

**Imunogenetica : [de] N. Pozsgi [și] Gr. Ghyka / [N. Pozsgi].**

**Contributors**

Pozsgi, N.  
Ghyka, Gr.

**Publication/Creation**

București : Editura Academiei Republicii Socialiste România, 1974.

**Persistent URL**

<https://wellcomecollection.org/works/dkhq67tm>

**License and attribution**

You have permission to make copies of this work under a Creative Commons, Attribution, Non-commercial license.

Non-commercial use includes private study, academic research, teaching, and other activities that are not primarily intended for, or directed towards, commercial advