proliferază. (fenomenul *expansiunii clonale*).

Existența factorului inductor (helper) eliberat de celulele T_H este dovedită experimental: celulele T_H sensibilizate, *in vivo*, față de un antigen și limfocitele B ale unui organism singenic sunt plasate în compartimentele unei camere, despărțite printr-o membrană poroasă, care permite numai schimburi moleculare. Cel puțin în unele situații, limfocitele B se activează sub acțiunea factorilor sintetizați de celulele T_H , ce difuzează prin membrana poroasă separatoare.

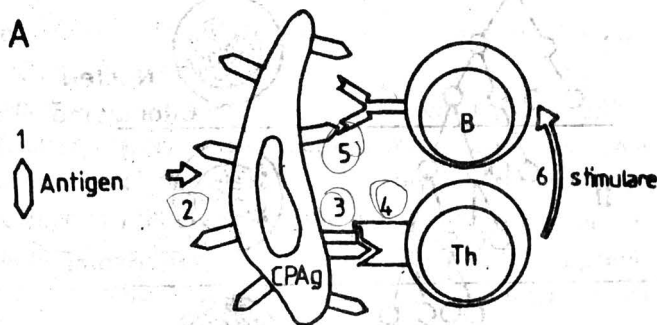
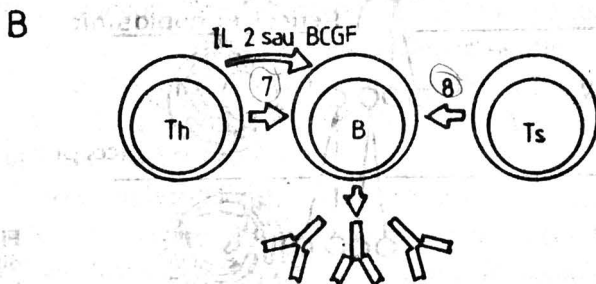


Fig. 50. A. Antigenele corpusculare sunt prelucrate de macrofage și prezentate limfocitelor T_H și B, care au receptori specifici. B. Cooperări celulare reglatoare între limfocitele B, T_H și T_S . 1-antigen; 2-epitopi antigenici liberi pe suprafața macrofagului; 3-epitopi prezentați în asociație cu moleculele CMH II; 4-receptorul de antigen al celulei T_H ; 5-receptorul de antigen al celulei B; 7, 8-intensitatea răspunsului imun este reglată de limfocitele T_H și T_S .



Limfocitele T_H și B cooperează și în cazul în care epitopii pe care-i recunosc sunt diferiți și sunt prezentați în asociație cu moleculele CMH II pe suprafața CPA. Majoritatea antigenelor *solubile* și toate antigenele *corpuseculare* sunt captate și prelucrate de macrofage și de celulele dendritice și sunt prezentate în asociație cu moleculele CMH II.

Epitopii *identici* sau cu specificitate *diferită* sunt recunoscuți de limfocitele B și T_H , prin intermediul receptorilor de antigen. Celulele T_H eliberează cantități mari de *limfokine* (IL-2), cu efect stimulator asupra limfocitelor B. Ele se diferențiază în limfoblaste și plasmocite.

În ser, IgG este de 10 ori mai concentrat decât IgM, ceea ce denotă că, după activare, limfocitele B, deși marea lor majoritate (circa 90%) au ca receptor de antigen molecula de IgM comută sinteza de IgM la sinteza IgG. Unele limfocite ale clonei B în expansiune sintetizează numai molecule de imunoglobulină care rămân asociate membranei citoplasmatică (mIg). În tehnica hemolizei localizate în gel a lui Jerne, aceste celule nu produc plaje de liză. Ele sunt celule de memorie.

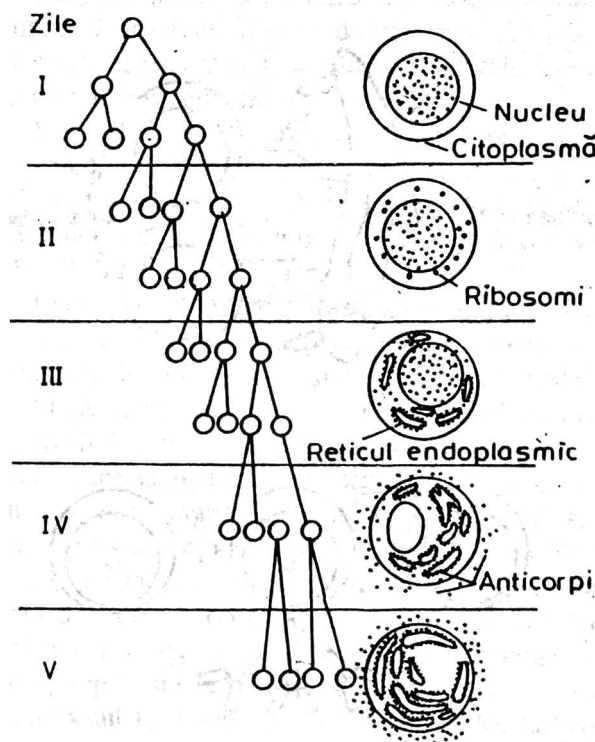


Fig. 51. Stadiile succesive ale diferențierii unui plasmocit matur, după stimularea antigenică (după Nossal, 1969).

Serul normal prezintă o mare diversitate a imunoglobulinelor: circa 10^9 tipuri diferite ale specificității de combinare, cifră mult superioară numărului total al proteinelor structurale, enzimatică și hormonale.

În serul normal, cantitatea totală de imunoglobuline este de 10 mg/ml (circa 5×10^{16} molecule). Înainte de imunizare, anticorpii serici specifici față de un antigen sunt sub nivelul detectabil prin metodele clasice.

Anticorpii îndeplinesc următoarele funcții esențiale:

- se combină specific cu antigenele solubile și formează complexe, care sunt ingerate și digerate de macrofage;
- fixează complementul pe suprafața unui antigen celular și efectul este liza (bacterioliza, citoliza).

DINAMICA RĂSPUNSULUI IMUN MEDIAT HUMORAL

Răspunsul imun generat după primul contact al organismului cu antigenul se numește răspuns imun primar. În dinamica sa se disting 3 faze: (1) faza de latență; (2) faza de creștere a titrului anticorpilor; (3) faza de scădere a titrului anticorpilor serici.

Faza de latență este intervalul de timp cuprins între momentul stimulării antigenice și începutul creșterii titrului anticorpilor serici. Durata sa este foarte variabilă, în funcție de natura antigenului (3-4 zile pentru hematiile de berbec, 3 săptămâni pentru toxina difterică), de doza de antigen administrată. Este mai scurtă pentru antigenele corpusculare. Perioada de latență este necesară expansiunii clonale. La contactul primar al sistemului imunitar cu antigenul, în organism există un număr mic de limfocite care vor recunoaște specific antigenul. În această perioadă, clona de limfocite, activată specific va prolifera intens (circa 8 generații de celule) și va produce o populație de celule, numeric corespunzătoare reacției de apărare.

Faza de creștere a titrului anticorpilor serici începe la sfârșitul perioadei de latență. Titrul anticorpilor crește cu o rată exponențială. Durata sa este foarte variabilă: față de hematiile de berbec, titrul maxim al anticorpilor este la 4-5 zile, iar al anticorpilor anti-toxină difterică, la 3 luni. Titrul rămâne maxim (în platou) câteva zile, după care începe să scadă.

Faza de scădere a titrului anticorpilor începe curând după ce a atins valoarea maximă. Rata scăderii depinde de rata sintezei, de rata degradării anticorpilor, dar și de cantitatea de antigen disponibil, care leagă anticorpii în complexe, determinând scăderea titrului lor. IgG se degradează în proporție de 7%/zi,

IgA-25%/zi, iar IgM-18%/zi. La 30-40 de zile, titrul anticorpilor poate deveni nedetectabil.

În perioada de debut a răspunsului imun primar se sintetizează IgM. După 6-7 zile se detectează IgG, care atinge un titru mai înalt decât IgM. IgM începe să scadă mai înainte ca titrul IgG să atingă nivelul maxim.

Răspunsul imun are caracter adaptativ și se caracterizează prin 3 trăsături esențiale (care lipsesc reacțiilor de apărare înăscută): 1) specificitatea (anticorpul se combină cu antigenul inductor); 2) diversitatea izotipică și a situsului de combinare; 3) memoria (experiența contactului cu antigenul este păstrată de celule speciale).

Diversitatea. Moleculele de anticorpi sunt foarte heterogene din punctul de vedere al izotipului (IgM, IgG, IgA și chiar IgE). IgM dispăre relativ repede, dar IgG și IgA persistă la concentrații scăzute, nedetectabile cu metodele obișnuite, perioade variabile (săptămâni, ani). Heterogenitatea anticorpilor generată de specificitatea lor de legare cu diferiți epitopi ai antigenului inductor este mai accentuată și este funcția situsului de combinare.

Anticorpul răspunsului imun primar (IgM și IgG), în general au afinitate slabă, dar aviditatea lor este mare.

Afinitatea anticorpilor măsoară forța de legare dintre un epitop și situsul de combinare al anticorpului specific. Afinitatea este rezultatul forțelor de atracție (legături de H, forțe van der Waals, electrostatice și legături hidrofobe) dintre cele două grupări reactante.

Aviditatea măsoară forța rezultantă a afinității dintre epitopi și paratopi și este consecința faptului că cele mai multe antigene sunt mozaicuri de epitopi.

RĂSPUNSUL IMUN SECUNDAR

Răspunsul imun secundar este expresia memoriei imunologice, care definește capacitatea unui organism de a elabora un răspuns imun mai eficient (mai rapid și, în special, mai intens), după al II-lea contact cu antigenul. Răspunsul imun secundar este indus de antigenele timodependente și are ca trăsătură esențială, maturarea de afinitate a anticorpilor, comparativ cu afinitatea celor sintetizați în răspunsul imun primar.

Răspunsul imun secundar față de antigenele timoindependente este comparabil cu răspunsul imun primar: cantitatea de anticorpi nu crește semnificativ, este sintetizat predominant izotipul IgM, nu se produce comutarea sintezei la anticorpi din clasa IgG, iar memoria imună este slab exprimată.

Titul Ig (scala \log_{10})

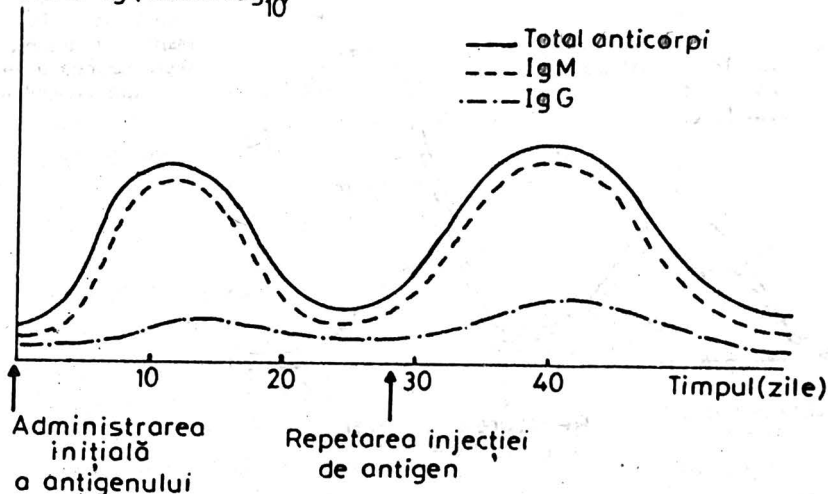


Fig. 52. Dinamica apariției diferitelor clase de imunoglobuline, în cursul răspunsului imun primar și secundar, față de antigenele timoindpendente.

Răspunsul imun secundar față de antigenele timodependente se caracterizează printr-o perioadă de latență mai scurtă. Titul anticorpilor crește rapid, cu un maxim mult mai ridicat decât în răspunsul imun primar.

Doza de antigen inductoare a răspunsului imun secundar este mult mai mică, iar timpul de dublare a titlului anticorpilor este de ordinul orelor. Inițial se sintetizează IgM, fără o perioadă de latență evidentă. Sinteza IgG este deasemenia accelerată. Titlul urcă la valori de câteva ori mai înalte decât în răspunsul imun primar și rămâne ridicat o perioadă mult mai lungă de timp.

Maturarea afinității anticorpilor în răspunsul imun secundar este o trăsătură esențială a răspunsului anamnestic. Fenomenul se explică prin faptul că, pe parcursul diferențierii proliferative a limfocitelor B, de regulă, se schimbă izotipul imunoglobulinelor de suprafață, prin comutarea tipului de lanț H pe care îl exprimă, dar niciodată nu se schimbă specificitatea față de antigen. Comutarea constă în trecerea de la sinteza IgM în răspunsul imun primar, la sinteza altor izotopuri (în special IgG) în răspunsul imun secundar. Mecanismul molecular al comutării îl constituie modalitatea diferită de înădrire a ARNm a segmentelor genice, V, D, J, cu ARNm al uneia din cele câteva gene care codifică regiunile constante ale claselor și subclasselor lanțurilor H.

Sinteza anticorpilor cu afinitate înaltă are două consecințe practice:

- complexele antigen-anticorp sunt greu disociabile;
- anticorpii reacționează încrucișat, cu antigene înrudite. În acest sens, imunizările cu antigene înrudite (dar nu identice) pot avea efecte neașteptate. De exemplu, indivizii adulți vaccinați cu virus gripal, pot să producă, paradoxal,

Titrul Ig (scala log₁₀)

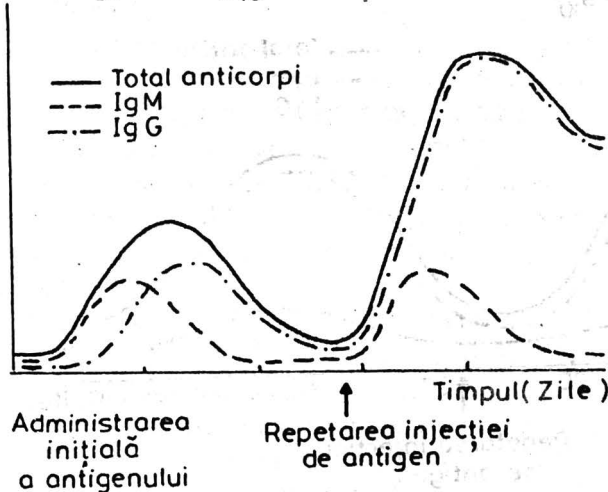


Fig. 53. Dinamica apariției diferitelor clase de imunoglobuline, în cursul răspunsului imun primar și secundar, față de antigene timodependente.

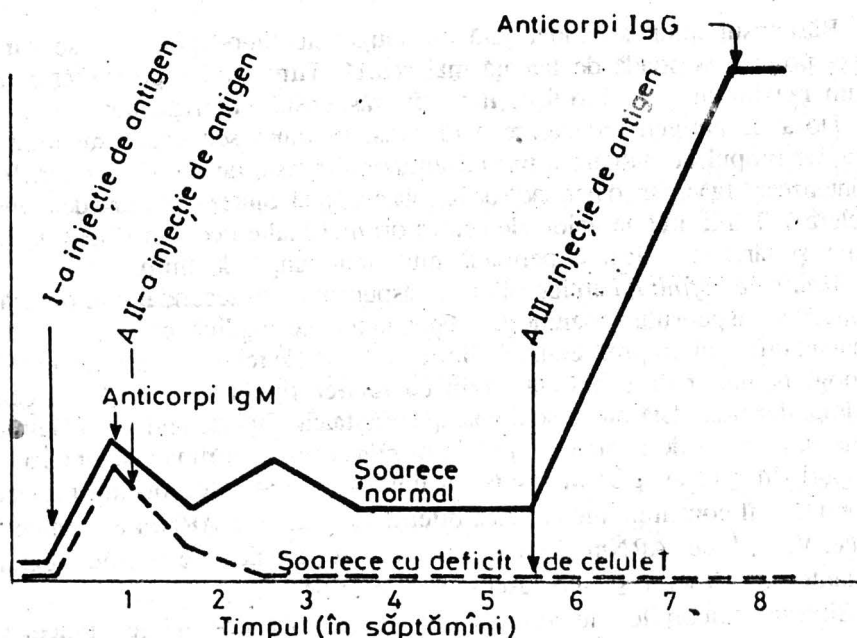


Fig. 54. Reprezentarea schematică a răspunsului imun la șoarecele normal, sau cu deficit al limfocitelor T, după injectarea unui antigen peptidic sintetic. Răspunsul imun primar (cu producere de IgM) este relativ independent de celulele T. Răspunsul imun secundar, caracterizat prin sinteza IgG este dependent de limfocitele T.

mai puțini anticorpi față de antigenul viral utilizat în vaccinare, decât anticorpi față de tulpina de virus care a produs o infecție la vârsta copilăriei. Acesta este fenomenul („amintirii păcatului original”) și stă la baza studiilor epidemiologice retrospective, pentru precizarea serotipului unui virus sau microorganism care a declanșat epidemii trecute. Explicația constă în faptul că prima imunizare generează celule cu memorie față de mai multe specificități antigenice. La reîntâlnirea cu un antigen înrudit este stimulată o populație de celule care recunoaște determinanți antigenici comuni. Se sintetizează anticorpi care se combină cu ambele variante antigenice, deși uneori, anticorpii față de epitopii celui de la II-lea antigen pot să lipsească.

Cantitatea de anticorpi sintetizați în cursul răspunsului imun este dependentă de calea de administrare a antigenului, de doză, de ritmul și modul de administrare și de factorii genetici ai organismului.

Calea *parentală* de administrare este avantajoasă pentru contactul rapid dintre antigen și celulele imunocompetente din ganglionii limfatici regionali, după administrarea intradermică, subcutanată și intramusculară, sau cu cele din splină, după injectarea intravenoasă. Răspunsul imun este de mică intensitate după injectarea intravenoasă, datorită eliminării rapide a antigenului. Injectarea subcutanată sau intramusculară este mai eficientă, deoarece eliminarea antigenului este mai lentă și prelucrarea sa de către celulele specializate este mai îndelungată. Cea mai eficientă cale de administrare a antigenului este cea *intradermică*, pentru că persistența sa în depozitul inițial este de lungă durată și la locul injectării se acumulează celule implicate în elaborarea răspunsului imun. Există posibilitatea, chiar a producerii locale (in situ) a anticorpilor.

Intensitatea răspunsului imun este dependentă de legea *dozelor repetate* și a *intervalurilor*. Administrarea aceleiași doze de antigen, în mod fracționat și la intervale adecvate de timp este mult mai eficientă decât administrarea dozei unice, deoarece fiecare injecție pregătește organismul făcându-l mai reactiv față de doza următoare.

Doza de antigen influențează nivelul afinității anticorpilor. Dozele mari de antigen induc o maturare insuficientă a afinității, în raport cu dozele mici. Explicația: numai celulele B cu receptori de înaltă afinitate leagă antigenul în doză mică și se diferențiază proliferativ, în timp ce dozele mari de antigen produc o activare simultană a limfocitelor B de înaltă și de joasă afinitate.

Pentru fiecare antigen se stabilește *schema proprie* de administrare (doza, numărul de administrări, intervalul, calea de administrare, adjuvantul). Pentru antigenele corpusculare, administrările se fac, în general, la 7 zile, iar pentru cele solubile (macromoleculare), la 14–21 zile.

Uneori, a II-a injectare, foarte apropiată de prima, poate fi inoperantă, deoarece antigenul este eliminat de anticorpii sintetizați după stimularea primară. Unul din cele mai bune protocoale pentru a obține un răspuns imun secundar optim constă în injectarea unei doze mici de antigen, urmată de doze progresiv crescând.

Factorii genetici sunt esențiali în ceea ce privește capacitatea de răspuns imun a organismului. Există posibilitatea ca organisme ale unor linii genetice diferite, sau ale unor specii diferite, să inducă sinteza anticorpilor față de epitopi diferiți ai aceluiași antigen. Antigenele naturale conțin mozaicuri de epitopi și organismele reacționează la unii determinanți, răspund mai greu sau îi ignoră pe alții. Alteori, o substanță poate să fie antigenică pentru unele specii, dar neantigenică pentru altele. De exemplu, polizaharidul capsular de pneumococ, înalt purificat este imunogen pentru om și șoarece și neimunogen pentru cobai și iepure, care răspund numai după injectarea celulelor bacteriene întregi.

Deoarece o substanță poate avea valoare antigenică diferită pentru indivizii aceleiași specii, serurile imune nu sunt reactivi standardizați.

Stimularca nespecifică a limfocitelor B. Proliferarea limfocitelor B este indusă nu numai de antigenul specific, ci de orice ligand care leagă încrucișat receptori de antigen și formează punți intermoleculare. Legarea încrucișată a imunoglobulinelor de suprafață este semnalul pentru proliferare, dar nu și pentru diferențierea lor în plasmocite.

Stimularca limfocitelor B este, uneori rezultatul activării receptorilor neimunoglobulinici de suprafață. Astfel, virusul Epstein-Barr și endotoxinele bacteriilor Gram negative stimulează diviziunea policlonală a limfocitelor B și diferențierea lor la plasmocite. Semnificația fiziologică a activării policlonale nu este clară. Se secretă anticorpi a căror specificitate nu este totdeauna complementară agentului inductor. De exemplu, limfocitele B umane stimulate de virusul Epstein-Barr secretă anticorpi care se combină cu fosforil-colina, o moleculă absentă în structura virionilor, dar prezentă în peretele celular de Streptococcus pneumoniae. Activarea policlonală a limfocitelor B este importantă atât în fazele timpurii ale infecției, cât și în inducerea variatelor fenomene autoimune.

Anticorpii naturali sunt cei cu specificitate față de antigene cunoscute, dar s-au sintetizat în afara oricărui proces de imunizare. De exemplu, în serul de șoarece există anticorpi anti-hematie de berbec. Sinteza anticorpilor naturali este consecința faptului că organismele, postnatal, sunt supuse stimulărilor antigenice multiple, cu antigene virale, bacteriene, fungice și alimentare, care pătrund pe calea mucoaselor digestive și respiratorii. Ele au rol stimulator asupra diferențierii limfocitelor B din formațiunile limfoide asociate tractului digestiv și respirator. Deși se sintetizează după stimulări cu doze antigenice mici, surprinzător, afinitatea

lor este inferioară celei a anticorpilor secretați după imunizare. Anticorpilor naturali reacționează cu mai multe antigene.

APLICAȚII PRACTICE ALE ANTICORPILOR

Cea mai largă utilizare (în perioada 1920–'40) a serurilor imune a constituit-o domeniul *seroterapiei* (terapia de urgență a unor infecții grave septicemice, în infecțiile difterice, scarlatinoase, tetanice, rabice). Dezavantajul este că serurile imune conțin și toate celelalte proteine serice, care sunt imunogene și după injectare induc răspunsul imun al organismului receptor de ser, cu manifestări patologice (boala serului).

Anticorpii se folosesc într-o varietate largă de tehnici și metodologii de diagnostic imunologic. Utilizarea lor depinde de posibilitatea de a-i produce pe iepure, capră, berbec, cal;

– în determinările fine a unor cantități mici de antigene (tehnicele ELISA, RIA);

– pentru purificarea proteinelor prin cromatografia de afinitate;
– pentru identificarea unor medicamente în ser și urină;
– pentru detoxificarea organismului de droguri (eliminarea digoxinei, în cazul intoxicației).

Biosinteza imunoglobulinelor

Sediul sintezei imunoglobulinelor este plasmocitul. Limfocitele sintetizează și ele 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 un singur de tip de imunoglobuline (circa 10000 de molecule/secundă).

Catenele polipeptidice H și L se sintetizează separat, pe polisomi de dimensiuni diferite, atașați pe reticulul endoplasmic granular. Mărimea polisomilor este proporțională cu lungimea lanțului polipeptidic pe care îl 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, sunt precipitați, *in vitro*, de serul imun anti H.

Cele două catene se sintetizează ca precursori mai mari, cu o secvență N-terminală de circa 20 aminoacizi (secvența leader), clivată în timpul transferului în lumenul cisternei reticulului endoplasmic.

Cele două tipuri de catene se sintetizează ca unități de sine stătătoare și ulterior se asamblează pentru a forma o structură tetracatenară.

Moleculele de imunoglobulină sintetizate se acumulează în cistemele reticulului endoplasmic granular și sunt transferate în cistemele Golgi. La acest nivel are loc formarea legăturilor S-S și glicozilarea. Compoziția componentei glucidice este variabilă, dar ca structură de bază este reprezentată de N-acetil-glucozamină, manoză, galactoză, fucoză, acid sialic. Legarea primelor două monozaharide începe în momentul în care catena H este încă atașată de polisom. Catena polizaharidică se alungește progresiv, pe măsură ce proteina se deplasează în cistemele Golgi. Moleculele de anticorpi părăsesc aparatul Golgi în vezicule secretorii, care fuzionează cu suprafața membranei și eliberează conținutul la exterior.

Legarea carbohidraților este indispensabilă pentru secreția moleculei de imunoglobulină.

Moleculele de IgA și IgM prezintă forme polimerizate. Asocierea monomerilor este catalizată de lanțul J. Polimerizarea are loc concomitent cu secreția. În citoplasmă nu se găsesc molecule polimerizate.

REGLAREA SINTEZEI IMUNOGLOBULINELOR

În celulele care sintetizează imunoglobuline destinate secreției, catenele L se găsesc în mic exces. Pentru fiecare din cele două tipuri de catene, există un număr egal de molecule de ARN, dar catena L se sintetizează de două ori mai repede decât catena H, având dimensiuni mai mici.

În stările patologice, rata sintezei celor două catene este dezechilibrată: în mielomul Bence-Jones, catenele L se sintetizează în mare exces; în mielomul lanțurilor grele sunt produse exclusiv catene H, dar cu deleții de mărime variabilă ale diferitelor domenii moleculare.

Reglarea sintezei anticorpilor este necunoscută. Sinteza anticorpilor IgM este inhibată de anticorpii IgG. Astfel este prevenită sinteza anticorpilor anti-Rh, prin administrarea IgG anti-D, persoanelor care prezintă riscul de a produce un nivel crescut de IgM anti Rh. Explicația inhibiției sintezei IgM prin IgG ar fi blocarea epitopilor antigenici, care nu ar mai fi astfel disponibili pentru a produce stimularea limfocitelor.

Rolul rețelei idiotipice în reglarea răspunsului imun. Răspunsul imun evoluează pe două direcții esențiale:

(1) Sinteza anticorpilor complementari față de antigenul inductor, a căror acțiune este legarea și neutralizarea antigenului;

(2) Sinteza unor molecule care se combină specific cu receptorii limfocitelor și îi blochează, inhibând funcția lor și stopând răspunsul imun. Aceste molecule au rol esențial în reglarea răspunsului imun.

Organizarea sistemului imunitar într-o rețea complexă de celule și molecule, aflate în interacțiuni strânse este esențială pentru înțelegerea orientării răspunsului imun, inițial în sensul eliminării antigenului, iar ulterior pentru limitarea răspunsului imun.

Factorul cheie al teoriei rețelei idiotipice este că anticorpul produce într-un răspuns imun poartă la rândul lor, determinanți antigenici noi, pe care organismul îi recunoaște ca nonself. Acești determinanți se numesc idiotopi și sunt localizați în jurul situsului de combinare al anticorpului. Setul de idiotopi al unei molecule individuale de anticorp formează idiotipul celui anticorp.

-Teoria rețelei idiotipice a lui Jerne pornește de la ideea că răspunsul imun față de un antigen se desfășoară în etape succesive. Faptul fundamental pentru această teorie este acela că organismul gazdă recunoaște ca străin idiotipul anticorpilor formați ca răspuns la pătrunderea unui antigen. Idiotopii prezenți pe anticorpul sintetizat în prima fază a unui răspuns imun se comportă ca antigene și declanșează un răspuns imun secundar, cu producerea de anticorpi anti-anticorpi din faza I a răspunsului imun. Anticorpul din faza a II-a se numește anticorp anti-idiotip. Dar și aceștia la rândul lor au un set de idiotopi proprii care se comportă ca antigene și induc sinteza anticorpilor din faza a III-a ș.a.m.d. Ca într-o sală de oglinzi, procesul de recunoaștere și sinteză se poate repeta continuu. Anticorpul produs într-o astfel de cascadă a răspunsului imun sunt legați într-o rețea de interacțiuni specifice care pot să implice întregul sistem imunitar. Anticorpul anti-idiotipic sunt forța reglatoare cheie a sistemului imunitar.

Anticorpul din prima undă are un situs de combinare complementar față de epitopul antigenic. Acești anticorpi sunt negativul epitopului și poartă imaginea sa internă. Anticorpul din faza a II-a (anticorp anti-idiotip) are un situs de combinare identic cu epitopul antigenic și poartă imaginea externă a acestuia. Anticorpul din unda (generația) a III-a vor fi din nou negativul antigenului.

În acord cu această concepție, imunizarea declanșează o cascadă de procese de sinteză, în care moleculele idiotipurilor succesive se recunosc reciproc și funcționează ca pînte pentru semnalele de reglare.

După imunizare, are loc o creștere masivă a anticorpilor specifici în sânge și, ca urmare, o creștere a idiotipurilor lor caracteristice. La rândul lor, aceste molecule idiotipice stimulează un răspuns anti-idiotipic, care limitează primul răspuns imun și readuce sistemul imunitar la starea de echilibru.

CATABOLISMUL IMUNOGLOBULINELOR

Catabolismul imunoglobulinelor este studiat cu ajutorul moleculelor marcate cu I^{125} sau I^{131} . Primul are timp de înjumătățire de 57 zile, iar al II-lea, de 8 zile. Iodul radioactiv este cuplat cu nucleul aromatic al tirozinei, sub acțiunea unor agenți oxidanți: H_2O_2 , cloramina T, în condiții blânde, care măresc șansa ca molecula de imunoglobulină marcată, să rămână identică din punct de vedere structural și metabolic, cu cea nativă și pe această cale să se aprecieze că scăderea radioactivității în sânge reflectă catabolizarea reală a proteinei. Catabolizarea imunoglobulinei este o reacție de ordinul I, adică din molecula nativă rezultă produși de catabolism.

Cantitatea de imunoglobulină catabolizată (dIg) într-un interval de timp dat (dt) este direct proporțională cu concentrația moleculelor în sânge, conform relației: $dIg/dt = kIg$ (k reprezintă rata catabolizării imunoglobulinelor, adică fracția de molecule, din cea totală, catabolizată în unitatea de timp, de obicei în 24 ore).

Rata de catabolizare și deci timpul de înjumătățire al imunoglobulinelor sunt cu atât mai mari cu cât concentrația lor este mai mare.

Pentru calculul ratei de catabolizare a imunoglobulinelor este suficient să se determine timpul de înjumătățire a radioactivității. Prin această metodă, la un individ normal, timpul de înjumătățire este de 22 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 capteze prin pinocitoză. Deoarece aceste celule au 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. Moleculele fixate pe receptori sunt protejate față de procesele degradative și părăsesc celula, revenind în circulație, în timp ce moleculele care au fost pinocitate nespecific (fără legarea prealabilă de receptori) sunt degradate. Ipoteza explică dependența ratei de catabolizare a imunoglobulinelor, de concentrație. La concentrații serice scăzute, majoritatea moleculelor de imunoglobuline sunt înglobate în celule, după asocierea lor cu

receptorii protectori și astfel se reîntorc intacte în circulație. Așa se explică faptul că, în hipogamaglobulinemie, timpul de înjumătățire este mare. La concentrații ridicate de imunoglobuline serice (mielom), numai o proporție mică de molecule (un număr egal cu numărul de receptori) este protejată, restul fiind degradate, ceea ce determină o scurtare a timpului de înjumătățire. Ipoteza explică transportul placentar și intestinal neonatal al IgG.

A II-a ipoteză sugerează că procesul catabolic este inițiat numai după ce molecula de imunoglobulină a suferit o modificare conformațională a regiunii Fc. Moleculele modificate, probabil prin uzură metabolică se fixează prin regiunea Fc de membrana leucocitelor PMN, a macrofagelor (în special hepatice și splenice) și sunt încorporate prin micropinocitoză. În vezicule 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 încorporate în celule și degradate parțial sau total. Hotărâtor în procesul catabolizării imunoglobulinelor este tranziția de conformație de la forma nativă la cea modificată. În sprijinul acestei ipoteze vin experiențele care atestă existența receptorilor pentru Fc de pe suprafața macrofagelor, capabili să fixeze numai moleculele care au suferit modificări ale regiunii Fc. Se pare însă, că receptorul celular implicat în catabolizarea imunoglobulinelor modificate este diferit de receptorul clasic pentru regiunea Fc a moleculelor intacte.

IMUNITATEA MEDIATĂ CELULAR

Răspunsul imun mediat celular s-a evidențiat înainte de descoperirea diferențelor funcționale dintre limfocitele T și B. S-a remarcat că unele antigene induc reacții inflamatorii, a căror intensitate nu este corelată cu nivelul anticorpilor serici, iar reacțiile de hipersensibilitate întârziată, ca manifestare directă a răspunsului imun mediat celular pot fi produse la indivizi la care anticorpii lipsesc. Reactivitatea imună mediată celular este transferabilă cu limfocitele.

Imunitatea mediată celular îndeplinește următoarele funcții:

- protecția față de infecțiile bacteriene cu localizare intracelulară, fungice, virale și cu protozoare;
- rezistența față de multe tipuri de celule tumorale;
- procesele inflamatorii asociate cu diferite procese infecțioase;
- respingerea alogrefelor.

În toate aceste cazuri, reacția imună mediată celular este consecutivă recunoașterii unei structuri antigenice, pe suprafața unei celule țintă, de către

limfocitul $T CD_4+$ sau $T CD_8+$. În general, limfocitele $T CD_4+$ recunosc antigenele solubile (fragmente peptidice), prezentate pe suprafața celulelor specializate, în asociație cu moleculele CMH II. Limfocitele $T CD_4+$ se activează (sub acțiunea IL-1 și IL-6) și secretă limfokine (interferon γ) prin intermediul cărora activează macrofagele, care la rândul lor sunt mediatorii principali ai reacției inflamatorii.

Limfocitele $T CD_8+$ recunosc antigenele prezentate pe suprafața celulelor țintă, în asociație cu moleculele CMH I. Nu sunt activate de antigene solubile. Aceste limfocite sunt citotoxice (LCT). Au dimensiuni mici și atacă celulele gazdă și singeneice infectate cu virusuri sau malignizate (*in vivo* și *in vitro*), dar și transplantele alogene sau xenogene. *In vitro*, aceste celule au o mobilitate deosebită. La contactul cu o celulă străină, mobilitatea se accentuează și întreaga suprafață a celulei țintă este explorată, în câteva minute, pentru detectarea antigenelor pe care LCT le recunoaște prin intermediul receptorului pentru antigen (RCT). Dacă antigenul este recunoscut, LCT se activează și eliberează componente citotoxice. Apoi se deplasează mai departe, pentru a explora alte celule, iar celula victimă se dezintegrează câteva minute mai târziu. LCT repetă procesul lizei de mai multe ori. Procesul de recunoaștere a antigenului este limitat (restrictiv) de identitatea moleculelor CMH I.

În spațiul îngust al joncțiunii cu celula țintă, LCT elimină o proteină citolitică, denumită perforină, serin-proteaze, proteoglicani, limfotoxină. Proteina citolitică cauzează liza rapidă a celulei țintă, iar proteinele citotoxice acționează lent.

LCT rezistă acțiunii litice a proteinelor proprii. Pentru liza unei celule țintă, LCT eliberează circa 10% din conținutul său toxic.

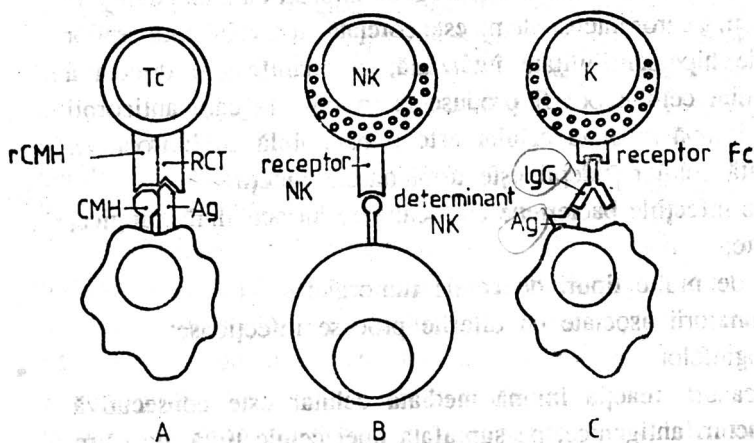


Fig. 55. Citotoxicitatea mediată celular, *in vivo* este consecința acțiunii a 3 tipuri de celule. A. Celulele T_c recunosc celula țintă, prin determinanți antigenici exprimați în asociație cu moleculele CMH I. B. Celulele (NK) recunosc determinanți exprimați pe celulele maligne fără restricția moleculelor CMH I. C. Celulele (K) recunosc segmentul Fc al moleculelor de IgG, fixat pe determinanți antigenici ai membranei celulei țintă (după Roitt și colab. 1985).

LCT se evidențiază *in vitro*, în reacția limfocitară mixtă (RLM), uni- sau bidirecțională. Limfocitele organismului A se cultivă în amestec cu limfocitele organismului B, blocate metabolic (prin tratament cu mitomicină sau iradiere). Sunt păstrate proprietățile stimulante, dar devin neproliferante. În 4-5 zile, limfocitele A, stimulate de limfocitele blocate, proliferază și devin citotoxice.

În RLM bidirecțională, are loc activarea concomitentă a celor două populații de LCT. Raportul numeric este decisiv pentru evoluția interacțiunilor. LCT victimă este supusă atacului concertat al câtorva LCT agresoare și este lizată. Îndepărtarea ionilor de Ca^{2+} cu EDTA, din mediul de cultivare, previne liza celulei victimă. Probabil Ca^{2+} are rol esențial în exocitoza și în activarea perforinei.

Alte celule citotoxice sunt limfocitele granulare mari (LGL = large granular lymphocytes), evidențiate la om și șoarece și care reprezintă 5-10% dintre limfocitele circulante. Ele exercită efecte litice asupra celulelor purtătoare de antigene nonsell, prin două mecanisme:

1) Celulele NK (natural killer) lizează spontan, *in vitro*, o varietate de celule tumorale, într-o interacțiune care nu este limitată (nerestrictivă) de recunoașterea moleculelor CMH I. Imunizarea prealabilă a organismului, cu celulele țintă sensibile nu ridică nivelul citotoxicității nerestrictive CMH și de aceea se numesc ucigașe naturale.

Interacțiunea cu celula țintă se face printr-un receptor cu specificitate nedefinită al celulei NK. Efectul litic este rezultatul acțiunii unui factor, pe care îl transferă în celula țintă, prin contact celular direct. Granulele secretorii conțin componente citotoxice ca și LCT.

Celulele NK pot avea rol important în rezistența naturală a organismului față de celulele tumorale și în distrugerea celulelor infectate cu virusuri învelite, înainte de sinteza anticorpilor și de activarea LCT.

Celulele K (killer) sunt LGL care posedă receptori celulari de înaltă afinitate pentru Fcy. Efectul lor litic asupra celulelor țintă este rezultatul interacțiunii mediată de moleculele IgG. Celulele tumorale sau cele infectate cu virusuri leagă moleculele IgG de suprafața lor, expunând regiunea Fc. Aceasta funcționează ca adaptor, permițând celulei K, prin intermediul receptorilor pentru Fc, să recunoască și să lizeze celulele învelite cu anticorpi. Liza celulei țintă prin intermediul moleculelor de anticorpi, care au rolul de punți moleculare între celula efectoră și celula țintă este cunoscută sub denumirea de citotoxicitate mediată de anticorpi (ADCC = antibody dependent cell cytotoxicity).

Pacienții injectați cu AMC față de antigenele unor celule tumorale (melanom, limfom al celulelor B) evoluează favorabil: se produce distrugerea extensivă a celulelor tumorale, atât prin ADCC cât și prin fixarea C.

O altă categorie de celule cu efect litic sunt cele activate, *in vitro*, de limfokine (LAK = lymphokine activated killer).

Monocitele și chiar unele PMN au activitate litică asupra celulelor purtătoare de antigene nonseli.

Macrofagele activate și monocitele sunt mai mari, exprimă mai intens moleculele CMH II, au lizosomi și conținut lizosomal mai bogat. Ele produc IL-1, TNF (tissue necrosis factor), intermediari reactivi ai oxigenului, colagenază. Factorul de necroză tisular este o proteină citotoxică, cu efect lent (48–72 ore) asupra celulelor sensibile, foarte asemănătoare limfotoxinei produsă LCT activate. Ambele sunt proteine hidrofobe și se leagă cu mare afinitate de aceiași receptori celulari.

Eozinofilele, în mod cert, au rol important în apărarea față de viermii paraziți, prin efecte de citotoxicitate de tip ADCC.

Rolul IMC în apărarea antiinfecțioasă

IMC este foarte eficientă în stoparea infecțiilor cu virusuri și cu alți agenți patogeni care se multiplică intracelular. La copiii cu deficit de sinteză al anticorpilor, infecțiile virale comune (rujeolă, oreion) sunt limitate de IMC.

Liza celulelor infectate cu virusuri se produce înainte de eliberarea virusului matur, LCT oferind astfel un avantaj strategic al apărării, spre deosebire de anticorpi, care oferă un avantaj tactic, prin blocarea infecțiozității virionilor.

LCT oferă avantajul care derivă din natura antigenului pe care îl recunoște: antigenul nucleocapsidic, care nu diferă de la un serotip la altul. Anticorpicii au spectru mai restrâns de acțiune, deoarece sunt specifici pentru una din variantele serotipice ale glicoproteinelor de înveliș.

IMC este principală modalitate de apărare față de microorganismele care se multiplică în celule. De exemplu, *L. monocytogenes* se multiplică în macrofage, pentru că sparge vacuola de fagocitoză. Trece de la o celulă la alta, fără să străbată spațiul extracelular și din această cauză anticorpicii nu au efect protector. Limfocitele T CD₄ recunosc antigenele de *Listeria* pe suprafața macrofagelor. Macrofagele sunt activate prin interacțiune directă, cu păstrarea restricției identității moleculelor CMH II și astfel sunt distruse celulele de *Listeria*. Macrofagul activat poate să lizeze o varietate de microorganisme, celule tumorale, paraziți extracelulari, indiferent de stimulul antigenic activator. Activarea macrofagului

este antigen-specifică (dependentă de celula $T CD_4^+$), dar după activare macrofagul are activitate nespecifică.

Celulele infectate cu *Listeria* pot să fie lizate de LCT, probabil pentru că exprimă antigene de *Listeria* asociate cu moleculele CMH I. Celulele de *Listeria* eliberate nu pot fi distruse de LCT, ci de macrofagele activate.

MEDIATORII MOLECULARI AI REACTIVITĂȚII IMUNITARE

(Limfokine, Interleukine)

Răspunsul imun este controlat prin interacțiuni complexe ale diferitelor tipuri de celule și de produsele de sinteză pe care acestea le secretă. Factorii solubili implicați în reglarea răspunsului imun au primit denumirea inițială de citokine. Citokinele sunt un grup heterogen de molecule proteice a căror activitate se manifestă *in vivo* și *in vitro*, la concentrații foarte scăzute. Fiind foarte active la concentrații foarte mici, au fost denumite imunohormoni (hormoni reglatori ai răspunsului imun), deoarece mecanismul lor de acțiune asupra celulelor țintă este similar cu acela al hormonilor peptidici. Denumirea de „limfokine” derivă din faptul că sunt produse în primul rând de limfocite (pentru moleculele produse de monocite și macrofage se folosește termenul de *monokine*), dar denumirea de interleukine (IL) este mai adecvată, întrucât reflectă rolul lor esențial, acela de a media cooperarea celulelor sistemului imunitar.

Interleukinele sunt peptide hidrosolubile cu rol reglator, produse de limfocite și de alte celule, al căror efect se exercită asupra limfocitelor.

Existența lor *in vivo* s-a recunoscut în 1967, când s-a remarcat că procesele inflamatorii sunt dependente de eliberarea factorilor solubili din celulele T activate și din macrofage, care recrutează alte celule la locul inflamației. Studiul lor a fost impus de faptul că rămăseseră neexplicate modalitățile în care o mulțitudine de celule neconectate anatomic își coordonează activitatea în direcția unui răspuns selectiv față de un antigen. Modul de reglare a sistemului imunitar, misterios până la descoperirea interleukinelor este similar cu al reglării altor organe.

Producerea interleukinelor *in vivo* este dovedită de următoarele fapte:

1) Existența liniilor celulare limfoide a căror creștere *in vitro* este dependentă de IL. Aceste linii celulare se folosesc pentru testarea prezenței IL într-un lichid biologic.

2) Existența clonelor de celule limfoide care produc cantități mari de IL după stimularea cu lectine. Aceste clone constituie o sursă de IL pentru analiza biochimică.

IL sunt produse *in vivo*, după activarea unor celule (limfocite T, monocite, macrofage etc) sub acțiunea antigenelor și a altor factori, *in vitro* în culturi limfocitare mixte, sau după stimularea nespecifică a limfocitelor cu substanțe mitogene (PHA, Con A).

IL își exercită efectul asupra celulelor sensibile după aceleași principii care guvernează acțiunea hormonilor propriu-ziși. Ele acționează direct asupra limfocitelor T, B și a macrofagelor și stimulează proliferarea și diferențierea lor spre celule efectoare: helper, citotoxice, producătoare de anticorpi sau modifică activitatea macrofagelor.

Producerea *in vitro* a IL s-a demonstrat în 1962, prin tehnica incubării celulelor exudatului peritoneal de șoarece în tuburi capilare, în ambianța materialului solubil eliberat de limfocitele sensibilizate după stimularea cu antigenul. Acest factor solubil produs de limfocitele stimulate s-a numit MIF (factorul inhibitor al migrării).

În funcție de efectul lor, limfokinele aparțin următoarelor grupe de activitate:

- a) factori care modifică mobilitatea celulelor
- b) factori care modifică proliferarea celulelor
- c) factori stimulatori ai activității specifice a celulelor
- d) factori care modifică viabilitatea celulelor.

IL-1 este produsă de celule din seria monocit-macrofag, dar și de keratinocitele tegumentare, de celulele endoteliale, gliale, dendritice și NK, sub acțiunea unor stimuli biologici (endotoxinele bacteriilor Gram-negative, exotoxinele și peretele celular al bacteriilor Gram pozitive, zimosanul din peretele levurilor, hemaglutininele unor virusuri, limfocitele T activate, complexe imune, C5a) și nebiologici (particule de siliciu, cristale de urați).

IL-1 este sintetizată ca o moleculă de 35 kD, după prelucrarea căreia rezultă o moleculă de 15 kD. Variantele moleculare de IL-1 (IL-1 α , IL-1 β) se explică prin existența unor factori genetici diferiți, sau a prelucrării diferite după traducerea informației genetice.

IL-1 acționează ca mesager cu spectru larg de acțiune;

– acționează direct asupra hepatocitelor și induce sinteza proteinelor de fază acută (proteina C reactivă), hipozincemie, hipofieremie și prin aceasta, inhibiția creșterii și diviziunii celulelor bacteriene;

– acționează direct asupra hipotalamusului prin stimularea sintezei prostaglandinelor (PG) și produce stare febrilă cu efect antiviral și antibacterian. De aceea, acțiunea monocitelor prin IL-1 asupra SNC poate avea consecințe importante, deoarece activitatea limfocitelor T este stimulată în stările febrile. Aspirina și indometacina blochează calea metabolică a acidului arachidonic, dar

inhibă și activitatea IL-1 asupra hipotalamusului: deci efectele IL-1 sunt modulate de intermediarii căii metabolice a acidului arachidonic;

- asupra cortexului cerebral, IL-1 produce inhibiție (somn) cu unde lente;
- stimulează producerea PGE₂ de către fibroblastele dermice și inhibă sinteza collagenului;

IL-1 β este factorul de activare al osteoclastelor și este implicată în procese patologice cu distrugere tisulară, în maladiile articulare (artrita reumatoidă);

IL-1 β stimulează resorbția osului și cartilajului prin transformarea condrocitelor în condrocite și de aici derivă denumirea de catabolină.

Efectele IL-1 asupra sistemului imunitar:

- stimulează producerea IL-2 de către celulele T și exprimarea receptorilor pentru IL-2

- este factor contrasupresor (inhibă activitatea celulelor Ts);

- stimulează proliferarea celulelor B după contactul lor cu antigenul;

- stimulează activitatea celulelor NK (exprimă permanent receptorul de IL-2;

- intensifică chimiotaxia macrofagelor și stimulează producerea TNF (tumor necrosis factor), stimulează producerea PGE₂. La rândul său PGE₂ inhibă producerea

IL-1, diminuează exprimarea moleculelor CMH II, astfel încât IL-1 ar putea fi un factor de limitare a răspunsului imun;

- intensifică metabolismul oxidativ, capacitatea de fagocitoză, chimiotaxia, producerea de collagenază, stimulând astfel activitatea neutrofililor.

Hormonii corticosteroizi (cu efect antiinflamator și imunosupresor) blochează producerea IL-1.

IL-2 (denumirea veche, TCGF) (T cell growth factor) este principalul hormon implicat în generarea unui răspuns imun eficient. Par a fi 3 surse producătoare de IL-2:

- limfocitele din sângele periferic sau din organele limfoide (splină, tonsile) *in vitro*, după stimularea cu mitogene produc IL-2 detectabilă în supernatant după 72 ore de cultivare. Producția se intensifică în reacția limfocitară mixtă de la câțiva donori;

- liniile celulare T, *in vitro*, după stimulare cu PHA sau Con A;

- liniile celulare T, care produc IL-2 fără să necesite stimularea cu substanțe mitogene;

În absența IL-2 nu este posibil RIMC. IL-2 este principalul hormon reglator al răspunsului imun. Descoperirea sa a permis explicarea fenomenului expansiunii clonale, după următoarea secvență de evenimente:

- antigenul este înglobat, prelucrat și prezentat de CPA (macrofage, celule B) unui număr mic de limfocite T care au receptori specifici și îl recunosc;

– limfocitele T care au recunoscut antigenul, sub acțiunea stimulatoră a IL-1, devin producătoare de IL-2. IL-2 își exercită efectul stimulator asupra celulelor producătoare (bucă autocrină). Acestea răspund prin proliferare și exprimarea intensă a receptorilor de IL-2 pe suprafața lor. Astfel se produce expansiunea clonei celulare care a recunoscut stimulul antigenic. IL-2 este produsă în câteva ore de la stimularea antigenică.

Clonarea genei pentru sinteza IL-2 a permis obținerea unei cantități suficiente de IL-2 în stare cristalizată. Este o proteină de 15,4 kD și conține resturi de sialil și glicozil.

Gena pentru sinteza receptorului IL-2 a fost deasemenea clonată. Receptorul IL-2 este format din două lanțuri proteice, unul de 55 kD, iar celălalt de 75kD. Receptorul are mare afinitate pentru IL-2. După stimularea antigenică primară receptorul de IL-2 este exprimat temporar. După a II-a expunere la antigen este exprimat permanent, cu o densitate înaltă. Rezultă că amplitudinea răspunsului imun este limitată de disponibilitatea receptorilor de IL-2. IL-2 este o moleculă efectoră nespecifică în privința originii sale dar acțiunea ei este

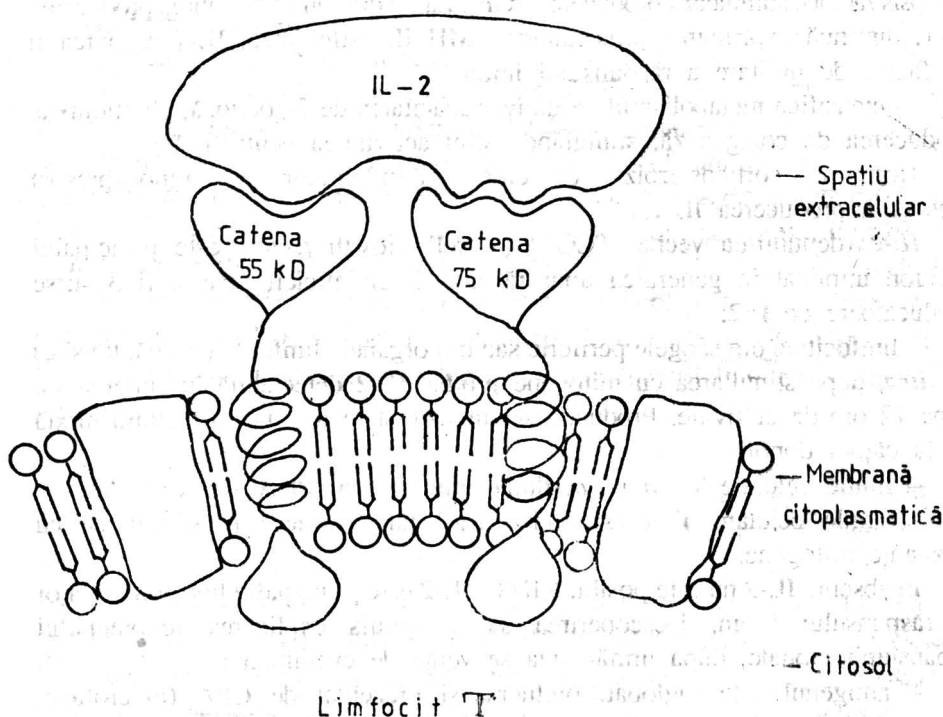


Fig. 56. Reprezentare schematică a interacțiunii IL-2, cu receptorul său membranal.

specifică pentru că produce expansiunea clonei care a recunoscut specific antigenul. Toate cele 3 seturi de celule (T_H , Tc, Ts) proliferază în prezența IL-2 și își sintetizează receptori pentru IL-2.

Receptorul de IL-2 funcționează ca un întrerupător start-stop. IL-2 interacționează cu lanțul de 55 kD și apoi se leagă cu proteina de 75 kD și produce efectul activator. Interacțiunea este strânsă și de aceea, disocierea este lentă. După disociere, activarea limfocitară încetează.

IL-2 joacă rol esențial în reglarea primelor evenimente ale răspunsului imun.

IL-3 stimulează proliferarea și maturarea mastocitelor.

IL-3, IL-4 și IL-5 sunt secretate de limfocitele T_H -2 (cele care stimulează limfocitele B în elaborarea răspunsului imun), în timp ce limfocitele T_H -1 sintetizează IL-2. IL-4 și IL-5 stimulează producerea de Ig E de 100-1000 de ori față de normal și de IgG₄ de circa 20 de ori, în populațiile de celule B stimulate policlonal.

IL-5 stimulează sinteza IgA.

IL-6 este secretată de macrofage. La rândul ei, IL-6 stimulează hepatocitele să secrete o proteină care se leagă cu mare afinitate de resturile manoză ale polizaharidelor și glicoproteinelor bacteriene.

Producerea și activitatea interleukinelor pare a fi reglată de hormonii glucocorticoizi. Această semnifică existența unei căi prin care activitatea sistemului imunitar se poate interconecta cu axa hipotalamo-hipofizaro-corticosuprarrenală.

Limfotoxinele sunt produse de celulele limfoide și macrofagele stimulate. Ele au efecte citotoxice sau citostatice pentru o varietate de tipuri celulare: celule neoplazice, sau infectate cu virusuri.

Limfotoxinele sunt produse de limfocitele citotoxice ($T8^+$), de celulele NK și K, de monocite și PMN (eozinofile și neutrofile).

Limfocitele Tc produc factorul citotoxic.

Macrofagele produc *TNF* sub acțiunea stimulatoare a IL-2 și a interferonului γ .

După stimularea cu endotoxine, macrofagele produc o monokină de 17 kD, denumită cașectină, denumire dată după efectul său stimulator asupra catabolismului, ceea ce explică apariția și manifestarea sindromului de epuizare (cașexia), caracterizată prin pierderea în greutate la pacienții cu unele infecții și neoplazii. Cașectina inhibă transcrierea genelor care codifică enzimele lipogene.

Receptorii de cașectină se găsesc pe hepatocite, pe celulele musculare și adipoase și răspund prin intensificarea catabolismului. Trigliceridele sunt mobilizate din depozite și crește concentrația plasmatică a lipoproteinelor cu densitate foarte mică.

BAZELE CELULARE ȘI MOLECULARE ALE MEMORIEI IMUNOLOGICE

Memoria imunologică implică tipuri funcționale specializate de limfocite T și B, denumite celule „de memorie”. Argumentul direct este însăși tempul de latență mai scurt al răspunsului imun secundar, explicabil prin faptul că, după prima întâlnire cu antigenul se creează o populație mai numeroasă de celule specifice față de epitopii imunostimulatori. Aceste celule au parcurs deja câteva trepte ale diferențierii spre celulele producătoare de anticorpi.

Receptorii de antigen ai celulelor B de memorie sunt molecule de IgG. După stimularea secundară, ele vor genera răspunsul imun secundar cu producerea de IgG. Pe suprafața altor limfocite B de memorie s-au identificat receptori ai altor izotipuri: IgM și IgG, IgM și IgA, IgM și IgE. Acești markeri asigură generarea izotipurilor corespunzătoare de imunoglobuline, fiecare dintre ele având o eficiență optimă ca mediatori ai funcțiilor efectoare particulare: IgA împiedică aderența microorganismelor patogene la suprafața mucoaselor, IgE activează mastocitele, iar IgM și IgG sunt anticorpii efectori ai răspunsului imun humoral. Calea de administrare a antigenului influențează profund izotipul de anticorpi care se sintetizează, ceea ce denotă faptul că celulele B de memorie au localizări specifice: celulele cu receptori IgA de suprafață, rămân localizate în structurile limfoide asociate mucoaselor (digestivă, respiratorie), iar cele cu receptori IgG se localizează în ganglioni.

Mecanismul generării limfocitelor B de memorie este controversat. Una din teorii consideră că precursorii celulelor plasmactice producătoare de anticorpi și celulele B de memorie derivă din aceeași celulă B. Celulele rezultate din diviziunile succesive declanșate de stimularea antigenică evoluează diferit: unele se diferențiază în celule plasmactice, iar altele rămân limfocite mici, care se întorc la starea G_0 și devin limfocite de memorie.

O altă teorie consideră că plasmocitele și limfocitele B de memorie provin din celule B diferite. Celulele imature (pre-B) ale unei clone sunt programate să devină celule de memorie sau celule plasmactice, înainte de stimularea antigenică.

Mecanismul păstrării pentru perioade îndelungate a memoriei imunologice (luni, ani, tot restul vieții) nu este cunoscut. După unii autori, memoria este păstrată de limfocitele de memorie cu viață lungă, care rămân în stare de repaus, fără diviziune, pentru câteva zeci de ani. O altă ipoteză sugerează că antigenul, sub forma complexelor imune, rămâne pe celulele dendritice din foliculii ganglionari, perioade foarte îndelungate de timp, realizând cicluri continue de activare a limfocitelor B, la un nivel scăzut, deși este greu de acceptat continuarea acestui

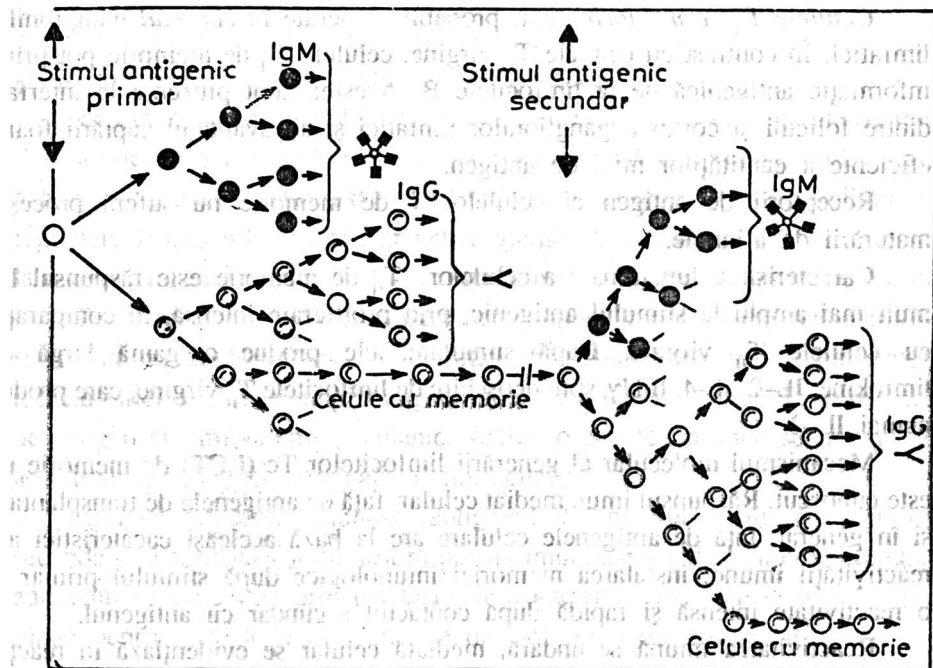


Fig. 57. Reprezentarea schematică a evenimentelor celulare care au loc în timpul elaborării răspunsului imun. Stimulul antigenic primar activează limfocitele B imunocompetente. Ele proliferază, și descendenții lor se diferențiază în celule anticorpo-formatoare, sau generează celule de memorie. Răspunsul imun secundar (după câteva luni sau ani) este mai rapid și mai intens, datorită celulelor cu memorie, precodificate să răspundă la același antigen (după Revelal și Rey, 1987).

proces timp de zeci de ani. O altă posibilitate ar fi ca memoria de durată să fie păstrată prin expunerea periodică a celulelor T și B la *antigene cu reacție încrucișată*, la superantigene sau mitogene, care determină o expansiune clonală limitată.

Cea mai argumentată pare a fi ipoteza limfocitelor B de memorie cu *viață lungă*. Expansiunea clonală a limfocitelor are loc în centrul germinativ al ganglionilor limfatici și splinei. Celulele B de memorie, cu *viață lungă* par să se întoarcă în măduva oaselor (un mediu foarte imunospresor). Semnalele care determină reintrarea acestor limfocite în circulație nu se cunosc, dar unul dintre ele ar putea fi chiar nivelul concentrației de antigen.

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 T_H de memorie sunt, probabil, generate în *cortexul ganglionilor limfatici*. În contrast cu celulele T_H virgine, celulele T_H de memorie pot primi informație antigenică de la limfocitele B. Acestea sunt prezente la interfața dintre foliculi și cortexul ganglionilor limfatici și au avantajul captării foarte eficiente a cantităților mici de antigen.

Receptorii de antigen ai celulelor T de memorie nu suferă procesul maturării de afinitate.

Caracteristica funcțională a celulelor T_H de memorie este răspunsul lor mult mai amplu la stimulul antigenic, prin proliferare intensă, în comparație cu celulele T_H virgine. După stimulare, ele produc o gamă largă de limfokine: IL-2, IL-4, IFN γ , spre deosebire de limfocitele T_H virgine, care produc numai IL-2.

Mecanismul molecular al generării limfocitelor T_c (LCT) de memorie nu este cunoscut. Răspunsul imun mediat celular față de antigenele de transplantare și în general, față de antigenele celulare are la bază aceleași caracteristici ale reactivității imune: instalarea memoriei imunologice după stimulul primar și o reactivitate intensă și rapidă după contactul secundar cu antigenul.

Reactivitatea imună secundară, mediată celular se evidențiază în reacția de respingere a alo- și xenogrefelor: organismul liniei genetice A respinge grefa primară de țesut de la linia genetică B, după tabloul respingerii primare (10-14 zile); a II-a grefă de țesut de la linia B este respinsă rapid (5-6 zile); a II-a grefă de țesut de la linia C este respinsă de organismul liniei A, după dinamica răspunsului imun primar.

RECIRCULAREA LIMFOCITELOR

Contactul antigenelor cu organele limfoide secundare, (suportul reacțiilor celulare ale răspunsului imun) impune, ca o condiție funcțională esențială, recircularea continuă a limfocitelor pentru a întâlni și a recunoaște antigenul. Din acest punct de vedere, limfocitele au o particularitate funcțională unică: părăsesc sângele (ca și PMN) și trec în organele limfoide secundare, dar se reîntorc în fluxul sanguin. Recircularea limfocitelor pe traseul sânge-țesuturi limfoide-sânge se repetă de foarte multe ori și este *independentă de stimularea antigenică*. Milioane de limfocite trec zilnic prin fiecare organ limfoid secundar, așa încât fiecare antigen pătruns în organism va fi expus întregului repertoriu de receptori de antigen ai limfocitelor.

Recircularea limfocitelor a fost evidențiată de Gowans (1960). El a observat că majoritatea limfocitelor din limfa eferentă a unui ganglion provin din sânge și nu sunt rezultatul proliferării lor în ganglion.

Recircularea limfocitelor este impusă de modul de organizare a sistemului limfoid: fiecare organ limfoid drenează un teritoriu definit al organismului. Astfel, antigenul injectat subcutanat sau intradermic va fi transportat la ganglionii limfatici regionali. Antigenul injectat intravenos ajunge în splină, iar cel care pătrunde la nivelul mucoaselor digestivă sau respiratorie va ajunge în structurile limfoide GALT și respectiv BALT. Localizarea antigenului la nivelul organelor limfoide secundare regionale impune cu necesitate, recircularea continuă a limfocitelor, mărind astfel șansa ca epitopii antigenului să fie recunoscuți specific de receptori de antigen ai limfocitelor circulante. Astfel, organele limfoide secundare sunt adevărate locuri „de pelerinaj” al limfocitelor.

Limfocitele care recunosc antigenul la nivelul țesuturilor limfoide secundare se activează și inițiază răspunsul imun. Limfocitele care nu au întâlnit antigenul specific trec prin țesuturile limfoide în câteva ore și se reîntorc în sânge pentru câteva minute, înainte de a-și relua un nou ciclu.

Migrarea limfocitelor s-a urmărit direct prin metoda autoradiografiei (limfocitele se recoltează și, *in vitro* incorporează markeri radioactivi sub forma cromatului de Na cu Cr^{51} sau a timidinei H^3). Mai recent marcarea celulelor s-a făcut cu compuși fluorescenți.

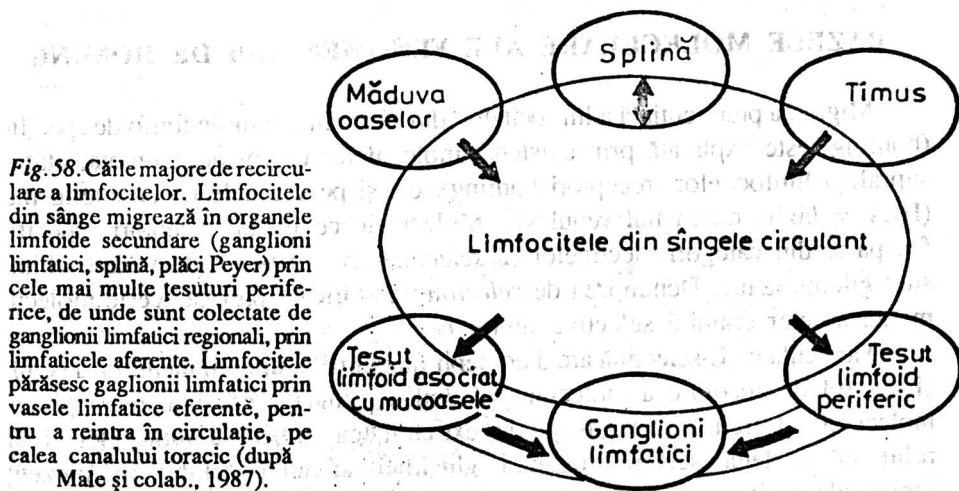


Fig. 58. Căile majore de recirculare a limfocitelor. Limfocitele din sânge migrează în organele limfoide secundare (ganglioni limfatici, splină, plăci Peyer) prin cele mai multe țesuturi periferice, de unde sunt colectate de ganglionii limfatici regionali, prin limfaticile aferente. Limfocitele părăsesc ganglionii limfatici prin vasele limfatice eferente, pentru a reîntra în circulație, pe calea canalului toracic (după Male și colab., 1987).

În țesuturile nelimfoide, recircularea limfocitelor este mai puțin intensă, dar este foarte importantă pentru supravegherea imună. De exemplu, în creier, traficul limfocitar are valori scăzute comparativ cu acelea din țesuturile limfoide, dar și aici se declanșează un răspuns imun eficient față de celulele alogene grefate.

Limfocitele circulante sunt celule competente (mature) T și cele de memorie T și B. Limfocitele B imunocompetente virgine (neangajate) au o perioadă de viață scurtă și în mod obișnuit nu recirculă. Celulele B mature virgine, după maturarea în măduva osoasă intră în circuit în două situații: în primele zile ale răspunsului imun primar și în cazul diminuării experimentale a celulelor B din circulație (prin tratamentul cu anticorpi anti IgM și anti IgD).

Rutele de recirculare a limfocitelor nu sunt întâmplătoare. Deși celulele T și B intră în țesuturile limfoide secundare în aceeași măsură, trecerea spre țesuturile nelimfoide este realizată în primul rând de limfocitele T, așa cum se evidențiază prin determinarea numărului de celule T și B în limfa din vasele eferente. Limfocitele T realizează controlul antigenelor de suprafață a celulelor din țesuturi. În cazul în care celulele prezintă antigene nonsell (virale, tumorale sau induse chimic), efectul este un răspuns imun citotoxic.

Recircularea limfocitelor arată o preferință evidentă pentru un anumit tip de țesut limfoid. Cele din ganglioni, la un viitor circuit se vor întoarce tot în ganglioni, iar cele din GALT vor urma traseul aceluiași structurii limfoide. Aptitudinea remarcabilă a limfocitelor de a recunoaște și de a coloniza anumite țesuturi limfoide a fost denumită de Sousa, *ecotaxis* (*homing*, *home*, *englez* = casă).

BAZELE MOLECULARE ALE FENOMENULUI DE HOMING

Migrarea preferențială a limfocitelor, din sânge în țesuturile limfoide specifice (*homing*) este explicată prin existența moleculelor cu rol de aderență, atât pe suprafața limfocitelor (receptori *homing*), cât și pe venulele cu endoteliu înalt (HEV = *high endothelial venules*). Moleculele cu rol de receptori specifici fac parte din categoria lectinelor (*L-selectine*) și din punct de vedere chimic sunt glicoproteine. Denumirea de *selectine* semnifică faptul că aceste molecule mediază interacțiunile selective dintre celule.

Molecula de L-selectină are 3 domenii funcționale: unul în membrana celulei și are rol de ancorare a moleculei; al doilea formează cea mai mare parte a moleculei; al treilea se găsește la extremitatea liberă a moleculei și are rolul de a lega selectiv liganzii glucidici ai altei celule, în prezența ionilor de Ca^{2+} .

Specificitatea de homing a limfocitelor este dependentă de interacțiunea lor specifică cu HEV și s-a studiat *in vitro* prin incubarea limfocitelor cu secțiuni subțiri de țesut limfoid. S-a evidențiat astfel că limfocitele recirculante se leagă specific de HEV și nesemnificativ de endoteliul altor vase sanguine. Limfocitele B se leagă predominant de HEV din plăcile Peyer, iar limfocitele T se atașează preferențial de HEV din ganglionii limfatici. Aceste preferințe de legare reflectă preferințele de migrare ale limfocitelor: plăcile Peyer sunt relativ bogate în limfocite B, iar în ganglionii limfatici predomină limfocitele T.

Receptorii limfocitari se leagă specific cu moleculele complementare de aderență existente la nivelul HEV și inițiază evenimentele al căror rezultat este migrarea limfocitelor în țesuturile limfoide. Trecerea limfocitelor din fluxul sanguin într-un organ limfoid secundar are loc în mai multe faze:

- legarea limfocitelor prin intermediul receptorilor de homing, la suprafața endoteliului venulelor post-capilare;
- deschiderea joncțiunilor strânse dintre celulele endoteliale (5–10 min);
- migrarea selectivă a limfocitelor T și B, în ariile caracteristice, în orele următoare.

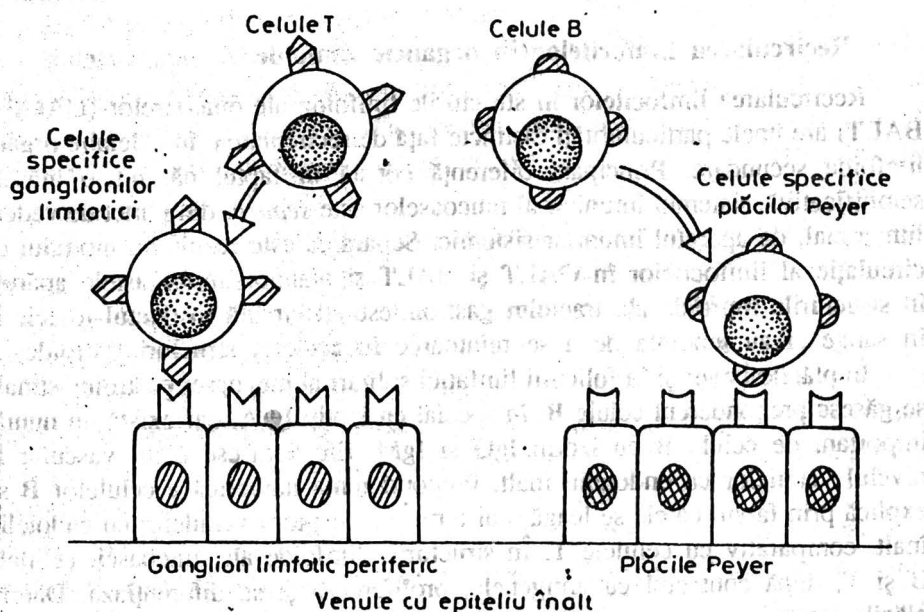


Fig. 59. Model ipotetic pentru explicarea bazelor moleculare ale fenomenului de „homing”, prin interacțiunea selectinelor specifice de pe celulele endoteliale ale venulelor din diferite organe limfoide, cu receptorii de pe suprafața limfocitelor (după Male și colab., 1987).

Fenomenul de *homing* este foarte important în procesul genezei embrionare a organelor limfoide primare, deoarece asigură migrarea în timus, respectiv în bursa lui Fabricius și echivalenții ei, a precursorilor limfocitelor T și B (pre-B și pre-T) precum și revenirea limfocitelor în organul limfoid secundar respectiv, după ce au circulat în organism.

Astfel, limfocitele recoltate din ductul toracic migrează preferențial în GALT, iar cele din ganglionii limfatici se reîntorc în ganglioni, în ariile timodependente, ca și limfocitele recoltate din timus. Limfocitele T și B splenice, după transferul în organismul receptor se distribuie în compartimentele corespunzătoare ale organelor limfoide secundare. Majoritatea limfocitelor din măduva osoasă migrează în regiunile timoindependente.

Ariile *timoindependente* ale organelor limfoide secundare sunt: foliculii cortexului extern din ganglionii limfatici, foliculii din plăcile Peyer, precum și foliculii zonei periferice din pulpa albă a splinei.

Ariile *timodependente* sunt următoarele: cortexul profund al ganglionilor limfatici (paracortex), manșonul limfoid periarteriole al pulpei albe splenice și zonele interfoliculare ale plăcilor Peyer.

Ariile *mixte* sunt reprezentate de zona medulară a ganglionilor limfatici, zona marginală a pulpei albe și pulpa roșie a splinei.

Recircularea limfocitelor în organele limfoide ale mucoaselor

Recircularea limfocitelor în structurile limfoide ale mucoaselor (GALT și BALT) are unele particularități distincte față de recircularea în celelalte organe limfoide secundare. Principala diferență constă în faptul că, într-o măsură semnificativă, sistemul imunitar al mucoaselor este *separat* din punct de vedere funcțional, de aparatul imunitar sistemic. Separarea este rezultatul modului de circulație al limfocitelor în GALT și BALT și anume: limfoblastele apărute în structurile limfoide ale tractului gastrointestinal circulă în ductul toracic și în sânge și au tendința de a se reîntoarce în aceleași structuri limfoide.

În plăcile Peyer și în foliculii limfatici solitari ai mucoasei gastrointestinale se găsesc preponderent celule B, în special cu izotip Ig A, dar există un număr important de celule B cu izotip IgG și IgM. Ele părăsesc patul vascular la nivelul venulelor cu endoteliu înalt. Preponderența numerică a celulelor B se explică prin faptul că ele se leagă mai ferm de receptorii venulelor cu endoteliu înalt, comparativ cu celulele T. În structurile limfoide ale mucoasei, celulele B și T, după contactul cu antigenele, proliferază și se diferențiază. Dar în plăcile Peyer, celulele producătoare de anticorpi, practic nu există, deși *in vitro* țesutul limfoid al plăcii Peyer produce anticorpi. Acest fapt denotă că plăcile Peyer sunt structuri limfoide specializate în *medierea* contactului dintre

limfocite și antigenele tractului intestinal, dar celulele B după stimulare migrează din plăcile Peyer, înainte de diferențierea în plasmocite.

Celulele B stimulate (blaste) părăsesc structurile limfoide ale mucoasei prin vasele limfatice aferente ale intestinului și pătrund în ganglionii mezenterici prin limfaticele lor aferente. Aici se pare că blastele dobândesc capacitatea de a migra selectiv în mucoasa digestivă și respiratorie constituind țesutul limfoid difuz. Din ganglionii mezenterici, celulele limfoide ajung în limfa ductului toracic. Receptorii de suprafață dobândiți în ganglionii mezenterici favorizează tendința netă de recirculare a acestor limfoblaste în structurile limfoide în care au fost stimulate: cele din plăcile Peyer se vor întoarce în țesutul limfoid al mucoasei tractului gastrointestinal, iar cele originare în ganglionii limfatici bronșici vor recircula tot în mucoase, dar mai ales în mucoasa respiratorie.

Una din explicațiile fenomenului de recirculare a limfocitelor în structurile limfoide ale mucoaselor este că aceste situsuri sunt bogate în antigenele la care celulele au fost sensibilizate inițial.

La nivelul mucoasei digestive, în plăcile Peyer, celulele B activate sintetizează în primul rând Ig A. De la locul activării, limfoblastele rezultate din profilerarea celulelor B migrează prin limfa eferentă și ajung cu sângele în splină. De aici limfoblastele se diseminează la nivelul altor structuri mucoase, în afara celei digestive: respiratorie, salivară, lacrimală, urogenitală.

S-a evidențiat un circuit limfocitar *enteromamar* (Roux și col. 1977). Astfel, celulele limfoide activate după contactul cu antigene enterice migrează în glanda mamară în perioada lactației. Aici secretă anticorpi care vor fi transferați în tractul digestiv al noului născut și vor avea efect protector față de antigenele intestinale.

Ruta de migrare spre mucoase, a blastelor generate la nivelul mucoasei intestinale ar fi foarte avantajoasă pentru protejarea organismului față de microorganismele care invadează diferite mucoase. În acest caz, imunizarea orală, cea mai facilă, ar putea fi eficientă și în protecția altor mucoase.

Celulele T au o modalitate de migrare mai puțin restrictivă în raport cu mucoasele. Deși ele sunt numeroase în ductul toracic, reprezintă o minoritate în populația limfoidă a mucoasei. Rolul lor pare a fi limitat la efecte reglatoare asupra celulelor B.

În concluzie, recircularea limfocitelor B la nivelul mucoaselor este restrictivă, în sensul că celulele stimulate în structurile limfoide ale mucoasei digestive au o tendință marcată de a recircula la nivelul altor mucoase. S-a avansat ipoteza unei specificități de organ a recirculării limfocitelor B. Cele activate (și originare)

în BALT vor recircula în mucoasa respiratorie, iar cele activate (și originare) în GALT vor recircula preferențial la nivelul mucoasei digestive, asigurând astfel o eficiență protectoare maximă.

EFFECTUL STIMULĂRII ANTIGENICE ASUPRA ȚESUTULUI LIMFOID SECUNDAR

Antigenul injectat intravenos va fi captat preferențial de macrofagele din zona marginală a splinei. Antigenele care străbat mucoasa intestinală sunt captate de celulele M ale plăcii Peyer și de limfocitele din domul epitelial și subepitelial, care le transportă până la limfocitele T și B din ariile plăcii. Evenimente asemănătoare probabil au loc în țesutul limfoid asociat bronhiilor. Antigenele injectate pe cale tegumentară sunt transportate în ganglionii limfatici locali, fie în stare liberă prin fluxul limfatic, fie legate de celule specializate (celulele *Langerhans* părăsesc epiderma prin vasele limfatice eferente, devin celule *voalate* și după ce ajung în ganglionul limfatic migrează în aria celulelor T și devin celule *interdigitate*). Rezerva de celule Langerhans o constituie, probabil, monocitul sanguin care trece din capilarele subepidermice, în epidermă.

Limfocitele mature recirculante vin în contact cu CPA, se activează și formează *centrii germinativi*. Se disting 4 faze ale reacției într-un ganglion limfatic:

1) În primele ore după stimularea antigenică se produce o reacție inflamatorie locală, cu o creștere a fluxului sanguin de circa 25 de ori. Se intensifică traficul limfocitar spre ganglion. Concomitent, pentru unele antigene, se produce obturarea ieșirii limfocitelor din ganglion, dar rata curgerii limfei nu se modifică. Sub acțiunea unor factori locali (prostaglandine, factori de aderență) se mărește adezivitatea limfocitelor și astfel în ganglion se formează un „dop” limfocitar.

2) După 1–2 zile se intensifică ieșirea limfocitelor ganglionare în fluxul limfatic eferent, în ganglion fiind reținute cele care au interacționat specific cu antigenul.

3) În cea de a 3-a și a 4-a zi după stimularea antigenică, proliferarea limfocitelor activate se intensifică și în limfa eferentă apar limfoblaste. Acestea au proprietăți specifice de homing: se vor localiza tot în ganglioni și în noile sedii se vor diferenția în celule producătoare de anticorpi (plasmocite).

4) După cea de a 4-a zi diminuează generarea celulelor blaste. Se formează celule mici de memorie, care trec în sânge și devin circulante.

Stimularea antigenică este însoțită de formarea centrilor germinativi. Numai antigenele timodependente induc formarea centrilor germinativi. În interiorul lor, celulele B proliferante se găsesc în asociație cu celulele Th.

TOLERANȚA IMUNITARĂ

Toleranța este o stare caracterizată prin *absența răspunsului imun* față de un antigen. Starea de toleranță este specifică pentru un antigen dat, deoarece este asociată cu păstrarea reactivității imune față de toate antigenele care nu dau reacție încrucișată cu antigenul tolerat.

Toleranța imunitară și reactivitatea prezintă următoarele caracteristici comune:

- sunt specifice față de un anumit antigen;
- ambele stări se manifestă după contactul cu antigenul inductor;
- ambele fenomene sunt mediate de limfocite.

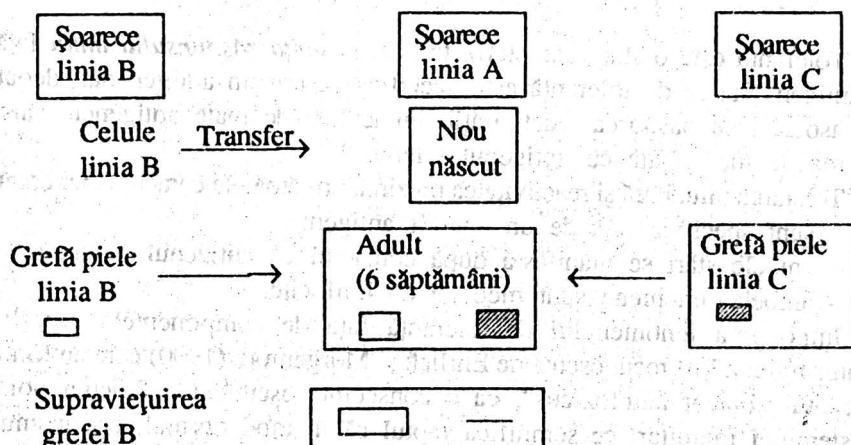
Importanța fenomenului de toleranță față de componentele proprii ale organismului a fost recunoscută de Ehrlich și Morgenroth (1900) care au formulat conceptul „horror autotoxicus”, ca o consecință esențială a funcției normale a sistemului imunitar, ce semnifică faptul că în mod normal, organismul își asigură protecția propriilor sale componente față de autodistrugerea prin reactivitate imunitară.

După 1920 s-a descoperit faptul că este posibilă inducerea toleranței față de unele antigene exogene: de exemplu, *dozele mari de toxină difterică* suprimă răspunsul imun indus de dozele mici ale acestui antigen. Același lucru s-a remarcat în cazul *polizaharidului de pneumococ* și a unui compus chimic simplu (neoadrenalină) care funcționează ca haptană.

În 1945 s-a evidențiat că *gemenii dizigoși* de bovine (diferiți din punct de vedere genetic) își tolerează reciproc antigenele tisulare, dacă în cursul vieții embrionare, un proces de fuziune placentară a permis un schimb reciproc de elemente figurate. Cei doi gemeni resping greșelile de țesut provenite de la organisme cu ascendență comună. Acești gemeni sunt *himere hematopoetice* stabile. Fiecare dintre ei posedă elemente sanguine cu originea în cei doi embrioni diferiți din punct de vedere genetic. Concluzia a fost că, *contactul timpuriu* (în viața embrionară) al celulelor sistemului imunitar cu antigenele creează o stare de toleranță față de acestea și sunt recunoscute ca self.

În anul 1959 s-a descoperit faptul că maturarea limfocitelor parcurge un stadiu în cursul căruia contactul cu antigenul perturbă acest proces, consecința fiind pierderea funcției imunitare, adică limfocitele devin tolerante față de antigenul respectiv.

Starea de toleranță se poate induce experimental, la șoarecii nou născuți, față de toate tipurile de antigene. Revelatoare în acest sens sunt stările de toleranță față de celulele provenite de la organisme genetic diferite, transferate la animalele nou născute. Animalele injectate la naștere cu celule alogenice vor accepta, la vârsta adultă, greșile tisulare de la organismele donatoare de celule:



În stadiul embrionar și o perioadă variabilă postnatală, în funcție de specie, sistemul imunitar este *imatur* și în consecință, foarte sensibil la inducerea stării de toleranță imunitară.

Limfocitele B imature sunt foarte sensibile la inducerea stării de toleranță, prin contactul lor cu antigenul, dar devin tot mai rezistente la acest proces pe măsură ce se maturează. Susceptibilitatea limfocitelor T față de inducerea toleranței variază în limite mai restrânse, în cursul ontogeniei lor.

Mecanismele celulare și moleculare ale inducerii sunt ipotetice, dar țin seama de momentul inducerii toleranței în cursul dezvoltării ontogenetice:

- după contactul primar cu antigenul, în cursul vieții embrionare, ar avea loc *eliminarea clonei activate* de limfocite B, ceea ce implică pierderea definitivă a capacității de răspuns la stimulul antigenic respectiv;

- în cursul vieții adulte, stimularea repetată cu un antigen timoinddependent antrenează cu sine *epuizarea* limfocitelor antigen-reactive. Toate limfocitele B mature, capabile să reacționeze specific la un antigen sunt stimulate și se diferențiază în celule producătoare de anticorpi, astfel încât o stimulare ulterioară cu același antigen rămâne fără răspuns. În cazul antigenelor timodependente, declanșarea răspunsului imun necesită un semnal cooperant al limfocitelor T_H . Dacă acest semnal lipsește din diferite cauze, limfocitul B nu se activează și se instalează toleranța;

– deoarece starea de toleranță a limfocitelor B mature este greu inductibilă, dar dozele mari de antigene greu degradabile sunt inductoare ale toleranței, cantitatea de antigen în exces ar bloca receptorii de suprafață ai limfocitelor și ar stopa diferențierea lor spre celule producătoare de anticorpi;

– uneori starea de toleranță, indusă de antigenele greu degradabile este *aparentă*, deoarece se sintetizează anticorpi specifici față de antigen. Se formează complexe imune care sunt fagocitate, dar antigenul nedegradat este eliberat și leagă alte molecule de anticorpi. Deși răspunsul imun există, în circulație nu se detectează anticorpi liberi;

– toleranța imunitară poate fi mediată de celule Ts. Acest mecanism a fost demonstrat experimental la șoarece, după injectarea unei doze mari de hematii de berbec. Starea de toleranță este transferabilă prin intermediul limfocitelor splenice Ts, la alte organisme izogcnice;

– toleranța indusă de factori blocați din ser, a căror natură, în general nu este cunoscută, deși uneori s-au identificat a fi anticorpi. Acest mecanism pare a fi activ în cazul celulelor tumorale, care scapă acțiunii efectorilor. Factorii blocați maschează determinanții antigenici ai celulei țintă și blochează astfel accesul efectorilor răspunsului imun (limfocite Tc și K) la suprafața celulei maligne. Efectul este favorizarea (facilitarea) creșterii tumorii (tumour enhancement). Efecte similare se produc în cazul răspunsului imun față de unele bacterii patogene.

Factorii care condiționează inducerea stării de toleranță

Inducerea stării de toleranță este dependentă de *doza de antigen* și de *modul de administrare*. Dozele inductoare ale răspunsului imun și ale toleranței variază mult de la un antigen la altul, dar adesea, dozele foarte mici și foarte mari induc starea de toleranță, iar dozele medii sunt inductoare ale răspunsului imun. De exemplu, albumina serică bovină induce starea de toleranță la doze mici (1 mg/kg, de 3 ori pe săptămână, timp de câteva săptămâni) sau la o doză mare (100 mg/kg). Administrarea antigenelor fără adjuvant favorizează instalarea toleranței imunitare.

Pentru inducerea și menținerea stării de toleranță este necesară *persistența antigenului*. Așa se explică faptul că o doză unică a unui antigen care se catabolizează lent (polimer al D-aminoacizilor) induce o toleranță mai îndelungată, în raport cu un antigen care se catabolizează rapid.

Calea de administrare a antigenului influențează inducerea răspunsului imun sau a stării de toleranță. Administrarea pe cale sanguină și chiar orală favorizează inducerea toleranței, iar administrarea subcutanată sau intramusculară facilitează declanșarea răspunsului imun.

Starea fizică a antigenului influențează răspunsul organismului. Antigenele proteice în stare *agregată* sunt imunogene, iar forma monomerică (solubilă) a aceluiași antigen este imunogenă sau tolerogenă, în funcție de doză. Dozele mari de monomeri favorizează inducerea toleranței, dar în asociație cu adjuvanții sunt imunogene. Adjuvanții favorizează agregarea monomerilor proteici, iar pe de altă parte formează un depozit tisular de antigen, de unde acesta este eliberat treptat.

Cea mai cunoscută stare de toleranță experimentală, cu posibile corespondențe clinice este cea indusă de dozele mari de polizaharide (antigene timoindependente, cu epitopi repetitivi). Ele produc paralizia limfocitelor B, după legarea în exces, de receptorii lor pentru antigen. Corespondentul clinic al acestei situații experimentale este starea de toleranță indusă de microorganisme care produc pneumonii la persoanele în vârstă. Pe fondul reactivității imunitare scăzute, țesutul pulmonar este inundat cu polizaharide capsulare bacteriene și sfârșitul este letal.

Starea de toleranță are specificitate, nu față de antigenul întreg, ci față de determinantul antigenic. Este posibilă toleranța simultană față de mai multe antigene diferite, dacă toate au un determinant antigenic comun.

Durata stării de toleranță este variabilă în funcție de mecanismul celular care a mediat instalarea ei. Dacă toleranța este indusă în cursul vieții embrionare și este rezultatul eliminării clonei de limfocite cu reactivitate specifică, toleranța este *ireversibilă*. Toleranța indusă după maturarea limfocitelor este o stare *reversibilă* și revenirea la starea imunoreactivă normală este dependentă de timpul necesar *regenerării limfocitelor mature*. Dacă starea de toleranță se datorează blocării celulelor producătoare de anticorpi (cea indusă de dozele mari de polizaharide), restabilirea reactivității imunitare depinde de *rata eliminării* antigenului. Transferul celulelor tolerante în mediu fără antigen este însoțit de pierderea rapidă a toleranței.

TOLERANȚA FĂTULUI

Pentru organismul matern, fătul este o *alogrefă*, deoarece jumătate din zestrea sa genetică este de origine paternă. Lipsa reactivității imunitare materne este greu explicabilă.

Din punct de vedere imunologic, organismul matern nu este tolerant în raport cu fătul, deoarece grefa de țesut fetal este respinsă. Organismul matern își păstrează capacitatea normală de reactivitate imunitară, dar fătul, prin intermediul placentei dispune de un sistem de protecție eficient.

Pentru a explica mecanismele protecției imunologice a fătului s-au emis mai multe ipoteze:

- *uterul* este un organ privilegiat din punct de vedere imunologic, așa cum este camera anterioară a ochiului, testiculul, bariera meningeală. În realitate, uterul nu pare a fi un organ privilegiat, deoarece sarcinile extrauterine eșuează din alte motive decât cele ale reactivității imunitare. Dacă uterul ar conferi o stare de protecție imunitară, embrionii ar trebui să se dezvolte la gazde din alte specii, ceea ce nu se întâmplă;

- *placenta* – anexă de origine embrionară – este o barieră neutră între organismul matern și făt. Pe fața sa internă (spre embrion), placenta nu exprimă antigenele majore de histocompatibilitate, în timp ce pe fața externă predomină antigenele minore, dar se găsesc și antigene majore. Se găsesc deasemenea antigene de origine paternă, potențial capabile să inducă un răspuns imun al organismului matern;

- organismul matern exercită un *efect imunosupresor* prin intermediul unor hormoni și factori proteici care cresc cantitativ în cursul sarcinii și ar diminua reactivitatea imunitară: progesterona, hormonul coriogonadotropic, α – fetoproteina.

Organismul matern recunoaște antigenele fetale placentare și reacționează față de ele, deoarece în circulația maternă se găsesc anticorpi antifetali la circa 15% dintre gravide. Diferențele antigenice dintre mamă și făt par a fi chiar benefice pentru dezvoltarea fătului. Așa se explică vigoarea hibridilor, în contrast cu dificultățile de propagare a liniilor înbreed. Reactivitatea imunitară maternă este favorabilă dezvoltării fătului. Greutatea placentei și a embrionului este mai mare la femelele alogenice față de cele singenice în raport cu fătul lor.

Modelarea reactivității imunitare a organismului matern, astfel încât este favorizată toleranța fătului are loc nivelul *placentei*, ca zonă de interfață feto-maternă.

La nivelul placentei sunt concentrate substanțe cu acțiune imunosupresoare strict localizată. Tot aici acționează factori placentari care blochează diferențierea limfocitelor citotoxice și ucigașe (Tc și K). În placenta s-au detectat limfocite granulare cu efect imunosupresor, iar numărul lor crește semnificativ în a II-a jumătate a sarcinii.

Un alt mecanism prin care placenta își exercită rolul protector este rezistența deosebită a celulelor sale la efectul litic al celulelor ucigașe. Pe de altă parte,

placenta eliberează substanțe care neutralizează local orice anticorp antiplacentă și îi transformă în anticorpi „blocați” care la rândul lor au efect protector.

Placenta are o capacitate de reacție proprie. Eventualele sale distrugerii celulare provocate de efectorii imunității celulare și humorale sunt compensate prin proliferarea celulelor rezistente. Placenta supusă atacului acestor efectori, la sfârșitul gestației este mai groasă decât cea normală.

Placenta are rolul de a minimaliza recunoașterea fătului de către organismul matern. Sub aspect imunitar, placenta este o „zonă neutră” datorită nivelului scăzut al moleculelor CMH. Dacă efectorii celulari ai imunității reușesc să se infiltreze, acțiunea lor este anulată de absența țintelor de atac.

O ultimă linie de apărare este sângele fetal al cordonului ombilical, care conține densități mari de celule imunosupresoare.

Dacă aceste bariere de apărare sunt depășite se produce avortul imunitar.

C a p i t o l u l VI

CONFLICTUL GAZDĂ-MICROORGANISME PATOGENE

În timpul dezvoltării embrionare, fătul este scăldat în lichidul amniotic steril. Odată cu expulzarea sa începe colonizarea cu un număr mare de microorganisme nepatogene, comensale, care trăiesc în diferite nișe ecologice ale gazdei, fără să determine starea de îmbolnăvire. Astfel, tegumentul, cavitățile tractului digestiv și respirator se populează cu microorganisme care realizează populații cu o densitate foarte mare de *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Streptococcus*, *Candida* etc. Ele constituie *microbiota*, formată din subpopulații stabile și echilibrate numeric, caracteristice stărilor de *eubioză*. În anumite situații particulare (regim alimentar dezechilibrat, tratament cu antibiotice cu spectru larg de acțiune), însoțite de dezechilibrul lor numeric (*disbioză*) sau de slăbire a forțelor de apărare a organismului, microorganismele componente ale microbiotei normale pot provoca procese patologice infecțioase cu manifestări clinice. În același timp, organismul este asaltat permanent de microorganisme patogene sau potențial patogene din mediul extern. Datorită contactului permanent cu microorganismele, funcția principală a sistemului imunitar al gazdei este apărarea față de microbiota proprie și față de microorganismele din mediul extern.

Contactul permanent cu microorganismele a condus, în evoluție, la apariția unor sisteme celulare, a căror funcție principală este anihilarea oricărei tentative de pătrundere a lor în mediul intern. Deosebit de sugestive în acest sens sunt formațiunile limfoide asociate mucoaselor, la nivelul cărora contactul cu microorganismele este permanent și masiv.

În concepția modernă, starea de sănătate sub aspect infecțios este rezultatul unui echilibru între mijloacele de apărare ale organismului și agenții patogeni sau potențial patogeni. Modificarea acestui raport în favoarea microorganismelor echivalează cu producerea procesului infecțios. Din aceste motive am considerat oportun să prezentăm, în contextul funcției imunitare, caracteristicile

microorganismelor patogene, precum și mecanismele care se activează pentru a le îndepărta sau pentru a le minimaliza acțiunea. Bacteriile au rol important în patologia acută și cronică, fie prin acțiunea directă ca urmare a multiplicării și a produselor de metabolism, fie indirect prin reacțiile imunitare pe care le stimulează.

Microorganismele patogene posedă o serie de particularități structurale și funcționale, care le permit să depășească diferitele mecanisme de apărare ale gazdei și să inițieze procesul infecțios.

Organismele superioare posedă 4 sisteme de apărare față de microorganismele patogene. În ordinea promptitudinii cu care își exercită efectul protector, cele 4 sisteme sunt următoarele: a) sistemul periferic al *tegumentului și mucoaselor*; b) sistemul celulelor *fagocitare*, a căror acțiune se exteriorizează prin reacția inflamatorie; c) sistemul factorilor humoralii nespecfici (proteinele de „fază acută“, properdina, sistemul complement, interferonii); d) *sistemul imunitar*.

CARACTERELE GENERALE ALE MICROORGANISMELOR PATOGENE

Bacteriile infecțioase prezintă două proprietăți definitorii: *patogenitatea* și *virulența*.

Patogenitatea

Patogenitatea este proprietatea esențială a oricărui microorganism infecțios, ce constă în capacitatea lui de a determina în condiții naturale sau experimentale, apariția unui proces infecțios transmisibil, decelabil din punct de vedere clinic la om, animale sau plante.

Patogenitatea este, în esență, un caracter calitativ, de specie. Unele specii sunt totdeauna *patogene* (*M. tuberculosis*, *Shigella*, *Salmonella* etc.), iar altele nu sunt *niciodată patologice* datorită incapacității lor de a se stabili și de a se multiplica într-un organism (*Azotobacter*, *Nitrobacter*, *Acetobacter* etc.). Cea de a treia categorie o reprezintă microorganismele *facultativ patologice* (oportuniste), care au capacitatea de a iniția un proces patologic numai în anumite condiții.

Microorganismele perfect adaptate acestui mod de viață implică un nivel al patogenității neletal pentru gazdă, pentru că odată cu moartea ei, posibilitatea diseminării agenților patogeni este limitată sau chiar anulată. Agenții patogeni cei mai adaptați pentru a supraviețui sunt cei care provoacă infecții ușoare,

cu un procent mare de îmbolnăviri subclinice și care creează o imunitate slabă și de scurtă durată.

Efectul patogen se poate datora acțiunii *directe*, asupra celulelor infectate, ori este rezultatul producerii toxinelor. Majoritatea efectelor patologice implică acțiunea *indirectă* datorată reacției gazdei și efectelor secundare asupra organelor țintă.

Studiul patogenității bacteriilor constă în identificarea factorilor de patogenitate, a importanței fiecăruia dintre ei, a naturii lor chimice și a mecanismului lor de acțiune asupra gazdei.

Uneori patogenitatea este rezultatul acțiunii unui singur produs bacterian și se determină ușor *in vitro*, dar de cele mai multe ori patogenitatea este multifactorială.

Virulența

Virulența este o proprietate multifactorială și exprimă capacitatea unei tulpini a unui microorganism patogen, de a se adapta, de a se multiplica și de a determina o stare patologică la o gazdă sensibilă.

Virulența este o proprietate individuală a unei tulpini bacteriene și se manifestă față de o anumită gazdă. Virulența se apreciază *in vivo* și exprimă *cantitativ* gradul de patogenitate al unei tulpini bacteriene în raport cu o gazdă sensibilă. Din această cauză, adeseori, termenii de virulență și patogenitate sunt folosiți ca echivalenți, dar în mod greșit, deoarece speciile de bacterii patologice au tulpini individuale cu grade diferite de virulență pentru diferite gazde.

Una din modalitățile de păstrare sau accentuare a virulenței constă în pasajul succesiv pe gazde sensibile, iar tulpinile avirulente se obțin prin subcultivări *in vitro*.

Gradul de virulență al unei tulpini bacteriene are o semnificație relativă. Diferențe majore ale virulenței unei tulpini bacteriene sunt create de alterări minime ale capacității de apărare a organismului. De exemplu, virulența și capacitatea de a induce un proces patologic la *V. cholerae* este în raport invers cu aciditatea gastrică. Creșterea acidității mărește rezistența și invers, scăderea acidității gastrice este condiția unei virulențe crescute a aceluiași tulpini de *V. cholerae*.

Factorii care condiționează virulența

Virulența este o proprietate a bacteriilor patologice, condiționată de 3 factori:

- a) *agresivitatea* sau capacitatea de invazie (invazivitatea);
- b) *infecțiozitatea*;
- c) *toxigenitatea*.

a) Agresivitatea

Agresivitatea definește capacitatea unui microorganism de a fi invaziv adică de a pătrunde în interiorul sau de a invade suprafața unui țesut și de a se multiplica, determinând modificări ale țesuturilor respective. Consecința acestei proprietăți este că bacteriile agresive vor determina infecții cu tendința de generalizare, iar cele neagresive vor determina infecții localizate.

Agresivitatea nu este o proprietate obligatorie printre bacteriile patogene care determină îmbolnăviri grave sau chiar mortale. Unele bacterii lipsite de capacitatea invazivă generează numai infecții locale, dar eliberează toxine foarte puternice, care provoacă efectul letal prin intoxicație generalizată. De exemplu, *C. diphteriae*, rămâne localizată la nivelul gâtului, dar infecția poate fi mortală, deoarece toxina sa foarte puternică se răspândește în tot organismul.

Agresivitatea este un parametru foarte important al virulenței unor bacterii, deoarece chiar dacă este puțin toxigen, un microorganism agresiv cu o mare capacitate de colonizare a țesuturilor provoacă efectul letal prin numărul mare de celule. De exemplu, *S. pneumoniae*, agentul pneumoniei nu este toxigen, dar fiind foarte virulent prin invazivitatea sa deosebită se dezvoltă în populații atât de numeroase în țesutul pulmonar, încât perturbă funcția sa, iar sfârșitul este letal.

Bacteriile care au o mare capacitate de invazie a țesuturilor au proprietatea de a elabora diferite substanțe biologice active denumite generic *agresine*. Agresinele nu au proprietăți toxice intrinsece, sau au efecte lezionale minime, dar favorizează colonizarea și inițierea procesului infecțios prin câteva mecanisme: facilitează difuzia microorganismului infecțios în țesutul gazdei, interferează cu mecanismele de apărare și le diminuează eficiența, potențează infecțiozitatea agenților patogeni.

Molecule și structuri celulare cu rol de agresine

Agresinele sunt produse de o varietate largă de bacterii patogene (*B. anthracis*, *S. aureus*, *C. diphteriae*, *M. tuberculosis*, *Clostridium*, *Pseudomonas* etc.). Ele facilitează infecțiozitatea microorganismelor respective, printr-o varietate de mecanisme.

O primă categorie de agresine o reprezintă *factorii de difuziune*. Cel mai cunoscut factor din această categorie este *hialuronidaza*, enzimă cu efect hidrolizant asupra hialuronatului din substanța fundamentală a țesutului conjunctiv. După depolimerizarea hialuronatului, substanța fundamentală se fluidizează și astfel difuzia bacteriilor în țesuturi este facilitată.

A doua categorie de agresine sunt acelea care *interferă cu factorii celulari și umorali bactericizi* nespecifici ai gazdei (fagocitele, lizozimul, complementul). Aceste efecte se atribuie *polizaharidelor capsulare* și unor componente ale peretelui celular. De exemplu, unele bacterii sintetizează molecule cu efect chimiotactic negativ asupra fagocitelor (*S. aureus*, *M. tuberculosis*), iar altele (*Brucella*) produc leucopenie marcată, prin efect direct supra măduvei hematogene. Structurile capsulare ale celulelor de *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae* inhibă aderența bacteriană de polimorfonucleare prin forțe electrostatice de respingere și prin proprietățile lor hidrofobe, dacă nu sunt opsonizate de către anticorpi.

O a III-a categorie de agresine o constituie o serie de *enzime bacteriene* care favorizează invazia prin alterarea integrității tisulare, prin citoliza locală sau la distanță a unor celule sensibile (leucocite, hematii), prin activarea mecanismelor fibrinolitice etc. Iată câteva exemple:

- *colageneza* produsă de *C. histolyticum* hidrolizează colagenul și astfel dezintegrează țesutul muscular;

- *lecitinaza* (fosfolipaza C) produsă de *C. perfringens*, *S. aureus*, *Pseudomonas* scindează lecitina (componentă a membranei celulare) în fosforilcolină și diglicerid, producând citoliză (tisulară, leucocitară, eritocitară), precum și ruperea membranelor organelor celulare (mitocondrii, reticul endoplasmic);

- *coagulazele* au ca efect coagularea fibrinogenului;

- *fibrinolizinele* (streptokinaza, stafilokinaza) produc liza cheagului sanguin care se formează local ca o reacție de apărare și favorizează diseminarea bacteriilor din rețeaua de fibrină;

- unele bacterii eliberează *toxine-enzime* cu acțiune selectivă asupra unor celule ale gazdei: *hemolizinele* lizează hematii, iar *leucocidinele* distrug leucocitele;

- streptococul hemolitic produce *streptodornaza* care depolimerizează ADN.

Factorii care interferă cu răspunsul imun. Uneori microorganismele patogene supraviețuiesc în organismul gazdă prin mecanisme menite să reducă eficiența răspunsului imun sau chiar să-l anuleze. În acest sens se constată o similitudine accentuată din punct de vedere chimic a unor antigene bacteriene, cu unele componente ale organismului: *proteina M* a streptococului este asemănătoare cu constituenți ai *fibrei miocardice*, iar lipopolizaharidele bacteriilor Gram negative sunt înrudite cu antigenele de histocompatibilitate. *Capsula* celulelor de *Streptococcus pyogenes* conține acid *hialuronic*, care la rândul său este o componentă normală a țesutului conjunctiv și prin urmare materialul capsular nu este antigenic. Altele, determinanții antigenici bacterieni sunt măști de molecule protectoare ale gazdei: de exemplu, coagulaza

stafilococică asigură izolarea celulelor bacteriene într-un strat de fibrină; *T pallidum* produce un material polizaharidic extern, avid absorbant al proteinelor serice, care devin protectoare față de efectorii răspunsului imun. În alte cazuri se sintetizează anticorpi față de componente structurale necesare ale microorganismului patogen.

La rândul lor, microorganismele infecțioase sintetizează unele componente chimice, cu acțiune asupra răspunsului imun al gazdei, efectul fiind diminuarea reactivității sale:

- celulele bacteriene pot elibera antigene solubile de suprafață (polizaharide) care blochează anticorpii circulanți, sau desensibilizează limfocitele T;

- *Neisseria gonorrhoeae* produce o protează care scindează molecula de IgA_1 , rupând legătura prolină–treonină a lanțului H în regiunea balama. Moleculele de IgA_2 nu sunt scindate. Tulpinile nepatogene de *N. gonorrhoeae* nu produc această protează;

- componenta polizaharidică a antigenului O (la *Enterobacteriaceae*), fiind situată la distanță de membrana externă a peretelui celular, deși leagă anticorpii specifici, împiedică liza mediată de complement. Anticorpii ineficienți au rolul de a bloca determinanții antigenici bacterieni. De aceea *specificitatea de epitop* a anticorpilor este foarte importantă pentru că fixarea complementului are loc la un situs bacterian care poate sau nu să producă liza celulei respective;

- celulele de *M. tuberculosis* au numeroase antigene proteice care ar trebui să inducă un răspuns imun humoral amplu, dar totuși sinteza de anticorpi rămâne nesemnificativă.

Variația antigenică este considerată a fi un factor de agresivitate. Virusurile și bacteriile au informația genetică necesară pentru a codifica un singur set de antigene de suprafață. Prin urmare, la bacterii, variația antigenică este limitată la cea care rezultă prin transferul materialului genetic între diferite tulpini ale aceleiași specii. În limitele aceleiași informații genetice, la virusuri și bacterii, variantele antigenice sunt practic absente.

Spre deosebire de virusuri și bacterii, la multe protozoare și paraziți pluricelulari, care au cicluri de viață complicate se produce fenomenul *variației antigenice* prin schimbarea periodică a antigenelor de suprafață ale unor celule ale tulpinii infectante (la *Plasmodium malariae*) sau prin comutare genică și activarea genelor pentru sinteza unor noi antigene de suprafață (la *Trypanosoma brucei*). Variația antigenică la *T. brucei* are loc în decursul unei singure faze a ciclului celular. Celulele au un înveliș de suprafață format din circa 7 milioane de molecule glicoproteice identice, cu g_m de 61 kD. Ele au o specificitate antigenică distinctă la diferite subpopulații de *T. brucei*, coexistente în

organismul infectat. Diferitele variante antigenice ale glicoproteinelor de suprafață celulară sunt codificate de circa 1000 de gene distincte. Fiecare variantă antigenică este codificată de un set de gene ale acestui complex. Cu o frecvență mică, celulele pot să se comute de la o variantă antigenică la alta. Comutarea este rezultatul rearanjării genice prin translocare, fenomen prin care, dintr-un set mare de gene variante ale aceluiași caracter, periodic se schimbă gena din proximitatea unui promotor pentru a fi transcrisă. Această capacitate de schimbare a variantelor antigenice ale glicoproteinelor de suprafață conferă *T. burcei* calitatea unui adevărat „cameleon” antigenic.

Sistemul imunitar poate să elimine orice variantă antigenică a glicoproteinelor de *T. brucei*. Totodată va apare însă o nouă variantă antigenică, ce înlocuie rapid varianta antigenică precursoră și astfel evită răspunsul imun. Variantele antigenice, în succesiunea lor preced cu o treaptă efectorii răspunsului imun și astfel infecția devine cronică.

Unul dintre cele mai interesante fenomene de variație antigenică este cel descris la virusul gripa A, la care hemaglutinina suferă continuu ușoare modificări ale structurii sale antigenice, ca rezultat al apariției unor noi variante genetice. Noile variante antigenice de virus inițiază noi epidemii. De fapt, serul imun indus de ultima variantă antigenică este adeseori neutralizant pentru varianta antigenică precursoră, dar nu și invers (anticorpii induși de varianta precursoră nu neutralizează ultima variantă antigenică). Acest tip de variație limitată se numește „drift” antigenic (englez, drift = derivație). Sporadic se produce o modificare majoră a antigenelor de suprafață, denumită „shift” antigenic (englez, shift = schimbare). Modificarea este rezultatul recombinării materialului genetic a două linii de virus, complet diferite, care infectează simultan aceeași celulă (materialul genetic al virusului gripa se află sub forma a 8 segmente separate de ARN, care permit cu ușurință reasortarea genică în cazul unei coinfecții).

O altă modalitate de evitare a unui răspuns imun eficient este eliberarea proteinelor „momeală”. Acestea sunt antigene eliberate de unele microorganisme și paraziți care deviază răspunsul imun al gazdei de la ținta antigenică majoră. De exemplu, *T. brucei* eliberează în soluție, glicoproteine de suprafață, prin protocoliza limitată a capătului C-terminal al glicoproteinelor de suprafață. Antigenele solubile leagă anticorpii specifici față de glicoproteinele de suprafață ale celulelor de *T. brucei*.

b) Infecțiozitatea

Pentru a produce infecția și a se adapta la gazde noi, bacteriile trebuie să aibă o proprietate suplimentară, atribut al virulenței și anume *infecțiozitatea* (comunicabilitatea, contagiozitatea). Ea reprezintă capacitatea unui micro-

organism de a depăși mijloacele de apărare a organismului, de a se implanta și de a coloniza țesuturile sănătoase, adică de a stabili o localizare și de a forma un focar primar de infecție.

Colonizarea țesuturilor de către un microorganism patogen este o fază inițială, critică pentru evoluția procesului patologic și este un fenomen complex, care implică atât implantarea cât și utilizarea substanțelor nutritive disponibile în mediul gazdei.

Pentru a iniția procesul infecțios, bacteriile trebuie să adere, adică să se atașeze de celulele gazdă. Atașarea este mediată de structuri specializate ale suprafeței bacteriene, denumite generic *adezine*. Suportul aderenței bacteriene este reprezentat, în primul, rând de celulele epiteliale.

Interacțiunea celor mai multe adezine cu receptori de suprafață ai celulei sensibile este *specifică* și *selectivă*, ceea ce are un rol hotărâtor asupra tropismului și colonizării atât de către celulele bacteriene patogene, cât și de către cele autohtone. Structurile bacteriene de aderență, anatomice sau moleculare sunt, de cele mai multe ori, *adaptive*, iar exprimarea lor fenotipică variabilă mărește mult șansa aderenței la diferiți receptori celulari. Ele dispar prin cultivarea succesivă *in vitro*. De aceea tulpinile bacteriene de laborator sunt mai puțin aderente de suport, comparativ cu izolatele bacteriene proaspete.

Structuri moleculare și anatomice cu rol de aderență

Mecanismul aderenței celulelor de *E. coli*, la celulele epiteliale ale tractului urinar a fost studiat de Duguid în anii '50. Pe suprafața celulelor bacteriene infecțioase s-a remarcat prezența *fimbriilor*, care *in vitro* produc aglutinarea hematiilor.

Astăzi se cunoaște specificitatea tisulară a aderenței celulelor bacteriene, ceea ce explică faptul că *E. coli* este foarte comună în infecțiile tractului urinar, iar streptococii grupului A colonizează tractul respirator superior și pielea, rareori fiind agenții infecțiilor urinare. Un alt exemplu de specificitate a interacțiunii este *N. gonorrhoeae*. Aderă numai de celulele epiteliale ale tractului genital uman și nu de alte celule, ceea ce explică limitarea spectrului de gazdă, la specia umană.

Aderența bacteriană este mediată de *lectinele* de suprafață, care recunosc specific și se leagă de resturi glucidice ale unor molecule complexe ale celulei epiteliale.

Cele mai cunoscute structuri de aderență sunt fimbriile tip I de *E. coli*, care se leagă preferențial de glicoproteinele celulare (epiteliale) care conțin manoză.

Receptori celulelor epiteliale pentru lectinele fimbriale sunt diferiți la diferite etaje ale tractului urinar, deoarece bacteriile nu aderă numai de carbohidratul terminal al moleculelor de suprafață, ci se leagă și de glucide, situate în interiorul

moleculei. Diferite lectine bacteriene se pot lega de zone diferite ale aceluiași carbohidrat. Uneori oligozaharidul este expus parțial la suprafața celulei și prin urmare, receptivitatea ei pentru diferite bacterii este variabilă. Capacitatea unui glucid de a funcționa ca receptor al unei lectine bacteriene depinde nu numai de prezența zahărului respectiv, ci și de accesibilitatea și modul lui de prezentare.

Deoarece aderența bacteriană este o etapă critică în evoluția procesului infecțios se studiază posibilitatea utilizării zaharurilor cu specificitate de legare a lectinelor bacteriene, pentru prevenirea infecțiilor și pentru tratament. Această strategie se bazează pe faptul că zaharurile care au inhibat selectiv aderența bacteriilor de celulele epiteliale *in vitro*, pot fi folosite ca „momeli” moleculare pentru a intercepta bacteriile patogene, înainte ca ele să adere de celulele sensibile. Pe această cale a fost parțial inhibată aderența celulelor de *E. coli*, de epitelii vezicii urinare, prin adăugarea zahărului specific al receptorului celular (manoză). Controlul infecțiilor prin blocarea receptorilor epiteliali, cu ajutorul zaharurilor este promițător, deoarece diversitatea biochimică a fimbriilor face imposibilă administrarea unor preparate vaccinale.

La *E. coli* s-au descris structuri asemănătoare fimbriilor, mai subțiri și mai ondulate, cu rol în aderență (notate K88 și K99).

Flagelii amplifică infecțiozitatea bacteriană, deoarece asigură mobilitatea și facilitează străpungerea stratului mucos care tapetează epiteliiile mucoaselor. Rolul lor în colonizarea epitelului și în declanșarea procesului infecțios a fost demonstrat pentru *V. cholerae*. Tulpinile imobile sunt mai puțin virulente și aderente la bordura în perie a celulelor epitelului intestinal.

Mucopolizaharidele acoperă suprafața celulei bacteriene, formând un glicocalix, cu grade foarte diferite de dezvoltare: un glicocalix propriu-zis (fuzy coat), microcapsula sau capsula propriu-zisă. Moleculele sale componente au caracter anionic și funcționează ca o capcană de substanțe nutritive și cationi, au rol protector față de virusuri și fagocite și formează o barieră față de factorii humoralii ai apărării. Totodată facilitează aderența bacteriei de suprafața celulei gazdă.

Proteinele de aderență sunt proteine transmembranare ale bacteriilor Gram negative, care se leagă de receptori celulei epiteliale. Pe suprafața acestora există un mare număr de proteine, care îndeplinesc diferite funcții: unele au rol de *receptori* și participă la transportul transmembranar, altele ancorează celula în matricea extracelulară. Toate sunt cunoscute sub denumirea de *integrine* (integrează celula în ambianța tisulară). Aceste proteine pot să funcționeze ca punți de legătură între celula bacteriană și cea epitelială. De exemplu, proteina

M de la *S. pyogenes* facilitează aderența bacteriei la epiteliul faringian. Proteine cu funcție similară s-au descris la *N. gonorrhoeae*.

La *V. cholerae* funcția de aderență o au *hemaglutininele*. Ele mediază o interacțiune strânsă între suprafața bacteriei și microviliile celulei epiteliale. Aceleași molecule aglutinează eritrocitele.

Acizii lipoteichoici sunt molecule de aderență neadaptative, indispensabile supraviețuirii celulei bacteriene. Rolul lor s-a evidențiat la *S. pyogenes*. După îndepărtarea capsulei de hialuronat (prin hidroliză cu hialuronidază streptococică), aderența bacteriană s-a intensificat. Numai anticorpii anti-acizi lipoteichoici au inhibat aderența bacteriană.

În procesul atașării celulelor bacteriene de suprafața epitelială (sau de un suport inert), indiferent de mecanismul de realizare se disting două faze: o fază inițială, *reversibilă*, mediată de interacțiunea forțelor intermoleculare necovalente (van der Waals, electrostatice); o fază *ireversibilă*, mediată de interacțiuni specifice între moleculele suprafeței bacteriene și receptorii celulei sensibile.

Interacțiunea specifică este evenimentul primar, prin care microorganismele inițiază colonizarea suportului. Ea implică formarea unor legături stabile între receptorii celulei sensibile și molecule ale suprafeței bacteriene.

Proteinele membranare de virulență sunt situate în membrana externă a bacteriilor Gram negative și funcționează ca mecanisme moi de amplificare a infecțiozității. Dintre acestea, o atenție deosebită s-a acordat proteinelor care înglobează Fe, denumite *siderofori*. Concurența pentru Fe între macroorganism și bacteriile infecțioase este surprinzătoare, deoarece în organismul uman și animal există o cantitate mare de Fe (circa 4,5 g la om). Lipsește însă Fe disponibil – factor cheie al activității unor enzime ale metabolismului bacterian, deoarece este legat de proteine parțial saturate: lactoferina (LF) și transferina (TF). Ambele leagă Fe cu constante foarte înalte de asociere, astfel încât Fe disponibil se găsește în concentrații foarte mici (10^{-18} M).

LF se găsește în secreția lăcrată, iar TF în ser. TF leagă doi ioni de Fe^{3+} /moleculă și nivelul său normal de saturare este de 30%. Rolul acestor proteine în rezistența antiinfecțioasă nespecifică este dovedit experimental, *in vitro*: adăugarea Fe^{3+} , în exces față de capacitatea totală de legare a proteinelor anulează efectele lor antibacteriene.

LF, ca și IgA se găsește în secreția mucoaselor digestive și respiratorii și are rol în protecția față de microorganismele infecțioase. Funcția antibacteriană a LF se exercită și în interiorul polimorfonuclearelor, în fagolizosom, prin același mecanism de legare a Fe.

Bacteriile infecțioase trebuie să dobândească Fe^{3+} prin două mecanisme: 1) prin competiția cu proteinele gazdei pentru legarea Fe; 2) din combinațiile cu Fe ale gazdei.

Competiția cu proteinele parțial saturate ale gazdei, pentru legarea Fe este mediată de agenții *chelatori* ai Fe. Unele serotipuri de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, unele specii de *Salmonella* sintetizează enterochelina, un trimer ciclic al 2,3-dihidroxi-N-benzoil-serinei, cel mai puternic chelator al Fe.

A II-a modalitate de disponibilizare a Fe pentru bacterii este utilizarea sa din combinația hemică. Fierul hemic derivă din eritrocitele care se lizează. O dovadă certă a utilizării Fe hemic a fost adusă pentru *E. coli*: creșterea sa este foarte rapidă în cavitatea peritoneală, contaminată cu hem, după ligaturarea intestinului. De asemenea, *Y. pestis* crește într-un mediu în care se adaugă proteine de legare a Fe și hem. Dependența sa de hem este argumentată indirect de faptul că transmiterea infecției se face de către un artropod hematofag, care digeră eritrocitele de la gazda infectată și în leziunea proaspătă regurgitează atât bacteriile cât și hemul.

Capacitatea de a obține Fe din moleculele complexe (TF, hemoglobină, mioglobină, LF) a fost evidențiată pentru *Meningococcus*. La purtătorii de *Meningococcus*, celulele din orofaringe intră în competiție pentru Fe cu LF iar în cursul procesului infecțios bacteriile mobilizează Fe din TF. Această proprietate nu este constitutivă, ci este indusă de nivelul scăzut al Fe disponibil. Toate tulpinile patogene de *Meningococcus* și *Neisseria* utilizează LF ca sursă de Fe *in vitro*, în timp ce tulpinile nepatogene de *Neisseria* nu au această proprietate.

c) Toxigenitatea

Toxigenitatea (toxigeneza) reprezintă capacitatea unor agenți patogeni de a elabora în cursul creșterii lor, una sau mai multe substanțe toxice și este o caracteristică esențială a patogenității bacteriene. Numeroase alte organisme (alge, fungi, protozoare, plante, animale) sintetizează toxine.

Ideea că bacteriile pot cauza îmbolnăviri prin producerea toxinelor a fost sugerată de Loeffler (1884), pe baza observației că după inocularea subcutanată a unui mare număr de cobai cu bacili difterici a constatat existența leziunilor cu arie mare de răspândire în organism, din care bacteriile au lipsit. Concluzia a fost că baciliile s-au multiplicat la locul inoculării și au produs o substanță toxică, solubilă, care s-a răspândit la distanță pe calea torentului sanguin.

Ulterior s-a observat că multe bacterii patogene produc toxine. De fapt simpla prezență a unui număr mare de bacterii în țesuturi sau în umori nu este suficientă pentru a explica fenomenele patologice care însoțesc procesul infecțios. În unele cazuri, microorganismul patogen eliberează produse

metabolice care alterează desfășurarea normală a metabolismului tisular, fără a fi ele însele toxice.

Toxinele bacteriene au fost descoperite de Roux și Yersin (1888). Ei au arătat că unele specii bacteriene eliberează, *in vitro*, substanțe care reproduc leziunile și simptomele caracteristice bacteriilor respective, iar uneori, după injectare au chiar efect letal.

Termenul de *toxină* derivă din cuvântul grecesc „toxicon” care înseamnă otravă. Orice substanță macromoleculară cu efect toxic sau letal pentru un organism animal, vegetal sau uman este o toxină. Definiția se extinde la efectul toxic *in vitro*, asupra celulelor, țesuturilor sau organelor. Se cunosc circa 140 toxine proteice, din care 2/3 sunt produse de bacteriile Gram pozitive. Unele bacterii produc simultan între 5 și 10 tipuri de toxine.

Capacitatea de a elabora toxine nu este limitată la bacteriile patogene propriu-zise. Numeroase saprobacterii produc substanțe toxice, uneori foarte puternice (toxina botulinică produsă de *Cl. botulinum*). Toxigenitatea bacteriilor variază în cadrul aceleiași specii și este dependentă de condițiile de mediu.

Pentru a-și exercita efectul, toxinele trebuie să se elibereze din celule și să se solubilizeze în umorile organismului. După sinteză, toxinele pot rămâne asociate permanent sau temporar cu celula sau sunt eliminate la exterior. Aceste diferențe sunt dependente, în primul rând de specia producătoare, precum și de fazele succesive ale evoluției unei populații bacteriene: de creștere exponențială, staționară sau de declin. Chiar toxinele care în faza exponențială sunt asociate celulei, în faza de declin se găsesc libere în mediul extracelular datorită lizei. Din această cauză, studiul raportului topologic între celulă și toxină are semnificație numai pentru faza de creștere a culturii bacteriene. Din acest punct de vedere se disting următoarele categorii de toxine:

a) toxine localizate în celulă (citoplasmatic) produse de bacterii Gram negative (*S. dysenteriae*, *Y. pestis*, *B. pertusis*, *E. coli* etc.) și Gram pozitive (enterotoxina de *Cl. perfringens*, streptolizina S, toxina produsă de *Cl. difficile*, pneumolizina produsă de *S. pneumoniae*). Ele sunt de natură proteică;

b) toxinele constitutive ale peretelui celular, produse numai de bacteriile Gram negative și care corespund endotoxinelor clasice. Din punct de vedere chimic sunt complexe glico-lipidice sau glico-lipo-proteice.

Toxinele constitutive nu sunt niciodată eliberate în cursul fazei de creștere exponențială și nici după îndepărtarea peretelui celular;

c) toxinele eliminate în mediul extern sau exotoxinele propriu-zise sunt de natură proteică și sunt produse mai frecvent de bacteriile Gram pozitive (toxina difterică, toxinele stafilococice, toxina de *B. anthracis*), dar și de cele

Gram negative (*V. cholerae*, *P. aeruginosa*). Bacteriile Gram negative conțin cantități superioare de lipide în alcătuirea peretelui, ceea ce limitează excreția macromoleculelor;

d) toxine cu *localizare mixtă* (endocelulară și exocelulară). În faza exponențială sunt secretate parțial în mediu, dar o fracție semnificativă rămâne în interiorul celulei și este eliberată după autoliză (toxinele tetanică, botulinică, produse de specii ale g. *Clostridium*).

Mult timp s-a considerat că exotoxinele sunt de natură proteică, iar endotoxinele – de natură lipopolizaharidică. Această diferențiere nu este netă, deoarece unele toxine proteice aparțin categoriei endotoxinelor, fiindcă rămân asociate celulei producătoare, și invers, uneori, toxinele de natură lipopolizaharidică sunt eliminate la exterior, ca exotoxine. De aceea, clasificarea toxinelor trebuie să se facă după criteriul compoziției chimice. Din acest punct de vedere, majoritatea exotoxinelor sunt de natură *proteică*, iar majoritatea endotoxinelor sunt *lipopolizaharidice*.

În raport cu tropismul lor se disting *neurotoxine*, *enterotoxine*, *cardio-toxine*, cu efecte limitate la țesutul respectiv, sau toxine *pantropice*, cu efecte asupra mai multor categorii de țesuturi.

Toxine de natură proteică

Majoritatea toxinelor de natură proteică sunt *exotoxine*. Ele se sintetizează sub forma unei proteine precursorare, mai lungă decât proteina extracelulară, ce cuprinde o secvență N-terminală de 15–30 aminoacizi, hidrofoabă, a cărei funcție este traversarea membranei. Ea este excizată de o peptidază membranară și rezultă proteina hidrofilă, activă funcțional.

In vivo, exotoxinele sunt eliminate la locul multiplicării bacteriilor, de unde sunt transportate la distanță și își exercită efectul asupra țesuturilor sensibile. *In vitro*, exotoxinele sunt eliminate în mediul de cultivare. Eliberarea lor are loc predominant în faza de creștere exponențială, astfel încât concentrația lor în mediu este maximă la sfârșitul perioadei de creștere, sau la scurt timp după aceea. Unele exotoxine sunt eliberate nu numai ca produse de secreție, ci și după autoliza celulei. Astfel, o cantitate oarecare de toxină tetanică și botulinică părăsește celula intactă prin *difuziune*, dar o proporție semnificativă rămâne legată de corpul celulei și este eliberată prin autoliză sau sub acțiunea diferiților factori.

Comparativ cu altele substanțe toxice, exotoxinele bacteriene au o toxicitate foarte ridicată, atât în stare brută sub forma filtratelor de cultură, dar mai ales în formă purificată. În cazul filtratelor de cultură, DL_{50} (doza letală 50 sau

cantitatea de toxină care omoară jumătate din animalele de experiență) la cobai este:

- 0,002 ml pentru toxina difterică
- 0,0005 ml pentru toxina tetanică
- 0,0001 ml pentru toxina botulinică.

Exotoxinele purificate au un efect toxic impresionant. Toxina botulinică, purificată și cristalizată – cea mai puternică toxină naturală – conține într-un mg – 1200000 DLM (*doze limite mortale*) pentru 1 kg corp (adică 1 mg toxină omoară 1200000 kg cobai). Ar fi suficiente 300 g de toxină purificată pentru a omorî toată populația globului. Toxicitatea toxinei tetanice este cu puțin inferioară. *In vitro* se apreciază că o singură moleculă de toxină difterică este suficientă pentru a omorî o celulă, iar pentru liza unei plachete sanguine umane sunt necesare 15 molecule de streptolizină O. Toxina botulinică este de circa un milion de ori mai puternică decât stricnina și de 15000 de ori față de aconitinei – cel mai puternic alcaloid. Doza letală este mai mică după administrarea intravenoasă, în raport cu alte căi parenterale. Pe cale orală sunt active enterotoxinele perfringens, stafilococică, holerică și neurotoxina botulinică. Dozele letale pentru căile respiratorie și digestivă sunt de 100–1000 ori mai mari decât pentru căile i.v., i.m., i.p sau s.c. Pielea intactă este o barieră eficace, dar cea mai mică rană este o cale de acces a toxinei.

Structura moleculară a toxinelor bacteriene

Majoritatea toxinelor bacteriene sunt holoproteine. Câteva au fost purificate și cristalizate (difterică, botulinică, holerică, tetanică, toxina dermo-exfoliatoare stafilococică). Greutatea moleculară variază între 2000 (enterotoxina termo-stabilă de *E. coli*) și 150000 (toxinele tetanică și botulinică).

Ca model general de structură moleculară, exotoxinele bacteriene sunt similare hormonilor glicoproteici: ambele tipuri de molecule sunt alcătuite fie din două lanțuri, fie din două subunități, notate cu A și B. Lanțul A are activitate biologică, iar lanțul B mediază legarea de receptorul celular. Toxina tetanică este monocatenară în formă nativă endocelulară, dar în procesul secreției este clivată și rezultă două catene peptidice unite prin punte S–S între cele două resturi cisteinil situate de o parte și de alta a punctului de clivare.

Neurotoxinele botulinice, în interiorul celulei sunt monocatenare (g m 150 000), dar după clivarea proteolitică rezultă două lanțuri peptidice legate printr-o punte S–S.

Subunitatea A a toxinei holerice este alcătuită din două peptide (A_1 și A_2), inegale, legate printr-o punte S–S.

Structura primară completă a fost clarificată pentru enterotoxina stafilococică B, pentru fragmentul A al toxinei difterice și pentru lanțul B al toxinei holerice. Ultimul are o homologie semnificativă a secvenței sale cu 4 hormoni glicoproteici: tireotropina bovină, hormonul luteotrop bovin, gonadotropina corionică umană și hormonul foliculostimulant uman.

Cîteva toxine sunt *glicoproteine*: exotoxina de *Corynebacterium ovis*, toxinele eritrogenă streptococice A și B și toxina dermo-exfoliatoare stafilococică. Streptolizina S este un nucleopeptid dimeric. Fiecare monomer este alcătuit dintr-un lanț peptidic de 32 aminoacizi, asociat cu un oligoribonucleotid bogat în guanină, iar toxina de *C. perfringens* pare a fi o metaloproteină cu Zn.

Unele toxine prezintă un *polimorfism antigenic* evident, deși din punct de vedere farmacologic sunt identice. De exemplu, toxina botulinică prezintă 7 serotipuri (notate A → G), care nu dau reacție încrucișată semnificativă cu anticorpii obținuți față de una dintre ele. Neutralizarea fiecărei variante este realizată numai de anticorpii homologi. Polimorfismul antigenic este probabil rezultatul unor mutații care au afectat numai situsurile antigenice ale moleculelor de toxină, dar determinanții de toxicitate au rămas nemodificați.

Este cunoscută și situația inversă, în care, toxine bacteriene diferite sunt înrudite imunologic, adică prezintă reactivitate încrucișată. Se cunosc 3 grupe de toxine care dau reacții încrucișate:

1) Toxinele tiol-dependente formează un grup de 15 proteine citolitice, sintetizate de diferite bacterii Gram pozitive. Prototipul lor este streptolizina O. Efeciele ei cardiotoxice și hemolitice depind de prezența grupărilor tiol în moleculă. Aceste toxine sunt inactivate prin oxidare, dar activitatea lor biologică este restabilită prin reducere. Efeciele lor sunt inhibitate de colesterol și de alți steroli. Ele au determinanți antigenici comuni și reacționează încrucișat cu anticorpii neutralizanți sau precipitanți, obținuți față de una dintre ele.

2) Enterotoxinele termolabile de *E. coli*, *V. cholerae*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium*. Reactivitatea lor încrucișată este explicabilă prin existența determinanților genetici comuni, consecință a transferului intergeneric de material genetic.

3) Toxinele de *C. difficile* și *C. sordellii* au deasemenea reactivitate încrucișată.

Determinismul genetic al sintezei toxinelor

Sinteza toxinelor bacteriene este codificată de gena *tox* a cărei localizare este cromosomală, plasmidială sau fagică.

La *V. cholerae*, gena *tox* care codifică sinteza enterotoxinei are situs cromosomal și prezintă 4. alele.

Enterotoxinele și hemolizinele de *E coli*, toxina dermo-exfoliatoare stafilococică sunt codificate de gene plasmidiale.

Gena *tox*, codificatoare a toxinei difterice aparține genomului unor bacteriofagi ADN (β , P, I, W), iar controlul ei este realizat de o genă situată pe cromosomul bacterian.

Fagii purtători ai genei *tox* se găsesc în celulele de *C. diphtheriae* sub formă de profag, de fag virulent replicativ, fie sub formă de replicon autonom neintegrat în cromosomul bacterian, dar în stare de represie. Este cunoscut modul de funcționare a genei *tox*, purtată de fagul β , ce se integrează ca profag. Ea se găsește aproape de situsul de inserție cromosomală a genomului fagic, dar are propriul său promotor și se poate exprima independent de alte gene fagice, după cum poate fi represată fără să afecteze biosinteza altor proteine fagice. Această genă nu pare a fi esențială pentru genomul fagic. Modificarea ei mutațională nu afectează ciclul de replicare a fagului.

Gena *tox* de origine fagică conferă toxicitate altor două tulpini de *C. diphtheriae*, varietatea *ulcerans*, infecțioasă pentru iepure și om și varietatea *ovis*.

Sinteza toxinei eritrogene streptococice (scarlatinoasă), precum și a toxinelor botulinice C și D este deasemenea codificată de fagi temperați.

La *C. perfringens*, toxigeneza este legată de procesul sporulării. Sporularea este o condiție obligatorie, dar insuficientă pentru producerea toxinei. Toxina pare a fi un produs al genei de sporulare, o proteină de structură a tunicii sporale.

Rolul toxinelor în patogeneză bacteriană

Unele toxine (tetanică, difterică, botulinică, holerică, eritrogenă) au un rol determinant în patogenitatea bacteriană. Primele 4 enumerate mai sus sunt factori unici ai patogenității pentru bacteriile producătoare. În cazul holerei, gravitatea infecției este rezultatul consecințelor fiziopatologice nespecifice (pierderea apei și sărurilor pe cale intestinală) ale toxinei asupra mucoasei.

Eritemul specific scarlatinos este datorat efectului primar al toxinei eritrogene streptococice.

Enterotoxinele stafilococice și enterotoxina *perfringens* produc efecte patologice ca rezultat al intoxicației alimentare, în special în colectivități.

Dizenteria produsă de *Shigella* este deasemenea consecința acțiunii toxinei, deoarece enterocitele și celulele endoteliale ale vaselor mici mor și provoacă ulcerarea mucoasei intestinale.

Exotoxina de *B. anthracis* produce edem local și hemoragie, iar în infecția septicemică, efectul letal pare a fi datorat efectelor sale neurotrophe, în special asupra centrului bulbar al respirației.

Efectele biologice ale toxinelor pot fi considerate ca având loc la 4 nivele de structură:

- la nivelul *organelor și țesuturilor*, pe baza căruia se disting neurotoxine, cardiotoxine, enterotoxine, nefrotoxine;
- la nivelul *celulelor*: hemolizine, leucocidine, citotoxine, dermatoxine;
- la nivelul sistemelor *subcelulare* (membrane, organite, lanțuri transportoare de electroni);
- la nivelul sistemelor moleculare.

Ultimele două nivele de acțiune sunt puțin cunoscute.

Receptori celulari pentru toxine

Interacțiunea toxinelor cu celulele sensibile, asemenea altor molecule bioactive (hormoni, **antigene**, lectine, mediatori) este mediată de molecule specifice denumite *receptori*. Moleculele receptor se găsesc în stratul extern al membranei citoplasmatică. Celulele sensibile nu au receptori specifici pentru toxine, deoarece ele nu-și programează structuri moleculare pentru a se sinucide. Toxinele „parazitează” **receptorii** care în mod obișnuit au rolul de a îngloba molecule utile metabolismului celular.

Natura chimică a receptorilor câtorva toxine este cunoscută. Receptorul streptolizinei O este **colesterolul**, iar alte câteva toxine diferite au ca receptori ganglioizidele. Acestea sunt glicolipide hidrosolubile ale suprafeței celulare, în special în neuroni, alcătuite dintr-o componentă oligozaharidică, legată de un ceramid (acid stearic și **sfinгоzină**). Ganglioizidele diferă între ele prin numărul și secvența glucidelor componente, în special a acidului N-acetil neuraminic (NANA) sau acid sialic.

Toxina tetanică se leagă de ganglioizide, în special de di- și tri-sialo-ganglioizide, care conține două și respectiv trei resturi de acid sialic, atașate de galactoză. Între **toxina tetanică** și hormonul tireostimulator (TSH) există o competiție de legare strict reciprocă, pe membrana celulelor tiroidiene. Pe baza acestor rezultate s-a dedus că receptorul neuronal pentru toxina tetanică este asemănător cu receptorul celulei tiroidiene pentru TSH. Moleculele de glicolipide (ganglioizide) sau glicoproteinele cu o catenă polizaharidică asemănătoare ar putea fi receptorii toxinei tetanice.

Receptorul celular pentru toxina *holerică* este o ganglioizidă. Efectul toxinei asupra celulelor adipoase și asupra ansei intestinale de iepuri, *in vitro*, este blocat prin incubarea prealabilă a toxinei cu preparate brute de ganglioizide. Ganglioizida receptor este un glicolipid (GM₁). S-a observat o corelație directă între conținutul membranar în GM₁ și sensibilitatea tisulară la toxină. O linie de fibroblaste de șoarece deficiente în sinteza GM₁ nu răspunde la toxina

holerică, dar integrarea GM_1 exogenă în membrana acestor celule a reconstituit o sensibilitate maximă la acțiunea toxinei.

Aceleași molecule (GM_1) au rol de receptor pentru toxina termo-labilă de *E. coli*, foarte asemănătoare toxinei holerică.

Receptorul celular al toxinei de *B. pertusis* pare a fi tot o gangliozidă care conține acid sialic.

Receptorul celular pentru toxina difterică ar fi o glicoproteină, deoarece tratamentul celulelor sensibile cu neuraminidază determină o ușoară intensificare a efectului toxic. Aceasta denotă că un carbohidrat expus după tratamentul cu neuraminidază, ar putea fi implicat în legarea toxinei.

Exotoxina de *S. dysenteriae* s-ar lega de resturile oligozaharidice legate β -1-4 de N-acetil-D-glucozamină ale unei glicoproteine.

În rapori cu localizarea țintei lor moleculare se disting după tipuri generale de acțiune a toxinelor:

- cele care au ținta finală la nivelul membranei;
- toxine a căror țintă finală este citoplasmatică.

Ținta finală este structura a cărei interacțiune cu toxina produce efectul toxic, în timp ce ținta intermediară, care include și receptorul înlesnește acțiunea toxinei. În unele cazuri, ținta finală este însuși receptorul.

Toxinele a căror țintă finală este localizată în membrană acționează prin modificări structurale ale membranei citoplasmatică, urmate de ruperea acesteia. Consecința este citoliza ori moartea celulei. Multe toxine își exercită efectul asupra celulelor prin dezorganizarea membranei. Acestea se numesc hemolizine (citolizine), deoarece eritrocitele se utilizează în mod curent pentru titrarea și studiul efectelor lor citolitice.

Toxinele a căror țintă primară este intracelulară acționează asupra unor molecule după ce au traversat membrana citoplasmatică.

Pătrunderea moleculelor de toxină în celulă

Toxinele bacteriene a căror țintă este intracelulară sunt molecule bifuncționale, ca și toxinele vegetale (ricina), bacteriocinele sau hormonii glicoproteici. Toate aceste categorii de molecule sunt alcătuite după același model: sunt monocatenare (toxina difterică, exotoxina de *P. aeruginosa*) sau sunt dimere (enterotoxinele holerică și termolabilă de *E. coli*). Cele monocatenare au un segment COOH-terminal de legare la nivelul receptorului și un segment NH_2 -terminal, care pătrunde în citoplasmă și interacționează cu ținta intracelulară. Pentru cele dimere, funcțiile de legare (B) și de activitate propriu-zisă (A) sunt realizate separat de fiecare catenă.

Pătrunderea toxinei în celulă se realizează prin următoarele mecanisme: a) endocitoză mediată de receptori; b) pinocitoză nespecifică în faza lichidă; c) transferul direct al moleculei prin membrana citoplasmatică. Înglobarea prin mecanismul endocitozei mediată de receptori conferă specificitatea și eficiența pentru moleculele mari. Receptorii celulari de toxină, fiind destinați unor funcții normale sunt în număr mare față de numărul moleculelor de toxină necesare pentru a induce efectul biologic. De exemplu, 4–10 molecule de toxină holerică și una singură de toxină difterică sunt inductoare ale efectelor specifice de intensitate maximă.

Dinamica receptorilor după interacțiunea cu moleculele de toxină s-a studiat în cazul celor de natură glicoproteică. În mod normal (libere, neocupate de ligand), aceste molecule sunt distribuite uniform în planul membranei sau sunt concentrate în zone specializate denumite *zone tapetate* (coated pits) cu *clatrină*, un înveliș de natură proteică pe fața citoplasmatică a membranei.

După legarea moleculei de toxină, complexele receptor-toxină se aglomerează în zonele tapetate cu clatrină situate la baza microvilozităților. Zonele respective se invaginează și formează *vezicule acoperite cu clatrină*, cu rol de transport. În citoplasmă, învelișul de clatrină se dezorganizează și receptorii celulari deveniți disponibili sunt reciclați spre suprafața celulei, – iar molecula transportată (toxina) este eliberată spre un situs intracelular specific.

MECANISMELE DE ACȚIUNE CELULARĂ ȘI MOLECULARĂ A PRINCIPALELOR GRUPE DE TOXINE

Toxigenitatea toxinelor proteice este caracterizată prin *specificitate* (adică efecte farmacologice proprii fiecărei toxine sau grup de toxine) și prin *intensitatea* considerabilă, mult superioară altor toxine vegetale, animale sau chimice.

Toxine citolitice

Toxinele citolitice, denumite și *citolizine* acționează la nivelul membranei citoplasmatică și produc schimbări conformaționale ale rețelei glicolipoproteice membranare, consecința fiind ruperea acestei bariere osmotice și eliberarea componentelor solubile și a organitelor în mediul exterior, sau o dezorganizare a acestei rețele moleculare, incompatibilă cu viața.

Unele toxine citolitice au acțiune *enzimatică fosfolipazică de tip C* (toxina α de *Cl. perfringens*). Ele hidrolizează fosfatidil-colina, sfingomieline, lecitina și alte substraturi lipidice, la nivelul legăturii ester a acidului fosforic și eliberează un diacil-glicerol și componenta fosforilată.

Streptolizina O redusă se fixează pe colesterolul de la suprafața membranei celulare și modifică interacțiunea sa normală cu fosfolipidele adiacente, rezultatul fiind o creștere a rigidității membranei.

Toxinele cu efect membranar s-au dovedit a fi utile ca sonde moleculare în studiul biomembranelor. S-a estimat mărimea porilor membranari prin studiul mobilității moleculelor radiomarcate, de diferite dimensiuni.

Toxine neutrotrope

Din această categorie fac parte toxinele tetanică, botulinică și într-o măsură mai mică, toxina cărbunoasă. Efectele lor se produc asupra țesutului nervos central sau periferic și interferează cu transmiterea influxului nervos. Consecințele sunt paralizia spastică, flască și respectiv blocarea centrului respirator bulbar.

Toxina tetanică

Molecula de toxină tetanică este sintetizată sub formă monocatenară. Sub acțiunea proteazelor bacteriene din mediul de creștere, molecula nativă este incizată și rezultă un lanț greu (100 000 D) și unul ușor (50 000 D), care rămân legate printr-o punte S-S și prin interacțiuni necovalente.

Sinteza toxinei are loc, în special, la sfârșitul perioadei de creștere logaritmică, ceea ce sugerează o competiție între creșterea masei celulare și sinteza toxinei, la nivelul transcrierii.

În prezența O_2 se produce liza celulară și toxina este eliberată, iar în anaerobioză, toxina rămâne în celulă sub formă monocatenară.

In vitro, toxina se leagă numai de celule derivate din sistemul nervos central, iar *in vivo* legarea se face preponderent de substanța cenușie. Neurotropismul se explică prin specificitatea de legare a toxinei de ganglioizidele cerebrale, care conțin două unități de galactoză, două unități de N-acetil-glucozamină și 3 resturi de acid N-acetil-neuraminic.

După injectarea plantară, cu ajutorul toxinei radiomarcate cu iod s-a reconstituit următorul traseu: terminații nervoase motorii, trunchiul nervului, rădăcina ventrală, motoneuronii α din coarnele anterioare. Are loc un transport retrograd. Toxina se fixează pe sinaptosomii componente presinaptice.

Toxina tetanică acționează la nivel presinaptic, printr-un mecanism molecular necunoscut. Ea produce blocarea eliberării mediatorilor cu efect inhibitor asupra motoneuronilor. Consecința este paralizia spastică a musculaturii. Efectele sale se exercită asupra circuitelor-polisinaptice, care includ interneuroni Renshaw de tip inhibitor.

Toxina tetanică reproduce toate simptomele tetanosului clinic. Calul este foarte sensibil, dar manifestările tetanice apar rareori la porc și cîine. Păsările sunt rezistente.

Cîteva mii de persoane, anual, pe glob sunt afectate de această infecție toxigenică.

Toxina botulinică

Toxina botulinică este produsă de *C. botulinum*. În formă nativă, molecula este monocatenară, cu g m de 150 kD. Cea mai mare parte a toxinei se eliberează după autoliză. *In vitro*, liniile bacteriene proteolitice clivează pretoxina sub acțiunea proteazelor proprii, în mediul extracelular. *In vivo*, molecula precursorare produsă de tulpinile neproteolitice este scindată sub acțiunea proteazelor intestinale, înainte ca toxina să fie absorbită în sânge. După clivare rezultă două catene polipeptidice, de 100 kD și respectiv de 50 kD, legate între ele printr-o punte S-S. Activitatea toxică se manifestă numai după clivare.

Se cunosc 8 variante antigenice ale toxinei botulinice: A, B, C₁, C₂, D, E, F, G. Majoritatea tulpinilor de *C. botulinum* sintetizează o singură variantă antigenică de toxină. Toate variantele au g m de 150 kD și produc aceleași efecte farmacologice.

Mecanismul de acțiune. Legarea toxinei de receptori trîganglioizidici (GT₁) se face prin intermediul catenei grele. Activitatea neurotoxică se exercită, în esență, la nivelul sistemului nervos periferic. Toxina botulinică blochează transmiterea impulsului nervos la nivelul sinapselor colinergice ale fibrelor nervoase preganglionare parasimpatice și simpatice, ale fibrelor parasimpatice postganglionare și ale terminațiilor somatice motorii. Efectul ei se produce la nivel presinaptic și constă în inhibarea eliberării acetilcolinei din veziculele sinaptice. Se pare că este stopată printr-o scădere a Ca^{2+} în vezicule, etapă obligatorie a exocitozei conținutului lor.

Sistemul nervos central pare a fi protejat de acțiunea toxinei botulinice, fie de bariera hematoencefalică, fie de absența receptorilor.

Ca și în cazul toxinei tetanice s-a sugerat posibilitatea unui transport axonal retrograd al toxinei botulinice până la nivelul sistemului nervos central. Efectul s-ar exercita asupra sinapselor colinergice excitatoare. Rezultatul intoxicației, prin ingestia alimentelor în care s-a multiplicat *C. botulinum* este paralizia musculară flască, similară celei consecutive secționării nervului. Mușchiul rămâne însă excitabil și se contractă la o excitație directă. Conductibilitatea nervoasă nu este alterată. De aceea se consideră că toxina acționează la nivelul joncțiunii neromusculare.

Funcția musculară se restabilește într-un interval lung, necesar regenerării unor noi structuri sinaptice, ca și în cazul denervării chirurgicale a mușchilor.

În concepția clasică, botulismul era considerat exclusiv de natură toxică, consecutiv ingestiei alimentelor conservate, contaminate cu CI botulinum insuficient sterilizate. Recent s-a avansat ideia *toxiinfecției botulinice*, care survine după ingestia, odată cu alimentele, a celulelor de *C. botulinum*. Ele se multiplică în lumenul intestinal și produc toxină, care este absorbită în circulație. Toxina liberă este sensibilă la acțiunea enzimelor digestive, dar cea complexată cu un suport proteic este stabilă și foarte eficientă în ceea ce privește producerea efectelor toxice.

C. botulinum se multiplică, deasemenea, în plăgile contaminate cu granule de sol.

Toxina cărbunoasă

Bacillus anthracis produce o exotoxină care s-a pus în evidență prin faptul că moartea organismelor infectate survine după depășirea fazei acute a bacteriemiei, sub acțiunea protectoare a antibioticelor. Plasma sterilizată prin filtrare, a cobailor morți după infecția cărbunoasă, injectată subcutanat produce edem la cobaiul sănătos și are efect letal după injectare intravenoasă.

Toxina este produsă de liniile necapsulate și constă din 3 componente distincte din punct de vedere chimic:

- factorul I, denumit *factor de edem* este o glicoproteină care dă o singură linie de precipitare cu antiserul corespunzător,

- factorul II este *antigenul protector*, deoarece este imunogen și stimulează răspunsul imun în cursul infecției cărbunoase. Este o proteină de 100 kD. Proteina nativă, purificată pe DEAE–celuloză, urmată de gel–filtrare produce o singură linie de precipitare cu antiserul omolog, dar prin învechire își pierde antigenitatea, păstrându-și specificitatea serologică;

- factorul III denumit *factor letal* este de natură proteică. Efectul său letal se manifestă numai dacă este administrat în amestec cu factorii I și II.

Toxina, produsă *in vivo* sau *in vitro* (pe mediu cu hidrolizat de cazeină) este letală și produce edem. Factorii componenți, injectați separat nu au efecte toxice.

În infecția cu *B. anthracis*, toxina este un factor de virulență. Ea interferează cu activitatea fagocitelor și anulează efectul bactericid al serului, ceea ce favorizează inițierea infecției.

Edemul este consecința modificărilor permeabilității capilare.

Toxina cărbunoasă este letală prin acțiunea sa asupra centrilor respiratori bulbari.

Toxina difterică

Molecula de toxină difterică este cea mai cunoscută în ceea ce privește mecanismul de acțiune la nivel celular și molecular.

Toxina este sintetizată sub forma unei singure catene polipeptidice de 62 kD, stabilizată prin două punți S-S. Prima, în jumătatea N-terminală încheie o buclă între aminoacizii 186 și 201, iar cea de a II-a este situată în jumătatea COOH terminală. Bucla N-terminală conține 3 resturi de arginil, ce se rup ușor sub acțiunea proteazelor de tipul tripsinei din supernatantul celular, secretate odată cu toxina. După clivarea enzimatică rezultă două polipeptide: fragmentul A (englez, activity) (21500 D) și fragmentul B (englez, binding) (40500 D), legate prin puntea S-S. Fragmentul B mediază legarea de receptorul celular (o glicoproteină), iar fragmentul A exercită efectul specific. Atât molecula nativă cât și cea clivată sunt citotoxice, dar subunitățile A și B separate nu au activitate biologică. În prezența substanțelor reducătoare care conțin o grupare tiol, legătura S-S se rupe și cele două fragmente se separă.

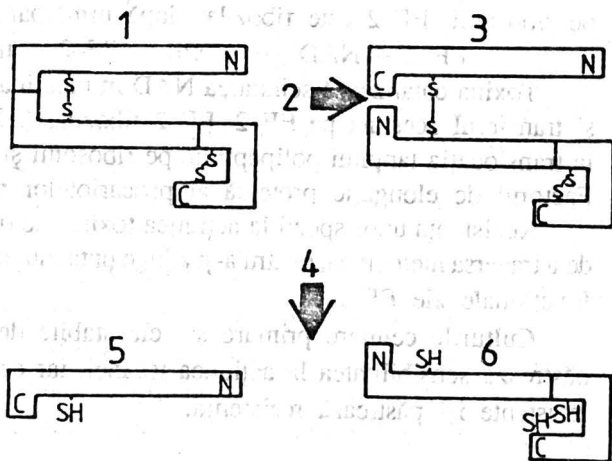


Fig. 60. Reprezentare schematică a structurii moleculei de toxină difterică. Molecula este alcătuită din două fragmente (A și B) și are g m de 62 kD. *In vivo* este activă numai în formă clivată, sub acțiunea unei proteaze care separă cele două fragmente, dar care rămân asociate printr-o legătură S-S. Sub acțiunea agenților reducători, cele două fragmente, se separă complet și își pierd activitatea (1 = molecula întregă cu g m de 62 kD; 2 = proteaza; 3 = toxina clivată; 4 = reducere; 5 = fragmentul A, de 24 kD; 6 = fragmentul B, de 38 kD) (după Bizzini, 1976).

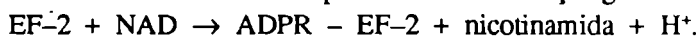
- 1 Toxina g m 62 kdal
- 2 Proteaza
- 3 Toxina „clivată” 62 kdal
- 4 Reducere
- 5 Fragmentul A 24 kdal
- 6 Fragmentul B 38 kdal

Toxina difterică își exercită efectele toxice asupra anumitor specii: omul, iepurele și cobaiul sunt foarte sensibile, iar șoarecele, șobolanul și majoritatea nevertebratelor sunt rezistente. Metoda de titrare a toxinei constă în injectarea intradermică la cobai și aprecierea efectului dermonecrotic, iar la om permite evaluarea imunității antidifterice (reacția Schick).

Toxina pătrunde în celulă fie pe calea *pinocitozei nespecifice* (calea neproductivă, fără efecte toxice, deoarece este degradată în celulă), fie pe calea *specifică a endocitozei mediate de receptori* (calea productivă, cu manifestarea efectelor toxice).

Fragmentul B, prin regiunea COOH-terminală interacționează cu receptori celulei sensibile, creind un canal în membrană, în care se inseră fragmentul hidrofob A. Puntea S-S care reunește cele două fragmente se rupe sub acțiunea glutatationului intracelular și eliberează fragmentul A.

Efectul primar al toxinei difterice constă în inhibiția sintezei proteice, dar celelalte activități metabolice rămân normale timp de câteva ore. Ținta acțiunii toxinei este factorul 2 de elongație a lanțului polipeptidic (EF-2). În prezența NAD, toxina difterică inactivează EF-2. EF-2 este o polipeptidil-ARNt-transferază și este implicat în biosinteza lanțului polipeptidic, în etapa de translocare pe ribosomi. EF-2 este ribozilat după următoarea reacție globală:



Toxina catalizează scindarea NAD în nicotinamidă și ADPR-ribozil, precum și transferul acestuia pe EF-2. EF-2 ribozilat (EF-2-ADPR) nu mai participă la translocarea lanțului polipeptidic pe ribosomi și sinteza proteică este blocată. Factorul de elongație proteică al procariotelor nu este inhibat.

Rezistența unor specii la acțiunea toxinei se datorează incapacității acesteia de a traversa membrana, pentru a-și atinge ținta intracelulară și nu unor particularități funcționale ale EF-2.

Culturile celulare primare și cele stabile de la organisme sensibile își păstrează sensibilitatea la acțiunea toxinei, iar cele ce provin de la organisme rezistente își păstrează rezistența.

Exotoxina A produsă de *Pseudomonas aeruginosa*

Liniile toxigene de *P. aeruginosa* secretă exotoxina A, un factor proteic de virulență de 66 kD, cu un rol important în bacteriemii consecutive arsurilor, în infecțiile pacienților imunodeficienți, precum și în infecțiile experimentale. Toxina este secretată sub forma unui lanț polipeptidic cu 4 punți S-S, fără activitate toxică (pretoxină). Activarea toxinei are loc fie în prezența agenților reducători, fie prin clivaj proteolitic. Fragmentul activ are 26 kD.

Exotoxina A are activitate enzimatică similară cu aceea a toxinei difterice: catalizează ribozilarea EF-2, dependentă de NAD. Forma inactivă (pretoxina) nu catalizează reacția de ribozilare în sistemele aceluare, dar fiind preluată de celulele animale este degradată de enzimele lizosomale și se eliberează fragmentul cu activitate enzimatică. Clivajul proteolitic poate să survină în timpul depozitării toxinei native, sau în timpul secreției sale în mediu, sub acțiunea proteazelor de *P. aeruginosa*.

Sinteza exotoxinei A de *P. aeruginosa*, ca și a toxinei difterice este inhibată de adăugarea Fe în mediul de cultură. Cele două toxine nu se aseamănă structural și nu au reactivitate imunologică încrucișată și de aceea este surprinzător mecanismul lor similar de acțiune. Totuși, unele linii celulare sunt sensibile la una dintre toxine și rezistente la cealaltă (celulele de șoarece sunt rezistente la toxina difterică, dar sensibile la exotoxina A. Celulele umane se comportă invers). Diferențele se explică pe scama receptorilor de toxine și a mecanismelor de pătrundere în celulă.

Toxina dizenterică

Toxina dizenterică este un factor important al virulenței în infecțiile produse de *S. dysenteriae*. Preparatul brut obținut prin filtrarea mediului de creștere, ca și lizatul celular au activitate *citotoxică* (evidențiată pe celulele HeLa), *enterotoxică* (evidențiată prin acumularea lichidului în ansa ileală, *in vitro*) și *neurotoxică* (manifestată prin efect letal la șoarece, iepure, maimuță). Toate aceste activități se datorează aceleiași proteine.

Citotoxina de *S. dysenteriae* este o exotoxină sintetizată în formă inactivă, de pretoxină. După clivarea proteolitică rezultă forma activă.

Molecula de toxină are g m de 65–68 kD și constă din două componente:

- un lanț greu (A), cu acțiune enzimatică, cu g m de 30 kD;
- un oligomer (B) format din 6–7 subunități, cu g m de 5 kD fiecare.

Lanțul A este sensibil la acțiunea tripsinei și este scindat în două fragmente, A₁ și A₂, care rămân legate printr-o punte S–S. Catenele A sau B izolate nu sunt toxice pentru celule, dar fragmentul A₁ este inhibitor al sintezei proteice în sistemele aceluare.

Molecula de toxină pătrunde în celulă prin endocitoză mediată de receptori glicoproteici. Efectul ei asupra sistemului celular este inhibiția sintezei proteice, afectată la nivelul alungirii lanțului proteic: este inhibată etapa transferului aminoacizilor pe lanțul polipeptidic. Nu există dovezi în favoarea ribozilării EF-2. Efectul enterotoxic nu este însoțit de creșterea nivelului AMP-ciclic intracelular.

În unele cazuri, faza diareică a infecției cu *S. dysenteriae* este urmată de faza dizenterică, inițiată prin invazia celulelor epiteliului colonic. Bacteriile se multiplică în celulele epiteliale și secretă toxină al cărei efect este inhibiția sintezei proteice și eventual moartea celulară.

ENTEROTOXINE

Grupul enterotoxinelor este heterogen cu privire la talia și structura moleculelor, la mecanismele lor de acțiune, dar au în comun efectele enteropatogene de intensitate și durată variabile.

Enterotoxinele sunt produse de bacterii Gram pozitive (*S. aureus*, *C. perfringens*, *C. difficile*, *B. cereus*) și Gram negative (enterotoxinele termostabile și termolabile de *E. coli*, *S. typhimurium*, respectiv *K. pneumoniae*, toxina holerică, toxina shiga, toxina de *P. aeruginosa*).

Producerea enterotoxinelor a fost evidențiată prin diferite metode:

- metoda ansei intestinale, la iepure sau cobai, ce constă în ligaturarea ileonului după injectarea toxinei sau a culturii bacteriene. În lumenul ansei se acumulează o cantitate variabilă de lichid, care se corelează direct cu intensitatea efectelor toxinei;

- injectarea intragastrică sau intestinală a diferitelor toxine;
- evaluarea efectului dermonecrotic după injectarea intradermică.

Utilizarea culturilor de celule a permis studiul mecanismelor de acțiune a toxinelor, în special a celor ce activează adenilat-ciclaza. Evaluarea efectelor enterotoxinelor asupra culturilor de celule a permis împărțirea lor în două subgrupe:

- enterotoxine *citotoxice* (toxina shiga, toxina *C. perfringens*) omoară celulele în cultură;
- enterotoxine *citotonice* (produse de *E. coli*, *V. cholerae*), activatoare ale adenilat-ciclazei și care se reflectă în diferite activități celulare (stimularea steroidogenezei în celulele suprarenalei etc.).

Toxina holerică

Toxina holerică, secretată de *V. cholerae*, după ce agentul infecțios colonizează intestinul subțire este cauza holerei clinice. Celulele bacteriene aderă de mucoasa intestinală prin mecanisme necunoscute, deși au fost implicate diferite structuri: o adezină flagelară și hemaglutininele. Colonizarea intestinală cu *V. cholerae* nu implică penetrarea sa în celulele mucoasei și nici apariția leziunilor detectabile histologic.

Molecula de toxină este alcătuită din 7 subunități: A_1 (29 kD), A_2 (5,5 kD) și 5 fragmente B (B_1 - B_5 , cu g m 11,5 kD fiecare) așezate concentric în

jurul unui miez central format de subunitatea A_1 . Subunitatea hidrofobă B se leagă de receptori celulari (gangliozidul membranar $GM1_1$) și își modifică configurația spațială, formând un canal prin care subunitatea A_1 pătrunde în citoplasmă. Subunitatea A_2 are un rol nedefinit (probabil participă la internalizarea subunității A_1). Legarea toxinei holerice de gangliozide este similară legării tireotropinei de receptorul său pe celulele tiroidiene. Tireotropina are secvențe omologe de aminoacizi cu toxina holerică. Cîrca 50 molecule de toxină sunt suficiente pentru a produce efectul, mediat de creșterea nivelului AMP ciclic intracelular.

Aproape toate liniile de culturi celulare sunt sensibile la acțiunea toxinei.

AMP ciclic rezultă prin acțiunea adenilat-ciclazei din stratul fosfolipidic intern al membranei citoplasmatiche asupra ATP:

ATP \rightarrow AMP - 3'-5' ciclic + PPI. Reacția implică participarea NAD, GTP și a proteinelor din citosol. Fragmentul A are activitate NAD-azică. După hidroliza enzimatică a NAD, toxina catalizează legarea ADP-ribozei de diferite proteine celulare, în special de proteine membranare, inclusiv de adenilat-ciclază. Ribozilarea adenilat-ciclazei determină creșterea de circa 6 ori a concentrației sale. Această creștere induce acumularea și menținerea în celulă a unor concentrații foarte ridicate de AMP-ciclic. Efectul toxinei este mediat de NAD (un cofactor al ribozilării adenilat-ciclazei) și de proteine reglatoare.

Creșterea nivelului celular al AMP-ciclic induce, pe de o parte, inhibiția absorbției Na^+ și a Cl^- din lumenul intestinal și pe de altă parte, o excreție

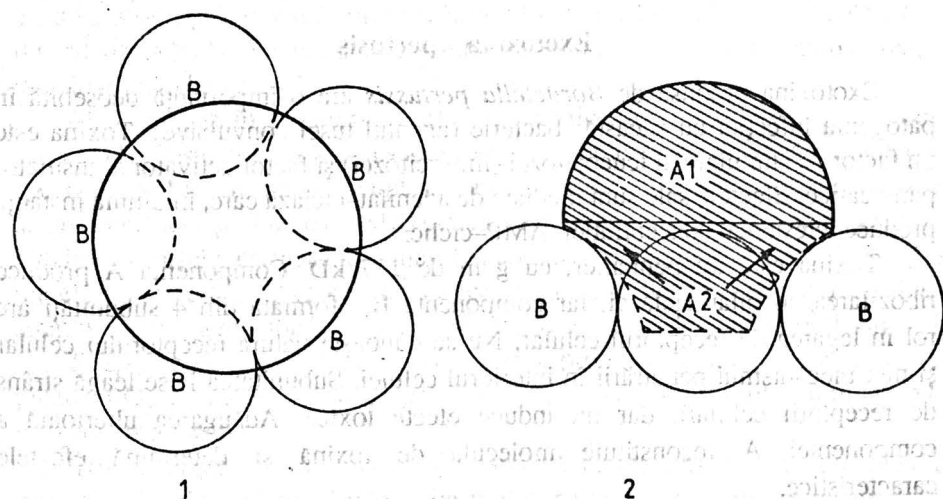


Fig. 61. Reprezentare diagramatică a aranjamentului spațial al subunităților toxinei holerice (1 = reprezentare plană; 2 = reprezentare în spațiu) (după van Heyningen, 1977).

masivă a Na^+ , Cl^- , la care se adaugă K^+ , bicarbonatul de sodiu, apa și glucoza, care se acumulează în lumen. Astfel, sistemul adenilat-ciclază-AMP-ciclic acționează ca mediatorii ai perturbării fluxului normal de ioni, apă, glucoză. Efectul letal al toxinei nu se datorează unor leziuni directe, detectabile, ci survine ca urmare a deshidratării și a pierderii masive de ioni.

Enterotoxinele produse de *E. coli*

Liniile toxigene de *E. coli* produc majoritatea cazurilor de diaree la persoanele care călătoresc. Se disting două tipuri de enterotoxine: termolabilă și termostabilă.

Enterotoxina *termolabilă* (TL) este foarte asemănătoare toxinei holerice, atât ca structură moleculară, cât și ca mecanism de acțiune. Ea recunoaște același receptor celular (ganglioziada GM1) ca și toxina holerică. Toxina activează adenilat-ciclaza prin ribozilare dependentă de NAD (ca și toxina holerică) și catalizează hidroliza NAD la ADP-riboză și nicotinamidă.

Enterotoxina *termostabilă* (TS) produsă de *E. coli* are g m 2000 D și nu manifestă reactivitate încrucișată cu enterotoxina TL. Liniile de *E. coli* producătoare de enterotoxină TS determină afecțiuni diareice la copii. Se cunosc variante antigenice distincte (TS_A și TS_B), care nu dau reacții încrucișate.

Nu se cunosc receptorii celulari pentru aceste toxine și nu se știe dacă, este necesară pătrunderea în celulă pentru a-și exercita efectul, mediat de stimularea guanilat-ciclazei. (Middlebrook, 1984).

Exotoxina pertusis

Exotoxina produsă de *Bordetella pertussis* are o importanță deosebită în patogenia infecției cu această bacterie (agentul tusei convulsive). Toxina este un factor de stimulare al leucocitozei (limfocitozei) și factor activator al insulelor pancreatice. Efectele sale sunt mediate de adenilat-ciclază care, în ultimă instanță produce creșterea concentrației AMP-ciclic.

Toxina este un pentamer, cu g m de 117 kD. Componenta A produce ribozilarea adenilat-ciclazei, iar componenta B, formată din 4 subunități are rol în legarea de receptorul celular. Nu se cunoaște natura receptorului celular și nici mecanismul penetrării în interiorul celulei. Subunitatea B se leagă strâns de receptorii celulari, dar nu induce efecte toxice. Adăugarea ulterioară a componentei A reconstituie molecula de toxină și determină efectele caracteristice.

Toxina hidrolizează NAD la ADP-riboză și nicotinamidă. Efectele ei sunt mediate de adenilat-ciclază. Creșterea concentrației sale implică o creștere

corespunzătoare a nivelului AMP-ciclic. Mecanismul molecular al producerii acestor modificări nu se cunoaște, dar este diferit de acela al toxinei holerice.

Toxine streptococice

S. pyogenes produc numeroase tipuri de molecule extracelulare, dar rolul lor în patogeneză este puțin cunoscut. Cele mai cunoscute tipuri de molecule streptococice sunt streptolizina O (SLO) și streptolizina S (SLS). Ele determină proprietățile hemolitice și citotoxice ale filtratelor de cultură. Efectele lor se produc asupra membranei plasmatică.

Cel mai important factor de virulență produs de *S. pyogenes* este proteina M, situată la exteriorul peretelui celular. Ea conferă specificitate antigenică de tip, streptococilor grupului A și este chimiotactic negativă pentru fagocite. Este antigenică și induce sinteza anticorpilor specifici cu efect opsonizant. Un alt factor de virulență este acidul hialuronic capsular, de asemenea cu efect protector față de fagocite.

SLO este produsă de toți streptococii grupului A și este prototipul toxinelor citolitice sensibile la acțiunea O_2 , dar activate de grupările SH. Sunt produse de câteva bacterii Gram pozitive. Aceste toxine sunt înrudite antigenic. Activitatea lor este complet inhibată de concentrații foarte mici de colesterol.

Cea mai caracteristică proprietate a SLO este activitatea hemolitică. Concentrații foarte mici de SLO, la 37° produc liza eritrocitelor într-un interval de ordinul minutelor. Interacțiunea inițială a SLO cu membrana celulară pare a fi reversibilă. Treapta absorbției necesită forma redusă a toxinei. SLO se leagă cu colesterolul din membrană. Adăugarea colesterolului la un preparat de SLO inhibă complet activitatea sa hemolitică.

SLO are rol în patogeniza febrei reumatice. În timpul infecției streptococice, SLO este eliberată în țesuturi și în circulație și se combină cu anticorpii specifici (ASLO), formând complexe care persistă în circulație. Aceste complexe se disociază lent și eliberează SLO activă, care se acumulează pe sau în țesuturile sensibile (mușchi cardiac, articulații), până ce este atins un nivel toxic și se manifestă simptomele febrei reumatice. Manifestările nu apar după infecția streptococică tegumentară, deoarece SLO este inhibată de colesterolul din piele.

Streptolizina S (SLS) este o hemolizină produsă de streptococi, stabilă în prezența O_2 . Pe mediu cu sânge produce beta-hemoliza în jurul coloniilor. SLS nu este imunogenă.

Toxina poate exista sub formă asociată celulei, sau ca un complex cu câteva molecule purtător. Moleculele purtător pot fi ARN, proteine serice sau *in vitro*, tween ori triton. Porțiunea hemolitică este un polipeptid, inactivat sub acțiunea papainei sau pronazei, care are 28 aminoacizi.

Moleculele care au rol de suport pentru SLS transferă polipeptidul de la un purtător la altul fără să-i modifice efectul litic. Dacă ARN-hemolizina este tratată cu RN-ază, activitatea hemolitică se pierde. Activitatea hemolitică este inactivată, distrugând fie componenta hemolitică fie purtătorul specific.

SLS legată de celulele de *Streptococcus* s-a evidențiat prin incubarea celulelor bacteriene cu eritrocitele, la 37°. Pentru ca liza să se producă este necesar contactul dintre celula bacteriană și eritrocit. SLS are acțiune citolitică pentru multe tipuri de celule eucariote, ca și pentru protoplaștii bacterieni. Activitatea citotoxică și efectele litice ale SLS sunt rezultatul interacțiunii cu fosfolipidele membranei celulare. Faptul că eritrocitele se umflă înainte de liză, denotă că hemoliza se face prin proces osmotic.

Toxina *eritrogenă* (scarlatinoasă) tip A este o proteină de 30,5 kD, cu o singură grupare SH/moleculă. Prin gruparea SH, toxina se leagă de alte molecule proteice sau de molecule mici. *In vitro* acționează ca mitogen nespecific, efect pe care îl conferă filtratului acelular de cultură streptococică. Toxina purificată este pirogenă pentru iepure și mărește sensibilitatea animalelor la șocul endotoxic. Diminuă titrul anticorpilor serici și a celulelor formatoare de plajă. După circa 10 zile, răspunsul imun se intensifică.

Toxine stafilococice

Testele hemolitice și serologice au relevat existența a 4 hemolizine; alfa, beta, gama, delta. Aceste toxine sunt distincte de leucocidină și enterotoxină.

Toxina alfa-hemolitică are și efecte letale și dermonecrotice. Este produsă de majoritatea liniilor de *S. aureus*. În preparatele purificate se prezintă sub formă polimeră din 6 subunități monomere, cu dispoziție inelară. Toxina alfa acționează asupra membranei celulare și îi mărește permeabilitatea. Hematiile de iepure sunt foarte sensibile, iar cele umane foarte puțin sensibile. Toxina alfa interacționează cu lipidele și astfel penetrează regiunea hidrofobă a membranei hematice. Nu se cunoaște mecanismul său de acțiune: ar fi o acțiune enzimatică proteolitică sau una colesterilesterazică.

Toxina beta este o hemolizină activă la cald și la rece, asupra hematiilor de berbec, bovine, capră, om. Cele de iepure și cobai sunt relativ rezistente. Toxina beta este produsă de liniile de *S. aureus* izolate de la animale. Este o hemolizină foarte activă pe hematiile de berbec și necesită prezența ionilor de Mg^{2+} ; (10^6 unități hemolitice/mg). Enzima este o fosfolipază C. Produsele hidrolizei sale sunt N-acilsfingozina și fosforilcolina. Studiul efectelor sale a înlesnit cunoașterea distribuției fosfolipidelor în membrana hematice.

Compoziția în aminoacizi a toxinei și g. m. (30000) sunt similare cu acelea ale toxinei alfa. Toxina înalt purificată este letală pentru iepure, cobai, șoarece în doze de 10–100 μg.

Toxina gama este alcătuită din două componente cu acțiune sinergică, ambele necesare pentru efectul hemolitic și toxic asupra șoarecelui. Cele două componente, cu g. m. 29000 și respectiv 26000 sunt proteine cationice. Toxina este imunogenă și *in vivo* se formează anticorpi neutralizanți.

Toxina delta este o hemolizină a eritrocitelor unor specii de manifestare. Din punct de vedere chimic este un polipeptid din care lipsesc histidina, arginina, prolina, tirozina și cisteina. Este alcătuită din două componente cu puncte izoelectrice diferite.

Leucocidina are efect toxic asupra polimorfonuclearelor și macrofagelor de iepure și om. Molecula sa este alcătuită din două subunități: *F*(fast) și *S*(slow), în raport cu migrarea lor pe coloane de carboximetil-celuloză. Separate, cele două componente sunt inactivă. Acțiunea lor este sinergică asupra leucocitelor.

Enterotoxina stafilococică determină intoxicația alimentară stafilococică, prin ingestia unor produse care conțin enterotoxina preformată. Voma și diareea sunt simptomele obișnuite. Sunt 6 variante antigenice ale enterotoxinei, cu specificitate serologică: A, B, C₁, C₂, D, E, cu g. m. între 28–35000. Enterotoxina acționează asupra viscerelor abdominale, determinând descărcarea impulsurilor care ajung la centrul vomei prin nervul vag.

Exfoliatina stafilococică este o proteină (glicoproteină) cu g. m. 24000 termostabilă și acidolabilă. Este produsă de liniile de *S. aureus* sensibile la grupul fag 2. Toxina determină exfolierea tegumentului la om și șoarece. Leziunile inițiale sunt sterile, iar stafilococii se izolează din tractul respirator. Nu se cunoaște modalitatea de transport a toxinei la locul viitoarei leziuni, deși ruta sanguină nu este exclusă (Kapral, 1975).

În concluzie, exotoxinele bacteriene prezintă următoarele asemănări: 1) au o structură generală a moleculei după modelul unei subunități de legare de receptorul celular și o subunitate care realizează activitatea specifică asupra țintei celulare; 2) pătrunderea în celulă are loc pe calea endocitozei mediată de receptor; 3) activitatea enzimatică a ADP-ribozilării la nivelul biochimic.

Numeroși alți ligazi pătrund în celulă prin mecanismul endocitozei mediată de receptori. Receptorii s-au identificat a fi de natură glicoproteică pentru toxina difterică și pentru toxina shiga. Moleculele exogene (liganzi) care interacționează cu suprafața celulei prin receptori glicoproteici sunt transportate prin invaginarea membranei în vezicule tapetate cu clatrină.

În cazul toxinei holerice și tetanice, receptorii s-au identificat a fi glicolipide. Internalizarea ulterioară în celulă se realizează prin microinvaginări netapetate cu clatrină.

Este posibil ca toxinele a căror țintă celulară se află în citosol, să pătrundă în celulă după legarea de un receptor glicoproteic, iar toxinele ce acționează la nivelul feței citosolice a membranei plasmactice, să utilizeze un receptor glicolipidic.

Problema receptorilor celulari în general și a celor care leagă toxinele bacteriene (nespecifiți, dar „uzurpați” funcțional de acestea) beneficiază de rezultatele superioare calitativ ale utilizării anticorpilor monoclonali față de moleculele receptor. Aceștia vor trebui să blocheze legarea toxinei și să protejeze celula de efectul toxic.

Anticorpii monoclonali față de receptorii celulari, dar și unii hormoni polipeptidici (insulina) ar putea fi folosiți pentru construirea unor molecule „hibride” cu subunitatea activă a exotoxinei. S-ar identifica mai ușor receptorii suprafeței celulare și modalitatea de internalizare precum și ținta celulară.

Toxinele bacteriene s-au dovedit a fi sonde moleculare remarcabile pentru explorarea structurii și funcției celulei eucariote.

ENDOTOXINELE LIPOPOLIZAHARIDICE

Termenul de *endotoxină* (Pfeifer, 1892) este impropriu deoarece lipopolizaharidele (LPS) sunt componente ale suprafeței celulei bacteriene Gram negative și pot fi eliberate. El este totuși folosit pentru că, spre deosebire de exotoxine semnifică asocierea LPS cu celula.

Factorul toxic al bacteriilor Gram negative a fost extras de Boivin și Mesrobianu (1933). Ei au identificat complexul glico-lipidic cu antigenul somatic (O) al bacteriilor care formează colonii netede (S). Endotoxinele LPS sunt componente ale peretelui celular la toate bacteriile Gram negative patogene și se deosebesc de exotoxine prin următoarele proprietăți:

- sunt produse de bacteriile Gram negative (*Salmonella*, *E. coli*, *Y. pestis*);
- sunt componente structurale ale membranei externe a peretelui celular al bacteriilor Gram negative și sunt eliberate după dezintegrarea celulei;
- sunt relativ termo-stabile;
- sunt mai puțin toxice decât exotoxinele, iar efectele lor sunt lipsite de specificitate;
- din punct de vedere chimic, endotoxinele LPS sunt macromolecule complexe care conțin fosfolipide și polizaharide;
- toxicitatea lor rezidă în fracția fosfolipidică;
- nu se denaturează și nu rezultă anatoxine.

Localizarea parietală, la suprafața celei bacteriene permite izolarea endotoxinelor LPS prin diferite metode chimice:

- solubilizarea cu acid tricloracetic și precipitare cu alcool;
- solubilizare cu amestec fenol-apă la 68° și precipitare cu alcool;
- extracție cu fenol-cloroform-eter de petrol.

Endotoxinele LPS reprezintă 25% din moleculele de suprafață ale celei și sunt esențiale pentru integritatea membranei externe. Împreună cu proteinele și fosfolipidele, LPS formează o barieră hidrofobă protectoare.

Structura chimică a moleculei de LPS

Molecula LPS este alcătuită dintr-un complex *poliozidic* și o parte *lipidică*. De aici derivă proprietățile amfipatice ale acestui agregat molecular, conferit de grupări polare hidrofile și grupări apolare hidrofobe.

La microscopul electronic, filamentele LPS au o structură trilaminară, corespunzătoare celor două straturi poliozidice și stratului lipidic.

Cele mai studiate și cunoscute LPS sunt cele ale g. *Salmonella*, deoarece clasificarea speciilor sale (tabelul Kauffmann-White) se bazează pe specificitățile serologice ale antigenelor O și H.

Din punct de vedere chimic, molecula LPS, după extracția prin metoda fenol-apă cuprinde 3 regiuni distincte:

- regiune polizaharidică externă, ce conferă specificitate serologică antigenului O;
- un miez oligozaharidic intermediar (regiunea R);
- o regiune internă hidrofobă - lipidul A, prin care LPS se ancorează în membrana externă și conferă calitatea de toxină moleculei de LPS.

Ultimele două regiuni ale moleculei (oligozaharidul regiunii R și lipidul A) sunt relativ invariabile și au constituenți similari la diferite specii de bacterii Gram negative. Oligozaharidul „R” conferă o largă specificitate de gen, fiind comun tuturor speciilor de *Salmonella*.

Polizaharidul O este un polimer de unități oligozaharidice repetitive și conferă specificitate serologică de grup, diferitelor variante antigenice de *Salmonella*. Unitățile oligozaharidice conțin 2-4 componente monozaharidice: D-manoză, D-galactoză, L-ramnoză, o dezoxihexoză, o didezoxihexoză. Didezoxihexozele sunt zaharuri care nu există libere în natură, dar intră frecvent în structura polizaharidului O al Enterobacteriaceelor și au primit denumiri care derivă de la speciile de origine: abequoză, tiveloză, paratoză, colitoză.

Polizaharidul O conferă specificitate antigenică de grup. La *Salmonella* există peste 60 grupe antigenice O. Variația antigenică a polizaharidului O se amplifică pe următoarele căi:

- schimbări ale poziției legăturilor (de exemplu, 1-4 în loc de 1-6);
- configurații moleculare modificate;

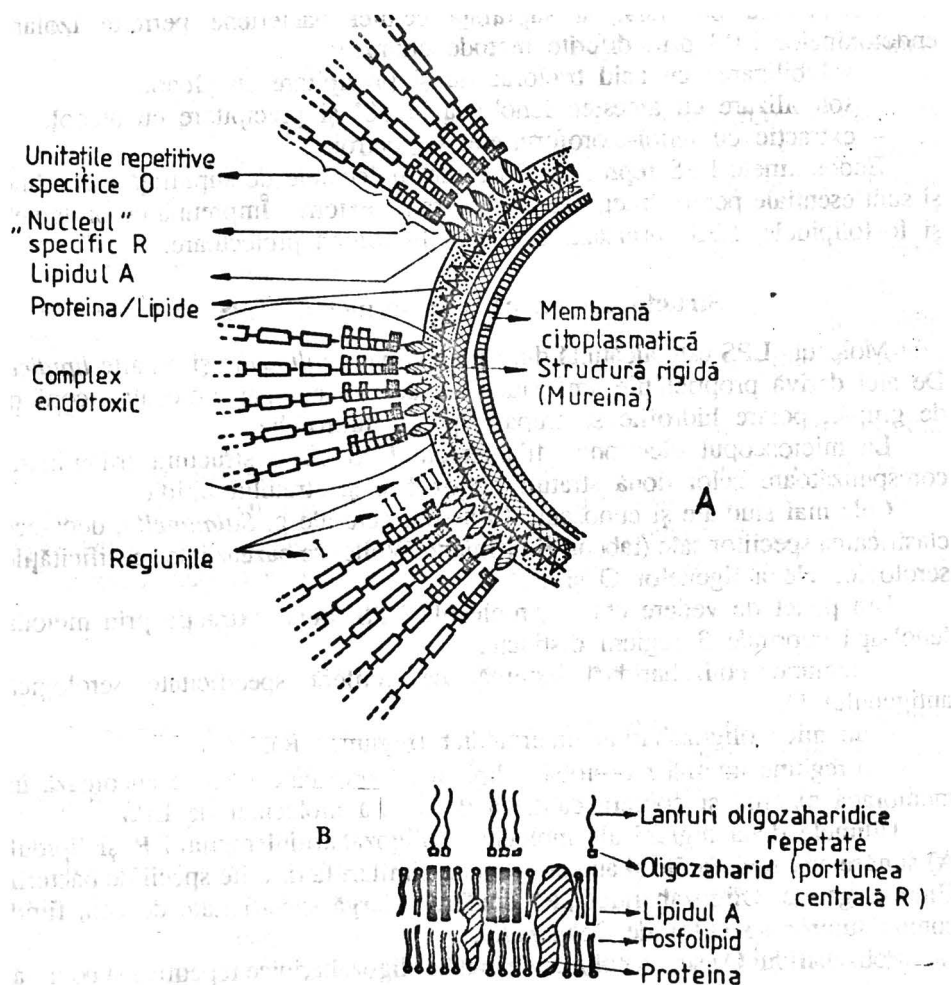


Fig. 62. A. Peretele celular de *Salmonella* sp., prezentând structura lipopolizaharidului. B. Detaliu care evidențiază relațiile lipopolizaharidului cu membrana externă a peretelui celular (după Westphal, 1974).

- înlocuiri la nivelul diferitelor subunități repetitive;
- deleția sau substituția unui monozaharid în subunitățile oligozaharidice.

Regiunea centrală a LPS („miezul” R) are o variabilitate chimică mult mai restrânsă și conferă specificitate de gen. Miezul oligozaharidic este legat de lipidul A printr-un trizaharid, 2 ceto-3-dezoxioctonat (KDO).

Lipidul A este legat covalent de oligozaharidul „miezului” R. La *Salmonella*, lipidiul A este alcătuit din dizaharide de D-glucozamină legate

Citotoxina de *Bordetella pertussis*

Infecția cu *B. pertussis* determină apariția unui spectru larg de simptome, dar cel mai caracteristic și dramatic care condiționează severitatea infecției este cel care implică tractul respirator. La nivelul căilor aeriene superioare, infecția este urmată de colonizarea specifică a celulelor epiteliale ciliate. Distrugerea acestor celule are consecințe patologice importante pentru tractul respirator, care influențează evoluția procesului infecțios.

Faptul că *B. pertussis* este infecțios în mod natural numai pentru organismul uman a anulat posibilitatea utilizării unui model experimental al infecției. În 1977 Collier și col. au arătat că traheca de hamster, *in vitro* este sensibilă la infecția cu *B. pertussis*. Singurele care sunt infectate și manifestă semnele unor efecte citopatice marcate sunt celulele ciliate ale epitelului traheal. În cele din urmă, celulele ciliate sunt eliminate din epiteliu, locul lor fiind luat de alte celule neciliate.

Simptomele și evoluția procesului patologic *in vivo*, la om argumentează în favoarea unei endotoxine cu efect pe termen lung: semnele clinice ale infecției nu se modifică dacă antibioticele sunt administrate după ce tusea paroxistică s-a declanșat, deși bacteriile sunt eliminate.

Citotoxina traheală s-a purificat din mediul de cultivare al *B. pertussis* în fază logaritmică de creștere. Compoziția chimică este foarte asemănătoare cu aceea a peptidoglicanului din structura peretelui bacteriilor Gram negative: acid muramic, acid diaminopimelic. Alte componente sunt alanina, acidul glutamic, glucozamina.

Neisseria gonorrhoeae, un patogen Gram negativ cu specificitate pentru mucoase se pare că realizează efectele patologice printr-o toxină similară. Dovada este indirectă: în faza logaritmică de creștere gonococii prezintă un turnover cu o rată înaltă a peptidoglicanului.

ENDOTOXINELE – MEDIATORI AI PATOGENIEI ÎN INFECȚIILE CU BACTERII GRAM NEGATIVE

Preparatul de endotoxină obținut de la o linie patogenă de bacterii Gram negative reproduce experimental tabloul manifestărilor patologice ale infecției. Căinele și iepurele sunt sensibile la endotoxină, în timp ce păsările și animalele cu sânge rece sunt rezistente.

Efectele endotoxinei se manifestă atât în starea fizică legată de celulă, cât și după ce este eliberată. Endotoxinele se eliberează prin moartea și liza celulei

sau printr-un proces de „înmugurire“ care nu afectează viabilitatea acesteia. Din această cauză, cele două stări, *endotoxemia* și *bacteriemia* pot să coexiste sau să se manifeste în etape distincte ale procesului infecțios. Proprietățile endotoxice ale celulelor bacteriene, vii sau omorâte sunt aceleași cu ale preparatului de endotoxină. În organismul infectat nu este o corelație lineară între nivelul bacteriemiei și intensitatea efectelor endotoxice. Capacitatea organismului de a detoxifica este un factor modulator esențial al manifestărilor endotoxice. Glucocorticoizii au efect protector, probabil prin modificarea permeabilității capilare.

Endotoxinele nu au rol în colonizarea și penetrarea suprafeței mucoase, deoarece lipidul A are o localizare profundă în membrana externă. Liniile invazive și neinvazive ale aceleiași specii produc cantități similare de endotoxină. Singurul rol potențial atribuit endotoxinei în inițierea infecției constă în capacitatea sa de a induce o scădere trecătoare a capacității de apărare a gazdei, prin întârzierea declanșării unui răspuns inflamator. Dacă un inocul de *S. aureus* se asociază cu endotoxina, procesul infecțios evoluează rapid.

Dozele mici de endotoxină măresc rezistența organismului la infecțiile bacteriene și virale prin stimularea activității fagocitare și respectiv a producerii de interferon. Endotoxina mărește rezistența la o doză letală de radiații, probabil prin stimularea diviziunii celulelor măduvei osoase.

Endotoxinele inițiază calea alternativă de activare a complementului. Se eliberează mediatorii leucotactici (anafilatoxinele), inductori ai procesului inflamator.

Endotoxinele stimulează celulele efectoare ale răspunsului imun humoral: limfocitele B și macrofagele. În vitro, LPS au efect mitogenic asupra limfocitelor B, iar in vivo, LPS induc stimularea nespecifică, policlonală a lor. Stimulează răspunsul imun specific față de un antigen administrat simultan, având efect de adjuvant.

Spre deosebire de exotoxine, care au mecanisme specifice de acțiune la nivel celular, în doze mari, endotoxinele determină o varietate de manifestări patologice:

- *hipertermie* (febră), prin acțiunea lor asupra centrilor termoreglării, chiar după administrarea unor doze minimale;

- *leucopenie* urmată de leucocitoză. Efectul se exercită direct și rapid asupra leucocitelor, care părăsesc patul vascular și se retrag aproape instantaneu în plămâni și în alte țesuturi, în proporție de circa 60%. După aproximativ 4 ore de la injectarea endotoxinei, numărul leucocitelor circulante crește peste limitele normale. Crește numărul hematiilor circulante, datorită eliberării în circulație

a rezervelor celulare din centrele de formare și depozitare a celulelor sanguine;

– *modificări cardiovasculare*: legarea endotoxinei de celulele hepatice sau de alte celule induce eliberarea rapidă a aminelor biogene din depozitele celulare (histamină, serotonină) și a peptidelor (bradikinină). Numărul plachetelor scade rapid. Aminele provoacă o hipertensiune trecătoare, urmată de hipotensiune severă, hipovolemie și depozitarea intravasculară a fibrinei. Aceasta este rezultatul interacțiunii endotoxinei cu sistemul enzimatic de coagulare, cu cel fibrinolitic, cu cel de producere a kininelor și cu sistemul complement. Endotoxina interacționează cu factorul Hageman (factorul XII al sistemului de coagulare) și îl activează. Astfel, sistemul coagulare–fibrinoliză este decompensat și în vase are loc coagularea. Factorul XII activează factorul XI, iar acesta catalizează generarea trombinei și formarea fibrinei. Factorul XII activează plasminogenul din care se formează plasmina, cu efect litic asupra fibrinei intravasculară. Plasmina activează componenta C1 a complementului, dar activează și factorul XII. Acesta convertește prekalikreina la forma sa activă din care rezultă kininele. Kininele activează factorul XII și astfel efectele inițiate de endotoxină sunt întreținute și amplificate;

– efecte *metabolice*: pierderea rezervelor de glicogen nu se datorează intensificării ratei metabolice, ci inhibiției sistemelor enzimatice ale gluconeogenezei și ale sintezei glicogenului.

Din punct de vedere clinic dozele mari, de endotoxină produc următoarea succesiune de modificări: frison, febră, somnolență, dispnee, modificări ale tranzitului intestinal, diaree sanguinolentă, hiperglicemie inițială, urmată de hipoglicemie, paralizie, comă, moarte. Aceste manifestări patologice se derulează în circa 24 ore după administrarea endotoxinei la animalele sănătoase și corespund stării de *șoc endotoxic*. Starea de șoc este consecința *endotoxemiei*. Endotoxemia este rezultatul supraîncărcării celulelor cu rol de apărare, ca urmare a revărsării bacteriilor și endotoxinelor în circulație. Starea de endotoxemie nu este totdeauna urmată de șoc și moarte. La unii indivizi, instalarea ei nu este însoțită de manifestări clinice. Nu se cunosc cauzele acestor diferențe mari de reactivitate și răspuns la starea de endotoxemie. Șocul și moartea sunt rezultatul interacțiunii endotoxinei cu unele componente ale sângelui, în primul rând cu sistemul de coagulare pe care îl activează și îl amplifică. S-a emis ipoteza că instalarea șocului ireversibil este favorizată de absorbția în sânge a endotoxinelor produse de microbiota intestinală. În mod normal, mecanismele de detoxifiere ale organismului sunt eficiente, dar starea de șoc se instalează consecutiv diverselor tulburări funcționale ale organismului, care împiedică o reactivitate optimă față de infecția cu bacterii Gram negative.

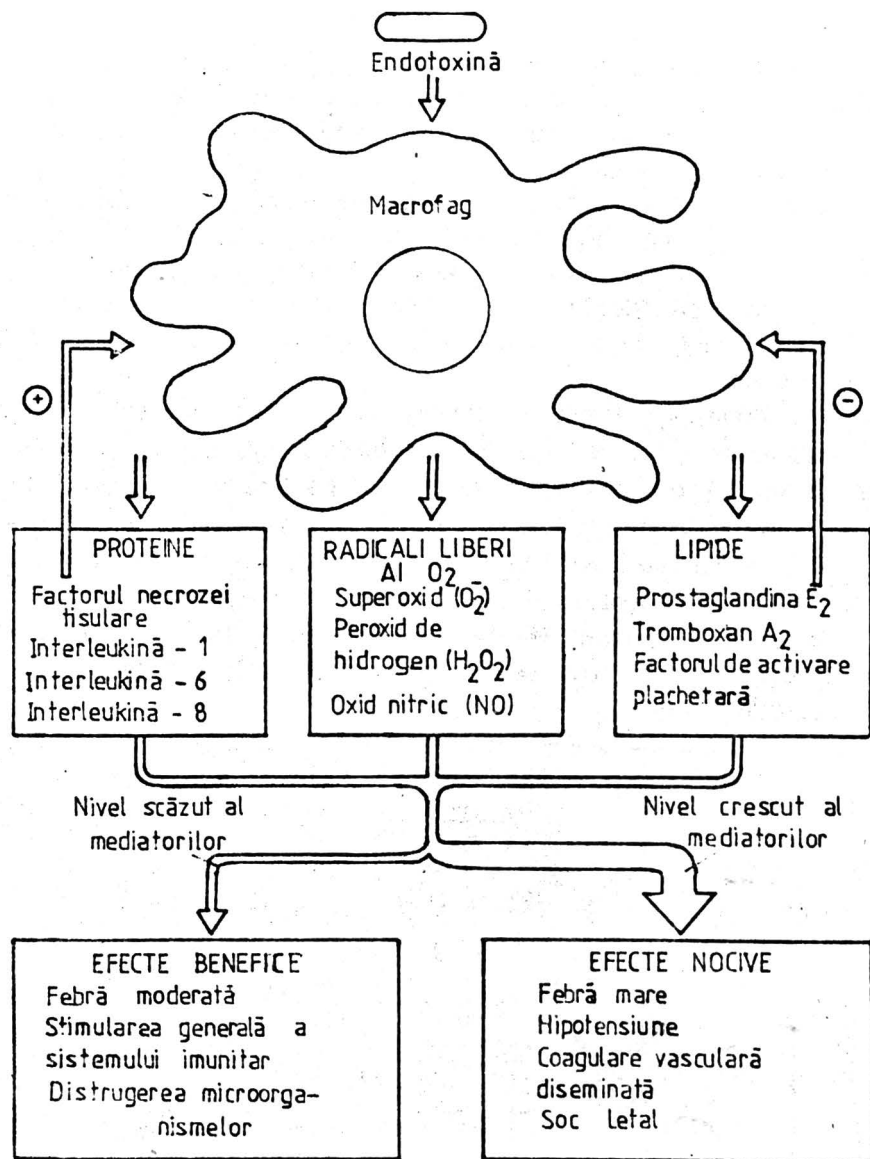


Fig. 64. Efectele endoxinelor. Endoxinele stimulează macrofagele să producă 3 grupe de mediatori: proteine, radicali liberi ai O_2 și lipide. Acești mediatori acționează independent, sinergic sau secvențial, pentru a produce, în funcție de doză, efecte benefice sau patologice. Factorul de necroză tisulară amplifică sinteza mediatorilor, iar prostaglandina E_2 o inhibă (după Rietschel și Brade, 1992).

Lipidul A are afinitate față de diferiți factori humorali și față de diferite celule ale gazdei. Celulele expuse acțiunii LPS eliberează mediatorii stării endotoxice, al cărui mecanism este dedus parțial din rezultatele experimentale și din observațiile clinice.

Unele efecte ale LPS sunt inhibitate de acidul acetil-salicilic (aspirină) și de alți compuși antiinflamatori (indometacina), inhibitori ai sintezei prostaglandinelor (PG). Din această cauză, pe baza argumentelor indirecte, PG au fost considerate ca mediatori moleculari ai efectelor timpurii ale LPS: febră, frison, somnolență, dispnee, hiperglicemie urmată de hipoglicemie.

PG formează o familie de compuși – acizi grași nesaturați – cu catenă de 20 atomi de C. Sinteza lor are loc pe seama acizilor grași liberi, polinesaturați. Precursorul PG este acidul *arachidonic* (cu două duble legături) legat esteric de C₂ al fosfolipidelor membranare, de unde este eliberat sub acțiunea fosfolipazei A₂. Sinteza PG este catalizată de *ciclooxigenază*, dar sinteza acestei enzime este inhibată de acidul acetil-salicilic și de indometacină.

În anumite țesuturi, în special în endotelii, PG se sintetizează din endoperoxizi. Aceștia sunt transformați enzimatic, pe căi diferite, în PG și respectiv în tromboxan.

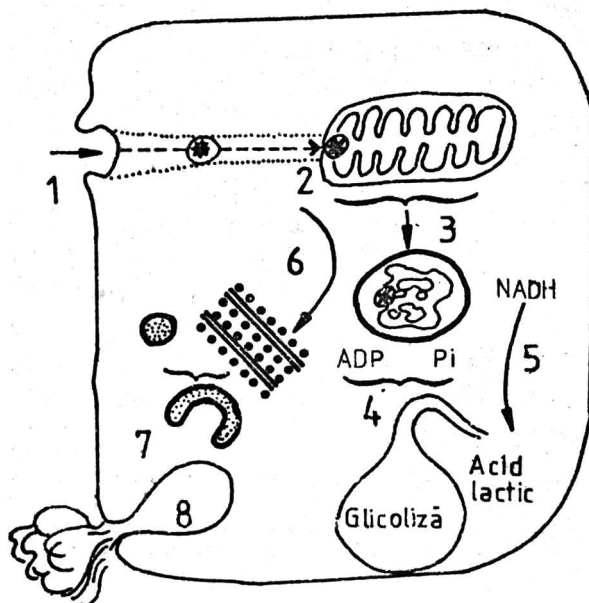


Fig. 65. Bazele celulare ale acțiunii endotoxinelor: 1 = endocitoza moleculelor de LPS; 2 = translocarea endotoxinei spre mitocondrii; 3 = modificarea gradientului de protoni; 4 = acumularea ADP și NADH în citosol; 5 = intensificarea glicolizei; 6 = inducerea enzimelor lizosomale; 7 = stimularea autofagiei; 8 = eliberarea hidrolazelor (după Bradley, 1981).

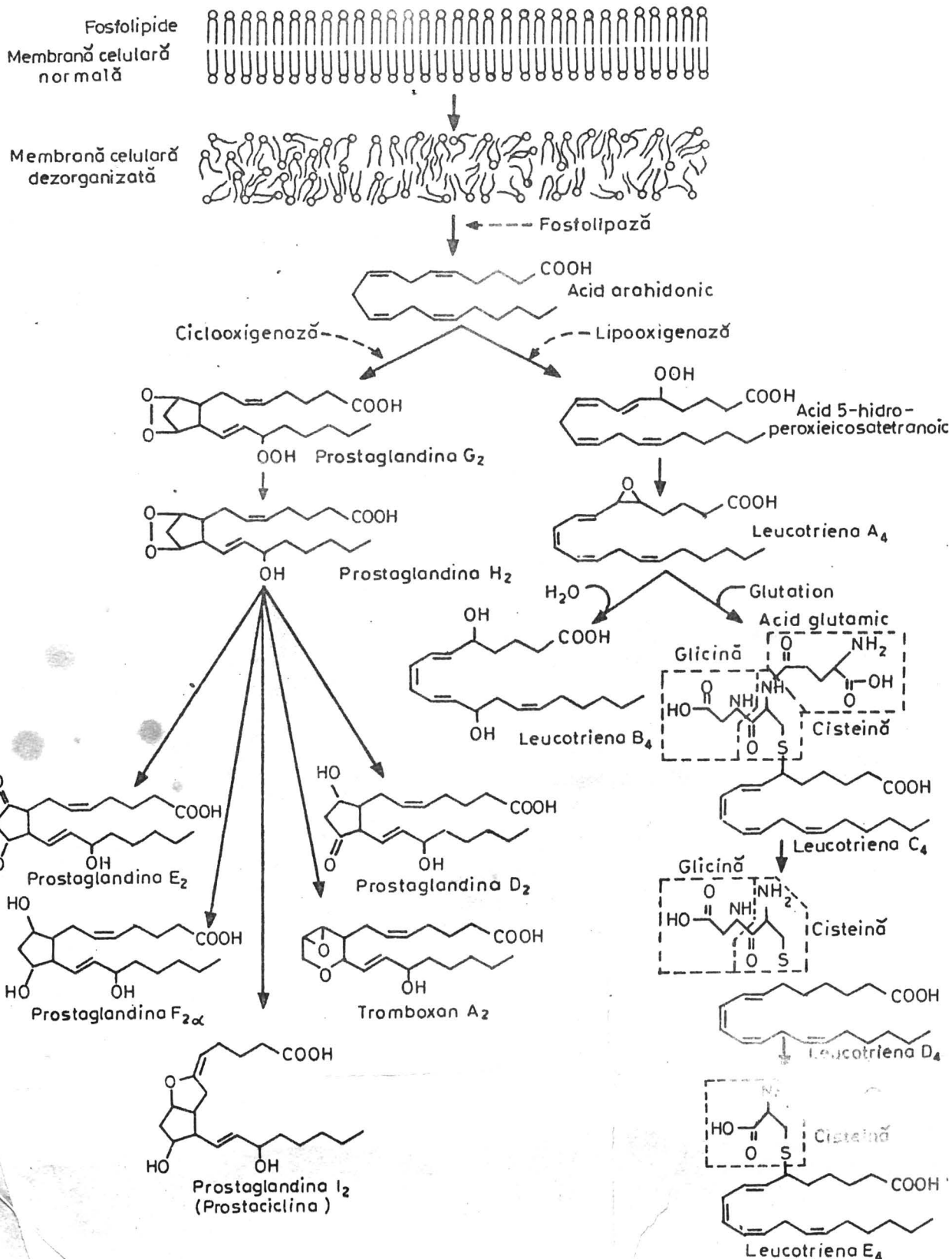


Fig. 66. Reprezentarea schematică a cascadelor enzimatice, care duc la sinteza prostaglandinelor și leucotrienelor, mediatori ai efectelor endotoxice și ai reacțiilor inflamatorii.

PG se sintetizează în majoritatea țesuturilor organismului uman și animal. Sursa celulară majoră de PG este reprezentată de macrofag, monocit și granulocite. După sinteză, PG sunt eliberate în circulație și sunt inactivate de ficat, rinichi, plămân.

În starea de endotoxemie, PG se produc atât prin intensificarea căii proprii de biosinteză, cât și datorită alterării metabolismului celular.

Se cunosc 4 clase de PG naturale: E, F, A, B. În structura lor de bază intră totdeauna acidul *prostanoic*, un acid gras cu 20 atomi de C.

PG sunt inhibitori ai răspunsului imun indus de endotoxine. Ele diminuează reactivitatea limfocitelor și macrofagelor. Unii compuși ai acestei clase au efecte benefice: acidul arachidonic este protector față de șocul endotoxic.

În concluzie, virulența este o proprietate multifactorială, condiționată de invazivitatea, infecțiozitatea și toxigenitatea agentului infecțios. De cele mai multe ori, microorganismele patogene sunt foarte sofisticate în adaptările lor complexe la mediul gazdei. În acest sens se cunosc puține lucruri despre rolul unor antigene ale suprafeței bacteriene în patogeneză. De exemplu, unele linii de *Streptococcus* au o mare putere de invazie și produc bacteriemie, în timp ce alte linii nu sunt invazive, dar sunt foarte toxigene și produc forme grave de scarlatină.

Nivelul expresiei cantitative al factorilor de virulență variază independent unul față de altul. Pentru a produce o epidemie, o tulpină bacteriană trebuie să posede toți factorii de virulență, exprimați în grade variate.

Virulența bacteriană se poate aprecia sub raportul *infecțiozității* sau al *toxicității*, în funcție de numărul minim de bacterii sau cantitatea minimă de toxină, necesare pentru a produce infecția, respectiv moartea animalelor din experiență. În cazul bacteriilor toxigene, virulența se exprimă în *doza limită mortală 50*, care reprezintă cantitatea minimă de toxină ce omoară 50% din organismele din experiență, la o anumită specie, cu o greutate standard și la un anumit interval de timp.

Pentru cazurile în care efectul letal nu este un criteriu utilizabil, virulența se exprimă în *doza infecțioasă 50* (DI 50), care reprezintă numărul de bacterii necesare pentru a produce infecția a 50% din organismele inoculate.

Virulența este un parametru variabil, atât în condiții naturale cât și de laborator, putând fi pierdută prin mutație.

Bacteriile patogene, pe baza celor 3 proprietăți cumulate (agresivitate, infecțiozitate, toxigenitate) pot coloniza pe termen scurt sau îndelungat, organismul uman sau animal și să determine un proces patologic infecțios.

CONDIȚIILE DE APARIȚIE A PROCESULUI INFECȚIOS

Simpla prezență a unui microorganism patogen în mediul înconjurător nu este suficientă pentru a produce o infecție la o gazdă sensibilă. Pentru inițierea procesului infecțios sunt necesare următoarele condiții obligatorii: existența unui *izvor de infecție*, a unei *căi de eliminare* a agentului infecțios, a unei *căi de transmitere* și a unei *porți adecvate de intrare* în organismul sensibil. Domeniul specializat al bacteriologiei medicale care se ocupă cu studiul căilor de eliminare, transmitere și pătrundere a agenților patogeni în organism se numește *epidemiologie*.

a) Izvorul de infecție

Necesitatea existenței *izvorului de infecție* derivă din faptul că mediul extern (sol, apă, aer) este nefavorabil creșterii și multiplicării majorității microorganismelor patogene. Mediul extern asigură, cel mult, condiții de supraviețuire temporară. Perpetuarea microorganismelor în natură este condiționată de existența unui *izvor* sau *rezervor* de infecție care servește ca nișă naturală de viață și de multiplicare. Aici se realizează procesul de acumulare naturală, de unde agentul patogen se poate răspândi la alți indivizi sănătoși pe care îi contaminează.

Izvorul de infecție este diferit, în funcție de agentul patogen și de spectrul de gazdă al proceselor patologice pe care le produce. Unele microorganisme și virusuri, în mod natural infectează numai gazdele animale și produc *zoonoze*, omul fiind infectat în situații accidentale. Altele, agenții patogeni produc boli infecțioase (transmisibile) strict caracteristice omului (*antroponoze*) fără să infecteze organisme animale. În acest caz, omul reprezintă unicul izvor de infecție în natură (pentru viroze – variola, varicela, oreionul, poliomiелita, guturaiul, gripa, hepatitele, sau bacterioze – dizenteria, febra tifoidă, febrele paratifoide, tusea convulsivă, sifilisul, gonoreea, lepra). Pentru unele din aceste maladii infecțioase – lepra, sifilisul, variola, rujeola – omul bolnav este unicul rezervor natural al infecției. În alte cazuri (febra tifoidă, scarlatina, difteria, poliomiелita, holera) agentul infecțios este transmis atât de omul bolnav, cât și de cel sănătos, *purător de agenți patogeni*. Purătorii sunt în unele cazuri, foști bolnavi care s-au imunizat, nu mai prezintă nici un simptom clinic, dar păstrează în organism agentul patogen, temporar sau pentru totdeauna, pe care îl elimină în mediu. Purătorii sunt deosebit de importanți pentru diseminarea agenților patogeni în mediul extern, deoarece fiind aparent sănătoși sunt greu de depistat și se deplasează liber în colectivități, unde pot transmite boala la organismele receptiv.

O altă categorie de boli infecțioase sunt comune omului și animalelor și sunt incluse în denumirea generică de *antropozoonoze*. Izvorul lor de infecție este reprezentat de animale domestice sau sălbatice: câinele pentru rabie (turbare), febră butonoasă, leptospiroze; bovinele pentru salmoneloze, vaccină, bruceloze, tuberculoză, febră Q; șobolanul pentru salmoneloze, leptospiroze, febra mușcăturii de șobolan (sodoku), turbare, pestă (ciumă), tifos murin; păsările pentru encefalite virale, ornitoze, salmoneloze etc.

Controlul antropozoonozelor este foarte greu pentru că în circuitul agentului patogen intră animalele sălbatice. De exemplu, turbarea este răspândită la vulpe, veveriță, liliac. De aici este transmisă la câine, iar de la câine la om. Chiar dacă incidența bolii scade după imunizarea câinilor (prin vaccinare), virusul nu se poate elimina din populațiile de animale sălbatice.

Unele microorganisme patogene se dezvoltă în primul rând în mediile naturale (sol, apă) și numai accidental infectează gazdele: sunt agenții tetanosului și gangrenei gazoase. Agentul se multiplică în sol și pentru a se menține nu trebuie transmis la o gazdă. Ele cauzează îmbolnăviri în mod cu totul accidental. Într-o situație similară se află *Clostridium botulinum*, care determină intoxicația alimentară – botulismul. Se dezvoltă numai în sol, de unde ajunge în conservele de legume, se multiplică și produce toxină foarte puternică și periculoasă dacă este ingerată.

b) Calea de eliminare a agenților patogeni

Agenții patogeni care se multiplică în izvorul natural de infecție sunt eliminați de la locul multiplicării și pot să infecteze gazde noi. Calea de eliminare este condiționată de localizarea lor specifică în organismul gazdă. Principalele căi de eliminare a agenților infecțioși sunt calea intestinală și cea respiratorie.

Calea intestinală este calea de eliminare a bacteriilor enterotrope, prin intermediul materiilor fecale, care pot conține intermitent sau continuu, cantități mari de agenți patogeni ai febrei tifoide și paratifoide, dizenteriei, holerei, ai toxinfecțiilor alimentare, precum și virusuri (virusul hepatitei epidemice, poliomielitei).

Calea respiratorie asigură răspândirea agenților patogeni ai infecțiilor respiratorii (difteria, tusea convulsivă, rujeola, variola, varicela, oreionul, gripa, guturaiul) prin intermediul secrețiilor nazofaringiene și bucale, proiectate în timpul tusei, strănutului, vorbirii. Pe această cale, omul bolnav sau purtător răspândește în jur o pulbere fină de aerosoli constituiți din picături microscopice

de secreții încărcate cu agenți patogeni. În timpul tusei și strănutului, picăturile fine încărcate cu bacterii părăsesc cavitatea bucală cu o viteză de 200 mile/oră. Într-un strănut se pot elimina între 10000–100000 celule bacteriene. Bacteriile rezistente la uscăciune își păstrează viabilitatea pentru perioade lungi de timp, atașate de particulele inerte.

În afara acestor căi principale, agenții infecțioși se mai pot elimina prin leziuni deschise – răni și supurații (în cazul infecțiilor produse de stafilococi, streptococi, bacilul piocianic, gangrena gazoasă), pe cale urinară (febra tifoidă, leptospiroze, febra Q, tuberculoza renală), prin secreția glandei mamare (bruceloză, tuberculoză, febră Q).

În cazul unor infecții generalizate, care nu au poartă naturală de ieșire din organism, eliminarea agentului patogen se realizează prin intervenția unui artropod hematofag, care sugă sângele infectat (tifos exantematic, pestă, encefalite virale, paludism) sau în mod artificial, prin seringă sau instrumente chirurgicale (hepatită, sifilis).

c) Calea de transmitere a agenților infecțioși

După ce au fost eliminați din organismul bolnav sau purtător, microorganismele patogene trebuie să fie transmise la o nouă gazdă receptivă. Transmiterea se realizează în mai multe modalități.

Transmiterea prin *contact direct* are loc în cazul în care, între organismul infectat și cel receptor există o legătură strânsă, directă, fără participarea vreunui factor de mediu animat sau neanimat. Transmiterea prin contact direct se realizează: prin mușcătură (turbarea, febra mușcăturii de șobolan); prin supt (la animale febra Q, tuberculoza; la om tuberculoza, infecțiile cu piogeni); prin sărut (tuberculoza pulmonară, sifilisul); prin contact cutanat direct (boli de piele – dermatomicoze, furunculoza); prin contact sexual (când agentul cauzal este transmis prin căile genitale, infecția se numește venerică – sifilisul, gonoreea).

În cele mai multe cazuri transmiterea infecției este *indirectă*, prin interpunerea mai mult sau mai puțin evidentă a unui factor de mediu neanimat denumit *vehicul* (lapte și carne de la animalele bolnave – tuberculoza, febra, Q) sau a unui organism – denumit *vector* care se interpune între izvorul de infecție și organismul receptor. Iată câteva exemple de transmitere indirectă:

– transmiterea prin intermediul *obiectelor* folosite de un bolnav (veselă, rufe, îmbrăcăminte, cărți, jucării etc.) este posibilă un timp limitat după contaminarea acestora, proporțional cu rezistența agenților patogeni la condițiile de mediu. Astfel se transmite tuberculoza, difteria, scarlatina, variola;

– transmiterea prin *vectori* se realizează prin intermediul artropodelor, de cele mai multe ori hematofage (insecte, căpușe), care preiau agenții patogeni din izvorul natural și îi transmit la o nouă gazdă, fie prin înțepătură, fie depunându-i pe tegumentul intact sau lezat. Uneori, vectorul acționează numai ca purtător al microorganismului patogen (având numai rol mecanic), pe care îl transportă fie în tubul digestiv, fie pe suprafața corpului. Musca este vectorul mecanic pentru agentul patogen al febrei tifoide, al dizenteriei. Alteori, vectorul este el însuși infectat și realizează o transmitere *biologică*. În acest caz, după ce au ajuns în organismul vectorului, microorganismul sau virusul, fie numai se multiplică masiv (*Rickettsia prowazeki* – agentul tifosului exantematic, în corpul păduchelui), fie străbate o fază a ciclului său vital (sporozoidul *Plasmodium* – agentul patogen al malariei, în corpul țânțarului). Flavivirusurile (arbovirusuri) se multiplică în organismul artropodelor, fără să producă boala sau avaria țesuturilor. Transmiterea virusurilor la om, la alte mamifere sau la păsări se face prin înțepătura artropodelor. La rândul său, vectorul se infectează prin ingestia sângelui de la o gazdă viremică;

– transmiterea prin intermediul *aerului* se face prin inhalarea picăturilor septice, răspândite de un bolnav sau de un purtător de agenți patogeni. Cele mai eficiente sunt picăturile septice foarte mici (nuclei), care pot rămâne în suspensie în aer (aerosoli), mult timp după eliminarea lor din organism. Astfel se transmite gripa, guturaiul, rujeola, rușcula, varicela, scarlatina, tusea convulsivă;

– transmiterea *hidrică* este proprie infecțiilor intestinale (febrele tifoidă și paratifoidă, holera, hepatita, enteroviroze) și leptospirozelor și se produce prin contaminarea accidentală a unei surse de aprovizionare cu apă, cu agenții patogeni proveniți din dejecții umane sau animale;

– transmiterea prin *alimente* (lapte, carne, ouă) are loc în cazul în care alimentele provin de la animale infectate, sau sunt contaminate prin manipularea de către o persoană (bolnavă sau purtătoare) care elimină agenți patogeni. De regulă bacteriile patogene se multiplică în alimente, care sunt adevărate medii nutritive. Prin intermediul alimentelor contaminate se transmit agenții febrei tifoide, ai toxinfecțiilor alimentare (cu *Staphylococcus* și *Salmonella*), ai febrei Q, ai infecției cărbunoase, ai botulismului;

– transmiterea prin intermediul *solului* are loc în cazul unor plăgi, de regulă adânci, în care au fost antrenate granule de sol. Astfel se transmit infecțiile cu *B. anthracis* (cărbunele), cu *Clostridium tetani* (tetanosul), agenții gangrenei gazoase – *Welchia perfringens*, *Cl. oedematiens*, *Cl. histolyticum*.

d) Poarta de intrare în organism

Pentru ca agenții patogeni să determine o boală infecțioasă este necesar ca ei să învingă barierele naturale care se opun pătrunderii lor în organismul gazdei receptive. Poarta de intrare în organism corespunde, în general, căii prin care s-a făcut eliminarea agentului patogen din organismul infectat, fiind însă condiționată și de modul de transmitere a infecției.

De cele mai multe ori poarta de intrare în organism este reprezentată de: calea *respiratorie*, în infecții ca oreionul, guturaiul, gripa, rujeola, variola, varicela, difteria, tusea convulsivă, scarlatina; *calea digestivă*, în infecția cu agenții febrei Q, ai hepatitelor infecțioase, poliomielitei; *calea cutanată*, pentru infecția carbunoasă, tularemie, febră Q, pentru infecțiile transmise prin mușcătură, prin înțepătura vectorilor, prin rănire.

Unii agenți pătrund prin tegumentul intact, dar de obicei pătrunderea lor este condiționată de existența unor leziuni infime (zgârieturi, înțepături de insecte, de acul seringii, răni deschise).

Unii agenți patogeni pătrund în organismul receptiv pe mai multe căi, din care una este de obicei principală, dar determină aceleași manifestări indiferent de poarta de intrare.

Alți agenți patogeni produc maladii cu caractere clinice diferite în funcție de poarta de intrare, *ca unic factor determinant* și fără relație cu vreun caracter biologic particular al agentului patogen. De exemplu, *B. anthracis*, după pătrunderea pe cale tegumentară, determină cărbunele cutanat; după ingestia alimentelor contaminate provoacă un proces patologic intestinal; dacă infecția are loc pe cale respiratorie, rezultatul este infecția pulmonară gravă.

Infecția. Tipuri de infecții

Infecția reprezintă totalitatea proceselor biologice care se desfășoară în organismul animal sau uman, ca urmare a pătrunderii și multiplicării agenților patogeni.

Pentru inițierea procesului infecțios, agentul patogen trebuie să pătrundă în organism într-o doză suficientă, pe o cale adecvată, iar organismul să fie receptiv (să permită multiplicarea agentului infecțios). În concepția modernă, procesul infecțios trebuie interpretat ca rezultat al interacțiunii dinamice dintre micro-și macroorganism. Procesul infecțios reprezintă o reacție a macroorganismului la acțiunea excitantului patologic complex, care este agentul patogen. În această concepție ecologică, agentul infecțios este forța motrice a procesului

infecțios, iar reactivitatea organismului condiționează intensitatea, extinderea, gravitatea și însăși posibilitatea apariției procesului infecțios.

Ca regulă generală se poate afirma că procesul infecțios este specific, adică fiecare afecțiune de natură infecțioasă este produsă de un anumit agent patogen. Astfel, *C. diphtheriae* este agentul difteriei, *C. tetani* – agentul tetanosului, *Brucella abortus* – cauza brucelozei, *Treponema pallidum* – agentul sifilisului. Se cunosc însă maladii infecțioase la care specificitatea este absentă. Rinichiul poate fi infectat de *E. coli*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*. Toate acestea (și altele) sunt agenți cauzatori ai nefritei (nefro = rinichi; itis = inflamație). În acest caz, analiza simptomelor nu oferă indicii despre identitatea agentului cauzal. Situația este similară în cazul endocarditei, meningitei, pneumoniei, peritoniei.

Între cele două limite, a specificității stricte și a lipsei totale de specificitate există situații intermediare, în care un organism patogen poate să inducă mai mult decât o afecțiune clinică. De exemplu, *M. tuberculosis* cauzează tuberculoza pulmonară, dar poate să determine infecții ale pielii, oaselor și ale organelor interne.

În 1878, R. Koch a stabilit criteriile, pe baza cărora se poate concluziona că un anumit microorganism este agentul etiologic al unei anumite maladii (postulatele lui Koch): 1) agentul patogen trebuie să fie prezent totdeauna în organismul bolnav; 2) agentul patogen să poată fi izolat și cultivat *in vitro*, în culturi pure și subcultivat în serie; 3) agentul izolat, după inoculare la un organism sănătos să reproducă maladia în forma clinică particulară și să poată fi din nou izolat de la acesta, cu același caracter.

Exigențele postulatelor nu pot fi îndeplinite în totalitate, în toate cazurile de maladii infecțioase, dar rămân valabile ca un îndreptar pentru a stabili legătura cauzală dintre un agent patogen și o anumită maladie infecțioasă. În unele cazuri (sifilis, lepră), agenții nu se pot izola prin cultivare pe medii inerte. Ulterior s-au adăugat noi criterii: apariția reacției serologice pozitive și instalarea unei reactivități imune crescute.

În raport cu perioada de viață în care se face infecția organismului uman și animal există 4 tipuri de infecție.

a) Infecția *germinală* se produce în cazurile în care ovulul sau spermatozoidul sunt purtătorii agentului infecțios, pe care-l transmit celulei-ou (pe verticală) odată cu caracterele ereditare. Acest mecanism de infecție nu s-a demonstrat la om și nici la animalele superioare. A fost descris la artropode

(căpușe din g. *Ornithodoros*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*), infectate astfel cu bacteria spiralată *Borrelia recurrentis*, agentul patogen al febrei recurente de căpușe. Ele devin astfel rezervoare naturale de infecție.

b) Infecția *transplacentară* (intrauterină) este demonstrată și la om. Uneori este condiționată de producerea prealabilă a unor leziuni placentare sub acțiunea agentului patogen, ca de exemplu, *T. pallidum*, *Brucella*, *C. burnetii* (agentul febrei Q). Alteori, infecția are loc fără modificări placentare (infecția variolică, rujeolică, hepatică etc.).

c) Infecția *intrapartum* are loc în timp ce fătul traversează căile genitale (la expulzie), cu microorganisme patogene ale tractului genital matern (oftalmia și conjunctivita gonococică a noilor născuți).

d) Infecția *postpartum* se produce după naștere. În această categorie sunt cuprinse majoritatea infecțiilor omului și animalelor. Ele se manifestă în special după epuizarea imunității pasive, conferită de transferul anticorpilor materni, prin placenta și colostru.

În raport cu *originea* microorganismelor care le produc, infecțiile sunt de două categorii:

- *exogene*, provocate de microorganisme care pătrund pe o cale adecvată;
- *endogene*, provocate de microorganisme autohtone (indigene), potențial patogene ale microbiotei normale, datorită scăderii rezistenței locale sau generale a gazdei, după iradiere, tratamentul cu medicamente citotoxice, hormoni corticosteroizi, malnutriție, obstrucția căilor de excreție. Aceste infecții nu induc un răspuns imun detectabil clinic. Au tendința să revină ciclic sau să evolueze lent.

Colonizarea. După pătrunderea în organismul gazdă, la nivelul porții de intrare începe multiplicarea sau *colonizarea* agentului infecțios. Multiplicarea realizează condiția cantitativă obligatorie a procesului infecțios, deoarece în mod obișnuit, numărul bacteriilor sau virusurilor contaminate este prea mic pentru a iniția imediat procesul infecțios. Cu cât tulpina este mai patogenă, cu atât numărul de celule, necesar inițierii infecției este mai mic.

Din punct de vedere microbiologic, starea caracteristică a organismului infectat cu un agent patogen, înainte de declanșarea simptomelor este aceea de *contaminare*.

Consecință directă a colonizării (multiplicării) agentului patogen la poarta de intrare, local se constituie un *focar de inflamație*, adică o reacție de apărare locală a organismului, cu mobilizarea și aglomerarea leucocitelor. Rezultatul inflamației este a *supurație* (formare de puroi). Supurația are loc la nivel cutanat și la nivelul mucoaselor respiratorie, digestivă, urinară, genitală.

În funcție de natura agentului patogen, de preponderența unuia sau altuia dintre factorii de virulență, patologia infecțioasă se produce pe următoarele căi:

- *Intoxicația* de natură bacteriană, fără infecție este o situație de excepție, în cazul botulismului. *C. botulinum* se multiplică în alimentele conservate și produce toxină. Consumul unor astfel de alimente determină intoxicația;

- *Toxiinfecțiile* sunt procese alterative produse de bacteriile care se multiplică la poarta de intrare și eliberează toxine difuzibile în organism. De exemplu, *C. tetani* se multiplică în plaga anaerobă (provocată de rănire), iar toxina tetanică ajunge prin difuzie axonală retrogradă, la motoneuronii din coloanele anterioare ale măduvei, unde își exercită efectul. În mod asemănător, *C. diphteriae* se multiplică la nivelul mucoasei faringiene. Toxina, transportată de torrentul sanguin produce efecte patologice la distanță, asupra fibrei musculare cardiace, celulei nervoase, a glandelor suprarenale etc.

- *Toxiinfecțiile alimentare* sunt rezultatul consumului alimentelor infectate (carne, lapte, ouă), provenite de la animale bolnave sau contaminate în timpul manipulării. De exemplu, *Salmonella*, sp. și *S. aureus* se multiplică excesiv în alimente (carne) și concomitent se acumulează endotoxine și respectiv enterotoxine (precum și cataboliți). Consumul unor astfel de alimente echivalează cu ingestia culturii bacteriene. Concomitent se manifestă efectele toxinelor preformate, precum și procesul infecțios inițiat de celulele vii ingerate;

- *Infecția locală* (neinvazivă) este produsă de agenții patogeni care, de obicei rămân localizați la poarta de intrare în cursul întregului proces infecțios. Dacă sintetizează toxine, acestea se răspândesc, pe cale sanguină, în tot organismul (*C. diphteriae*, *C. tetani*). În aceste cazuri, infecția locală are caracterul unei toxiinfecții. O formă particulară a infecției locale este *infecția de focar*. Aceasta este însoțită de o reacție inflamatorie minimă la nivelul focarului inițial, dar se exprimă prin fenomene morbide la distanță, mediate de componente elaborate de bacteriile cantonate la nivelul focarului inițial. Maladia reumatismală este considerată ca infecție tipică „de focar”, în cursul căreia, streptococul localizat la poarta de intrare (amigdale) elimină substanțe cu efect alterativ și alergizant;

- *Infecțiile invazive* sunt acelea care, după o perioadă inițială de multiplicare la poarta de intrare, agenții infecțioși se răspândesc în organism pe diferite căi;

- prin *contiguitate*, în cazul agenților infecțioși cu multiplicare intracelulară (virusuri, rickettsii). După eliberare, prin necroza celulei, prin înmugurire, prin

permeabilizarea sau ruperea membranei, agenții infecțioși se fixează și pătrund în celulele sensibile învecinate;

– prin *continuitate*, în cazul agenților patogeni care se multiplică într-un țesut prevăzut cu un sistem canalicular preexistent. Diseminarea se face din aproape în aproape: agenții patogeni care produc infecții respiratorii progresează spre bronhii (și produc bronșite), spre țesutul pulmonar (produc pneumonii) sau spre pleură (produc pleurite); procesele inflamatorii la nivelul apendicelui generează peritonite; infecțiile căilor urogenitale și biliare. La nivelul acestor canale, agentul infecțios întâlnește o rezistență minimă, conferită de scurgerea secrețiilor și de unele manifestări de mobilitate locală, orientată în sens opus progresiei infecției;

– pe cale *limfatică*. Agenții infecțioși sunt preluați de curentul limfatic, de la nivelul focarului primar (suprafața mucoaselor). Consecința imediată este inflamarea vaselor limfatice și a ganglionilor regionali (limfadenită). Infecția poate să progreseze până la vărsarea limfei în sânge și rezultatul este *bacteriemia* sau viremia. Trecerea bacteriilor în sânge, facilitată de lezarea prealabilă a pereților vasculari se poate realiza direct din țesutul infectat, la nivelul capilarelor.

Bacteriemia semnifică prezența unui număr mic de bacterii în torentul circulator, pentru o perioadă strict limitată de timp. Sistemele de apărare (în special sistemul fagocitar) elimină bacteriile circulante. Bacteriemia este consecutivă proceselor infecțioase acute pulmonare, intervențiilor chirurgicale, extracției dentare, absorbției intestinale și chiar periajului dentar. În sângele circulant, de obicei, bacteriile nu se multiplică. De aceea, prezența lor în sânge semnifică o eliberare dintr-un focar de infecție, atât de abundentă, încât, temporar depășește capacitatea protectoare a mecanismelor de apărare a organismului.

Uneori infecția localizată este o caracteristică distinctă a microorganismelor lipsite de invazivitate. Față de orice tip de infecție, organismul se apără prin intermediul barierelor mecanice, enzimatice și imunitare. În funcție de eficiența forțelor de apărare, infecția invazivă va rămâne *localizată* sau se va *generaliza*.

* Extinderea infecției pe una din căile menționate poate determina, fie o infecție *regională*, care corespunde extinderii infecției (diseminării) pe teritorii întinse (de exemplu, sistemul limfatic regional și eventual vasele sanguine tributare zonei), fie o infecție *generalizată*.

Dintr-o infecție regională, agenții patogeni diseminați pe o cale adecvată pot dobândi localizări *secundare*, în orice țesut sau organ, unde inițiază noi

focare infecțioase. Aceste localizări pot fi unice (de exemplu, pe valvulele cardiace, în plămâni, în meninge, în ficat, în vezica biliară, în creier, în rinichi etc.) sau *multiple* (miliare) denumite *septicopioemii*. Infecțiile secundare cu localizări multiple evoluează spre infecții generalizate.

Infecțiile generalizate sunt diseminate pe cale sanguină. Ele sunt precedate de trecerea masivă a bacteriilor dintr-un focar infecțios, în sânge. Prin numărul lor mare, bacteriile depășesc capacitatea de apărare a organismului. Existența stabilă a unui număr mare de bacterii în sânge caracterizează infecția *septicemică*. Septicemia este consecința descărcării masive de bacterii dintr-un focar de infecție, vascularizat. Starea septicemică poate fi însoțită de toxemie, ca urmare a difuziei toxinelor din focar (abces, meningită).

Septicemia, consecutivă revărsării microorganismelor dintr-un focar semnifică incapacitatea mijloacelor de apărare ale gazdei de a reacționa eficient față de agentul infecțios. Cu rare excepții, (bacilul cărbunos, bacilul peștei), bacteriile nu se multiplică în sânge.

Uneori, faza septicemică nu este precedată de multiplicarea agentului patogen la poarta de intrare. Agenții patogeni ai infecțiilor transmise de insectele hematofage (tifos exantematic, febră recurentă) sau prin mușcătură (leptospiroze) străbat mucoasele și trec direct în sânge.

Infecția bacteriană produce modificări de tip alterativ ale organismului gazdă. Ele sunt *primare* (directe), datorate factorilor de patogenitate bacteriană (intoxicații, toxiinfecții, bacteriemii) și *secundare*, mediate de factorii umorali și celulari ai sistemului imunitar (stările de hipersensibilitate).

Possibilități de evoluție a procesului infecțios

Infecția poate evolua în două modalități: *inaparent* sau *aparent*, ca boală infecțioasă.

Infecția *inaparentă* caracterizează acele situații în care procesul infecțios nu se exteriorizează prin simptomatologie clinică. Nu se produce o stare maladivă, dar reacțiile imune devin pozitive. De exemplu, infecția tuberculoasă inaparentă se detectează prin reacția de hipersensibilitate întârziată la tuberculină. Reacția este pozitivă la un procent mare de indivizi, dar maladia tuberculoasă clinică se manifestă la un mic procent din persoanele pozitive pentru testul tuberculinei. De cele mai multe ori, infecțiile inaparente se detectează prin reacții serologice *in vitro* sau prin reacții de hipersensibilitate *in vivo*.

Uneori, infecția asimptomatică poate fi mortală. De exemplu, după inocularea intranasală la iepure, a unei culturi foarte virulente de pneumococ, moartea survine fără apariția prealabilă a manifestărilor patologice. Explicația constă în paralizia mecanismelor de apărare ale gazdei.

Infecția *aparentă* este aceea care se manifestă printr-un ansamblu de semne clinice obiective și subiective, specifice și nespecifice, consecințe ale alterărilor produse de agentul infecțios și de produsele activității sale.

Maladia infecțioasă prezintă următoarele caracteristici: a) este produsă de microorganisme vii sau de toxine ale microorganismelor; b) poate realiza o imunitate specifică de durată variabilă; c) organismul bolnav poate deveni sursă de îmbolnăvire a indivizilor sănătoși; d) este specifică, în sensul că aceeași boală este produsă totdeauna de același agent cauzal, deși ca formă clinică se poate prezenta sub aspecte variate.

Etapele maladiei infecțioase

În evoluția sa, procesul infecțios aparent parcurge mai multe etape distincte, separate în timp.

Perioada de incubație sau perioada inițială a infecției este intervalul de timp scurs între momentul pătrunderii agentului patogen în organism și acela al debutului maladiei. Această perioadă nu este marcată de vreun simptom clinic evident. Durata ei variază între anumite limite, în funcție de natura agentului patogen, iar pentru același agent, în raport cu doza infectantă, cu virulența agentului patogen și cu reactivitatea organismului gazdă. Această perioadă este de maximă activitate a agentului patogen: se multiplică, se localizează la nivelul țesutului receptiv și eventual elaborează substanțe toxice.

Durata incubației se măsoară în zile, săptămâni, luni, sau este foarte scurtă, de ordinul orelor. Pentru infecțiile *exogene* – produse de agenți patogeni care nu fac parte din microbiota rezidentă a organismului, se poate determina relativ precis durata acestei perioade, prin infecția experimentală a animalelor de laborator sau a voluntarilor umani. Pentru infecțiile *endogene* – acelea inițiate de microorganisme din microbiota rezidentă a organismului, perioada de incubație nu se poate determina. Din momentul contaminării este posibilă scurgerea unei perioade foarte lungi de timp până când microorganismul poate să inițieze un proces infecțios. Este cazul bacteriilor *oportuniste* sau *condiționat patogene*.

Cel mai adesea agenții infecțioși manifestă un *organotropism* evident, legat de faptul că, în general, fiecare specie își găsește condițiile optime de dezvoltare într-un anumit țesut. Astfel, indiferent de calea de pătrundere în organism, vibriionul holerici se localizează în intestinul subțire, bacilul dizenteric (*S. dysenteriae*), în peretele intestinului gros, *Brucella* – în placenta bovinelor, ovinelor, datorită concentrației mari de eritrol (dar nu în placenta umană), *Rickettsia prowazekii* – în celulele epiteliale ale capilarelor sistemului nervos central, *B. pertusis* – exclusiv în mucoasa bronșică.

B. anthracis se multiplică în orice țesut, chiar și în sânge.

Uneori, în evoluția maladiei infecțioase se poate interpune perioada *prodromală*. Ea urmează incubajiei și durează până la apariția primelor simptome caracteristice maladiei. Această perioadă se exteriorizează prin semne nespecifice: astenie, indispoziție.

Debutul bolii este marcat de momentul în care numărul de bacterii și cantitatea de toxine acumulate au atins un nivel critic. Debutul poate fi brusc sau lent și este caracterizat din punct de vedere clinic, prin instalarea (bruscă sau gradată) a semnelor bolii: febră, cefalee, frisoane, algiile musculo-articulare. Debutul marchează începutul perioadei de invazie a agentului infecțios de la locul multiplicării primare, sau a eliberării unei cantități prag de toxină, spre noi zone sensibile, iar din punct de vedere cronologic și clinic semnifică începutul *perioadei de stare*.

Perioada de stare este intervalul de timp, în care maladiile infecto-contagioase își desfășoară un tablou clinic cu simptome caracteristice, de amplitudine maximă, decisivă pentru evoluția ulterioară. În această perioadă poate să survină decesul.

La sfârșitul perioadei de stare, simptomele dispar *brusc* – în *crisis* – (de exemplu, în pneumonia bacteriană), însoțită de sterilizarea bacteriologică, sau *lent* – în *lysis* (în cazul febrei tifoidice). Organismul se poate steriliza, sau poate să rămână infectat pentru o perioadă nedefinită de timp.

În perioada *de stare*, organismul se imunizează abundant cu antigene bacteriene sau virale și se sintetizează anticorpi. Imunizarea are, de regulă, ca rezultat, sterilizarea bacteriologică sau virologică a organismului (eliminarea completă a agentului infecțios). Uneori, organismul nu se sterilizează. În focarele de infecție greu accesibile efectorilor răspunsului imun, agentul persistă, consecința fiind a *infecție cronice*.

Convalescența este perioada de timp în care organismul își reface potențialul de activitate, anterior îmbolnăvirii.

Infecția cronică corespunde unei stări de echilibru între agentul infecțios și organismul gazdă, caracterizată prin faptul că vindecarea clinică (dispariția simptomelor) nu este însoțită de sterilizarea organismului. Focarele de infecție cronică au localizări greu accesibile factorilor de apărare a organismului sau medicației: în peretele arterelor mari, în sistemul nervos central, în viscerele parenhimatoase (ficat, rinichi, splină), în sinusurile osoase, în glandele bine încapsulate (prostata). Infecția cronică poate să persiste fără simptome clinice (sifilisul latent) sau poate evolua cu reacutizări intermitente la diferite perioade de timp (bruceloză, tuberculoză, sifilis terțiar).

Starea de purtător este, fie consecința unei infecții cronice, fie a persistenței, pentru o perioadă de timp, a unui focar de infecție, în organismele clinic sănătoase. Uneori, foștii bolnavi tolerează la nivelul mucoaselor (respiratorie, digestivă, urinară), agentul patogen, pe care-l elimină timp de câteva săptămâni (*S. pyogenes*, *C. diphtheriae*, *V. cholerae*). În alte cazuri, microorganismele și viruşurile sunt eliminate pentru perioade îndelungate (ani): *S. typhimurium* rămâne localizată în vezica biliară, de unde se elimină intermitent. Purtătorii creează probleme dificile din punct de vedere epidemiologic, deoarece reprezintă un izvor de infecție greu de depistat. Bolnavii de difterie pot rămâne purtători ai bacilului *C. diphtheriae*. Starea de purtător de *S. typhi* poate să dureze zeci de ani. Purtătorii sunt foarte periculoși pentru sănătatea publică, mai ales dacă vin în contact cu alimentele, ca manipulatori sau preparatori ai acestora.

Tipuri de evoluție epidemiologică a infecției

Din punct de vedere epidemiologic, maladia infecțioasă poate evolua pe mai multe nivele de extindere spațio-temporală și incidentală:

- evoluția *sporadică* semnifică apariția cazurilor izolate de îmbolnăvire, atât în timp cât și în spațiu;
- evoluția *endemică* este definită prin apariția cazurilor relativ rare de infecție, care se mențin constante numeric într-o colectivitate și apar cu relativă regularitate, de obicei sezonier, la intervale variabile de timp. Majoritatea indivizilor populației sunt imunizați și deci indemni față de agenii infecțioși;
- evoluția *epidemică* caracterizează evoluția rapidă a unei infecții, într-un interval scurt de timp, cu un număr mare de îmbolnăviri într-o colectivitate de mărime diferită (cămin, cazarmă, sat, regiune, țară). Se cunosc epidemiile de ciumă, gripă, rujeolă, scarlatină;

– evoluția *pandemică* este aceea în care maladia infecțioasă se extinde foarte rapid pe un teritoriu foarte larg, cu cazuri foarte numeroase de îmbolnăvire (țări, continente). Evoluția pandemică este caracteristică infecției gripale și este facilitată de mijloacele de deplasare rapidă, la distanțe foarte mari.

Fără de un agent patogen, absent în mod obișnuit dintr-un areal, populația poate fi foarte susceptibilă. La primul contact cu populația receptivă, agentul patogen declanșează o epidemie explozivă, dar odată cu instalarea stării de imunitate specifică a populației, incidența maladiei scade.

Dacă agentul își modifică specificitatea antigenică, epidemia evoluează și într-o populație imunizată, deoarece față de noile variante antigenice, populația nu posedă anticorpi specifici.

Epidemiile sunt condiționate de standardul de viață al comunității. Maladia tuberculoasă este o reflecție a acestei condiții, în timp ce bolile venerice sunt favorizate de promiscuitatea sexuală.

C a p i t o l u l VII

MECANISME DE APĂRARE ANTIINFECTIOASĂ

IMUNITATEA ANTIINFECTIOASĂ

Răspunsul imun față de un microorganism este foarte complex, comparativ cu răspunsul imun față de un antigen macromolecular, datorită complexității antigenice a celulelor. La rândul lor, cele mai simple virusuri exprimă câteva antigene distincte, iar paraziții pluricelulari au un număr nedefinit de antigene diferite pe suprafața lor.

Celulele bacteriene ocupă o poziție intermediară, nu numai în privința complexității structurale, ci și a heterogenității antigenelor celulare. Fiecare tip molecular al suprafeței unei celule bacteriene poate să conțină câțiva epitopi, repetitivi (de natură polizaharidică) sau distincți din punct de vedere chimic.

Problema heterogenității antigenice a virusurilor și bacteriilor patogene este importantă nu numai din punct de vedere teoretic, ci este esențială pentru aspectul practic al vaccinării, deoarece există riscul stimulării funcțiilor imune care nu au efect protector, ci dimpotrivă, consecința este agravarea maladiei infecțioase sau chiar activarea mecanismelor patogenității autoimune.

Evaluarea antigenicității moleculelor de suprafață ale virusurilor și bacteriilor este dificilă, deoarece, o moleculă în soluție poate avea o altă configurație a epitopilor decât în cazul integrării ei într-o structură. Diferența derivă din raporturile spațiale cu moleculele vecine, pe suprafața virusului sau celulei. Din această cauză, răspunsul imun al organismului, la stimularea cu fiecare agent patogen rămâne un domeniu de studiu practic nelimitat. O altă complicație derivă din faptul că specificitatea antigenică a unor molecule este uneori variabilă.

Răspunsul imun antibacterian și antiviral este atât humoral cât și celular. Prevalența unuia sau altuia din cele două compartimente este diferită în funcție

de natura agentului infecțios. De cele mai multe ori predomină răspunsul imun mediat humoral. În cazuri mai rare (infecția cu *M. leprae* sau *M. tuberculosis*) este preponderent răspunsul imun mediat celular.

Răspunsul imun față de diferite antigene ale agenților patogeni are diferite grade de protecție antiinfecțioasă, în funcție de natura agentului, de gradul său de patogenitate și de natura răspunsului imun pe care-l inițiază.

Uneori răspunsul imun antiinfecțios este puțin benefic pentru organismul gazdă sau este chiar detrimental, ca rezultat al unor mecanisme diferite de acțiune:

- răspunsul imun este orientat față de componentele moleculare neesențiale ale agentului patogen și declanșarea sa împiedică activarea unui răspuns imun eficace;

- răspunsul imun produce leziuni mai puternice și mai extinse decât virusul sau microorganismul înșăși, adică determină reacții de hipersensibilitate și/sau autoimunitate.

Unele componente antigenice ale unui agent patogen determină un răspuns imun mai eficient. Ele poartă denumirea de *situsuri critice*. Organismele diferitelor specii pot să recunoască același antigen critic și să producă anticorpi specifici cu eficiență diferită, deoarece au specificitate față de *epitopi* diferiți ai aceluia antigen.

Structura antigenică a celulei bacteriene

Localizarea determinantilor de specificitate antigenică pe suprafața celulei bacteriene este dificilă datorită diversității moleculelor potențial capabile să activeze mecanismele imunitare. Pe de altă parte, eficiența răspunsului imun antibacterian depinde de raportul dintre activitatea sistemelor imunitare efectoare și mecanismele de autoprotecție ale bacteriei, menite să devieze răspunsul imun.

Din punct de vedere antigenic, bacteriile interacționează cu gazda, prin modalități diverse, de la producerea unor cantități mici de toxine, de către cele lipsite de atributul invazității, până la cele care cresc numeric cu o rată logaritmică în țesuturi sau în sânge.

Unele bacterii prezintă pe suprafață, determinanți antigenici asemănători ca structură chimică, cu moleculele proprii organismului. Răspunsul imun va fi absent sau nesemnificativ. Altele, suprafața bacteriană conține determinanți antigenici de natură proteică sau polizaharidică, inductori ai unui răspuns imun prompt. Un răspuns imun antibacterian eficient trebuie să aibă ca rezultat final, lezarea structurii peretelui bacterian, urmată de liză, ca o consecință a activării sistemului complement.

Cele mai semnificative structuri bacteriene din punct de vedere antigenic sunt cele parietale. Bacteriile patogene prezintă 4 tipuri majore de structuri

parietale: peretele Gram pozitiv, peretele Gram negativ, peretele complex al micobacteriilor și structurile parietale ale spirochetelor. Toate cele 4 categorii structurale de perete conțin o componentă peptido-glicanică (mureina), dar se deosebesc prin alte numeroase structuri moleculare, cu semnificație antigenică.

În cazul bacteriilor Gram negative, componentele antigenice esențiale ale membranei externe a peretelui celular sunt *lipopolizaharidele* (LPS). Specificitatea lor antigenică este conferită de polizaharidul O, structură *imunodominantă*, care cuprinde până la 40 unități glucidice. Numeroasele variații structurale ale catenei glucidice determină existența unui număr corespunzător de variante antigenice bacteriene.

Structura moleculară antigenică esențială a bacteriilor Gram pozitive este *peptidoglicanul*, care formează peste 50% din greutatea uscată a peretelui. Mureina are unele proprietăți toxice și pirogenice similare cu ale endotoxinei. Acizii teichoici sunt de asemenea molecule antigenice, stimulatoare ale răspunsului imun.

Proteinele de suprafață asociate peretelui celular au uneori semnificație antigenică. Cele mai cunoscute sunt proteinele M de la *Streptococcus* (grup A), care conferă specificitate de tip. Sunt peste 80 de variante antigenice ale proteinei M, dar fiind asemănătoare fibrei musculare cardiace nu stimulează răspunsul imun, ci au rol de factor de virulență.

Polizaharidele capsulare ale unor bacterii patogene Gram pozitive și negative, libere în supernatant sau legate de perete sunt foarte imunogene dacă conțin lipide sau proteine terminale. Variația lor antigenică derivă nu numai din schimbarea ordinii unităților componente, ci în primul rând din posibilitatea legării monozaharidelor de oricare din cei 6 atomi ai hexozei adiacente. Diferențele de secvență a subunităților monozaharidice generează determinanți antigenici

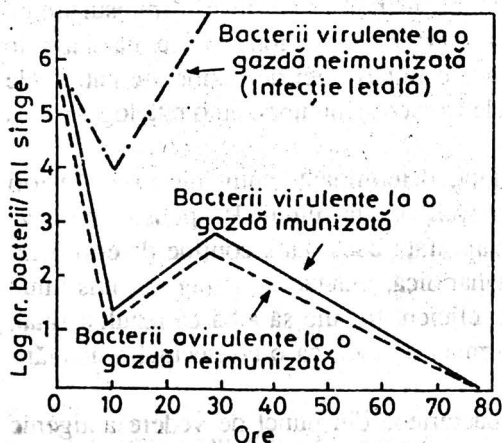


Fig. 67. Rolul anticorpilor în imunitatea antiinfecțioasă. Reprezentarea schematică a ritmului de dispariție a bacteriilor din circulație, în organisme imunizate și neimunizate. La gazdele imunizate, bacteriile virulente dispar la fel de repede ca și bacteriile avirulente, în organismele neimunizate.

diferiți, care nu reacționează încrucișat cu anticorpii specifici față de un alt determinant cu aceeași compoziție.

Materialul capsular este inhibitor al fagocitozei, deoarece celulele fagocitare nu au receptori pentru componentele oligozaharidice ale polizaharidelor capsulare. Uneori acestea sunt asemănătoare oligozaharidelor din moleculele glicoproteice proprii organismului, ceea ce explică slaba lor imunogenitate.

Toxinele de natură proteică sunt imunogene și stimulează răspunsul imun cu efect protector.

Micobacteriile prezintă un perete celular foarte rezistent la acțiunea factorilor litici, cu o structură moleculară particulară. În alcătuirea sa intră *glicolipide*, formate din resturi de acid micolic legate covalent de resturile de carbohidrat ale arabino-galactanului. Complexul glicolipidic se leagă prin punți fosfat, de peptidoglican.

Spirochetele prezintă o membrană externă bogată în lipide, stimulatoare a sintezei anticorpilor și a reacțiilor de hipersensibilitate.

În concluzie, tabloul antigenic al celulei bacteriene este complex și variabil, nu numai de la o specie la alta, ci chiar între tulpinile diferite ale aceleiași specii.

Pentru producerea efectului litic, esențial în apărarea antibacteriană, moleculele de anticorpi și proteinele complementului trebuie să se lege într-un situs celular care să permită lezarea peretelui celular. Uneori, anticorpii au efect opus, de protecție a celulei bacteriene, deoarece activează complementul la situsuri neesențiale ale bacteriei. De exemplu, anticorpii antiflagelari, care *in vitro* mediază reacția de aglutinare de tip H au probabil o eficiență mai scăzută *in vivo*, limitată la inhibarea mobilității.

Răspunsul imun în infecțiile cu bacterii toxigene, lipsite de invazivitate (*Corynebacterium*, *Clostridium tetani*, clostridiile enterice) este de tip humoral anitoxic.

Bacteriile invazive care determină infecții regionale (sistemice) sau generalizate se disting în funcție de capacitatea lor de a se localiza intracelular sau extracelular.

Bacterii cu localizări extracelulare

Streptococcus sp.
Staphylococcus sp.
Neisseria sp.
Escherichia coli
Klebsiella sp.
Proteus sp.
Pseudomonas sp.
Bacteroides fragilis
Hemophilus influenzae
Actinomyces sp.

Bacterii facultativ intracelulare

Mycobacterium tuberculosis
Mycobacterium leprae
Brucella sp.
Listeria monocytogenes
Yersinia sp.
Salmonella typhi
Salmonella paratyphi
Treponema pallidum

(Modificat după Kasper și Finberg, 1987)

Bacteriile cu localizare *extracelulară* induc un răspuns imun mediat humoral. Activarea limfocitelor B este realizată prin cooperarea cu celulele T_H . În focarul de inflamație, bacteriile extracelulare determină formarea abcesului, în care predomină polimorfonuclearele. Pentru formarea abcesului este necesară activarea celulelor T.

Bacteriile cu localizare *intracelulară* induc preponderent un răspuns imun mediat celular. Persistența lor în celulele fagocitare are ca rezultat final formarea *granulomului*. Cele mai tipice granulome se formează în infecții cu *M. tuberculosis* și *M. leprae*. Nivelul activității limfocitelor T este esențial pentru supraviețuirea celulelor de *Mycobacterium* în interiorul macrofagului.

Tipuri de imunitate dobândită (adaptativă)

Homeostazia organismului uman și animal este asigurată de sisteme complexe de apărare, ale căror particularități funcționale au fost definite în primul rând în raport cu modul de acțiune față de agenții infecțioși.

Organismele dispun de două mari compartimente de apărare:

- cele de apărare *specifică*, reprezentate de sistemul imunitar;
- cele de apărare *nespecifică*, care asigură rezistența sau *imunitatea naturală*.

Prin imunitate *naturală* înțelegem rezistența unui organism față de un agent infecțios sau față de un parazit, în absența unui răspuns imun evident.

Cele două sisteme de apărare, specifică și nespecifică se condiționează reciproc, dar nu se poate face o evaluare a gradului în care mecanismele de rezistență naturală sunt influențate de contactul cu virusurile și microorganismele. Pe de altă parte, răspunsul imun detectabil sau subliminal poate produce schimbări semnificative ale stării de activitate a *sistemului fagocitar mononuclear* și a celulelor killer.

Mecanismele imunitare de apărare antiinfecțioasă au caracter *specific și adaptativ*. Ele intră în acțiune numai după contactul cu stimulul antigenic (nonself). Răspunsul imun are un caracter net de specificitate față de antigenul declanșator. Mecanismele imunitare au o anumită finalitate a activității lor, aceea de a recunoaște antigenul, de a-i neutraliza activitatea (anihilarea infecțiozității virusurilor, neutralizarea toxinelor), facilitând degradarea și eliminarea sa din organism.

Activitatea sistemului imunitar se bazează pe activarea unor sisteme celulare complexe: sistemul *imunocitar* (reprezentat de limfocitele angajate în elaborarea răspunsului imun) și *sisteme celulare cu acțiune nespecifică* (sistemul fagocitar mononuclear și polimorfonuclear).

Imunitatea dobândită are un caracter specific și se definește ca o stare de rezistență antiinfecțioasă, cu caracter individual, condiționată de contactul anterior al organismului cu agentul infecțios virulent sau cu produsele lui toxice în stare nativă (într-un proces infecțios natural) sau cu agentul infecțios

atenuat și anatoxinele sale (în cazul vaccinării). Imunitatea dobândită denumită și *inductibilă* este de obicei relativă, în sensul că, deși în general este foarte solidă poate fi învinsă prin agresiunea exercitată de o cantitate mare de virusuri sau bacterii sau de atacul unei tulpini deosebit de virulente.

În funcție de originea și modul de instalare, imunitatea dobândită este de două tipuri: dobândită în mod *natural* și dobândită în mod *artificial*. În ambele cazuri imunitatea poate fi dobândită atât *activ*, prin răspuns imun propriu la stimulul antigenic, cât și *pasiv*, prin transferul anticorpilor exogeni.

Imunitatea dobândită natural în mod activ este proprie organismelor după ce au trecut printr-o stare de infecție aparentă (decelabilă clinic) sau inaparentă și care au devenit astfel rezistente la reîmbolnăvire. Durata acestei stări de imunitate este variabilă. Trecerea prin unele infecții asigură o protecție specifică pentru tot restul vieții (rujeola, variola, varicela, oreionul); alte infecții (difteria, scarlatina, tusea convulsivă etc.) conferă o protecție mai puțin solidă, astfel încât la o nouă expunere (după câțiva ani) organismele pot face din nou boala într-o formă mai ușoară decât prima îmbolnăvire. După infecția gripală, starea de imunitate este scurtă (1–3 ani). Ca mecanism, această imunitate este condiționată de faptul că organismul a dobândit o reactivitate deosebită, legată de memoria sa imunologică, datorită căreia, la un contact ulterior cu antigenul respectiv va reacționa foarte activ, împiedicând evoluția infecției.

Imunitatea dobândită natural în mod pasiv este rezultatul transmiterii transplacentare a anticorpilor de la mamă la făt și al transferului lor prin colostru de la mamă la nou născut. Această formă de imunitate este variabilă calitativ și cantitativ în funcție de diversitatea antigenelor la care a fost expus organismul matern. Transferul gamaglobulinelor prin filtrul placentar depinde de structura placentei, respectiv de numărul de straturi tisulare interpuse între circulația maternă și cea fetală. Astfel, tranzitul anticorpilor este limitat la animalele care au placentă cu structură epiteliocorială (cu 7 straturi de țesut) cum sunt bovinele, cabalinele și porcinele și este foarte intens la cele cu placentă hemocorială (omul, maimuța, rozătoarele). La om, nou-născutul primește anticorpi materni și după naștere prin colostrul bogat în imunoglobuline, provenite din circulația maternă.

Imunitatea dobândită în mod natural și pasiv asigură nou-născutului o stare de nereceptivitate față de maladiile infecțioase pentru care organismul matern este imun și față de care el însuși dispune de substanțele protectoare de origine maternă primite prin intermediul placentei. Imunitatea dobândită scade treptat după naștere, prin dispariția anticorpilor materni din organismul copilului, în așa fel încât, după o perioadă variabilă de timp (3–6 luni), acesta devine sensibil față de agenții patogeni respectivi, deoarece, odată cu anticorpii specifici, el

nu a moștenit și capacitatea caracteristică imunității active de a reface și menține anticorpii specifici la un nivel de concentrație adecvată. Imunitatea transplacentară explică raritatea bolilor infecțioase la copil în primele 3 luni după naștere.

Imunitatea dobândită artificial reprezintă o stare de rezistență a organismului, realizată prin intervenția voită a omului, respectiv prin injectarea unor produse biologice capabile să stimuleze formarea anticorpilor protectori (vaccinuri) sau conținând substanțele protectoare gata formate (seruri imune). În primul caz, când organismul uman sau animal sintetizează substanțele protectoare prin propriile sale mijloace, imunitatea dobândită este *activă*; în cel de-al doilea, când le primește ca atare, imunitatea dobândită este *pasivă*.

Denumirea de *vaccin* vine de la cuvântul latin „vaca” și semnifică originea primului vaccin viral pe care E. Jenner (1798) l-a utilizat pentru controlul variolei cu virus vaccinal. Ultimele se disting prin proprietățile sale, atât față de virusul variolei (smallpox) cât și față de cel al vaccinei.

Imunitatea dobândită artificial în mod activ este consecutivă administrării *vaccinurilor*. Acestea sunt produse biologice care conțin bacterii vii cu virulență atenuată, bacterii omorâte, toxine modificate (anatoxine), sau virusuri infecțioase dar cu virulență atenuată ori inactivate și care, introduse în organismul uman sau animal stimulează formarea anticorpilor protectori specifici, generând o stare de imunitate temporară față de agentul din care au fost preparate.

Preparatul vaccinal trebuie să fie *eficient*, adică să inducă un răspuns imun protector, a cărui memorie să se păstreze în timp și să prezinte un grad înalt de *siguranță*, adică să nu determine efecte secundare defavorabile.

Administrarea unui vaccin se face pe baza unei strategii prealabile, bine definită. Scopul vaccinării poate fi *eradicarea*, *eliminarea* sau *limitarea* unui proces infecțios. Eradicarea semnifică dispariția agentului patogen. *Eliminarea* se referă la dispariția manifestărilor patologice, dar agentul patogen se păstrează în populația umană sau animală. *Limitarea* definește controlul unei maladii infecțioase până la un nivel la care nu mai reprezintă o problemă de sănătate publică.

În general, vaccinurile se administrează înainte de a se produce infecția cu tulpina sălbatică a agentului patogen. Face excepție virusul rabic (cu sediul replicării în sistemul nervos central), caz în care vaccinul se administrează după ce s-a produs infecția. Acest fapt este posibil, deoarece perioada îndelungată de incubație a virusului de tip sălbatic permite elaborarea unui răspuns imun eficient, față de preparatul vaccinal care modifică evoluția infecției.

Vaccinurile de origine bacteriană

Vaccinurile vii constau din suspensii de bacterii vii, dar cu virulență atenuată astfel încât să nu determine o infecție aparentă, dar să rămână capabile să inițieze o infecție inaparentă, cu efect imunizant. Vaccinurile vii conțin un număr mic de celule viabile, slab virulente și care, după administrare induc o imunitate solidă, comparabilă aceleia consecutive trecerii prin boală, fără să fi provocat însă decât cel mult semne minime de îmbolnăvire. Indiferent de locul inoculării, agentul infecțios din vaccinul viu nu rămâne localizat, ci se răspândește în organism, pătrunzând și multiplicându-se în aceleași țesuturi în care se localizează și în cazul infecției naturale. Infectând un număr mic de celule sensibile și multiplicându-se lent, agentul infecțios din vaccin nu declanșază o boală clinică, ci numai o infecție de formă atenuată, care este însoțită de modificări umorale și de reactivitate, necesare instalării stării de imunitate.

Pentru prepararea vaccinurilor vii se utilizează mutante bacteriene cu virulență atenuată, selecționate prin cultivarea unor tulpini sălbatice la temperaturi nefavorabile (de exemplu, la o temperatură superioară celei optime în cazul vaccinului contra cărbunelui), sau prin acțiunea unor substanțe chimice și a unor medii de cultură nefavorabile (vaccinul BCG contra tuberculozei).

Vaccinurile omorâte constau din suspensii bacteriene omorâte prin încălzire la temperaturi ridicate (60°) ori sub acțiunea formolului sau a fenolului și care conțin totdeauna una din aceste substanțe ca prezervant. Din această categorie fac parte vaccinul tifoparatic (TAB), pertusis (contra tusei convulsive), stafilococic.

Anatoxinele (toxozii) sunt produse cu proprietăți imunogene, derivate din exotoxine. Uneori, toxinele se transformă spontan în derivați atoxici, dar păstrează proprietățile de imunogenicitate și specificitate ale toxinei native. Mecanismul inactivării nu este cunoscut. Este un proces lent și progresiv, dependent de pH, temperatură, prezența ionilor sau a proteinelor contaminante, de procesul îmbătrânirii preparatului. Un factor major al inactivării pare a fi proteoliza parțială a moleculelor de toxină sub acțiunea proteazelor contaminante, dar și schimbarea conformației moleculei, polimerizarea sau detașarea unui fragment molecular pot acționa în același sens.

Inactivarea toxinelor și transformarea lor în produse atoxice are loc în condiții dirijate în prezența formolului 4%, la 37° și rezultă *anatoxine*. Fenomenul a fost descoperit de Ramon (1925). Beta-propiolactena, 2-4-dinitrofluorbenzenul și glutaraldehida au aceleași efecte asupra toxinelor.

Pentru a fi utilizată ca vaccin, o anatoxină trebuie să îndeplinească următoarele condiții: a) să fie imunogenă și să inducă formarea unei cantități suficiente de

anticorpi pentru a neutraliza, *in vivo*, toxina nativă; b) să fie complet lipsită de toxicitate; c) să aibă proprietăți alergizante cât mai diminuate.

Anatoxina ideală ar putea fi produsă de microorganisme manipulate genetic sau prin mutații ale genei codificatoare a toxinei. Ea ar fi o proteină netoxică, dar cu aceleași proprietăți de imunogenicitate cu ale toxinei native, capabilă să inducă sinteza anticorpilor neutralizanți.

Condițiile optime pentru obținerea anatoxinelor sunt proprii fiecărei toxine și au fost optimizate empiric, deoarece mecanismele moleculare ale inactivării nu se cunosc. În general, condițiile optime pentru obținerea anatoxinelor sunt următoarele:

- concentrația proteică trebuie să fie de 1 mg/ml, iar cea de formol, de 1,3 mg/ml;
- temperatura de detoxifiere este de 37–40°;
- pH optim este 7,8–8,2 pentru toxinele difterică și tetanică și 5,5 pentru cea botulinică;
- durata contactului cu formolul este de 3–5 săptămâni.

Detoxifierea începe simultan cu adăugarea formolului. Ea este evidentă după un minut și crește exponențial timp de 24 ore, când toxicitatea are valoare foarte scăzută și tinde spre 0 la 5 zile. Forma netoxică poate reveni total sau parțial la forma toxică. De aceea este necesară prelungirea contactului cu formolul o perioadă mai lungă de timp. Molecula de anatoxină are o structură stabilizată, prin formarea legăturilor noi între formol și resturile aminoacizilor, 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.

Exotoxinele bacteriene, ca și anatoxinele sunt imunogene foarte bune pentru om, cal, iepure, cobai, în special după asocierea cu adjuvanți (fosfat de calciu). Prin hiperimunizarea calului se obțin seruri hiperimune antidifterice și anti-tetanice, utilizabile în seroterapie. Datorită riscului reacțiilor imune secundare (alergie, șoc anafilactic) OMS recomandă înlocuirea serurilor hiperimune obținute pe animale, cu cele umane, obținute de la donori hiperimunizați.

După conținutul lor, vaccinurile pot fi *monovalente*, cele care conțin antigenele unei singure tulpini bacteriene sau virale (de exemplu, vaccinul stafilococic), *bi-*, *tri-*, sau *polivalente*, cele care conțin antigene provenind de la 2–3 sau mai multe specii de microorganisme (de exemplu, vaccinul diftero-tetano-pertusis).

După proveniența bacteriilor folosite la prepararea vaccinului se poate vorbi de *autovaccin*, adică vaccinul este preparat cu o tulpină de microorganisme izolată de la un bolnav și este destinat a fi folosit numai de bolnavul respectiv

și de *stock-vaccinuri*, produse în general din mai multe tulpini și destinate a fi folosite pentru imunizări în masă.

Vaccinurile virale

Majoritatea vaccinurilor virale sunt eficiente în ceea ce privește *prevenirea îmbolnăvirii*, dar sunt mai puțin eficiente cu privire la *prevenirea infecției*. Prevenirea procesului infecțios este o necesitate absolută în unele cazuri, ca de exemplu virusul hepatitei B și HIV.

Scopul major al vaccinării cu virusul hepatitei B este de a împiedica transmiterea infecției pe verticală, de la organismul matern infectat persistent, la copil, în perioada neonatală. Infecția neonatală mărește riscul carcinomului hepatic. Imunizarea neonatală cu antigenul de suprafață al virusului hepatitei B are o eficiență de 90%.

Prevenirea infecției este dificilă pentru orice imunizare antivirală, dar în cazul HIV pare și mai dificilă, deoarece nu se sintetizează anticorpi neutralizanți față de virusul infectant.

Vaccinurile virale sunt de trei categorii: vaccinuri cu virus *activ*, vaccinuri cu virus *inactivat* și vaccinuri *subunitare*.

Vaccinurile cu virus activ atenuat (infecțios) își au originea în tulpinile virale umane (cu excepția virusului vaccinal), dar sunt complet sau aproape complet lipsite de patogenitate și sunt capabile să inducă un răspuns imun protector. Ele se multiplică în organismul uman și realizează o stimulare antigenică continuă într-un interval de timp. Aceste vaccinuri conferă o imunitate de durată, după o singură doză.

Cele mai ample programe de imunizare cu vaccinuri atenuate sunt vaccinarea antivariolică, antipoliomielitică și antirujeolică.

Atenuarea virusurilor s-a realizat pe mai multe căi:

- folosirea unui virus înrudit de la o altă gazdă. Cel mai vechi vaccin viral (Jenner, 1798) utilizat în controlul variolei este virusul vaccinal, care pe baza studiilor moderne denotă o mai mare asemănare cu virusul variolei (smallpox) decât cu cowpox;

- inocularea agentului patogen sau parțial atenuat pe o cale nenaturală. Această metodă este folosită pentru obținerea vaccinurilor de uz veterinar. Pentru om nu este folosită, deoarece riscul infecției este mare;

- pasajul virusului de origine umană într-un substrat „nenatural”. Cele mai importante vaccinuri la om și animale au fost obținute pe această cale. Virusul se cultivă în mod repetat prin inoculare la organisme sănătoase sau în culturi primare de celule: virusul febrei galbene s-a inoculat la șoarece și apoi în embrioni

de găină; poliovirusul s-a inoculat în celulele de rinichi de maimuță; virusul rujeolei – în cultură de fibroblaste de embrion de găină.

Mutantele selectate prin pasaje într-un substrat celular nenatural sunt rezultatul unui cumul de evenimente mutaționale întâmplătoare. Dintre acestea se utilizează în practica vaccinării, acelea care au proprietățile dorite de atenuare și imunogenitate.

Unul din marile succese ale acestei metode de atenuare este prepararea vaccinului polio: s-a selectat o linie caracterizată prin lipsa virulenței la maimuță, după inoculare în creier sau în măduva spinării.

Vaccinurile virale atenuate au avantajul important al stimulării ambelor compartimente ale răspunsului imun: celular și humoral, sistemic și local. Acest fapt este deosebit de important pentru infecțiile virale în care imunitatea mediată celular are un rol esențial, cât și pentru infecțiile virale, ale mucoaselor, situații 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 aceea indusă de virusurile inactivate. Reactivitatea încrucișată este foarte importantă pentru virusurile care suferă variație antigenică progresivă.

Vaccinurile virale atenuate păstrează capacitatea de replicare în organismul vaccinat, astfel încât virusul se răspândește în populație și imunizează chiar indivizii nevaccinați.

Vaccinurile atenuate se produc cu un preț de cost mai scăzut și se administrează mai ușor.

Dezavantajele vaccinurilor virale atenuate sunt legate de riscul ridicat al *contaminării* cu agenți supraadugați. 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. Virusul contaminant a fost eliminat repede din vaccin.

Unele virusuri atenuate (rujeolic, rubcolă, febră galbenă) păstrează un nivel scăzut de virulență reziduală. O problemă importantă legată de infecțiozitatea vaccinurilor atenuate este aceea a restaurării unui grad variabil de virulență după vaccinare. Cu o frecvență mică ($1/10^6$ – 10^7), după vaccinarea cu poliovirus, procesul infecțios evoluează cu manifestări clinice (paralizie), la copiii cu deficiențe ale sistemului imunitar. Procesul infecțios nu este consecința alterării genetice a virusului din vaccin.

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°), pe toată durata depozitării.

Vaccinurile *inactivate* conțin virioni care nu pot să se replice. În acest scop, virusurile se cultivă în oul embrionat de găină (influenza), în culturi celulare de rinichi de maimuță (polio) sau în fibroblaste diploide umane (polio, rabic). Rezultă un preparat viral brut, care se inactivează cu formol sau acetiletilenimină sau β - propiolactonă.

Vaccinurile virale inactivate au avantajul riscului minim al infecției. Rareori, astfel de vaccinuri conțin virus infecțios, care a rezistat inactivării, sau care provine din contaminarea cu un alt virus.

Vaccinurile virale inactivate prezintă câteva dezavantaje. Tratamentul extensiv cu agent de inactivare poate să anuleze imunogenitatea, iar tratamentul insuficient determină păstrarea infecțiozității suficiente pentru a produce îmbolnăvirea. Unele vaccinuri inactivate au potențat infecția, în loc s-o prevină. Un vaccin rujeolic inactivat cu formol a prevenit inițial infecția, dar după câțiva ani indivizii vaccinați au pierdut starea de rezistență. Inactivarea cu formol a anulat imunogenitatea proteinei de fuziune (F), astfel încât vaccinul și-a pierdut proprietatea de protecție.

Vaccinurile inactivate sunt dezavantajoase în privința stimulării limfocitelor Tc, care au rol important în recuperarea și în rezistența la infecțiile cu o gamă de virusuri. Acest tip de răspuns este indus de proteinele virale prelucrate și prezentate în asociație cu moleculele CMH I, celulelor imunitare.

Alte căi de obținere a unor noi vaccinuri virale

Calea de abordare a lui Jenner (1798) pentru obținerea preparatelor virale utilizabile ca vaccin implică izolarea unor virusuri de la mamifere sau păsări, pentru a imuniza omul față de un virus uman, înrudit antigenic cu cel animal. Virusurile mamaliene și aviare, bine adaptate la gazdele lor, adesea nu se replică eficient în celulele umane și deci se atenuază. Nu se cunoaște determinismul genetic al restricției spectrului de gazdă. Genele virusurilor mamaliene sau aviare, identificate ca fiind responsabile pentru restricția spectrului de gazdă au o mare diversitate de secvențe de nucleotide, față de genele corespunzătoare ale virusurilor umane. Efortul de a realiza noi vaccinuri pe calea clasică jenneriană trebuie să aibă în vedere tehnicile de genetică virală, biologie moleculară și imunologie.

Utilizarea virusurilor umane atenuate ca vaccinuri. Uneori, virulența diferitelor linii de virus uman ce aparțin aceluiași serotip variază considerabil. Sabin (1957) a observat că liniile de poliovirus izolate de la persoanele sănătoase au manifestat

o largă variație a neurovirulenței, măsurabilă prin inocularea intracerebrală sau intraspinală a maimuței. Circa 1/5 din aceste linii au fost foarte atenuate. Așa s-a identificat linia de poliovirus tip 2, utilizabilă ca vaccin oral.

Vaccinurile subunitare. Inițial vaccinurile inactivate s-au obținut din preparatele brute de virus după replicarea sa în culturi celulare sau în țesuturi. Pe măsură ce a fost posibilă obținerea unor titruri înalte de virus, în scopul diminuării toxicității vaccinului s-a trecut la purificarea virusului și a unor componente virale. Pentru virusul influenza, vaccinul subunitar conține antigenele de suprafață, hemaglutinina și neuraminidaza. Preparatul este mai puțin toxic decât virusul integral inactivat, dar este mai puțin eficient în stimularea răspunsului imun. Producerea vaccinurilor subunitare proteice, în culturile de celule animale ridică probleme dificile de purificare a proteinelor virale, de proteinele celulare. Trebuie îndepărtat ADN celular, deoarece liniile în cultură continuă sunt maligne și în consecință conțin ADN potențial oncogen.

Celulele se infectează cu virus și din lizatul celular se purifică proteinele virale. Lizatele celulare, mai mult chiar decât virusul purificat se folosesc cu predilecție, deoarece în celulele infectate se sintetizează proteine virale în mare exces, care nu sunt încorporate în virioni.

Tehnici moderne de obținere a vaccinurilor. Dezvoltarea biologiei moleculare și progresul înțelegerii mecanismului răspunsului imun au influențat preocupările privind obținerea unor noi vaccinuri. Cu ajutorul anticorpilor monoclonali este posibilă identificarea epitopilor cu rol esențial în stimularea răspunsului imun. Genele codificatoare pentru antigenele protectoare se pot izola după fragmentarea genomului cu ajutorul enzimelor de restricție și se inseră, prin tehnologia ADN recombinant, în celula procariotă (*E. coli*, *B. subtilis*), sau în celulele eucariote (levuri, celule mamaliene).

Fragmentarea genomului cu endonucleaze de restricție este posibilă numai pentru virusurile ADN. Genomul virusurilor ARN trebuie transcris mai întâi în ADN și ulterior este manipulat. Sunt adecvate unor asemenea tehnici, virusurile ARN cu catenă de sens pozitiv (poliovirusul). ADNc al unei catene ARN de sens negativ nu a fost transferat în celulă.

Celulele mamaliene reprezintă un sistem optim pentru producerea proteinelor virale, deoarece pliarea, transportul celular și prelucrarea sunt asemănătoare celor ce au loc în celula gazdă. Ele produc cantități mari de antigen viral.

ADN viral este funcțional după transferul în celula procariotă, prin intermediul unui vector (plasmidă sau fag).

O altă modalitate de a produce vaccinuri virale atenuate, stabile genetic implică obținerea *mutantelor de deleție*. Aceste mutante au o capacitate redusă

de replicare, ceea ce echivalează cu atenuarea. Se fac eforturi pentru a obține mutante virale stabile, prin deleție, al căror efect să fie atenuarea accentuată a virusului, însă cu păstrarea infecțiozității și imunogenității.

O variantă a tehnicilor de ADN recombinant este obținerea vaccinurilor cu *virusul vaccinal hibrid*. ADN viral este introdus în genomul virusului vaccinal prin recombinare la situsuri omologe. Virusul vaccinal hibrid se multiplică în celule și produce antigenele unui spectru larg de virusuri. În genomul virusului vaccinal au fost inserate gene ale virusurilor hepatitei B, rabic, herpes simplex etc. Vaccinurile virale hibride sunt stabile și stimulează ambele compartimente ale răspunsului imun.

O altă modalitate de a produce vaccinuri virale este *sinteza in vitro* a peptidelor. Metodele de secvențiere a bazelor au făcut posibilă determinarea secvenței aminoacizilor unor proteine cu activitate biologică. Antigenele peptidice sintetice sunt avantajoase, deoarece au o structură chimică bine definită și sunt lipsite de componentele inutile pentru stimularea răspunsului imun. Dezavantajul este că aceste antigene stimulează într-o măsură prea mică limfocitele T.

Caracterele generale ale imunizării artificiale active.

Vaccinurile bacteriene omorâte, cele care conțin virioni inactivați și anatoxinele se administrează, în general, pe cale parenterală (subcutanat, intradermic, intramuscular etc), în mod obișnuit în 3 injecții separate, la intervale de 5–7–21 de zile. Vaccinurile vii se administrează într-o singură injecție. Vaccinul BCG (viu) și vaccinul antipoliomielitic cu virus infecțios atenuat, la nou născuți se administrează pe cale orală.

Imunitatea consecutivă vaccinării se instalează relativ lent, la aproximativ 15–20 de zile de la ultima injecție și durează un timp variabil de la un vaccin la altul (în general, între 1 și 7 ani), scăzând treptat până la dispariția completă. Vaccinarea primară, ca și infecția, conferă organismului o stare specială de reactivitate – *memoria imunologică* – grație căreia orice contact ulterior cu agentul patogen respectiv, realizat pe cale naturală (infecție și boală) sau artificială (prin vaccinare), declanșează o „redeșteptare” rapidă a imunității, care de obicei se manifestă cu o intensitate mai mare decât aceea a răspunsului imun postvaccinal. Injecția de rapel declanșează o reacție anamnestică cu o creștere bruscă și masivă a titrului anticorpilor.

Deși este destul de solidă, imunitatea postvaccinală este relativă, în sensul că unele persoane vaccinate pot totuși să facă boala (într-o formă mai ușoară), mai ales dacă se infectează masiv cu un agent patogen deosebit de virulent. Datorită faptului

că se instalează lent, imunizarea prin vaccinare este folosită în scop profilactic pentru a se evita riscul eventual de infecție cu un agent patogen.

Imunitatea artificială pasivă. Serurile imune sau terapeutice sunt produse biologice obținute din serul sanguin al unui animal imunizat activ prin vaccinare sau al unui convalescent imunizat activ prin boală. În ambele cazuri, serul conține anticorpi protectori specifici, capabili să neutralizeze acțiunea agentului respectiv. Primele încercări de folosire a serurilor în terapeutică datează din 1888, când *Richet* și *Hericourt* demonstrează că inocularea unor culturi bacteriene la un animal determină apariția în serul lui sanguin, a unor substanțe care pot proteja nu numai organismul care le-a produs, ci și organisme la care acest ser este injectat.

În general, serurile imune se prepară pe animale mari (de obicei pe cal) care sunt injectate după principiile imunizării active, cu doze repetate crescânde de celule, antigene virale, anatoxine sau toxine. Serul sanguin obținut prin sângerarea animalelor imunizate este inactivat și tratat cu fenol (prezervant), apoi controlat pentru sterilitate, inocuitate (lipsa de nocivitate) și eficacitate (concentrația de anticorpi). Serul se administrează sub formă de injecții intravenoase, intramusculare sau subcutane. După cum specia organismului donator este sau nu aceeași cu a organismului receptor, serurile pot fi *omologe* (serurile recoltate de la convalescenți), sau *heterologe* (serurile preparate pe cal). După natura antigenelor folosite pentru imunizarea animalului donator de anticorpi, serurile sunt de 3 categorii: 1) *antibacteriene*, preparate prin administrarea de corpi celulari (de exemplu, serurile antistreptococice și antimeningococice); 2) *antitoxice*, obținute prin injectarea de toxină și anatoxină (de exemplu, serurile antidifteric și antitetanic); 3) *mixte* (antibacteriene și antitoxice) obținute prin imunizarea cu corpi celulari și cu toxine (de exemplu, serul antigangrenos).

Caracterele generale ale imunizării artificiale pasive. Imunitatea pasivă, consecutivă administrării serurilor imune se instalează imediat după injectarea intravenoasă sau după câteva ore, pe măsura resorbției anticorpilor, în cazul administrării pe alte căi. Imunitatea pasivă asigură o protecție de scurtă durată (circa 30 de zile) datorită faptului că anticorpii primiți în mod pasiv au *un timp de înjumătățire* de 14 zile. Persistența lor este mai îndelungată dacă serul provine de la un organism de aceeași specie cu organismul receptor, deoarece imunoglobulina omologă este acceptată și reținută mai bine de acesta, decât cea heterologă.

În momentul în care anticorpii exogeni sunt eliminați, organismul redevine receptiv față de infecție. Datorită acestei particularități, serurile imune sunt folosite în special pentru tratamentul unei boli în evoluție (*seroterapie*). Serurile imune antitoxice, ca și serurile antivirale, acționează în mod obișnuit acoperind cu anticorpi suprafața moleculelor de toxină și a particulelor virale, ceea ce alterează configurațiile chimice specifice care asigură adsorbția moleculelor de toxină sau a

virionilor pe celulele sensibile. Datorită acestui mecanism de acțiune, eficiența lor este maximă în cazul unei administrări cât mai precoce. Celulele lezate de toxine, ca și acelea în care virusul a pătruns deja, nu mai pot fi apărate de anticorpii din serul imun.

Serurile antibacteriene acționează făcând celulele mai sensibile la acțiunea fagocitelor și a complementului. Serurile imune pot fi folosite și în scop preventiv (*seroprofilaxie*) la persoane care au fost siguri în pericol de a se infecta și la care urmărim să preîntâmpinăm declanșarea bolii. Pentru a evita riscurile de infecție care pot surveni după epuizarea imunității pasive, se recomandă ca seroterapiei și seroprofilaxiei să li se asocieze vaccinarea, aceasta lăsând o imunitate activă de lungă durată, care se instalează după eliminarea anticorpilor introduși artificial în organism. În prezent se folosesc seruri imune concentrate și purificate, din care s-au eliminat circa 3/4 din proteinele serului sanguin, păstrându-se numai fracțiunea globulinică specifică (anticorpi). Prin acest procedeu s-a redus foarte mult volumul serului injectat și se evită accidentele care ar putea rezulta din sensibilizarea organismului uman față de proteinele nespecifice din serul de cal.

REZISTENȚA ANTIINFECȚIOASĂ NESPECIFICĂ

Factorii umorali și celulari ai apărării specifice și nespecifice fac parte din patrimoniul ereditar al organismului. Atât imunitatea dobândită cât și cea naturală sunt înscrise în genotipul organismului respectiv, astfel încât capacitatea de reacție imună (specifică) și nespecifică sunt determinate genetic.

Rezistența sau imunitatea naturală, înăscută sau congenitală reprezintă capacitatea unui organism normal de a fi îndemn față de un anumit agent patogen cu care vine în contact, sau de a-l îndepărta dacă acesta s-a implantat în țesuturi. Această proprietate este o însușire naturală (înăscută) a unei specii animale și în mod obișnuit este *absolută*, adică toți indivizii speciei respective sunt rezistenți față de un anumit agent patogen, chiar în cazul inoculării lor cu doze mari ale agentului infecțios. De exemplu, omul este rezistent la agenții care produc *zoonoze* (agentul pestei bovine, al pestei porcine, al holerei găinilor etc), iar animalele sunt rezistente la gonoree, rujeolă, oreion, dizenterie etc.

Starea de rezistență nu este condiționată de contactul anterior cu agentul patogen respectiv, ci este o modalitate promptă de reacție a organismului. Starea diametral opusă este aceea de *receptivitate* sau de *sensibilitate* (susceptibilitate), caracteristică organismelor care, ca rezultat al agresiunii unui agent patogen reacționează prin apariția unui proces infecțios. Starea de nereceptivitate este uneori *relativă*, în sensul că există deosebiri individuale de reactivitate în cadrul speciei,

unii indivizi fiind total rezistenți, iar alții prezintă diferite grade de receptivitate. Răspunsul diferit al organismelor unei specii, la contactul cu un agent patogen este rezultatul eficienței variabile a forțelor de apărare ale organismului, care, izolate sau în asociație opun agentului patogen o barieră de nepătruns, determină inhibarea multiplicării sau distrugerea lui în țesuturi sau umori, precum și neutralizarea și eliminarea substanțelor toxice eliberate de microorganisme. Diferențele sunt probabil rezultatul unor factori de ordin genetic. De exemplu, oile din Alger sunt mult mai rezistente la infecția carbunoasă (produsă de *B. anthracis*) decât cele din Europa. La primele, macrofagele conțin un număr mai mare de lizosomi și enzimele componente au activitate hidrolitică mult mai intensă. S-au evidențiat diferențe de sensibilitate a raselor umane față de tuberculoză; populațiile africane sunt mai sensibile. Influențele de ordin genetic asupra rezistenței naturale au condus la concluzii de ordin practic. Pe acest criteriu se face selecția populațiilor (liniilor) genetic pure ale animalelor de laborator, care au o rezistență foarte mare față de un anumit 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, de intrarea în acțiune a mecanismelor rezistenței constitutive, nespecifice, reprezentate de *barierele mecanice* (pielea și mucoasele), de componentele *moleculare* antiinfecțioase, de componentele *celulare* care au capacitatea de fagocitoză, de reacția inflamatorie. Ulterior, după activarea specifică intră în acțiune sistemul imunitar. Diferitele mecanisme de apărare sunt strâns integrate funcțional, astfel încât în orice punct al organismului, acțiunea lor este combinată. De exemplu, epiteliul tubului digestiv secretă lizozim, iar în pătura de mucus care îl tapetează se găsește IgA secretor.

Factorii mecanici ai apărării organismului

Rolul pielii și al mucoaselor. Tegumentul și mucoasele reprezintă bariere mecanice foarte eficiente, deși contactul lor cu microorganismele saprobionte sau patogene este aproape permanent. Particularitățile lor funcționale sunt conferite de integritatea lor anatomică, de secreții, de reînnoirea prin descumare, de impermeabilitatea sau permeabilitatea selectivă. Astfel, pielea este impermeabilă pentru virusuri și microorganisme. Alterarea structurală, 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 are efect bacteriostatic. După spălarea peliculei de secreție acidă, funcția protectoare antiinfecțioasă diminuează.

Mucoasele sunt acoperite de secreții. Conjunctiva este protejată prin acțiunea mecanică și chimică a secreției lacrimale, în care se găsește *lizozim*. Lizozimul are

efect enzimatic asupra peretelui mureinic bacterian. La nivelul tractului respirator, rolul protector este îndeplinit de secreția care imobilizează agenții invadatori, iar expulzarea lor este asigurată prin mișcarea cililor celulelor epiteliale și prin reflexele de strănut și tuse.

Mucoasa gastrică este protejată de gelul mucos care o tapetează, ce formează un adevărat glicocalix și de aciditatea conferită de HCl, component al sucului gastric. Bacteriile Gram negative sunt foarte sensibile la acțiunea mediului acid gastric. După neutralizarea acidității gastrice cu substanțe alcaline, capacitatea sa protectoare diminuează până la dispariție și infecțiile se instalează rapid. Totuși, pe cale digestivă pătrund agenții patogeni a numeroase maladii, evitând bariera acidității gastrice. Bolul alimentar este protector față de aciditate și în interiorul său există condiții favorabile supraviețuirii agenților patogeni ingerați odată cu alimentele.

Secrețiile mucoase, în compoziția cărora intră mucinele (glicoproteine) au rol important în apărarea antiinfecțioasă. Mucinele aderă la suprafața agenților patogeni și a paraziților formând un strat molecular care împiedică interacțiunea lor cu celulele epiteliale. Lor li se atribuie deasemenea, un rol neutralizant asupra toxinelor. În același timp, secrețiile formează o peliculă fină (film) protectoare, continuă pe suprafața mucoasei, constituind o barieră greu de trecut pentru microorganisme, în drumul lor spre situsurile epiteliale de aderență. Pelicula elimină microorganismele care nu se pot adapta condițiilor de sub peliculă, la granița mucus-epiteliu.

Un alt mecanism nespecific care controlează creșterea microorganismelor la zona de contact cu mucoasa digestivă este *peristaltismul* intestinal. Microorganismele aderă la mucoasa epitelială prin intermediul unor molecule din categoria *lecinelor*, care realizează adevărate punți de legătură între suprafața bacteriei și a celulei epiteliale. Peristaltismul împiedică realizarea acestor interacțiuni, creind un flux care deplasează microorganismele patogene înainte ca ele să colonizeze suprafața epiteliului. Numeroase infecții intestinale accelerează peristaltismul. Anomaliile peristaltismului sunt factori favorizanți ai creșterii excesive a populațiilor bacteriene ale microbiotei normale a tractului intestinal. În absența unui clearance mecanic normal al tractului digestiv, microbiota normală poate dobândi un rol patologic.

Rolul factorilor humoralii în apărarea nespecifică

Hormonii au un rol esențial în reglarea unor mecanisme homeostatice. Ei nu modifică specificitatea de reacție a celulelor limfoide. Cantitățile optime de hormoni vor determina o funcționalitate optimă a sistemului imunitar iar modificările lor cantitative vor induce perturbări corespunzătoare ale metabolismului limfocitelor. Cunoașterea multiplelor interacțiuni dintre funcția imunitară și sistemul endocrin, precum și perfecționarea tehnicii de radioimunodozare (RIA) a

hormonilor au condus la delimitarea unei noi discipline intermediare – *imunoendocrinologia*.

Asemănarea dintre hormoni și imunoglobuline rezultă din similitudinea structurală și funcțională a celor două categorii de molecule: ambele conțin o regiune de legare la un receptor celular și o alta capabilă să transmită semnale specifice la un sistem efector.

Există dovezi că moleculele CMH I, implicate în prezentarea antigenelor au rol de receptor pentru insulină.

Antigenicitatea 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.

Uneori, însă se sintetizează anticorpi anti-receptor hormonal. Cum se stimulează sinteza lor? Se consideră că receptorii de hormoni sunt „secretați” de celule în mediul intern. Moleculele sunt preluate și prelucrate de celulele specializate și sunt prezentate limfocitelor. Anticorpii antireceptor hormonal pot să blocheze funcția hormonului respectiv.

Afecțiunile de natură endocrină au un răsunet major în raport cu rezistența nespecifică față de agenții patogeni. Un exemplu în acest sens este patologia infecțioasă asociată cu diabetul. Bolnavii de diabet fac în mod frecvent infecții de tip tuberculos, infecții urinare și tegumentare de tipul furunculozelor. Ele se datorează fie unor dezechilibre locale provocate de lipsa insulinei, fie glicemiei crescute.

Hormonii tiroidieni influențează rezistența față de infecții. Hipotiroidismul mărește incidența infecțiilor. Cortisolul are influență directă asupra limfocitelor. Hipofuncția suprarenaliană 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. Astfel se explică rezistența organismului față de numeroasele agresiuni ale microorganismelor care pătrund permanent pe diferite căi în țesuturi. Microorganismele (bacterii și alți agenți infecțioși) trec din lumenul intestinal în sânge, la toate animalele, inclusiv la om, datorită condițiilor speciale de permeabilitate a epitelului, create în timpul absorbției intestinale. Permeabilitatea mucoasei este mai accentuată la rumegătoare. La om s-a evidențiat că postprandial se produce o bacteriemie temporară, originară în cavitatea bucală, ca rezultat al masticăției sau consecutivă periajului dentar. După extracția dentară există chiar o perioadă septicemică (cu multiplicare bacteriană). Datorită stării de bacteriemie temporară, animalele ce urmează a fi sacrificate nu se hrănesc o perioadă de 10–20 ore înainte.

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 sunt improprii multiplicării microorganismelor datorită în primul rând concentrației O_2 : microorganismele strict anaerobe nu se multiplică în țesuturile bine oxigenate, ci numai în cele traumatizate sau devitalizate. *C. perfringens*, agentul gangrenei gazoase crește în rănille musculare provocate de explozii. *M. tuberculosis* este strict aerob, ceea ce explică localizarea sa preferențială la nivelul țesutului pulmonar. Prin multiplicare, celulele bacteriene determină necroza țesutului pulmonar și transformarea lui în zonă cazeoasă, în care O_2 nu difuzează. Se creează condiții de anaerobic improprii multiplicării celulelor de *M. tuberculosis* și astfel evoluția infecției este limitată;

- substanțe din categoria lizinelor cu efect antibacterian: alfa- și beta-lizine, spermina și spermidina;

- properdina (*pro* și *perdere*) descoperită de Pillemer (1954) este o globulină serică normală, cu acțiune bactericidă foarte puternică. Este o gamaglobulină înrudită cu imunoglobulinele și are g m 1200 kD. Acțiunea sa litică asupra bacteriilor se exercită în asociație cu sistemul complement și în prezența ionilor de Mg^{2+} . Properdina inhibă multiplicarea bacteriilor pe care nu le lizează și a virusurilor. Se pare că properdina reprezintă un complex de anticorpi naturali ce se formează în cursul vieții ca rezultat al stimulărilor cu antigene ale microbiotei normale a organismului;

- sistemul complement (alexina) este un grup complex de enzime din serul normal care se activează în cascadă în asociație cu complexe antigen-anticorp și cu properdina. Efectul activării sale este bacterioliza și hemoliza;

- interferonul este un sistem molecular proteic, cu rol protector antiviral, căruia i s-au demonstrat proprietăți antitumorale.

- proteina C reactivă (CRP) este unul din reactanții de „fază acută”. Denumirea de „proteină C reactivă” derivă de la faptul că precipită polizaharidul C al pneumococului. Este o glicoproteină cu g m 110–140.000. Este alcătuită din 5–6 subunități legate necovalent (inelar), într-un pentamer sau hexamer. Se inactivează prin încălzirea serului la 65° , timp de 30 min. Face parte din mijloacele nespecifice de apărare a organismului, fiind prezentă la toate vertebratele și chiar la unele nevertebrate. Este cel mai semnificativ reactant de fază, alături de α_1 -glicoproteina acidă. Se sintetizează în ficat și nu traversează bariera placentară. Se aseamănă cu imunoglobulinele prin capacitatea ei de a lega antigenul, prin secvența de aminoacizi, dar se deosebește prin structura moleculară, modul de combinare cu antigenul și prin sediul sintezei sale.

Funcția CRP este de a epura unele antigene moleculare exogene (mai ales bacteriene) și produșii rezultați în procesele inflamator-destructive. Se complexează cu structuri antigenice celulare. Complexarea cu antigenele este dependentă de Ca^{2+} și favorizează eliminarea lor prin activarea complementului, prin stimularea captării și metabolizării hepatice și splenice, a antigenelor sau prin efectul său opsonizant. CRP activează complementul pe ambele căi. Participă la reacțiile de aglutinare și precipitare. Inhibă limfocitele T supresoare, prin intermediul receptorilor pentru Fc de la suprafața lor.

În serul indivizilor sănătoși, CRP se găsește în concentrație foarte mică (sub 1 mg%), decelabilă prin R I A. În condiții patologice, valoarea CRP crește foarte rapid, în 12–24 ore, de peste 300 de ori față de normal, atât în ser cât și în diferite lichide biologice: lichidul pleural, articular, cefalorahidian. Nivelul crescut al CRP reflectă desfășurarea unui proces inflamator-distructiv, infecțios sau neinfecțios.

Concentrația CRP crește în infecțiile bacteriene acute sau cronice, localizate sau generalizate, în procese inflamatorii asociate cu necroza (infarct, neoplazii), în afecțiuni reumatice și colagenoze (reumatism poliarticular acut, poliartrroză reumatoidă, lupus eritematos diseminat), în meningite, în unele viroze.

Sisteme celulare implicate în rezistența nespecifică antiinfecțioasă

Rezistența antiinfecțioasă a organismului uman și animal este rezultatul intervenției unor sisteme celulare care acționează în virtutea unor mecanisme independente de caracterul nonself al unei substanțe sau al unui agent infecțios. În cazul în care mecanismele de rezistență naturală, enumerate anterior au fost depășite și microorganismul sau virusul a pătruns într-un țesut, procesul infecțios este stopat de intervenția celulelor *sistemului fagocitar*.

Sistemul fagocitar include celule de origine mezodermică, distribuite difuz în întregul organism, dotate cu proprietatea comună de a îngloba moleculele nonself, virusurile și celulele străine și de a le distruge prin procese enzimatic de digestie intracelulară.

Fenomenul de fagocitoză (*phagein = a mânca*) a fost descoperit de *Iliia Metchnikoff** (1882). El a dat denumirea generică de „fagocite“, celulelor circulante libere sau fixate în țesuturi care înglobează particule străine.

Sistemul fagocitar cuprinde două tipuri de fagocite „profesioniste“:

- 1) Celulele sistemului mononuclear;
- 2) Celulele sistemului polimorfonuclear.

Celulele sistemului fagocitar mononuclear cooperează funcțional cu celulele sistemului *imunocitar* în elaborarea răspunsului imun specific.

Conceptul SFM a fost propus în 1969 de *Langevoort* și elaborat de către *van Furth* în 1972, sub egida OMS. Până la delimitarea acestui concept funcțional, s-au folosit, succesiv, 3 sisteme de clasificare a fagocitelor. *Metchnikoff* a împărțit fagocitele („celule care mănâncă”) în două categorii:

- microfage (polimorfonucleare) care fagocitează particule mici;
- macrofage, cele care înglobează particule mari, chiar celule întregi.

În 1924, *Aschoff* a creat *sistemul reticuloendotelial* (SRE) care reunește celule cu o serie de funcții comune (înglobează coloranții vitali și particulele de carbon). Sistemul include celule care diferă calitativ și cantitativ sub aspectul proprietăților morfologice, funcționale și al originii lor. În afară de macrofagele propriu-zise, SRE grupa și celulele reticuloendoteliale ale sinusurilor limfatice ganglionare, celulele reticulare ale sinusurilor venoase din splină și ganglioni, fibroblastele, celulele endoteliale ale vaselor sanguine și limfatice. Reevaluarea acestui sistem a fost impusă de faptul că ultimele două categorii de celule nu fagocitează.

În 1927 *Voltera* a propus denumirea *sistem reticulohistiocitar* (SRH). Denumirea este folosită uneori și astăzi.

SFM grupează într-un sistem unitar, celulele mononucleare care au capacitatea de a fagocita, precum și celulele de origine ale fagocitelor mononucleare, *celulele stem* (stem, (englez) = matcă, de origine, primordial).

Celula stem este celula cap de serie, localizată în măduva osoasă, neidentificată. Este nediferențiată, cu o înaltă activitate mitotică, mărind astfel considerabil populația celulelor stem. Este pluripotentă (după unii, totipotentă). Ea va genera nu numai precursorii macrofagelor ci și pe aceia ai eritrocitelor, polimorfonuclearelor, megacariocitelor. Pe măsură ce se divid, descendenții celulei stem își pierd potențialitatea de diferențiere multiplă și vor deveni precursori separați ai liniei monocitare, polimorfonucleare, eritrocitare, plachetare.

Prima celulă identificată pe linia de diferențiere a fagocitelor mononucleare este *monoblastul*. Este capabil de fagocitoză și aderă la suportul de sticlă. Pe suprafața sa are receptori pentru Fc. Se distinge de micloblast (linia de diferențiere a polimorfonuclearelor).

Promonocitul, localizat ca și monoblastul în măduva osoasă, este mai mare decât precursorul său (15 μm), nucleul este dantelar, citoplasma acidofilă bogată în poliribosomi. Granulațiile azurofile conțin mieloperoxidază.

* *Metchnikoff* a observat că celulele amoeboide ale crustaceului *Daphnia* ingeră sporii levurii *Metchnikowia* (*Monospora*) *bicuspidata*. Rezultatul infecției depinde de raportul numeric dintre fagocite și spori. El a extins cercetările asupra organismelor superioare și a descoperit că fagocitoza este un mecanism foarte eficient de apărare la toate organismele.

Promonocitul se maturează și rezultă *monocitul*. În 60 ore de la formare, monocitul se eliberează în sânge și devine o celulă circulantă pentru circa 24 ore, după care migrează spre un focar de inflamație. În lipsa acestuia, monocitul migrează întâmplător într-un țesut, unde devine macrofag rezident și își îmbogățește echipamentul enzimatic.

Redăm mai jos categoriile de celule ale liniei de diferențiere a sistemului fagocitar și distribuția lor în cele 3 compartimente: medular, sanguin și tisular:

<i>Tipul de celulă</i>	<i>Localizarea</i>
Celula stem (de origine) Monoblastul Promonocitul Monocitul	În măduva osoasă
Monocitul circulant	În sânge
Macrofagul interstițial	Histiocitul din țesutul conjunctiv din țesutul limfoid din măduva osoasă din plămâni din seroase
Osteoclastul* Microglia** Macrofagul intravascular sau juxtavascular	Celulele Kupffer Histiocitul din pulpa roșie a splinei din măduva osoasă din sinusurile ganglionare

* Osteoclastul (în țesutul osos) s-ar forma prin fuziunea mai multor monocite.

** Microglia (în sistemul nervos central) pare să aibă origine monocitară. Un argument indirect în acest sens este faptul că microglia nu se evidențiază înainte de formarea vaselor sanguine.

În SFM nu intră celulele reticuloendoteliale pentru că nu au potențial fagocitar ridicat, nu au aceeași origine cu a celulelor SFM, nu fagocitează complexe imune (nu au capacitatea de imunofagocitoză pentru că nu au receptori pentru regiunea Fc a imunoglobulinelor). Nu intră, de asemenea, celulele dendritice din plasmă și din ganglionii limfatici, deoarece au capacitatea de a fixa antigenul numai pe suprafața lor, dar nu fagocitează.

Din punctul de vedere al localizării se disting:

– fagocite mononucleare *tisulare* care reunesc histiocitele din țesutul conjunctiv, din țesutul limfoid (macrofage libere și fixe), din măduva osoasă, din plămâni (macrofage alveolare), din cavitățile seroase (macrofagele din pleură și peritoneu, macrofagele din articulații);

– fagocite mononucleare *intravasculare* sunt acele care au contact fie cu sângele (celulele Kupffer, histiocitele din cordoanele pulpei roșii splenice etc.) fie cu limfa (macrofagele intra- și extrasinusoidale din ganglionii limfatici).

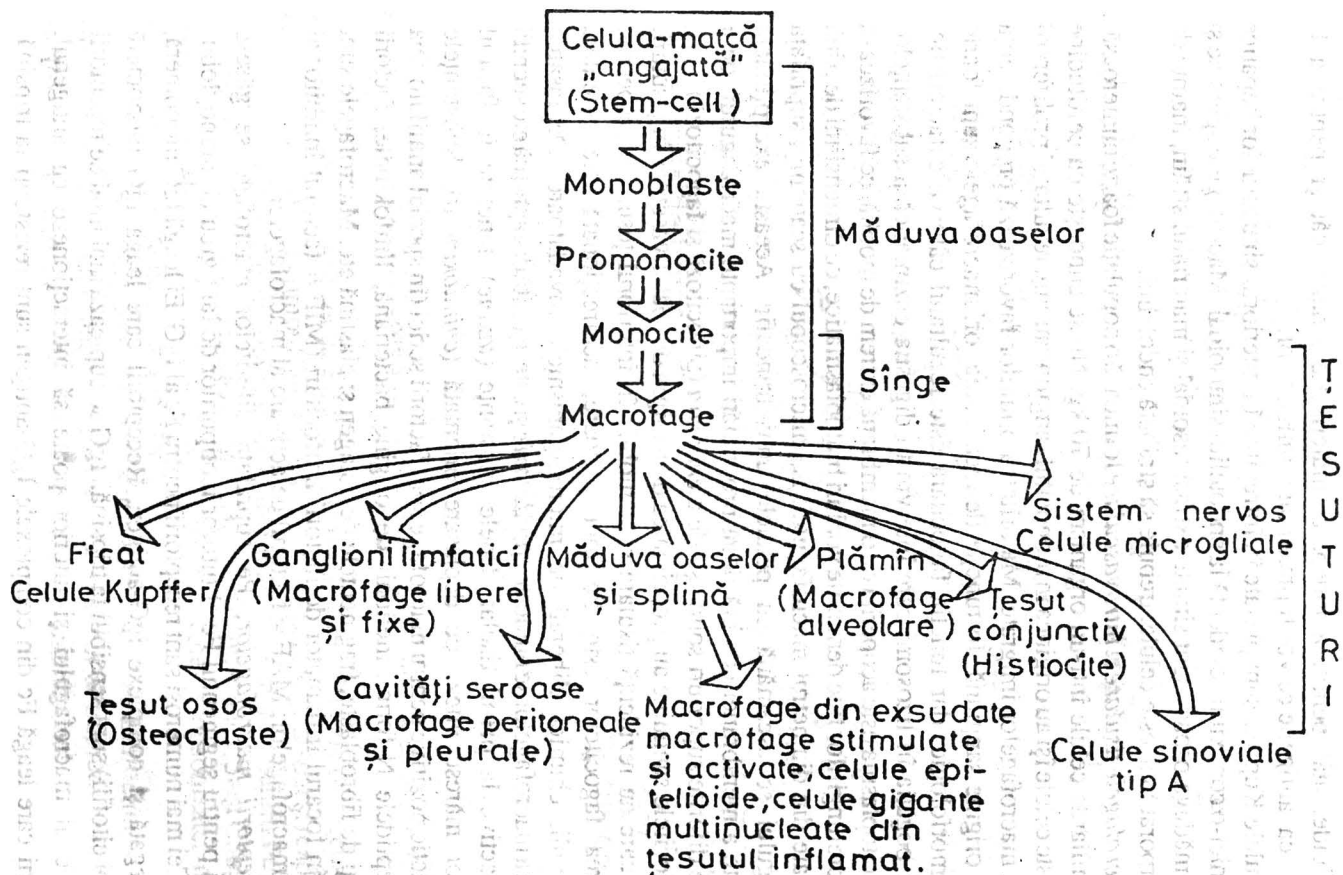


Fig. 68. Celulele sistemului fagocitar mononuclear și distribuția lor în organism

Macrofagele localizate în sau lângă fluxul sanguin și limfatic supraveghează aceste fluide, atât pentru a îndepărta materialele străine, cât și pentru a le prelucra ca antigene ce vor fi prezentate limfocitelor.

Celulele Kupffer sunt plasate în întregime în interiorul sinusoidelor hepatice și nu au nici-o conexiune evidentă la endoteliul sinusoidal. Macrofagele splenice și cele din măduva osoasă sunt situate extrasinusoidal și materialul străin, înainte de a fi încorporat în aceste celule, trebuie să străbată endoteliul.

Macrofagele tisulare și intravasculare formează o populație foarte numeroasă: 17–20 miliarde celule într-un organism de 70 kg. Nu se cunoaște cu certitudine dacă aceste celule își au originea în monocitul sanguin sau sunt rezultatul proliferării *in situ* a macrofagelor imigrate. Majoritatea opiniilor favorizează preponderența celor de origine sanguină. În funcție de localizarea lor, macrofagele sunt foarte diverse morfologic, dar funcția fagocitară este rezultatul câtorva caracteristici comune: bogăția în lizosomi care intervin în digestia enzimatică a substanțelor nonsell; citoplasma este acoperită de o membrană extrem de mobilă, ce favorizează apariția prelungirilor fine denumite voaluri hialoplasmice, cu dimensiuni de până la jumătate din diametrul macrofagului. La microscopul cu scanning, suprafața macrofagului se aseamănă cu petalele unui trandafir. Această excepțională mobilitate a membranei conferă două proprietăți importante macrofagului: de a *aderă* de diferite suporturi solide și de a *endocita* (pinocitoză și fagocitoză).

Fagocitele sanguine au proprietatea de a migra din patul vascular în țesuturi, iar cele care au rezidență tisulară sunt mobile în interiorul țesutului respectiv. Deplasarea fagocitelor este fie întâmplătoare, nedirecționată, fie orientată spre stimulii chimici eliberați de microorganisme invadatoare. Deplasarea orientată a macrofagelor se numește *chimiotaxie* și este ușurată de faptul că ele secretă enzime active la pH-ul tisular. Unele substanțe (*taxine*) generate în focarul inflamator măresc viteza de deplasare orientată (*chimiokineza*). Substanțele chimiotactice pozitive pentru macrofage sunt factorii serici (în special anafilatoxina C5a), peptidele N-formil-metionil de origine bacteriană, limfokinele, factorii sintetizați de fibroblaste, fragmentele de collagen și elastină etc. Macrofagele sunt reținute în focarul inflamator de factorii limfocitari (MIF = factorul inhibitor al migrării macrofagelor; MAF = factorul de activare al macrofagelor).

Receptorii macrofagelor. Pe suprafața diferitelor macrofage se găsesc receptori pentru segmentul Fc al tuturor izotipurilor de lanț greu al imunoglobulinelor. Cei mai numeroși sunt receptori pentru Fc al IgG. Ei leagă IgG monomeră, IgG agregată și complexe IgG-antigen. Receptorii care leagă IgG monomeră (anticorpi citofili) sunt sensibili la tripsină. IgG se cuplează mai întâi de receptori pentru Fc ai macrofagului și ulterior poate să interacționeze cu antigenul. Receptorii care leagă Fc din complexe IgG-antigen sunt rezistenți la tripsină.

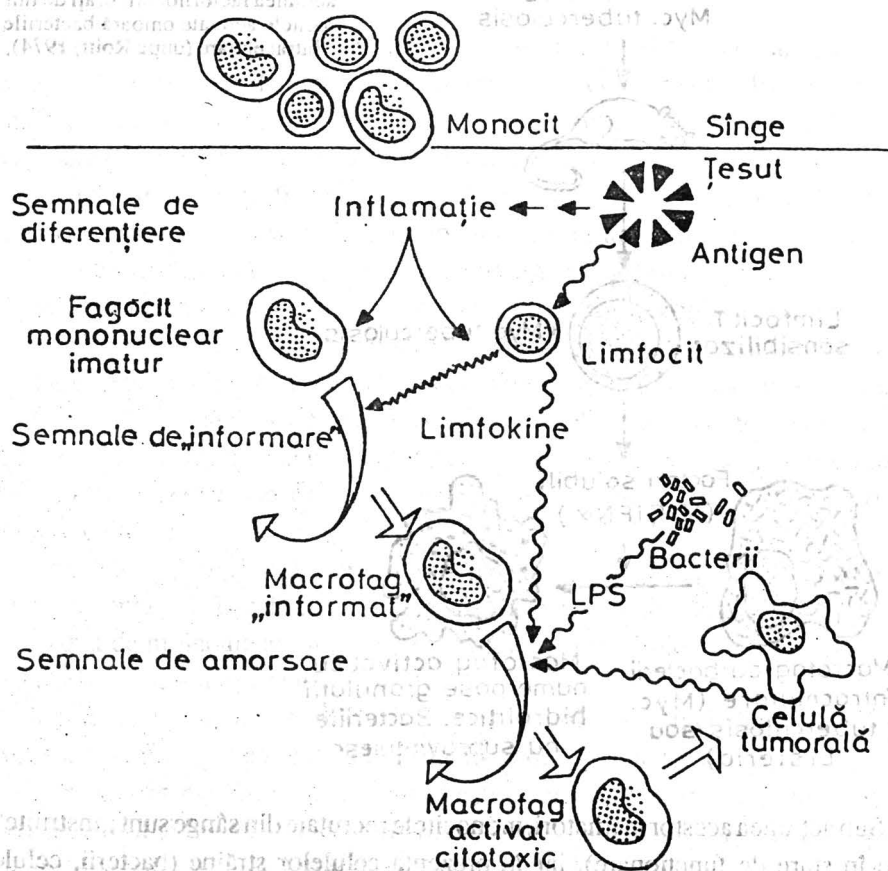


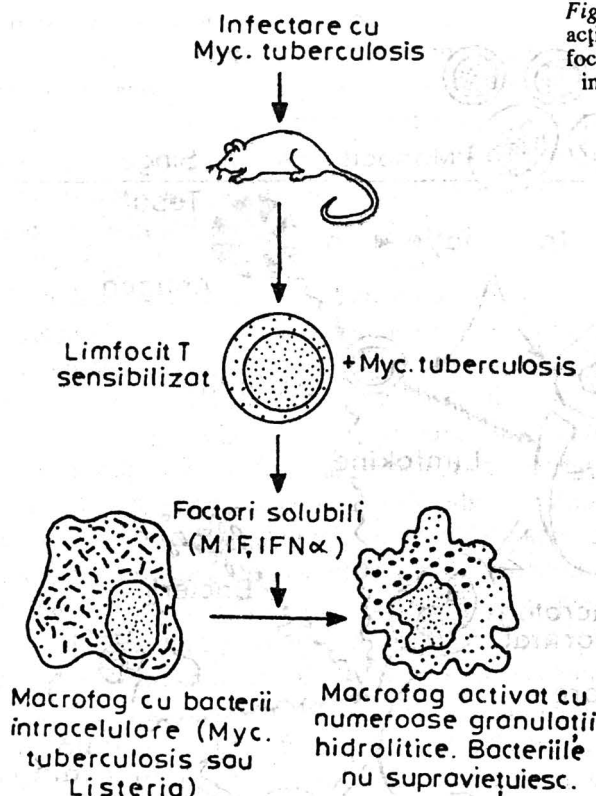
Fig. 69. Etapele implicate în dezvoltarea macrofagelor activate (după Meltzer, modificată de Shatna, 1986).

La om lipsesc receptorii pentru Fc al IgG₃. Un număr semnificativ de receptori sunt cei pentru Fc al IgE. În timpul fagocitozei, receptorii pentru Fc dispar și reapar după 6–24 ore. Macrofagele alveolare au un număr mare de receptori pentru Fc al IgA.

Receptorii pentru *complement* sunt cei pentru fragmentele C5a și C3b, ultimii fiind foarte eficienți ca mediatori ai legării particulelor opsonizate, dar mai puțin eficienți ca mediatori ai ingestiei.

Macrofagele recepționează mediatorii moleculari ai limfocitelor activate (limfokine). În această categorie intră factorul inhibitor al migrării macrofagelor (MIF), factorul activator al macrofagelor (MAF) și interferonul.

Fig. 70. Macrofagele stimulate sub acțiunea factorilor eliberați de limfocitele activate omoară bacteriile intracelulare (după Roitt, 1974),



Sub acțiunea acestor mediatori, monocitele recrutate din sânge sunt „instruite” (puse în stare de funcționare), iar în prezența celulelor străine (bacterii, celule tumorale) sunt convertite la starea de *macrofag activat*.

Pe suprafața macrofagului se găsesc receptori pentru hormoni (de exemplu, receptorul pentru insulină), precum și receptori pentru glicoproteinele care au glucide terminale cu resturi de fucozil, manozil, glucozil sau N-acetil-glucozamină. Ultimii sunt foarte importanți în procesul de recunoaștere a celulelor străine, a eritrocitelor îmbătrânite, a fungilor și bacteriilor.

Macrofagele au receptori pentru proteinele care conțin fier, ceea ce explică rolul macrofagului în metabolismul fierului. Receptorii pentru *fibronectină* ar putea fi implicați în aderența monocitelor la zonele de discontinuitate ale endoteliului vascular, dar și în ingestia particulelor învelite (opsonizate) cu fibronectină. Macrofagele au receptori pentru lectine (concanavalina A, aglutinina din grâu germinat).

Proprietatea definitorie a celulelor care alcătuiesc SFM este capacitatea lor foarte bine exprimată de a endocita. Ingestia moleculelor solubilizate în mediu lichid se numește *pinocitoză* (pinos (grec) = a bea). Pinocitoza are loc prin invaginarea membranei, fie prin formarea unor vezicule mici ($0,2\ \mu\text{m}$) fenomen denumit *micropinocitoză*, fie a veziculelor mari ($1-2\ \mu\text{m}$) (*macropinocitoză*). Micro-pinocitoza este *constitutivă* (adică are loc în absența unui stimul declanșator din mediu) și se desfășoară cu o rată foarte intensă. Pe această cale, în 30 min. se internalizează echivalentul întregii suprafețe celulare. Macropinocitoza are o rată minimă în condiții de repaus, *in vitro*, dar este stimulată de concentrațiile mari de ser adăugate în mediul de cultivare, de mucopolizaharide și de complexe imune.

Fagocitoza este procesul de ingestie al materialelor *particulate*. Procesul fagocitozei presupune derularea a două etape preliminare succesive: *aderența* și *ingestia*. Soarta materialului ingerat este variabilă în raport cu natura sa chimică.

Faza de aderență este prima etapă a procesului de fagocitoză. Aderența semnifică contactul fizic dintre particula străină și membrana fagocitului. Procesul este mediat de molecule ale suprafeței particulei, de sarcinile sale electrice ori de opsoninele din umorile organismului.

În funcție de forțele care mediază aderența dintre celula fagocitară și particula ce urmează să fie ingerată se disting două tipuri de fagocitoză:

- *fagocitoza nemediată de receptori* este declanșată de interacțiunea inițială dintre particulă și fagocit și este condiționată, în principal, de forțe ionice. Astfel sunt ingerate particulele de latex, de carbon, moleculele agregate de albumină, etc.;

- *fagocitoza mediată de receptori*, activă în ingestia bacteriilor presupune interacțiunea moleculelor de suprafață ale celulei bacteriene și ale fagocitului. Este mult mai eficientă. Receptorii fagocitului sunt de două feluri: specifici și nespecfici. Particulele care au pe suprafața lor carbohidrați se leagă la *receptorii nespecfici* de carbohidrați ai fagocitului, fie direct, fie prin intermediul lectinelor extracelulare, care funcționează ca punți de legare încrucișată între oligozaharidele suprafeței bacteriene și ale fagocitului.

De cele mai multe ori interacțiunea dintre celula fagocitară și bacterie este mediată de *receptori specifici*. Fagocitele recunosc și leagă cu ușurință bacteriile opsonizate. Toate *opsoninele* acționează în sensul legării celulei bacteriene de suprafața fagocitului și stimulează ingestia sa.

Moleculele opsonizante (opsein = a aduce de mâncare) favorizează ingestia unei particule de către o celulă fagocitară. Proteinele și peptidele serice tapetează suprafața celulei bacteriene și sunt recunoscute de receptori fagocitului, funcționând ca punți de legătură între fagocit și celula bacteriană. Opsoninele au rol hotărâtor în intensificarea procesului de fagocitoză.

Cele mai importante opsonine sunt *anticorpii specifici* și *peptidele* derivate din *fixarea complementului*. Anticorpii opsonizanți aparțin claselor IgG, IgM și IgA. Moleculele de anticorpi se leagă prin regiunile Fab de suprafața bacteriei, iar segmentul Fc este recunoscut de receptori specifici ai fagocitului.

Fragmentul C3b rezultat din cascada de fixare a complementului este un peptid cu proprietăți opsonizante. Moleculele de C3b învelesc celula bacteriană, alcătuind în jurul ei o pătură moleculară și rezultatul este imobilizarea acesteia. Opsonizarea celulei bacteriene cu C3b nu este totdeauna suficientă pentru declanșarea fagocitozei. De cele mai multe ori, ingestia sa este inițiată după ce celula fagocitară primește un al doilea semnal, transmis de moleculele de imunoglobuline opsonizante, care interacționează cu receptori pentru Fc de pe suprafața fagocitului. C3b este eficient ca factor opsonizant al bacteriilor Gram negative care cresc în forme coloniale R, deoarece lipopolizaharidele lor sunt lipsite de lanțurile poliacetice laterale. Formele coloniale S care sintetizează lipopolizaharide complete nu pot să fie fagocitate după opsonizarea cu C3b.

Macrofagele activate au o densitate mai mare de receptori pentru C3b, sunt mai aderente, au proprietăți fagocitare superioare și pot să ingere numai bacteriile opsonizate cu C3b.

Rolul opsonizant al fragmentului C3b nu se limitează la facilitarea fagocitării celulelor bacteriene, ci se extinde și ca mediator al altor interacțiuni: C3b intensifică citotoxicitatea mediată de anticorpi.

Ingestia unei particule opsonizate cu C3b poate fi stimulată de fibronectină, care funcționează ca o punte de legătură între celula bacteriană și receptorul pentru fibronectină al celulei fagocitare.

Faza de ingestie este condiționată de mobilitatea receptorilor de pe suprafața fagocitului. După invaginarea membranei sale, vacuola formată trebuie să se închidă asemenea unui fermoar. Dacă receptori fagocitului nu sunt suficient de mobili, sau dacă ligandul (moleculele de pe suprafața particulei ingerate, recunoscute de receptori) nu prezintă un număr suficient de grupări de interacțiune cu receptori fagocitului, ingestia nu are loc.

Ingestia este un proces activ, dependent de metabolismul fagocitului. Ea necesită o cantitate mare de energie, furnizată prin procese intense de glicoliză și este influențată de temperatură.

Capacitatea macrofagelor de a ingera complexe imune (mediată de receptori pentru Fc și C3b) se numește *imunofagocitoză*.

Odată formată, vacuola de fagocitoză este orientată spre aria perinucleară, de către tubulii contractili din citoplasmă. Aici, vacuola primară, după fuziunea cu lizosomii devine *fagolizosom*.

Dacă particula înglobată este o bacterie, după ingestie există următoarele posibilități de evoluție: *digestia, persistența, multiplicarea, distrugerea reciprocă, liza, fagocitului și păstrarea viabilității microorganismului*.

Digestia corespunde situației în care celula bacteriană este degradată de enzimele lizosomale, în număr de peste 40, active la pH acid. Rezultă molecule

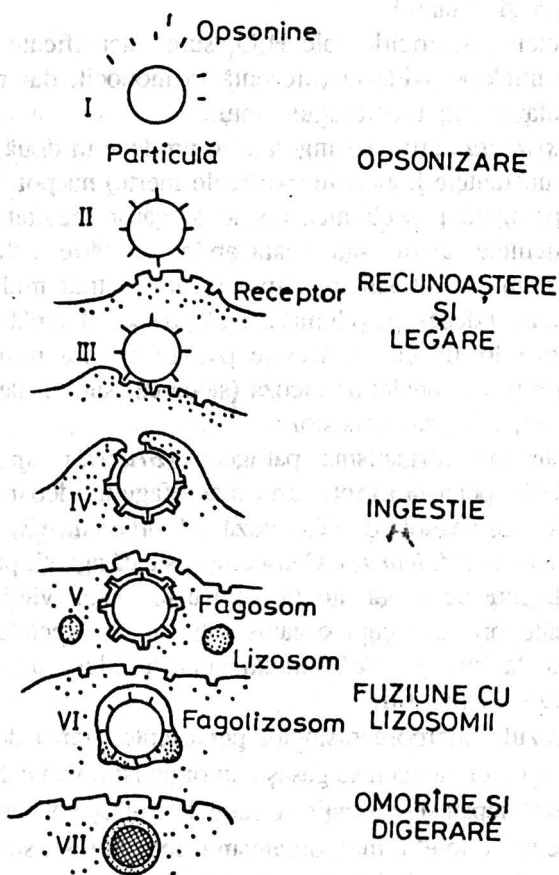


Fig. 71. Reprezentarea schematică a etapelor procesului de fagocitoză

mici (de circa 200 D), care trec în citoplasma fagocitului. Simultan sunt digerate și proteinele membranare ale vacuolei de fagocitoză, iar receptorii din membrană sunt recirculați spre suprafața celulei pentru a-și relua ciclul.

După ingestia bacteriei are loc o *creștere bruscă a intensității respirației* macrofagului. Crește consumul de O_2 , de glucoză și se activează oxidaza membranară dependentă de NADPH. Oxidaza reduce O_2 la O_2^- (amionul superioxid), care este dismutat de superoxid-dismutază (SOD) la H_2O_2 .

O parte din H_2O_2 este descompusă sub acțiunea glutat-ion-peroxidazei, reacție în care glutat-ionul este oxidat. Glutat-ion-reductaza regenerează glutat-ionul redus. Procesul este însoțit de oxidarea NADPH, furnizat de șuntul hexozomonofosfatului. Metaboliții reactivi ai O_2 exercită efecte bactericide și antitumorale. Macrofagul este protejat de efectele lor toxice, de către glutat-ion-ceroxidază și catalază.

Efectele bactericide ale H_2O_2 sunt intensificate de ionii de halogeni în prezența mieloperoxidazei (prezentă în monocit, dar nu în macrofagul matur) și a catalazei din macrofagul matur.

Persistența particulei ingerate se produce în două situații diferite: în cazul în care substanțele înglobate (particule inerte) nu pot fi digerate și atunci când agenții patogeni posedă mecanisme al căror rezultat este evitarea digestiei.

Particulele inerte sau neatacabile de către echipamentul enzimatic al macrofagului (azbest, siliciu, cărbune) sunt păstrate mult timp în macrofag. Dacă acumularea lor depășește o limită critică (în special în plămâni) se produc fenomene inflamatorii locale cu consecințe patologice. La mineri se descriu afecțiuni pulmonare profesionale: antracoza (stocarea pulberii de cărbune în macrofagele pulmonare), silicoza, azbestoza.

Unele microorganisme patogene (*Brucella*, sp. *Salmonella typhi*, *M. tuberculosis*) persistă în interiorul macrofagului, deoarece este blocată fuziunea lizosomilor cu vacuola de fagocitoză (*M. tuberculosis*) sau enzimele lizosomale sunt ineficiente (*M. leprae*). Consecința este că agenții patogeni respectivi produc infecții latente de lungă durată, pentru tot restul vieții, care pot deveni acute ori de câte ori rezistența organismului scade (recăderi). De exemplu, la 20 de ani de la infecție, *Salmomella* poate produce un abces tiroidian din care se izolează bacilul tific.

În cazul microorganismelor persistente, starea de protecție durează atâta timp cât agentul patogen se găsește în organism. Din celulele infectate, antigenul este eliberat treptat și se întreține o stare de protecție denumită *imunitate infecțioasă*. Dacă agentul este eliminat, organismul redevine sensibil. În cazul tuberculozei, după însănătoșirea clinică, organismul nu se sterilizează, deoarece *M. tubercu-losis* supraviețuiește în interiorul fagocitelor.

În unele cazuri are loc *multiplicarea* microorganismelor în macrofag: *M. leprae*, *M. tuberculosis* (la unii bolnavi de tuberculoză), *Salmonella*, *Lysteria monocytogenes*, *Brucella*, fungii *Candida* și *Histoplasma*, protozoarele *Plasmodium*, *Toxoplasma* sp., *Tripanosoma* sp., *Pneumocystis* sp.

Celulele infectate conțin cantități mari de microorganisme. Tratatamentul acestor infecții se face numai cu substanțe chimice care pătrund în interiorul celulei (coloranți care, *in vivo*, pătrund în celule și au efecte bacteriostatice). Nu pot fi utilizate antibioticele, deoarece ele se acumulează în lizosomi, iar agenții patogeni persistă în celulă prin efectul blocant al fuziunii între lizosomi și vacuola fagocitară.

Prin funcția sa fagocitară, macrofagul reprezintă ultima barieră protectoare față de infecție. Dacă această barieră este depășită, infecția se extinde și evoluează spre septicemie și generalizare.

Funcții auxiliare ale macrofagelor

Funcția secretorie a macrofagelor este la fel de importantă ca și cea fagocitară. S-au identificat peste 50 produse de secreție ale macrofagelor, unele cu influență majoră asupra evoluției procesului inflamator. Macrofagele sintetizează și secretă *lizozim*, spre deosebire de granulocite care conțin lizozim dar nu-l sintetizează, iar limfocitele nici nu îl sintetizează nici nu îl conțin. Nivelul seric al lizozimului este o reflectare a activității fagocitare a fagocitelor mononucleare: concentrația serică și urinară a lizozimului crește în stările infecțioase.

Lizozimul are efect antineoplazic prin acțiunea sa directă asupra membranei celulelor tumorale.

Macrofagele sintetizează și secretă aproape toate componentele căii clasice și alternative de activare a complementului.

Fagocitele mononucleare secretă o *proteină activatoare a plasminogenului*, la plasmină. Plasmina lizează fibrina, activează C1 și C3. Macrofagele activate de procesul inflamator secretă cantități mai mari de proteină activatoare a plasminogenului, comparativ cu macrofagele în repaus.

Macrofagele secretă *elastaza* și *colagenaze* care degradează atât unele macromolecule ale țesutului conjunctiv (colagenul, elastina) cât și imunoglobulinele, fibronectina și fibrinogenul. Aceste enzime pot juca un rol important în patogeniza bolilor pulmonare distructive (emfizemul).

În focarul inflamator macrofagele activate secretă *arginaza*. Depleția argininei provoacă inhibiția creșterii celulelor tumorale.

Macrofagele secretă un număr important de proteine plasmatice. *Macroglobulina alfa -2* are efect inhibitor pronunțat asupra tuturor enzimelor proteolitice și astfel modulează efectele litice ale enzimelor produse de

macrofage. *Fibronectina*, cu rol structural în membrana bazală, dar și în alte țesuturi conjunctive este produsă de macrofage. Unele *proteine ale cascadei de coagulare* sanguină sunt sintetizate în fagocitele mononucleare.

Macrofagele sintetizează compuși neproteici din categoria prostaglandinelor (lipide bioactive) ca și *factori reglatori ai răspunsului imun* (interleukina 1, considerată și ca factor pirogen endogen).

În focarul inflamator, macrofagele secretă factorul stimulator al *angiogenezei*.

Macrofagele participă la *metabolismul Fe*. Hematiile sunt distruse de macrofagele splenice în momentul în care rezerva lor de ATP s-a epuizat. Macrofagul preia Fe din hemoglobină și îl cedează transferinei, care îl transportă la locul de formare a hematiilor. *Transferina* este sintetizată de macrofage.

Macrofagele participă la *metabolismul lipidelor*. Ele captează lipidele plasmatică și le degradează sub acțiunea lipazelor proprii. Participă la sinteza colesterolului, a unor substanțe carotenoide etc.

Macrofagele eliberează un factor stimulator al diviziunii fibroblastelor și concomitent, al biosintezei de collagen de către fibroblaste. Activitatea fibroblastelor este foarte importantă în repararea tisulară (vindecarea leziunii) într-un proces inflamator. Macrofagele participă în mod direct la vindecare, prin înglobarea și distrugerea resturilor de celule tisulare moarte, bacterii, leucocite nefuncționale.

În infecția virală, macrofagele sintetizează o substanță cu rol protector: interferonul.

Funcția citotoxică a macrofagului. Macrofagele pot să omoare celulele tumorale prin mecanisme nefagocitare. Citotoxicitatea față de celulele maligne se poate manifesta prin câteva mecanisme distincte.

Citotoxicitatea specifică a macrofagelor a fost evidențiată prin faptul că macrofagele peritoneale recoltate de la șoarecele imunizat cu celule tumorale singenice*, au efecte citolitice față de celulele tumorale *in vitro*. Limfocitele T ale organismului imunizat cu celule tumorale „armează” macrofagele cu un factor care este adsorbit atât pe celulele țintă cât și pe macrofag. Supernatantul limfocitelor recoltate de la șoarecele imunizat cu celule tumorale, *in vivo* stimulează specific efectul citotoxic al macrofagelor. Este necesar contactul intim dintre macrofag și celula țintă, dar factorul litic nu se cunoaște.

* Organismele *singenice* aparțin aceleiași linii înbred. Ele sunt identice din punct de vedere genetic. Pe suprafața celulelor prezintă deasemenea molecule CMH identice.



Antigen



Macrofag

Antigen
prelucrat

Celule T

Celule B

Celule
sensibilizate

Linfokine

Anticorpi

Macrofag

Macrofag

Omoară

sau inhibă

Virus

Fungi

Bacterii

Celule
tumorale

Protozoare

Fig. 72. Reprezentarea schematică a interacțiunii macrofagelor cu limfocitele T și B, în inducția răspunsului imun. Macrofagele activate au efect bactericid și citotoxic față de celulele neoplazice (după Sharma, 1986).

Macrofagele au activitate *citotoxică naturală*, nespecifică, exprimată la un nivel mult mai scăzut decât citotoxicitatea specifică. Efectul s-a demonstrat *in vitro*, prin contactul macrofagelor cu celule alogene și se intensifică după activarea nespecifică a macrofagelor de către diferiți factori chimici sau biologici. Activitatea litică pare a fi consecința secreției unei proteaze neutre de către macrofage (Cameron, 1982).

Macrofagele pot să realizeze *citotoxicitate dependentă de anticorpi* (ADCC). Segmentul Fc al imunoglobulinelor fixate pe celula țintă este recunoscut de macrofag, prin intermediul receptorilor pentru Fc. Punțile moleculare între macrofag și celula țintă favorizează un contact spațial strâns și transferul unor factori litici necunoscuți.

Sistemul fagocitar polimorfonuclear (PMN)

Polimorfonuclearele (PMN) sunt elemente fagocitare „profesioniste” de tip *microfag*, prezente în sângele circulant. Ele își au originea în celulele stem ale măduvei osoase. Cultivarea celulelor-stem din măduva osoasă, *in vitro*, este urmată de apariția clonelor de macrofage și polimorfonucleare. Proliferarea celulelor stem este stimulată și se obțin mai multe colonii, după adăugarea unei substanțe serice, denumită generic *factorul de stimulare al coloniilor*. Producția sa este stimulată *in vivo*, de procesul inflamator sau de către infecție.

Celula stem, prin diviziuni repetate și diferențiere dă naștere succesiv, mieloblastelor, promielocitelor, mielocitelor și metamielocitelor. Metamielocitele se maturează în PMN. După caracterele tinctoriale ale granulațiilor se disting PMN *neutrofile*, *eozinofile* și *bazofile*.

PMN sunt adevărate elemente celulare „de asalt” în procesele de apărare antiinfecțioasă. Deși au o durată de viață relativ scurtă, numărul lor în sângele circulant este relativ constant, ceea ce înseamnă că producerea PMN este reglată în funcție de necesitățile organismului. Reglarea se manifestă atât în ceea ce privește numărul real de celule în organism, cât și în privința numărului de celule circulante.

Determinarea numărului de PMN în sânge reprezintă 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 față de microorganismul invadator. Scăderea numărului de PMN în cursul unei infecții semnifică de cele mai multe ori, o incapacitate de apărare a organismului.

PMN au o durată scurtă de viață: câteva zeci de ore (hematiile trăiesc 100–120 zile). La omul normal se distrug, în fiecare oră, circa 5 miliarde de leucocite și 10 miliarde hematii.

Redăm mai jos numărul absolut al diferitelor categorii de celule în sângele circulant:

Tip de celulă	Număr absolut pe un mm ³	Raportul procentual	Nou născut
Hematii	5 milioane la bărbat 4,5 milioane la femeie		5-8 milioane
Leucocite	5000-8000	100%	15000-50000
PMN neutrofile nesegmentate	150 - 400	3-5%	
PMN neutrofile segmentate	3000-6000	54-62%	7000-30000
PMN eozinofile	50 - 200	1-3%	
PMN bazofile	15 - 50	0-0,75%	
Limfocite	1500-3000	25-33%	2000-8000
Monocite	285 - 300	3-7%	
Trombocite	200000-400000		

La adult este o tendință de scădere a numărului de leucocite: o scădere mai accentuată a numărului de PMN neutrofile și o scădere ușoară a numărului de limfocite.

Creșterea numărului de leucocite poartă numele de *leucocitoză*. Ea este rezultatul descărcării în sângele circulant a leucocitelor din măduva osoasă. Cel mai adesea, leucocitoza este însoțită de *polinucleoză* (creșterea numărului de PMN neutrofile), care pot ajunge la 50000 în cursul infecției cu bacterii piogene. Numărul leucocitelor crește în cazurile de septicemie, pneumonie, flegmoane, abcese, apendicite (10-15000 în formele ușoare, până la 50000 în formele grave), în reumatism, în cazul tuturor distrugerilor tisulare (inclusiv în infarctul miocardic). Creșterea este moderată în cazul infecțiilor dentare, amigdalitene, urinare. Numărul leucocitelor crește în neoplazii. Necroza țesutului tumoral reprezintă un stimul pentru afluxul de leucocite.

Creșterea numărului PMN neutrofile este frecventă în infecțiile cu localizare periferică. Creșterea este rezultatul atât al unei descărcări din depozite cât și al hiperfuncției medulare. Hiperfuncția medulară se exteriorizează prin creșterea numărului de elemente tinere (nesegmentate) în sânge. Pentru fiecare neutrofil circulant, în măduva osoasă se află în rezervă 50-100 neutrofile mature.

Armeth a stabilit formula care îi poartă numele. Pentru determinarea formulei, pe un frotiu de sânge, colorat May-Grünwald - Giemsa se

înregistrează PMN neutrofile, care după numărul segmentelor nucleare se clasifică în 5 categorii:

I (nesegmentate);	II(2 segm.);	III (3 segm);	IV (4 segm.);	V (5 segm)
5%	35%	41%	17%	2% – normal
21%	65%	14%	0%	0% – apendicită

Când elementele neutrofile tinere predomină, ca semn al unei descărcări mai rapide și al hiperfuncției medulare, formula deviază spre stânga. În bolile parazitare (cu protozoare și viermi intestinali), în boli de piele, afecțiuni alergice (sensibilitatea exagerată față de anumite substanțe), leucocitoza este însoțită de *acidofilie* (creșterea numărului de eozinofile). Leucocitoza poate fi rezultatul unor malignități hematologice (leucemii). În aceste situații predomină elementele figurate tinere ale seriei afectate de transformarea malignă.

Scăderea numărului de leucocite (leucopenie) este întâlnită în infecția gripală, în febra tifoidă, în infecțiile grave în care forțele de apărare a organismului au fost paralizate. În situațiile de leucopenie extremă (agranulocitoză) numărul PMN neutrofile scade până la 200/mm³, datorită unor condiții de epuizare a măduvei osoase. În astfel de cazuri, sensibilitatea la infecții este foarte mare.

PMN sunt foarte bine echipate pentru a detecta, ingera și distruge microorganismele invadatoare. În citoplasma lor se găsesc numeroase granule lizosomale cu un bogat echipament enzimatic. Granulațiile PMN neutrofile aparțin la două categorii. Granulațiile *primare* sau *azurofile*, apar în stadiul de promielocit și înmuguresc din sistemele feței concave a aparatului Golgi. Ele se măresc prin fuziune succesivă și conținutul lor devine tot mai dens. După ce formarea lor s-a încheiat și celula trece în stadiul de mielocit, sistemele aparatului Golgi își inversează polaritatea și pe fața convexă se maturează granulațiile *secundare* sau *specifice*. Denumirile de granulații primare și secundare derivă din secvența apariției lor în celulă.

Granulațiile *primare* (azurofile), descrise de Bainton se mai numesc și *granulații A ale lui Baggiolini* și conțin mieloperoxidază, hidrolaze acide degradative (proteaze, fosfataze, nucleotidaze, galactozidaze) și substanțe cu acțiune bactericidă.

Granulațiile *secundare* (specifice ale lui Bainton) sau *granulațiile B ale lui Baggiolini* sunt mai mici, mai puțin electronodense, mai diverse ca morfologie (sferice, alungite) și conțin fosfatază alcalină și lizozim. Nu conțin alte enzime lizosomale. Sunt negative pentru peroxidază. Se formează când promielocitul trece în stadiul de mielocit.

Studiul granulațiilor PMNN a fost posibil după izolarea lor din celulele acumulate în cavitatea peritoneală a iepurelui, după injectarea glicogenului

(substanță chimiotactic pozitivă). PMNN se sparg foarte repede după o pipetare rapidă.

Granulațiile secundare (specifice) fuzionează foarte repede cu vacuola de fagocitoză, în timp ce ea este încă deschisă în spațiul extracelular. Din această cauză, peste 90% din conținutul lor se varsă în lichidul extracelular. Granulațiile primare (azurofile) fuzionează puțin mai târziu cu fagolizosomul. De aceea, circa jumătate din conținutul lor rămâne în fagolizosom, restul trecând în spațiul extracelular.

Sisteme bactericile active în PMN neutrofile

În PMN neutrofile funcționează două sisteme bactericide: unul este independent de O_2 , iar al II-lea este dependent de O_2 .

Sistemul bactericid independent de O_2 cuprinde o gamă largă de activități enzimatică (hidrolaze acide, proteaze neutre, lizozimul) cărora li se adaugă condiții fiziologice incompatibile cu viața bacteriilor ingerate (mediul acid în vacuola de fagocitoză, lipsa substanțelor nutritive). Granulele neutrofilelor conțin proteine bazice (cationice), bogate în lizină, cu activitate bactericidă. Ele au fost denumite generic „fagocitine”. Una dintre proteinele cu sarcină electrică pozitivă (cationică) este catepsina G, o enzimă proteolitică activă față de *Streptococcus*, *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas*. Un alt complex proteic granular determină creșterea permeabilității celulei bacteriene. Se consideră că proteinele cationice sunt foarte diverse, dar mecanismul lor de acțiune nu este cunoscut (Gallin, 1987). Se pare că aminoacizii cationici ai acestor proteine cedează protoni pentru a forma punți cu componente electronegative ale suprafeței bacteriei. Astfel, proteinele cationice sunt fixate pe suprafața celulei bacteriene și afectează mecanismele de transport ale acesteia.

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, solubile sau structurale: fibrinogen, collagen, elastină. *Catepsina G* face parte din aceeași categorie. Ambele au activitate bactericidă.

Hidrolazele acide, localizate în primul rând în granulațiile azurofile sunt reprezentate de catepsinele B, D, E și realizează digestia finală a proteinelor. Efectul lor se manifestă mai ales extracelular, deoarece în neutrofilul cu viață scurtă, digestia celulei bacteriene nu atinge etapele finale.

Lizozimul este o enzimă bactericidă din granulele secundare ale neutrofilelor. Este o muramidază: atacă mureina din peretele bacterian, prin scindarea legăturilor glicozidice beta 1-4 din lanțurile polizaharidice ale mureinei, dintre resturile de N-acetilglucozamină și acidul N-acetilmuramic. Rezultă dizaharide

ale compușilor menționați, la care se găsesc atașate lanțurile peptidice. După distrugerea structurii de rezistență a peretelui, celula bacteriană aflată într-un mediu neprotejat osmotic se lizează. Efectul lizozimului este deosebit de eficient asupra peretelui bacteriilor Gram pozitive (*Micrococcus lysodeikticus*, asupra căruia efectul s-a descoperit), la care mureina reprezintă 50–80% din conținutul peretelui. Eficiența lizozimului este mult diminuată asupra peretelui bacteriilor Gram negative, care are o cantitate mică de mureină, mascată de lipidele de suprafață. Lizozimul este eficient după tratamentul prealabil al celulelor cu un amestec generator de radicali activi (acid ascorbic și H_2O_2).

Lizozimul are acțiune bacteriostatică. Perturbă fenomenele de oxidoreducere bacteriană și astfel blochează procesele de creștere și diviziune. Lizozimul se găsește în ambele categorii de granule.

Mediul acid din fagolizosom este un factor cu efect bactericid. În vacuola de fagocitoză pH scade rapid (în câteva minute) prin producerea lactatului (din metabolismul anaerob al glucozei). Mediul acid este necesar activității unor enzime granulare.

Lactoferina este o proteină din granulele secundare ale neutrofilelor care leagă Fe și astfel inhibă activitățile vitale ale bacteriei, dependente de Fe.

Sistemul bactericid dependent de O_2 este complex și esențial pentru funcția neutrofilelor. Imediat după ingestia unei bacterii, în neutrofil se produce o intensificare bruscă a respirației, o adevărată explozie a acestui proces. O_2 este necesar pentru activitatea bactericidă optimă. Intensificarea respirației se realizează pe scama creșterii consumului de O_2 și este însoțită de producerea intermediarilor săi reactivi: 1O_2 (oxigen singlet), O_2^- (radical superoxid), OH^\cdot (radical hidroxil).

Mecanismul de acțiune al sistemului bactericid dependent de O_2 nu este pe deplin clarificat. Consumul sporit de O_2 este datorat intensificării metabolizării glucozei pe calea șuntului hexozo-monofosfat. Concomitent se intensifică eliberarea intermediarilor reducerii O_2 .

Sursa reducătoare pare a fi o oxidază complexă legată de membrana neutrofilului (FAD, quinonă, citocrom b). Oxidaza se reduce, preluând electronii de la o piridin-nucleotidă redusă (NADPH sau NADH) și se oxidează prin transferul electronilor la molecula de O_2 . O_2 este redus în ultimă instanță la H_2O , dar inițial are loc o reducere parțială și se formează astfel un mare număr de intermediari foarte reactivi.

Când O_2 acceptă un singur electron se formează radicalul perhidroxid (HO_2^\cdot) sau forma sa ionizată (O_2^-) (anionul superoxid). La pH neutru, radicalul există aproape exclusiv ca anion superoxid. Acesta (O_2^-) acționează fie ca

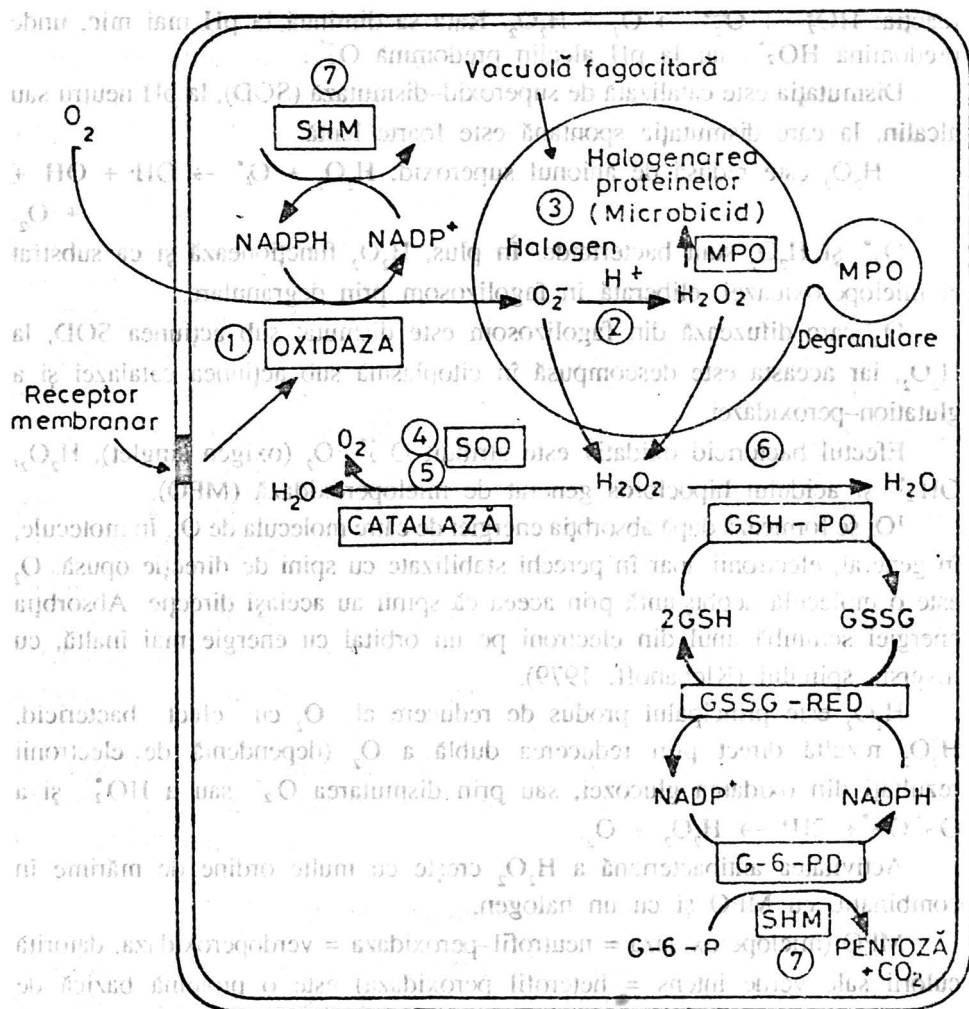


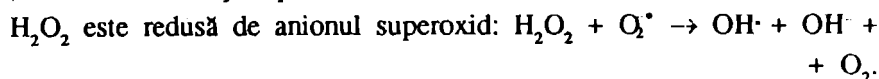
Fig. 73: Reprezentarea schematică a evenimentelor asociate cu efectul bactericid, sub acțiunea mecanismelor dependente de O_2^- : SHM – shuntul hexozomonofosfaților; MPO – mieloperoxidază; SOD – superoxid dismutază; GSH-PO – glutation peroxidază; GSSG – glutation oxidat; G-6-PD – glucozo-6-fosfat dehidrogenază; G-6-P – glucozo-6-fosfat (după Root, 1981).

reducător, fie ca oxidant. Când acționează ca reducător al unui substrat, pierde electronul suplimentar și este convertit la O_2 . Când acționează ca agent oxidant, $O_2^{\bullet -}$ câștigă un electron și se formează H_2O_2 .

Cei 2 radicali ai $O_2^{\bullet -}$, HO_2^{\bullet} și $O_2^{\bullet -}$ interacționează într-o reacție de dismutație, în care unul se reduce iar celălalt se oxidează și rezultă O_2 și H_2O_2 . Dismutația este cea mai rapidă la $pH = 4,8$, după

reacția: $\text{HO}_2^\cdot + \text{O}_2^\cdot \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$. Rata sa diminuează la pH mai mic, unde predomină HO_2^\cdot , iar la pH alcalin predomină O_2^\cdot .

Dismutația este catalizată de superoxid-dismutază (SOD), la pH neutru sau alcalin, la care dismutația spontană este foarte lentă.



O_2^\cdot și H_2O_2 sunt bactericide. În plus, H_2O_2 funcționează și ca substrat al mieloperoxidazei, eliberată în fagolizosom prin degranulare.

O_2^\cdot care difuzează din fagolizosom este dismutat sub acțiunea SOD, la H_2O_2 , iar aceasta este descompusă în citoplasmă sub acțiunea catalazei și a glutatation-peroxidazei.

Efectul bactericid oxidativ este atribuit O_2^\cdot , $^1\text{O}_2$ (oxigen singlet), H_2O_2 , OH_2^\cdot și acidului hipocloros generat de mieloperoxidază (MPO).

$^1\text{O}_2$ se formează după absorbția energiei de către molecula de O_2 . În molecule, în general, electronii apar în perechi stabilizate cu spini de direcție opusă. O_2 este o moleculă neobișnuită prin aceea că spinii au aceeași direcție. Absorbția energiei schimbă unul din electroni pe un orbital cu energie mai înaltă, cu inversia spinului (Klebanoff, 1979).

H_2O_2 este principalul produs de reducere al O_2 cu efect bactericid. H_2O_2 rezultă direct prin reducerea dublă a O_2 (dependentă de electronii rezultați din oxidarea glucozei, sau prin dismutarea O_2^\cdot sau a HO_2^\cdot și a $\text{O}_2^\cdot + \text{O}_2^\cdot + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$.

Activitatea antibacteriană a H_2O_2 crește cu multe ordine de mărime în combinație cu MPO și cu un halogen.

MPO (mieloperoxidaza = neutrofil-peroxidaza = verdoperoxidaza, datorită culorii sale verde intens = heterofil peroxidaza) este o proteină bazică de 150 kD. Se găsește în granulațiile primare. Catalizează oxidarea substanțelor donatoare de H^+ sau de electroni, de către H_2O_2 .

MPO, alături de H_2O_2 (agent oxidant) și de un halogen (clorul – în exces față de necesarul MPO sau iodul absorbit ca atare ori prin deiodarea hormonului tiroidian) formează un sistem toxic pentru microorganisme diverse: bacterii, fungi, protozoare, viermi, ca și pentru leucocite, eritrocite, plachete, celule tumorale. MPO și H_2O_2 formează un complex cu substratul, cu efect oxidant asupra halogenului și rezultă un compus oxidant: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- \xrightarrow{\text{MPO}} \text{H}_2\text{O} + \text{HOCl}$ (acidul hipocloros).

MPO – H_2O_2 – iodul formează un sistem puternic de iodurare a bacteriei ingerate, dar eliberează și $^1\text{O}_2$ (Klebanoff, 1979).

Radicalii hidroxil au efecte citotoxice puternice. Ei rezultă prin interacția H_2O_2 cu sărurile de Fe, după reacția: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$.

În neutrofile anionul superoxid ($\text{O}_2^{\cdot -}$) interacționează cu H_2O_2 și rezultă O_2 , OH^- și $\cdot\text{OH}$. $\cdot\text{OH}$ este agent oxidant puternic. Prin absorbția electronilor din substratul chimic eliberează alți radicali, care la rândul lor pot oxida alte substraturi: $\cdot\text{OH} + \text{R} \rightarrow \text{OH}^- + \text{R}^{\cdot}$.

Oxigenul singlet ($^1\text{O}_2$) revine la starea obișnuită, cu emisiune de lumină (cheiluminiscență). $^1\text{O}_2$ pare să se formeze în sistemul MPO– H_2O_2 –halogen. Acest sistem emite lumină, ceea ce sugerează formarea $^1\text{O}_2$ în fagocite. Acest derivat al O_2 ar putea fi toxic prin reacțiile de fotooxigenare. Dovada efectului bactericid al $^1\text{O}_2$ este indirectă: *Sarcina lutea* care conține pigment carotenoid este omorâtă mult mai greu decât mutantele nepigmentate, ceea ce se corelează cu capacitatea pigmentilor carotenoizi de a inactiva $^1\text{O}_2^{\cdot}$ (Foote și col, 1968, citat Gallin, 1987).

În concluzie, leucocitul PMN este supradotat cu o gamă largă de mijloace bactericide. PMN combină mai mulți factori antibacterieni în sisteme complexe cu putere bactericidă superioară fiecăruia izolat. Cel mai eficace sistem bactericid este MPO – H_2O_2 – halogen. Diferitele sisteme bactericide nu intervin în mod egal la toate speciile animale. La om, MPO are activitate maximă. Intervenția unuia sau altuia dintre sistemele bactericide depinde și de natura microorganismului fagocitat.

Deficiențe ale sistemului PMN neutrofile

Sistemul PMN neutrofile este esențial pentru apărarea organismului față de microorganisme invadante. Deficiențele sale numerice sau funcționale se răsfrâng asupra rezistenței antiinfecțioase. Cele mai cunoscute anomalii ale sistemului PMN neutrofile sunt *neutropeniile* de diferite grade. Când numărul neutrofilelor scade sub 1000 celule/ml, riscul infecțiilor crește mult, iar în cazul scăderii accentuate (200 neutrofile/ml) dispare posibilitatea unui răspuns inflamator eficient. Neutropenia se datorează fie unei producții medulare sub nivelul normal, fie unei distrugerii periferice extensive a neutrofilelor.

Deficiențele funcționale ale neutrofilelor sunt foarte numeroase și diverse: deficiențe de aderență, de chimiotaxie, de fagocitoză, de activitate bactericidă.

Deficiențele de aderență se datorează absenței unor glicoproteine membranare (de 110 și 180 kD), ceea ce împiedică migrarea lor extravasculară. Pacienții suferă infecții bacteriene și fungice recurente.

Maladia cronică granulomatoasă este lincată pe cromosomul X. Este cea mai cunoscută deficiență a activității bactericide a neutrofilelor. Ingestia este normală, dar omorârea bacteriilor care nu eliberează H_2O_2 (*Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*) este foarte mult diminuată. Efectul bactericid se menține asupra bacteriilor care produc H_2O_2 (streptococi, lactobacili). Fagocitele acestor pacienți au un metabolism oxidativ deficitar, întrucât nu produc H_2O_2 . Ingestia nu este însoțită de intensificarea metabolismului oxidativ. În aceste cazuri crește incidența infecțiilor cu bacterii aerobe, catalazo-pozitive, care inactizează H_2O_2 rezultată din propria lor activitate metabolică. Infecțiile cu bacterii, levuri (*Candida*), fungi filamentosi (*Aspergillus*) sunt trenante și urmate de reacții inflamatorii ample, care evoluează în granulome, ca o reflectare a incapacității de a inactiva chemoatracții și de a degrada antigenul. Deficiența enzimatică esențială este oxidaza care transferă electronii de la NADPH la O_2 pentru a forma anionul superoxid. Ar putea lipsi chiar donatorul de electroni (NADPH) (Forehand, 1986).

Maladia congenitală Chediak-Higashi se caracterizează printr-o activitate fagocitară mult diminuată a macrofagelor și a PMN: lizosomii lor nu fuzionează cu fagosomii. Din această cauză bolnavii suferă infecții repetate cu microorganisme facultativ patogene.

Aceste două maladii pun în evidență importanța mecanismelor de fagocitoză în apărarea organismului normal, față de infecțiile cu microorganisme puțin virulente.

În concluzie, fagocitoza contribuie decisiv la rezistența organismului uman și animal față de agenții infecțioși. Aproape 80% din particulele străine din sânge sunt eliminate la primul pasaj al sângelui prin ficat, plămâni și splină. După ce trece de câteva ori prin aceste organe, sângele se sterilizează.

Acțiunea opsoninelor este foarte importantă pentru stimularea fagocitozei. IgM este cel mai eficient opsonizant față de bacteriile Gram negative, iar IgG are o eficiență de 500–1000 de ori mai mică. Creșterea ratei fagocitozei complexelor imune și a particulelor acoperite de componente ale complementului (C3b) este consecința prezenței receptorilor pentru Fc și pentru C3b pe membrana fagocitelor. Fagocitele purtătoare ale acestor receptori au fost denumite „profesioniste”, deoarece pot să-și intensifice în mod specific activitatea, deosebindu-se astfel de fagocitele „amatoare” (celulele reticulare), lipsite de asemenea receptori.

INFLAMAȚIA

Inflamația (*inflamare = a arde*) este o reacție de apărare locală nespecifică. Reacția inflamatoare este consecutivă unui traumatism tisular, pătrunderii unui corp străin sau unei infecții. Inflamația este procesul prin care leucocitele și moleculele sângelui sunt eliberate în ariile avariate din organism. Cel mai adesea inflamația se produce independent de intervenția sistemului imunitar.

Suportul anatomic al reacției inflamatorii este microcirculația: arteriole, capilare, venule și șunturi arteriovenoase. În reacția inflamatoare se activează o diversitate de sisteme moleculare și celulare, care au o activitate vasculară marcată și determină apariția principalelor sale manifestări: *eritem, edem, durere, căldură* (rubor, tumor, dolor, calor, descise de Celsus cu 2000 ani în urmă).

Agresiunea tisulară (produsă pe cale traumatică, de agenți infecțioși, prin injectarea unor substanțe, ridicarea temperaturii, radiațiile) produce *vasodilatație* (hiperemie) cu creșterea fluxului sanguin spre aria afectată. Datorită alterării celulelor endoteliale se produce creșterea permeabilității vasculare în aria respectivă. Alterarea celulelor endoteliale stă la originea aderenței plachetelor de peretele capilar și a agregării lor, care declanșază fenomenul coagulării sanguine. Simultan aderă de perete și leucocitele.

Celulele endoteliale ale capilarelor avariate se contractă și lasă între ele spații libere. Crește permeabilitatea vasculară a zonei și componentele plasmiei trec în spațiile extravasculare. Unii mediatorii moleculari ai inflamației au capacitatea de a dilata capilarele și de a contracta venulele, mărinđ presiunea hidrostatică în venule, favorizând astfel extravazarea componentelor sanguine. Pe măsură ce transudarea progresează, sângele intravascular se concentrează, iar curgerea sa în condițiile hemodinamice locale (capilare dilatate și venule contractate) încetinește, sau încetează în focarele cu avarie severă. Se produce astfel *staza sanguină*. Spre deosebire de tromboză, staza este reversibilă și durează minute, ore sau chiar zile.

Migrarea leucocitelor din vase, în aria avariata este consecința creșterii permeabilității capilare. Primele leucocite care migrează în focarul inflamator sunt PMNN. Populația totală de neutrofile circulante în sângele periferic este alcătuită din două subpopulații: cele care circulă în curentul sanguin *axial* (circa jumătate din numărul PMNN) și cele care circulă în *zona marginală* a curentului sanguin și se deplasează încet, la contactul cu endoteliul vascular. În condiții normale, PMNN aderă foarte rar la endoteliul vascular.

În cazul unei infecții, celulele tisulare secretă citokine (interleukina 1, TNF). Citokinele stimulează celulele endoteliale capilare, să exprime pe suprafața lor,

o categorie specială de molecule denumite *selectine*. Selectinele sunt lectine care mediază contactul selectiv dintre celule.

Molecula de selectină are 3 domenii: un domeniu intramembranar (cu rol de legare), un domeniu extracelular și un al treilea situat la extremitatea liberă a moleculei, cu rolul de lectină. Funcția sa este mediată de prezența ionilor de Ca.

Moleculele de selectină se exprimă pe suprafața internă a celulelor endoteliului capilar, ori de câte ori țesutul este supus unei agresiuni. Leucocitele marginale aderă de moleculele de selectină ale endoteliului capilar. Se intensifică marginația celor care circulă în curentul sanguin axial. După aderență, PMNN își extind pseudopodele la joncțiunea dintre celulele endoteliale ale capilarului și se deplasează în acest spațiu, prin mișcare amoeboidă. Ulterior penetrează membrana bazală a capilarului și pătrund în țesut. Procesul migrării din lumenul vascular se numește *diapedeză* și este facilitat de secreția proteazelor neutre (elastază, collagenază).

Interacțiunea selectină – PMNN este specifică. Selectinele mediază aderența și transferul extravascular al leucocitelor, cu caracter adaptativ. Celulele endoteliale au o rezervă internă de selectină P, pe care o mobilizează și o expun la suprafață, în câteva minute, pentru mobilizarea rapidă a leucocitelor. Aceleași celule, la nevoie sintetizează și expun selectina E.

Odată ajuns în spațiul extravascular, deplasarea leucocitelor spre celulele avariate, spre agentul iritant sau patogen este controlată de factori chimiotactici. În focarul inflamator, leucocitele eliberează produse metabolice sau se lizează și eliberează enzime și mediatori. Aceștia, alături de factorii de coagulare și de componentele complementului amplifică procesul inflamator.

Pe lângă PMNN, la locul inflamației vin monocite, limfocite și chiar eritrocite. Monocitele provin din mai multe surse. *Monocitul circulant* intră în țesuturi fie pentru a deveni macrofag rezident tisular, fie ca răspuns la stimulii chimiotactici. Majoritatea mononuclearelor dintr-un focar inflamator provin din monocitele circulante, cu originea în măduva oaselor. A II-a sursă de monocite sunt cele rezultate prin procesul *diviziunii celulare*. A III-a sursă sunt mononuclearele *rezidente* în țesuturi, cu viață lungă, care se activează și se deplasează în focarul de inflamație. Acestea se găsesc în special, în granuloamele inflamatoare cronice.

Tipul celular dominant în focarul de inflamație variază mult, după natura stimulului antigenic și după tipul de reacție inflamatoare pe care o declanșază: *acută* sau *cronică*.

Reacțiile inflamatorii *acute* se derulează într-o perioadă scurtă de timp, deoarece forțele de apărare ale organismului neutralizează agentul invadant și curăță rapid locul inflamației. Focarele inflamatorii acute conțin în special

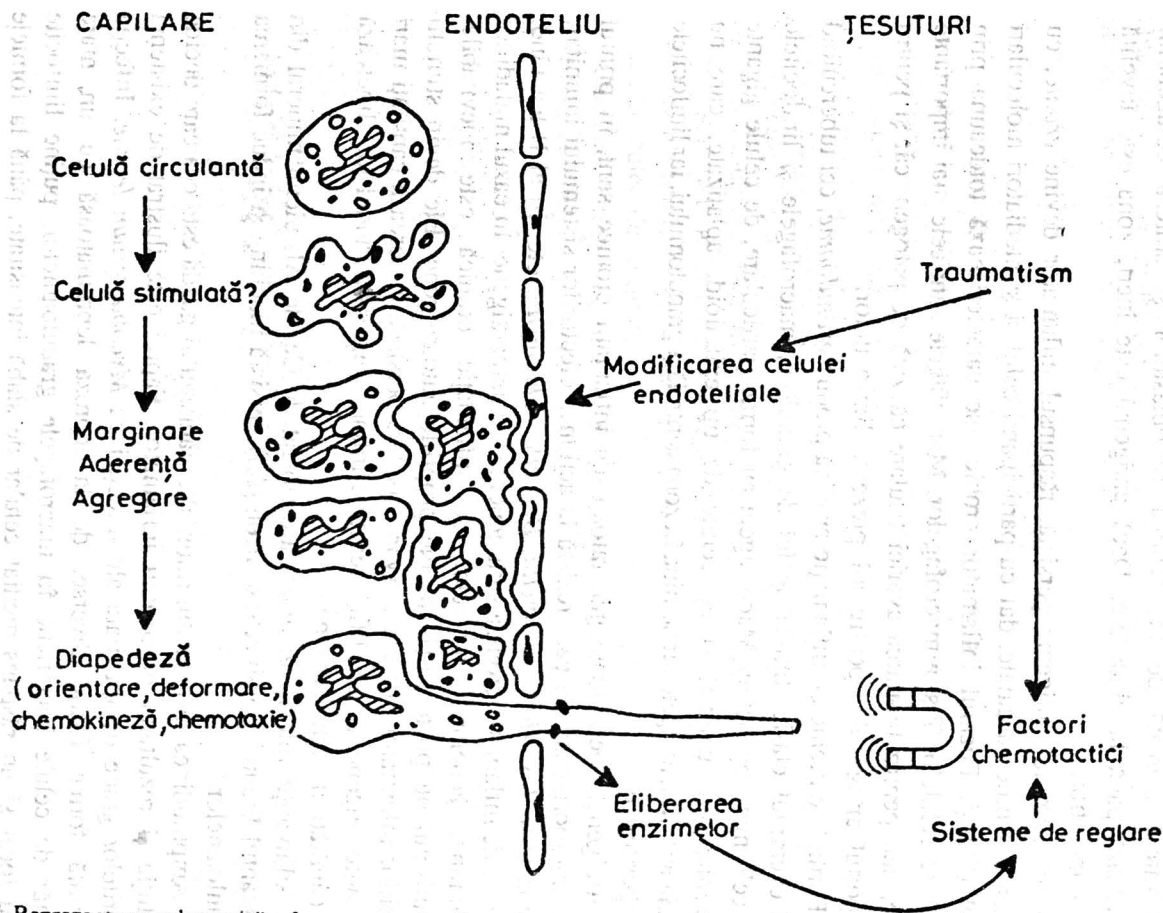


Fig. 74. Reprezentarea schematică a fenomenelor implicate în atragerea leucocitelor PMN în focarele inflamatorii (după Gallin, 1980).

PMNN și sunt delimitate de celule fagocitare și fibrină. Focarul are o cavitate centrală plină cu PMNN vii și moarte, celule invadante și resturi celulare. Centrul focarului este purulent, microorganismul este eliminat și regenerarea tisulară (cicatrizarea) marcată de proliferarea fibroblastelor și sinteza collagenului progresează până la vindecare. Dacă antigenul este inert, zona este învelită într-un inel fibros.

Dacă stimulul antigenic persistă, răspunsul inflamator devine *cronic*, cu aceleași 4 semne cardinale, dar cu participanți celulari și mediatori moleculari parțial diferiți. Focarul inflamator cronic se caracterizează totdeauna prin infiltrarea celulelor T și a macrofagelor. Macrofagele sunt cele mai importante celule, atât pentru limitarea avariei tisulare cauzată de patogen, cât și pentru transportul antigenului pentru a-l prezenta limfocitelor.

Formele extreme de inflamație cronică produc *granuloame*, cel tuberculoid fiind exemplul clasic. Într-un astfel de granulom, macrofagele și limfocitele sunt cele mai abundente. Macrofagele au forme particulare, de celule gigante (provenite din fuziune) și de celule de tip epitelioid, aplatizate, care nu fagocitează. Macrofagele predomină în zona centrală a granulomului, iar limfocitele sunt periferice.

Antigenele persistente generatoare de inflamații cronice sunt, în primul rând, microorganismele care rezistă la acțiunea efectorilor sistemului imunitar: micobacterii, *Listeria*, *Salmonella*, *Brucella*, *Chlamydia* etc. În al II-lea rând, focarele de inflamație cronică sunt generate de autoantigene. În cazul maladiilor autoimune, generarea focarelor de inflamație cronică este inevitabilă. Organismul nu poate să-și elimine propriile autoantigene. Ele devin stimulii reacțiilor inflamatorii cronice. Avaria tisulară persistă, eliberează cantități mari de autoantigene, se amplifică reacțiile inflamatorii și la rândul lor eliberează noi cantități de autoantigene.

Adjuvanții folosiți în imunizare (fosfat de Ca, de Al, uleiul mineral din adjuvantul Freund, complet sau incomplet) persistă îndelung și induc formarea granuloamelor.

Amplitudinea răspunsului imun al organismului gazdă este cea care decide evoluția și rezultatul procesului inflamator. Faptul este ilustrat de existența diferitelor grade de gravitate ale infecției cu *Mycobacterium leprae*. Infecția prezintă forme foarte diverse, de la leproza lepromatoasă cu un mare număr de celule bacteriene în macrofagele granuloamelor, puține limfocite T în focar și un răspuns mediat celular de slabă intensitate, până la formele de leproză tuberculoidă, cu puține celule de *M. leprae* și răspuns imun mediat celular, intens.

În concluzie, reactivitatea imună a organismului, dar și natura antigenului condiționează evoluția procesului inflamator. Antigenul este inițiatorul răspunsului inflamator, iar forțele de apărare modulează acest răspuns. Îndepărtarea antigenului este semnalul pentru terminarea reacțiilor mediate de mecanismele inflamatorii celulare și moleculare și pentru începerea fazei de cicatrizare.

Chimiotaxia

Moleculele chimiotactice sunt acelea care induc migrarea direcțională a leucocitelor. Chimiotaxia trebuie deosebită de chimiokineză, care semnifică intensificarea mișcărilor întâmplătoare, neorientate direcțional. Unii mediatori ai inflamației sunt *chimiochinetici* (histamina), dar nu chimiotactici. Factorii chimiotactici sunt reprezentați de derivați ai cascadei de *activare a complementului*, produși ai *coagulării și fibrinolizei*, *peptide bacteriene* și *sintetice* etc. Ei sunt generați în focarul de inflamație și difuzează spre capilarele locale. Sub acțiunea factorilor chimiotactici, *leucocitele traversează* endoteliul vascular și intră în focarul de inflamație. Leucocitele au receptori pentru peptidele N-formil-metionil (caracteristice procariotelor), pentru C3b, pentru regiunea Fc a moleculei de anticorp.

Cele mai importante molecule chimiotactice sunt generate de macrofage, limfocite, plachete, de agentul patogen și de interacția complexelor Ag-Ac

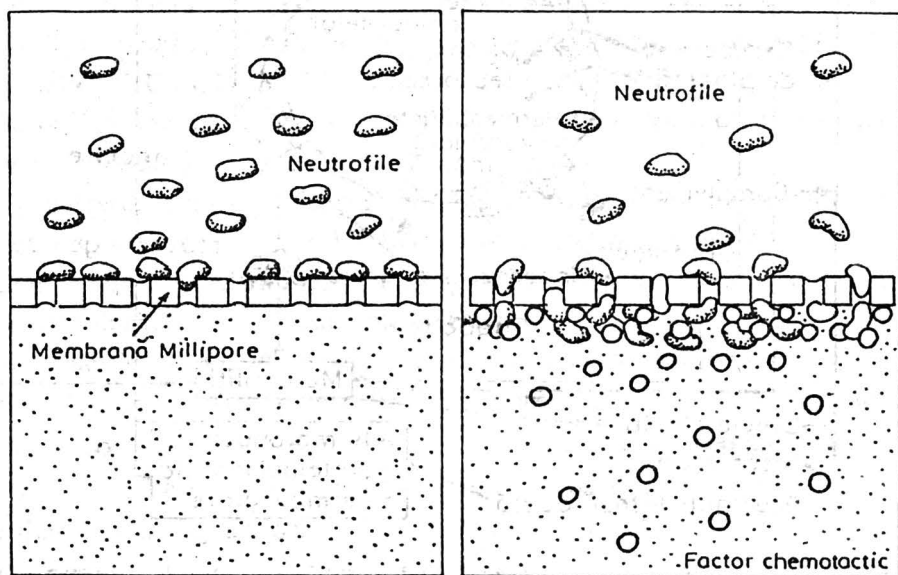


Fig. 75. Reprezentarea schematică a tehnicii de evidențiere a prezenței unui factor chimiotactic (după Dias da Silva, 1986).

cu complementul. Primul factor *chimiotactic* identificat este *C5a*, eliberat din cascada de activare a complementului, sub acțiunea hidrolazelor tisulare sau a proteazelor bacteriene. *C5a* este atrăctant pentru neutrofile și macrofage.

Monocitele, macrofagele și neutrofilele sunt atrase de concentrații mici (1 nM) de *peptide formil-metionil* eliberate de bacterii. Catena peptidică a procariotelor este inițiată cu un rest formil-metionil.

Neutrofilele din focarul inflamator produc leucotriena B₄. Monocitele, neutrofilele, eozinofilele au receptori pentru leucotriena B₄, astfel încât primele neutrofile care ajung în focarul inflamator induc imigrația altora. Neutrofilia inițială induce neutrofilie. Mediatorii chimiotactici nu-și blochează reciproc receptorii.

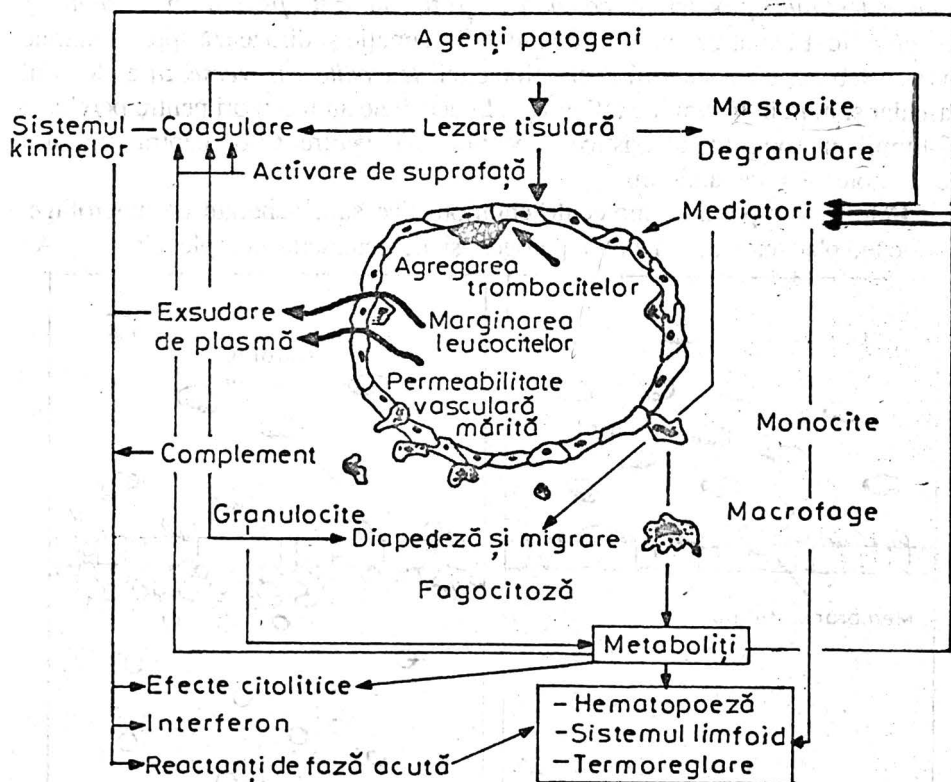


Fig. 76. Reprezentarea schematică a modificărilor celulare și umorale asociate cu reacția inflamatorie (după Fauve, 1970).

Mediatorii reacției inflamatorii

Pe lângă stimulii chimiotactici, în focarul inflamator se eliberează și alți factori, cu aceeași origine (în cascada de fixare a complementului, în limfocite, granulocite, mastocite, plachete) care determină manifestările reacției inflamatorii: alterarea fluxului sanguin și a permeabilității capilare. Acțiunea lor afectează vasele locale mici, dar nu se limitează la leucocite, ci implică întregul țesut ca suport al inflamației: C3a și C5a determină contracția mușchilor netezi (pentru că mimează reacția anafilactică se numesc *anafilatoxine*). Ambele induc degranularea mastocitelor, cu eliberarea histaminei și efectul este spasmogen. Mastocitele sunt celule din țesutul conjunctiv, așezate lângă vasele sanguine. Ele sunt activate fie direct de moleculele IgE, fie indirect de către C3a și C5a.

După activare, în mastocite se produce un influx de Ca^{2+} și creșterea nivelului AMPc. Are loc degranularea și simultan se eliberează o fosfolipază care scindează acidul arachidonic din fosfolipidele membranare. Acidul arachidonic este convertit în compuși eicosanoidici (cu 20 atomi de C): prostaglandine (PG) și leucotriene (LT).

PG sunt acizi grași nesaturați, cu 20 atomi de C, care conțin grupări OH^- și cetonice. Structura lor de bază este acidul prostanoic. Sinteza lor se face pornind de la acizii grași esențiali pe calca ciclooxygenazei. S-au identificat 4 clase de PG: F, E, A, B. PG E_2 are concentrația maximă în exudatul inflamator la 6–24 ore (denumirea de PG vine de la faptul că s-au identificat în secreția seminală a prostatei).*

LT sunt produse de neutrofile și rezultă din metabolismul acidului arachidonic pe calea lipooxygenazei. PG și LT măresc permeabilitatea capilară.

Granulațiile mastocitelor conțin histamină, enzime proteolitice, heparină, factori chimiotactici pentru neutrofile și eozinofile.

Macrofagele secretă în focarul inflamator, produși enzimatici: enzime lizosomale (colagenaze, elastaze) care fluidizează substanța fundamentală a țesutului conjunctiv; compuși cu rol de apărare (lizozim, interferon, componente ale complementului, beta-lizină, arginază); factori reglatori ($\text{IL}-1$ – mediator al interacțiunii macrofag-limfocite), sau factori cu efect la distanță, (asupra măduvei osoase), stimulând producția de neutrofile și asupra S N C (mediatori ai reacției febrile).

Beta-lizina este o proteină cationică, termostabilă ($g\ m = 6000\ D$). Se găsește în plachete și în umorile organismului. Omoară celulele bacteriene în câteva minute.

Arginaza este sintetizată și eliberată de macrofagele activate. Are efect litic asupra unor celule maligne.

Lactoferina este produsă și eliberată de PMN. Are proprietatea de a lega Fe. Dacă nu este complet saturată cu Fe inhibă creșterea bacteriilor deoarece leagă Fe necesar, ca un element esențial creșterii celulelor bacteriene.

Reacții de fază acută sunt proteine serice a căror concentrație în sânge crește în timpul și după procesul inflamator. Cele mai tipice proteine de fază acută sunt alfa 1-glicoproteina acidă (AGA) și proteina C reactivă (CRP).

AGA, alături de alfa 1- antitripsină, haptoglobină și ceruloplasmină face parte din cel de al II-lea set al reacțiilor de fază acută, a căror concentrație crește la 12-24 ore de la declanșarea procesului inflamator, fiind unul din indicatorii esențiali pentru diagnosticul și monitorizarea infecțiilor.

Rolul proteinei C reactive în apărarea humorală nespecifică a fost prezentat anterior.

În ciuda diversității factorilor moleculari care participă la răspunsul inflamator, activitatea biologică esențială ce se desfășoară într-un focar inflamator acut este *fagocitoza*. De fapt, o bună parte a moleculelor din focarul inflamator prin efectul lor opsonizant înlesnesc fagocitoza.

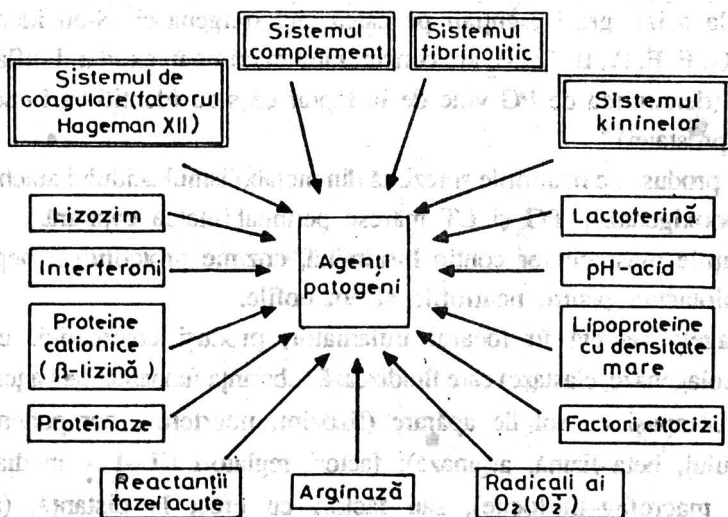


Fig. 77. Reprezentarea schematică a diferitelor sisteme enzimatice (în casete cu contur dublu) și produși secundari ai inflamației, implicați în apărarea organismelor față de agenții patogeni (după Fauve, 1980).

Uneori însă, agenții patogeni invadatori sau celulele maligne elimină factori chimiotactic negativi pentru celulele din focarul inflamator, sau *imunorepelenți*. Existența lor s-a demonstrat cel puțin în supernatantul unor celule maligne. Sunt molecule cu g m între 1000–12000 D. După injectarea lor la șoarece și cobai, reduc influxul PMN și al macrofagelor, reduc rezistența la infecția cu *L. monocytogenes*. Bacteriile și paraziții elimină factori repelenți pentru efectorii reacției de apărare a gazdei. Bacteriile virulente (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. pertusis*) diminuează reacția inflamatorie la locul inoculării și împiedică funcția celulelor fagocitare. Capacitatea de a inhiba concentrarea efectivelor celulare la locul agresiunii este unul dintre cele mai vechi mecanisme de virulență.

În concluzie, reacțiile inflamatorii sunt benefice pentru organismul gazdă. Ele reprezintă un mecanism nespecific de limitare a infecției și de curățire a resturilor celulare rezultate din avarie. De aceea se afirmă că mecanismele reacției inflamatorii sunt active nu numai în vindecarea leziunilor tisulare, ci și în reacțiile de apărare locală față de microorganismele infecțioase, constituind un mecanism esențial de apărare a integrității organismului.

Uneori, rezultatul reacției inflamatorii este necroza tisulară (fenomenul Arthus).

C a p i t o l u l VIII

SISTEMUL COMPLEMENT

Sistemul complement este un set de proteine și glicoproteine plasmatice 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 este modificată de imunizare.

Proteinele complementului (C) se găsesc la toate vertebratele. Ele acționează nespecific și completează efectele imunologice specifice ale anticorpilor. Unele componente sunt proteine de *fază acută*, adică se sintetizează rapid și concentrația lor serică crește în timpul răspunsului inflamator acut. Efectele C constau în *opsonizarea* celulelor bacteriene (favorizarea fagocitozei) și în avaria membranei celulelor purtătoare de antigene, uneori provocând *liza*.

Acțiunea sistemului C a fost evidențiată în 1884 de Grohmann, iar ulterior, de Nuttall și Buchner. Ei au arătat că serul are efecte litice asupra unor bacterii *in vitro*. Activitatea litică dispare după încălzirea serului la 56°, timp de 30 min. Factorul care mediază liza bacteriană este termolabil, și Buchner l-a denumit *alexină* (allexein = 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 (alexina) acționează în strânsă cooperare cu anticorpii.

Pfeiffer (1894) studia reacțiile imunologice la cobai, după infecția cu *Vibrio cholerae*, în diferite variante experimentale. La cobaii imunizați cu celule omorâte de *V. cholerae*, după inocularea vibrionilor virulenți în cavitatea peritoneală, a remarcat dispariția lor rapidă, iar la cei neimunizați, inocularea este urmată de infecția mortală. Fenomenul lizei vibrionilor a fost reprodus *in vitro*, prin

punerea în contact a serului imun de cobai, cu celule de *V. cholerae*. Încălzirea la 56° (30 min) a serului imun anulează efectul său litic *in vitro*, dar proprietatea este restabilită 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 enumerate în ordinea descoperirii lor. 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, se combină direct cu o țintă membranară, iar fragmentele *a* sunt mai mici, se eliberează în soluție și favorizează răspunsul inflamator. Starca activată enzimatic a factorilor C se notează cu o bară: de exemplu $\bar{C}1$.

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 căi se intersectează într-un punct, *clivajul lui C3*, eveniment cheie al activării sistemului C.

Fiecare componentă activată este o protează înalt specializată, care la rândul ei clivează un fragment peptidic al precursorului plasmatic. Consecutiv clivării rezultă un fragment principal, al cărui situs de legare la membrană este astfel expus. 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 sistemului C este analoagă coagulării și fibrinolizei. Principala diferență constă în faptul că sistemul C este legat de *membrane* sau de *complexe imune* și în condiții fiziologice acționează local.

Proteinele căii clasice sunt numerotate cu cifre arabe de la 1 la 9 și se activează în secvența 1, 4, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9. Majoritatea lor sunt beta-globuline (beta 1, beta 2). Proteinele C sunt alcătuite din 1–2 lanțuri peptidice, reunite prin punți S–S, cu excepția lui C4 care are 3 lanțuri peptidice, iar C1q are o structură particulară, unică.

În calea clasică, complexul proteic C1 se leagă de complexe antigen-anticorp și devine o protează activă, ce clivează și activează C4 și C2. Se formează o enzimă complexă – C3 convertaza, care scindează specific C3.

Calea alternativă nu necesită prezența anticorpilor pentru activare. Unele substanțe, mai ales cele din peretele bacterian și fungic, învelișul unor paraziți, peplosul viral, activează un alt set de proteine serice, care la rândul lor clivează C3.

Stadiile finale sunt comune pentru ambele căi.

CALEA CLASICĂ DE ACTIVARE A COMPLEMENTULUI

Calea clasică de activare a sistemului C este inițiată de complexe Ag-Ac, care conțin o moleculă de IgM sau cel puțin două molecule de IgG (subclasele IgG₁ și IgG₃). IgA și IgE nu leagă C. Necesarul pentru două molecule de IgG, implică faptul că epitopii trebuie să fie foarte apropiați. Dacă epitopii sunt prea îndepărtați, C nu va fi activat, indiferent de numărul moleculelor de IgG legate.

Secvența de evenimente ale acestei căi cuprinde următoarele etape: a) *recunoașterea*; b) *activarea enzimatică*; c) *atacul membranar*.

Unitatea de *recunoaștere* a sistemului C este complexul C1, un agregat format din 3 proteine: C1q, C1r și C1s, asociate lax, necovalent, într-un complex cu Ca²⁺. C1q este o proteină de 400 kD, formată din 18 lanțuri peptidice, reunite în 3 subunități de câte 6 lanțuri fiecare. Fiecare subunitate este formată din două helice triple, în formă de Y, reunite la un capăt printr-o structură în formă de tijă, iar la capătul opus se termină printr-o conformație globulară, nehelicală.

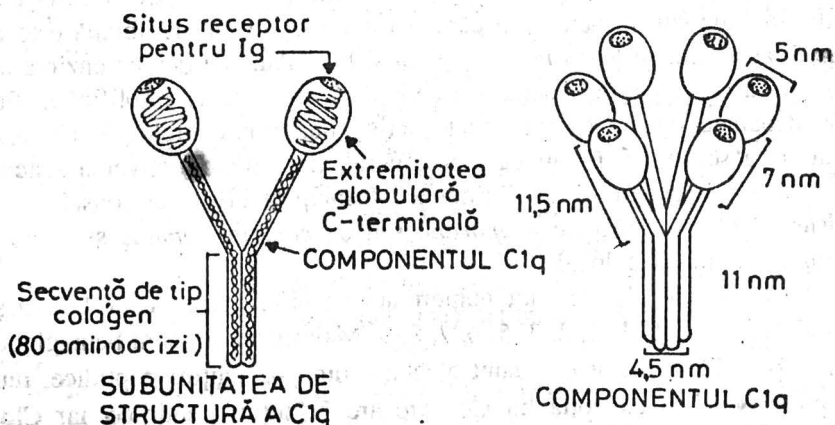


Fig. 78. Structura componentului C1q. Cele 18 catene peptidice sunt reunite în 3 subunități, fiecare formată din 6 catene. Fiecare subunitate este formată din două helixuri triple, reunite în Y la o extremitate și se termină cu un „cap” globulos, la nivelul căruia sunt situați receptori pentru legarea de segmentul Fc al imunoglobulinelor (după Roitt și colab., 1985),

Primii 80 aminoacizi care compun helicea fiecărui lanț triplu helix, conțin numeroase secvențe de tipul gly-x-y (prolină, izoleucină, hidroxilizină), foarte asemănătoare cu a fibrelor de colagen. La nivelul extremității globuloase se găsesc situsurile de legare cu molecula de imunoglobulină.

Faptul că legarea lui Clq necesită minimum două molecule de IgG implică obligativitatea ca determinanții antigenici să aibă o anumită densitate, pentru a permite apropierea suficientă a două molecule de IgG, care vor activa Clq. Legarea moleculelor de imunoglobulină în complexul imun, induce modificări conformaționale ale regiunii Fc, care va expune situsul de legare al lui Clq. Cantitatea Clq fixată crește în funcție de pătratul numărului de molecule de IgG și este proporțională cu concentrația IgM.

Clq nu are activitate proteazică. În prezența Ca^{2+} , Clq este asociat cu două catene Clr și două catene Cls. Mecanismul de activare al lui Clr și Cls nu este cunoscut. Ele sunt foarte asemănătoare (83 kD fiecare) și în treapta de clivare-activare, din fiecare rezultă două fragmente: ușor (27 kD) și greu (56 kD). Fragmentul ușor Clr are activitate serin-proteazică. Substratul acțiunii sale pare a fi Cls. Fragmentul mic rezultat din clivarea lui Cls interacționează cu următoarele două proteine ale C (C4 și C2), pe care le clivează.

Studiul căii clasice de activare a C s-a realizat pe complexul eritrocit-anticorp (EA). Activarea lui Cl se face după următoarea reacție globală: $\text{EA} + \text{Cl} + \text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{EACl}$ (EAClqrs).

Sistemul de activare enzimatică. Cls are activitate esterazică și clivează componenta C4 . C4 este alcătuit din 3 catene peptidice, legate prin punți S-S, notate alfa, beta și gama. Cls activat clivează un fragment mic N-terminal, de 9 kD (C4a), din lanțul alfa. Restul moleculei, C4b , relevă o punte tioester internă pe lanțul alfa și formează o legătură covalentă cu grupările NH_2 sau $-\text{OH}$ ale multor proteine. Clivarea are loc în plasmă. Mai puțin de 10% din moleculele de C4b se leagă de suportul activator, fie la complexul Clqrs , fie pe membrană într-un situs adiacent. Reacția globală este: $\text{EACl} + \text{C4} \rightarrow \text{EACl4b} + \text{C4a}$.

În prezența ionilor de Mg^{2+} , C4b din complexul EACl4b leagă C2 , pe care îl clivează în două fragmente. Cel mai mare, C2b (70 kD), rămâne legat pe C4b și formează complexul C4b2b , denumit *convertaza C3*. C2b din complexul EACl4b2b este relativ instabil ($T_{1/2} = 10 \text{ min la } 37^\circ$) și se disociază ca fragment inactiv, dar restul complexului (EACl4b) leagă și clivează altă moleculă de C2 și reface EACl4b2b ; $\text{EACl4b} + \text{C2} \rightarrow \text{EACl4b2b} + \text{C2a}$.

Clivarea lui C3 în calea clasică. $\overline{C4b2b}$ (C3 convertaza) dintr-un situs membranar adiacent sau din complexul $\overline{Clqrs4b2b}$ acționează asupra lui C3: $\overline{Clqrs4b2b} + C3 \rightarrow \overline{Clqrs4b2b3b} + C3a$.

C3-convertaza ($\overline{C4b2b}$) detașează un peptid de 9 kD de la extremitatea N-terminală a lui C3 și relevă un situs de legătură tisoestrică pe fragmentul mare C3b. Peptidul de 9kD este *anafilatoxina C3a*, iar C3b este principala *opsonină termolabilă* a serului. Fiecare unitate $\overline{Clqrs4b2b}$ clivează sute de molecule de C3, datorită concentrației sale plasmatice foarte ridicate. Majoritatea moleculelor de C3b rămân în plasmă și au rol *opsonizant*. Receptorii pentru C3b se găsesc pe toate celulele fagocitare (neutrofile, monocite, macrofage, eozinofile), dar și nefagocitare (eritrocite, epitelul glomerulului renal).

Moleculele opsonizante de C3b, prin situsul tioesteric se leagă la grupările-OH sau $-NH_2$ din membrana celulară, ori ale lanțului H al imunoglobulinei din complexe Ag-Ac.

Unele molecule de C3b se leagă la complexul $\overline{C4b2b}$, la situsul membranar și formează următoarea unitate catalitică, $\overline{C4b2b3b}$ (C5 convertaza), *care clivează C5*.

C3b clivează C5 într-un peptid de 15 kD, C5a (din lanțul alfa C5), iar restul este C5b. Ultimul se fixează pe membrana suport activatoare și inițiază formarea *complexului de atac membranar*. C5b liber este instabil și se agregă. Stabilitatea este conferită de complexarea cu C6. Reacțiile următoare ale căii implică formarea complexelor progresiv mai mari, fără ruperea legăturilor peptidice. Complexul $\overline{C5b6}$ este *hidrofil*. În prezența lui C7 rezultă complexul $\overline{C5b67}$, cu proprietăți amfifile: este *hidrofob* pentru că expune grupări apolare (nu formează legături de H cu moleculele de apă), prin care se leagă de fosfolipide și concomitent este hidrofil. Existența simultană a grupărilor hidrofobe și hidrofile în același complex poate explica tendința sa de polimerizare. În stare liberă, în soluție, $\overline{C5b67}$ este instabil (timp de înjumătățire de 0,1 s). Devine stabil prin inserția în dublul strat lipidic membranar și are proprietăți detergente.

La complexul $\overline{C5b67}$ se polimerizează C8 și C9 și rezultă un complex macromolecular ($\overline{C5b6789}$) de formă cilindrică, evidențiat la microscopul electronic, în membrana hematiilor. Complexul are o suprafață externă hidrofobă, un miez central hidrofil și reprezintă *complexul de atac membranar*. Esențiale pentru distrugerea celulei sunt moleculele de C9. Circa 18 astfel de molecule se leagă la un situs și formează canale transmembranare prin polimerizare. Aceste canale penetrează pe direcție perpendiculară, stratul lipidic al membranei și permit

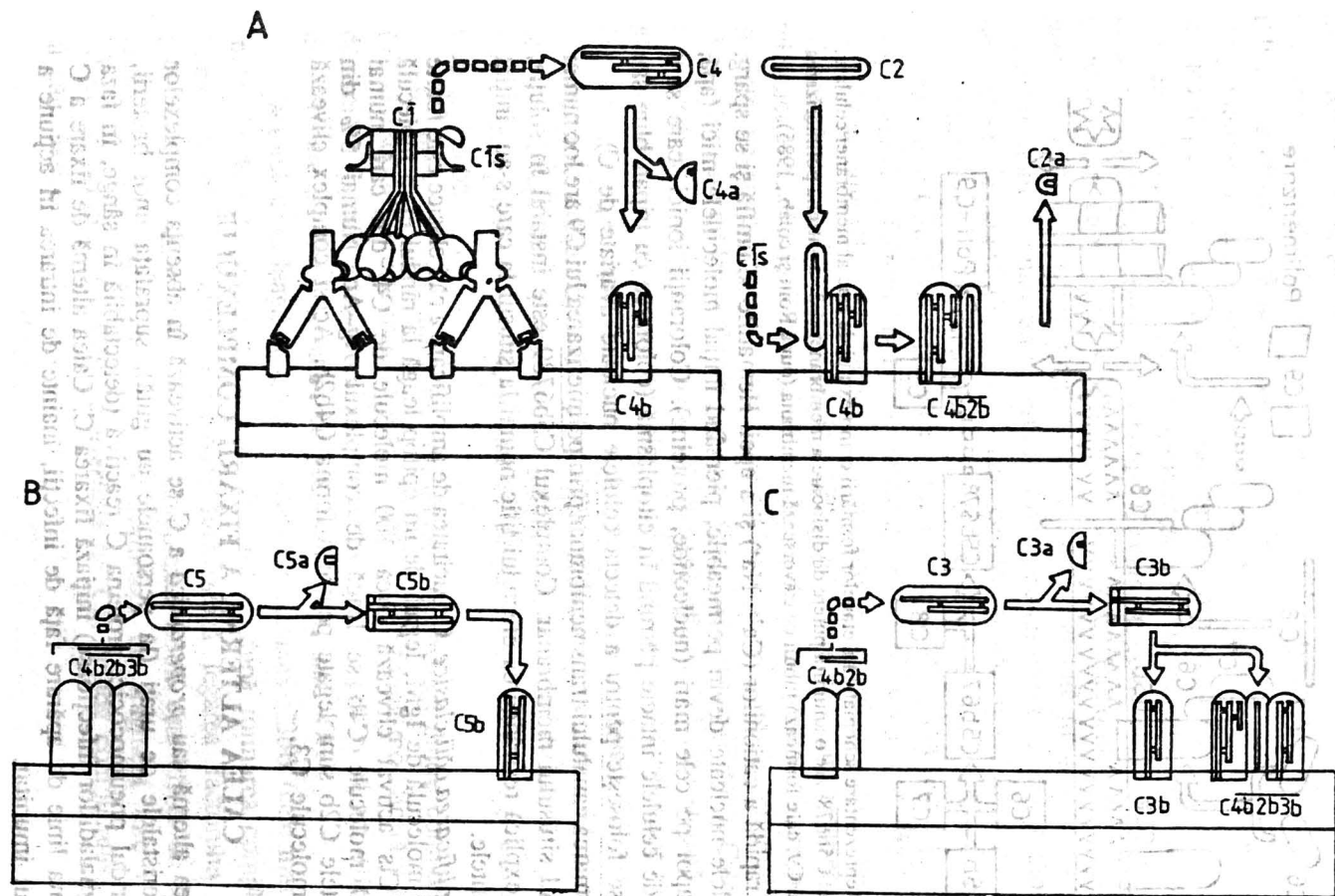


Fig. 79. A. Formarea C4b2b (convertaza lui C3 pe calea clasică). C1s clivează C4 și eliberează fragmentul C4a. C4b se leagă de membrana adiacentă. C2 din ser se asociază cu C4b și este clivat de C1s. Se eliberează C2a și se formează C4b2b.

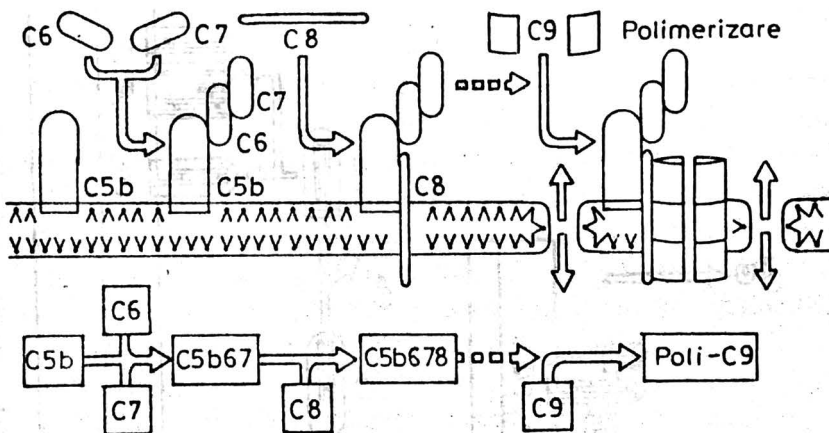


Fig. 80. Reprezentare schematică a etapelor formării complexului de atac al membranei celulare. Complexul C5b678 are o anumită putere de dislocare a membranei și de a antrenă polimerizarea lui C9, care formează tubuli ce traversează membrana (după Roitt și colab., 1985).

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 (apă, K^+) și apoi pe cele mari (nucleotide, proteine). Coloranții ionici, care sunt excluși de celulele intacte pătrund în citoplasmă (colorarea cu tripan blue sau eozină se folosește pentru a detecta celulele nucleate avariate de C).

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.

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 COMPLEXULUI

Calea alternativă sau *properdinică* a C se activează în absența complexelor imune: cristalele de urați (la persoanele cu gută), suprafața unor bacterii, polizaharidul pneumococic, proteina C reactivă (detectabilă în sânge, în faza acută a maladiilor infecțioase) inițiază fixarea C. Calea alternativă de fixare a C este prima linie de apărare față de infecții, 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 37° are loc activarea C și epuizarea sa din ser. La temperaturi mai mici, C nu a mai fost activat, dar serul își modifică proprietățile, fiindcă după separarea particulelor de *zimosan* prin centrifugare, C nu se mai activează. Concluzia a fost că *zimosanul* interacționează cu un factor din ser, chiar la temperatură inferioară activării C, care se poate elua de pe particule și restabilește capacitatea serului de a activa C. Factorul a fost denumit *properdină* (pro, perdere). Properdina a fost considerată mult timp ca un tip special de anticorpi naturali ai serului normal, cu un titru mic. Este o globulină de 150 kD, alcătuită din 3 subunități identice și are mobilitate gama.

Clivarea lui C3 în calea alternă. Secvența alternativă a activării C depinde de fragmentul C3b și de 3 proteine serice care nu participă la secvența clasică: properdina (P), factorul B (B) și factorul D (D). Este necesar Mg^{2+} .

Calea alternă este inițiată de diferite polizaharide (mai ales ale microorganismelor: *zimosan*, inulină, LPS ale bacteriilor Gram negative, acizii teichoici ai bacteriilor Gram pozitive), de suprafața bacteriilor (Gram pozitive și Gram negative), de unii paraziți, de moleculele agregate de anticorpi (chiar ai claselor care nu leagă C, IgG₄ agregat, IgA, fragmentele (Fab)₂). Calea 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 C, pentru că leagă și inactivează C3b și inhibă fixarea C).

C3 nativ, cu cea mai mare concentrație plasmatică dintre componentele C (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, formând un complex C3bB (cele mai multe molecule de C3b 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*, analog complexului C4b2b al căii clasice.

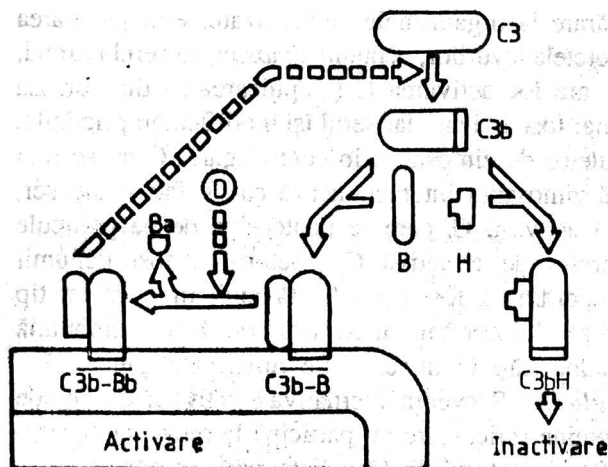


Fig. 81. Reprezentare schematică a căii alterne a fixării complementului. C3b și factorul B se asociază și formează complexul C3bB. Factorul B este clivat sub acțiunea proteazei D și rezultă C3bBb (convertaza lui C3) (după Roitt și colab., 1985).

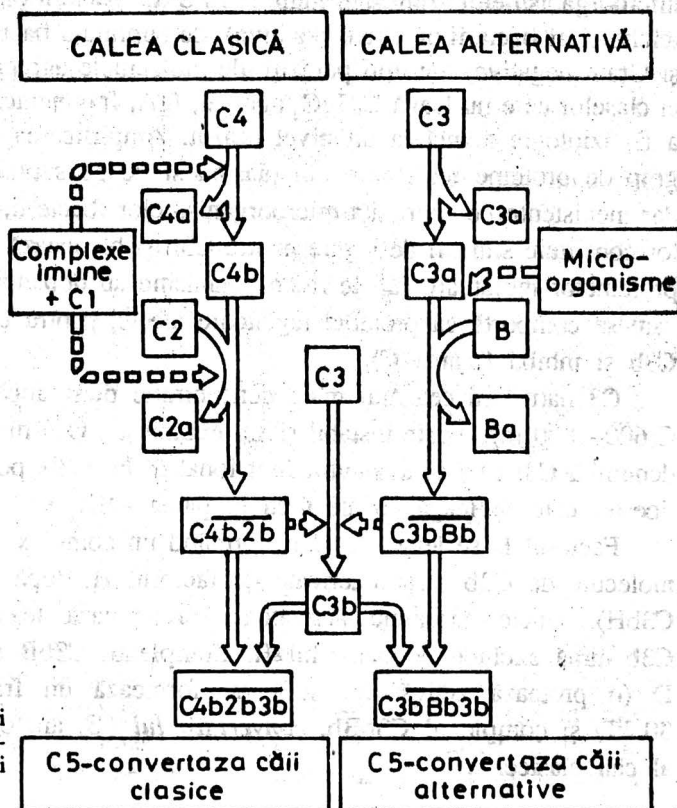


Fig. 82. Analogii și deosebiri între calea clasică și cea alternativă de activare a sistemului complement (după Roitt și colab., 1985).

$\overline{C3bBb}$ se disociază ușor și își pierde activitatea, dar prin legarea proteinei serice P se formează complexul $\overline{PC3bBb}$, relativ stabil, cu proprietăți proteolitice, care clivează C3 la aceeași legătură peptidică, ca și în calea clasică și eliberează aceleași fragmente, C3a și C3b.

Această cale se amplifică prin numărul mare de molecule de C3b care se leagă în jurul situsului în care C3b s-a fixat inițial. Ele captează un număr corespunzător de molecule B și formează mai multe complexe $\overline{PC3bBb}$ care scindează C3.

Este de subliniat faptul că C3b este atât componentă a complexului enzimatic, cât și produs al acțiunii sale.

Treptele ulterioare ale activității C sunt aceleași, descrise la calea clasică. Enzimele de clivare ale lui C3 ($\overline{C4b2b}$ în calea clasică, sau $\overline{PC3bBb}$ din calea alternativă) se combină cu una sau mai multe molecule de C3b și formează convertazele lui C5.

FUNCȚIILE SISTEMULUI COMPLEMENT

Componentele sistemului C realizează 3 categorii de funcții esențiale:

- a) *citoliza* (liza celulelor eucariote și bacteriene) și liza virusurilor învelite;
- b) *opsonizarea*, proces care implică învelirea celulelor străine cu fragmente proteice ale sistemului C și facilitarea ingestiei lor de către celulele fagocitare;
- c) *activarea celulară* reunește efecte generate de peptide ale activării C, care determină degranulara mastocitelor, migrarea unor celule mobile în focarul de inflamație, precum și intensificarea și inhibiția răspunsului imun.

Efectul litic al activării sistemului C s-a studiat asupra hematiilor de berbec, foarte sensibile la acțiunea anticorpilor specifici și a C. Pe suprafața eritrocitului de berbec se găsesc antigenele Forssman, de natură lipopolizaharidică, foarte răspândite în natură (bacterii, plante, unele animale). Ele lipsesc în țesuturile de iepure și de aceea, după injectarea hematiilor se formează anticorpi cu titru înalt. Sursa de sistem C este cobaiul. Gradul de liză al hematiilor se măsoară prin determinarea spectrofotometrică a intensității culorii hemoglobinei. Proporția hematiilor lizate, după sensibilizarea cu o doză subaglutinantă de anticorpi crește odată cu cantitatea de C adăugat în reacție. *Unitatea hemolitică* a C se definește ca fiind cantitatea care lizează 50% din hematiile sensibilizate, în condiții standardizate (densitatea hematiilor, concentrația și titrul anticorpilor, forța ionică, pH solventului, concentrația Mg^{2+} , Ca^{2+} , temperatura).

În cazuri patologice (hemoglobinuria paroxistică nocturnă), activarea C are loc *in vivo*. Hematiile se comportă ca o suprafață activatoare, inițiind fixarea C pe calea alternativă și liza, prin activarea componentelor terminale ale C.

IgG anti Rh nu lizează hematiile în prezența C, probabil datorită distanței prea mari între determinanții antigenici ai suprafeței eritrocitului.

Bacteriile Gram negative, învelite cu anticorpi pot fi lizate de C prin aceeași secvență de reacții ca și hematiile. Bacteriile Gram pozitive și micobacteriile sunt rezistente, probabil datorită structurii peretelui celular, deoarece protoplasții lor sunt lizați de C.

In vivo, activarea C, în exces de complexe imune circulante produce avaria celulelor sau favorizează procesele inflamatorii.

Efectul *opsonizant* al activării C este rezultatul formării unui număr mare de molecule de C3b, neimplicate în complexul C4b2b3b sau PC3bBb. Ele formează o pătură moleculară opsonizantă pe celula țintă, ușurând aderența ei de receptori pentru C3b ai fagocitelor. Formarea unei pelicule de C3b pe celula țintă este probabil una din cele mai importante funcții biologice efectoare ale cascadei de activare a C. Receptori pentru C3b se găsesc și pe suprafața unor celule nefagocitare: limfocitele B, o subpopulație a limfocitelor T, dar o importanță deosebită au receptori de pe suprafața hematiilor (la primat) și a plachetelor (la neprimat). Receptori pentru C3b au rol în transportul complexelor Ag-Ac-C, la ficat și splină, în special pe suprafața hematiilor. Legarea complexelor imune pe hematii este esențială pentru eliminarea lor. Diminuarea activității receptorilor hematice pentru C3b are ca efect persistența complexelor imune în circulație, depozitarea lor în rinichi și plămâni, însoțită de manifestări patologice. Mecanismul de clearance mediat de receptorul pentru C3b, probabil a evoluat pentru a elimina cantități mari de complexe Ag-Ac-C ce se formează în unele infecții.

ANAFILATOXINELE

Reacțiile inflamatorii se generează în imediata vecinătate a complexelor imune care fixează C și rezultatul este creșterea concentrației locale de proteine serice (imunoglobuline și complement) și a densității leucocitelor (fagocite activate).

Clivajul lui C3 și C5 sub acțiunea convertazelor corespunzătoare eliberează două peptide, C3a și C5a, de la extremitatea N-terminală a lui C3 și respectiv a lui C5. Efectele lor sunt diverse, dar în esență sunt anafilatoxine. Termenul *anafilatoxină* derivă din faptul că, cobaii suferă șocul fatal, asemănător anafilaxiei, după injectarea unui ser normal, care a fost incubat cu variate substanțe

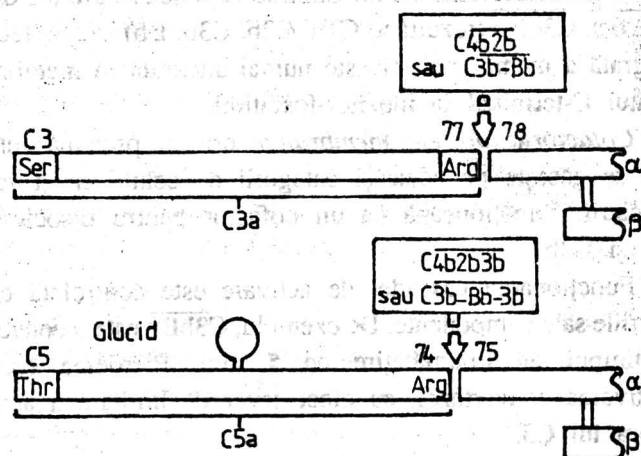
activatoare ale C, pe una sau alta din căi (inulină, complexe Ag-Ac, talc). Efectul s-a atribuit anafilatoxinelor, care se cunosc a fi fragmentele C4a, C3a, C5a, clivate din C4, C3 și respectiv din C5.

C4a, C3a și C5a sunt similare ca structură: C3a și C4a au 77 aminoacizi, iar C5a are 74 aminoacizi. Toate, la capătul carboxi-terminal au arg.

C3a produce contracția musculaturii netede în unele organe. Determină eliberarea histaminei din mastocite (histamina este vasoconstrictoare în prima fază și mărește permeabilitatea capilară cu producere de edeme; în faza a II-a produce vasodilatație periferică și scăderea brutală a tensiunii arteriale). C3a este repede inactivată în umorile organismului, sub acțiunea carboxipeptidazei B, care clivează arg. Se cunoaște secvența aminoacizilor săi, iar activitatea biologică pare să rezide în octapeptidul C-terminal care conține arg. Injectarea C3a în tegumentul uman inițiază un răspuns prompt, care imită reacția de hipersensibilitate imediată (indurare și eritem), iar efectul este blocat de medicamente antihistaminice.

C5a este de 10-20 ori mai activă decât C3a și are activități biologice mai extinse, dar eficacitatea sa *in vivo* este mai redusă, deoarece numărul moleculelor de C5a formate în cascada de activare este mult mai mic decât al moleculelor C3b. C5a este factorul major al chimiotactismului pentru neutrofile: determină migrația lor în vase și neutropenie circulatorie; activează neutrofilele, declanșând intensificarea metabolismului cu creșterea captării glucozei și a producerii H_2O_2 , cu efect bactericid; intensifică producerea leucotrienelor de către neutrofile (în special LT B4), care prelungește faza de permeabilitate crescută indusă de C5a; antrenează degranularea mastocitelor, contractă musculatura netedă, iar proprietățile sale persistă în restul peptidic după scindarea arg.

Fig. 83. Anafilatoxinele cascadei de activare a complementului, C3a și C5a, rezultate prin clivarea enzimatică a lui C3 și respectiv a lui C5, pe ambele căi, sub acțiunea corespunzătoare. La extremitatea COOH, ambele anafilatoxine au restul arg (după Roitt și colab., 1985).



PROTEINE REGLATOARE ALE ACTIVITĂȚII SISTEMULUI C

Extinderea excesivă a activității C este controlată de un set de 7 proteine reglatoare: 5 proteine ce inactivează complexe C în soluție și două proteine de membrană ce inactivează complexe C pe celulele normale. Aceste proteine acționează în principal, prin inhibarea formării, prin accelerarea degradării sau prin inactivarea lui C3b și a convertazelor lui C3 și C5.

Activitatea enzimatică a lui C1r și C1s este reglată de un inhibitor al esterazei C1 (CI-INH). CI-INH inhibă activarea în faza fluidă a lui C1, când acesta nu este asociat cu complexe Ag-Ac, rezultatul fiind disocierea rapidă a lui C1r și C1s de C1q.

Proteina de legare cu C4b(C4bp) se leagă cu C4b și acționează ca un cofactor al proteazei serice (factorul I), care degradează C4b.

Factorul I este o serin protează care clivează și inactivează C4b și C3b, dar numai în prezența cofactorilor C4bp și H.

Factorul H este elementul cheie care controlează funcționarea căii alterne. El reglează asocierea dintre C3b și factorul B. Formarea complexului C3bH blochează legarea factorului B. Factorul H disociază complexul C3bBb.

Factorul H se cuplează cu C3b în oricare din localizările sale, dar în special cu C3b liber în faza fluidă.

Proteina inactivatoare S se combină cu complexe $\overline{C5b67}$ în soluție și blochează inserția lor în membrana celulară. Complexul format ($\overline{C5b67S}$) poate să interacționeze cu C8 și C9, dar nu mai are efect litic.

Proteine reglatoare asociate membranei celulare. Pe suprafața tuturor celulelor sanguine și a altor categorii de celule se găsește *factorul accelerator al disocierii* celor două convertaze ale lui C3. Sub acțiunea sa are loc disocierea complexelor $\overline{C4b2b}$ și $\overline{C3bBb}$ (rezultând C4b, C2b, C3b, Bb). Acest factor nu este o proteină integrală a membranei, ci este numai ancorată în membrană, prin atașarea cu capătul C-terminal la inozitol-fosfatidil.

Cofactorul proteic membranar este o proteină integrată în membrană care se găsește pe aceleași categorii de celule ca și factorul accelerator al disocierii. Funcționează ca un cofactor pentru disocierea proteolitică a lui C4b și C3b.

Funcționarea cascadei de activare este controlată chiar de unele dintre propriile sale componente. De exemplu, $\overline{C3bBb}$ este o convertază relativ instabilă, cu timpul de înjumătățire de 5 min. Pierderea factorului Bb produce inactivarea convertazei, cu efect sever de limitare a amplificării căii alterne asupra lui C3.

EPUIZAREA EXPERIMENTALĂ A COMPLEMENTULUI SERIC

Diminuarea nivelului complementului plasmatic, la animale se realizează prin injectarea complexelor Ag-Ac formate *in vitro*. Injectarea 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 cobră (*Naja naja*). Componenta activă a veninului de cobră (140 kD) este omologă, din punct de vedere funcțional cu C3b, dar este diferită structural de acesta și este rezistentă la activitățile inhibitoare care se exercită în mod normal asupra lui C3b. Deoarece funcționează ca C3b, factorul din veninul de cobră (CoF) interacționează cu factorul B și activează calea alternativă. Se formează un complex stabil, PCoFBb, cu funcție de convertază a lui C3. C3b eliberat formează o cantitate mare de PC3bBb, alimentând astfel bucla de amplificare a convertazei C3. Astfel C3 este eliminat eficient pentru 4-96 ore.

Un efect similar, de stabilizare a căii alterne de activare a C îl are *factorul nefritic* (autoanticorpi din subclasa IgG3, anti complex enzimatic C3bBb). Factorul stabilizează complexul C3bBb, blocând înlocuirea factorului B de către factorul H. Consecința este o hipocomplementemie profundă a lui C3, generată printr-un mecanism autoimun.

BIOSINTEZA COMPONENTELOR SISTEMULUI COMPLEMENT

Aproape toate componentele C 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 lor fiind epitelul 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 funcționale fără să influențeze concentrația C seric. Sinteza acestor componente se intensifică în macrofagele activate în procesele inflamatorii.

Deficiențele de biosinteză ale componentelor sistemului C sunt asociate cu stări patologice, rezultate din diminuarea capacității de eliminare a complexelor imune.

Deficiența sintezei C1qrs sau 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 sensibilitate crescută la infecții.

ROLUL COMPLEMENTULUI ÎN APĂRAREA ANTIINFECȚIOASĂ BACTERIANĂ

Bacteriile Gram pozitive și Gram negative activează calea alternativă a fixării C în absența anticorpilor specifici. Moleculele LPS din structura peretelui celulelor Gram negative sunt principalii receptori de C3b și activează calea alternativă. Moleculele de C3b legate pe o suprafață activatoare au o afinitate mai mare de interacțiune cu factorul B. Principalul component activator al căii alterne a C, la bacteriile Gram pozitive este peptidoglicanul.

Materialul capsular polizaharidic al bacteriilor patogene Gram pozitive și Gram negative, în general este ineficient pentru fixarea C, datorită conținutului său ridicat în acid sialic. Acidul sialic al suprafeței eritrocitare are funcții reglatoare asupra activității C, măbind afinitatea de legare a factorului H pe C3b legat de eritrocite. Efectul pare a fi similar în cazul acidului sialic din polizaharidul capsular. Imposibilitatea polizaharidelor capsulare de a activa calea alternativă a fixării C este cel mai important mecanism prin care bacteriile capsulate evită atacul fagocitelor. Calea alternativă este activată de molecule subcapsulare, atât la bacteriile Gram pozitive, cât și la cele Gram negative.

Activarea C este inițiată de interacțiunea componentelor sale cu *proteina C reactivă*. Aceasta este un pentamer (sau hexamer) de 115 kD, care se leagă cu mare afinitate de fosforil-colină. Fosforil-colina este un component major al acizilor teichoici din peretele celulelor Gram pozitive. Legarea proteinei C reactive de suprafețele celulare care conțin fosforil-colină determină activarea căii clasice și alterne a fixării C.

Fibronectina se poate lega de suprafața unor bacterii (streptococi, stafilococi), având rol de opsonină, dar se găsește și pe suprafața macrofagelor. Fibronectina are afinitate pentru Clq, ceea ce ar putea oferi o capacitate opsonizantă superioară acestei molecule.

Complementul este activat de anticorpi specifici și efectul este liza celulei bacteriene. Acești anticorpi se numesc bactericizi și aparțin izotipurilor IgM și IgG. Anticorpii bactericizi au specificitate față de proteinele membranare, polizaharidele capsulare, sau față de determinanții repetitivi O ai LPS. Anticorpii față de structurile care se extind la o distanță relativ mare în raport cu suprafața celulei bacteriene (fimbrii, flageli) nu au efect bactericid, deoarece activarea C este inițiată la o distanță prea mare de structurile de suprafață (membrana

externă a bacteriilor Gram negative). Pentru ca efectul litic să aibă loc, trebuie să se producă lezarea ireversibilă a membranei externe și a stratului peptidoglicanic. Avaria membranei externe deschide calea lizozimului seric, la stratul subțire de peptidoglican situat sub membrana externă. Digestia peptidoglicanului sub acțiunea lizozimului este suficientă pentru a determina liza osmotică a celulei bacteriene. Dacă celula se află într-un mediu protejat osmotic, solubilizarea peptidoglicanului expune membrana citoplasmatică, complexului de atac membranar al C (C5b–C9). Se pare că aceste componente se inseră la situsurile de apozitie între membrana internă și cea externă (joncțiunile lui Bayer), unde peptidoglicanul lipsește. Astfel, complexul de atac membranar are acces direct la membrana citoplasmatică. Dovada indirectă a acestui mecanism de acțiune constă în faptul că celulele în faza de creștere logaritmică sunt mai sensibile la efectul litic al C.

Unele bacterii Gram negative și toate bacteriile Gram pozitive pot să-și păstreze viabilitatea în condițiile activării C. Atributul rezistenței la factorii serici este un factor de virulență al bacteriilor Gram negative, care se comportă ca proteină reglatoare a C: inactivează C3b.

Bacteriile sero-rezistente determină bacteriemii cu o frecvență mai mare, deoarece supraviețuiesc factorilor serici. Ele provoacă mai frecvent infecții profunde ale tractului urinar (pielonefrite), față de liniile sensibile la factorii litici ai serului, care provoacă o bacteriurie asimptomatică sau o cistită.

Tulpinile de *Neisseria* sunt exemple ilustrative ale raportului dintre rezistența la factorii serici și virulență. Toate tulpinile care produc bacteriemii sunt serorezistente, iar *N. gonorrhoeae* care provoacă infecții genitale localizate și *N. meningitidis* care colonizează mucoasele sunt sensibile la componentele serice.

Structurile bacteriene care determină rezistența la factorii serici sunt, în primul rând, moleculele de LPS întregi, care posedă lanțurile polizaharidice O laterale. Celulele care sintetizează polizaharidul O sunt variantele virulente care formează colonii S. Mutantele care cresc sub forme coloniale R, cu LPS incomplete sunt sensibile la factorii serici. Variantele coloniale S fixează C, dar complexul de atac membranar nu reușește să avarieze membrana externă sau pe cea internă. Cel mai adesea, activarea C este inițiată de moleculele LPS, cu lanțuri laterale polizaharidice lungi, la o distanță prea mare de domeniul hidrofob al membranei externe și astfel efectul bactericid nu se produce.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. BACH J. F., 1976 – *Imunologie, Flammarion Medicine Science*, Paris VI.
2. CLARK E. A., P. J. LANE, 1991 – *Regulation of Human B cell activation and adhesion* – Ann. Rev. Immun., 9, 97–127.
3. DOHERTY P. C., 1980 – *Surveillance of self: CMI to virally modified cell surface defined operationally by the MHC* – *Progress in Immunology*, Ed. M. Fougereau and J. Dausset, Acad. Press.
4. EWYK VAN W., 1991 – *T-cell differentiation is influenced by thymus microenvironments* – Ann. Rev. Immun., 9, 591–615.
5. FAUVE R. M., 1980 – *Inflammation and natural immunity*, in vol. *Progress in Immunol.*, Ed. M. Fougereau and J. Dausset, Acad. Press.
6. GREY H. M., A. SETTE, S. BUNS, 1989 – *How T cell see Antigen*, Sci. Amer. Nov.
7. HOOD L. E., I. L. WEISSMAN, W. B. WOOD, J. H. WILSON, 1984 – *Immunology*, The Benjamin Cummings Publ. Co. Inc., Menlo Park, California.
8. KLEBANOFF S. J., 1979 – *Oxygen dependent antimicrobial system of the neutrophil* – Microbiology, Ed. D. Schlessinger.
9. LEDER P., E. E. MAX, J. G. SEIDMAN, 1980 – *The organization of Ig genes and the origin of diversity*, *Fourth Congress of Immunol.*, Ed. M. Fougereau and J. Dausset, Acad. Press.
10. LE MINOR L., M. VERON, 1991 – *Bacteriologie Medicale, Flammarion Medicine Sciences*.
11. MALE D., B. CHAMPION, ANNE COOKE, 1987 – *Advanced Immunology*, J. B. Lippincott Company.
12. MC CORMACK W. T., L. W. TJOELKER, C. B. THOMPSON, 1991 – *Avian B cell development* – Ann. Rev. Immun., 9, 219–241.
13. MIDDLEBROOK J. L., DORLAND R. B., 1984 – *Bacterial Toxins. Cellular Mechanisms of action*, Micr. Rev., 48, 3, 419–443.
14. MILSTEIN C., M. R. CLARK, G. GALTRE, A. CUELLO, 1980 – *Monoclonal Antibodies from Hybrid Myelomas*, in vol. *Progress in Immunology*, Ed. M. Fougereau and J. Dausset, Acad. Press.
15. MURPHY B. R., R. M. CHANOCK, 1991 – *Immunization against Viruses*, in vol. *Fundamental Virology I*, Eds. Fields B. N., D. M. Knipe, Raven Press, Ltd., New York.
16. MOGENSEN S. C., 1979 – *Role of Macrophages in natural resistance to Virus infections*, Micr. Rev., 43, 1, 1–26.
17. NEVEU P. J., 1986 – *The Mononuclear Phagocyte System*, Bull. Inst. Pasteur, 84, 23–66.
18. OLINESCU A., LUCIA ANDRIEȘ, 1992 – *Compendiu de Imunologie fundamentală*, Editura Știința Chișinău.

19. ROITT I. M., J. BROSTOFF, D. MALE, 1985 – *Immunologie fondamentale et appliquée, Medecine et Sciences Internationales*, Paris.
20. ROTHBARD J. B., M. L. GEFTER, 1991 – *Interactions between Immunogenic peptides and MHC proteins* – *Annu. Rev. Immun.*, 9, 527–565.
21. SELA M., 1969 – *Antigenicity. Some molecular Aspects*. *Science*, 166, 1365.
22. SHARON N., HALINA LIS, 1993 – *Carbohydrates in cell Recognition*, *Sci. Amer.*, 268, January.
23. SMITH A. K., 1990 – *Interleukin-2*. *Sci. Amer.*, 265, March.
24. STARR M. P., H. STOLP, H. G. TRUPER, A. BALOWS, H. G. SCHLEGEL, 1981 – *The Prokaryotes*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
25. STEINMAN M. R., 1991 – *The dendritic Cell System and its role in Immunogenicity*, *Ann. Rev. Immun.*, 9, 591–615.
26. VITETTA S. ELLEN, M. T. BERTON, C. BURGER, M. KEPRON, W. T. LEE and XIAO MING YIN, 1991 – *Memory B and T cells*, *Ann. Rev. Immun.*, 9, 193–217.
27. ZARNEA G., 1970 – *Microbiologie generală*, Editura Academiei R.S.R.
28. ZARNEA G., 1990 – *Tratat de Microbiologie generală, vol. IV Imunobiologie*, Editura Academiei Române.



Tiparul s-a efectuat sub c-da nr. 76/1994
la Tipografia Editurii Universității București

DATA RESTITUIRII

3 MAR. 2009	04 MAI 2012	
20 MAI. 2007	19 FEB. 2013	
	15 DEC. 2013	
<u>16 IUN. 2009</u>		
13. NOV. 2008		
5 FEB. 2009		
13 IAN. 2011		
<u>13 IAN. 2011</u>		

ISBN 973-9160-37-9

Lei 31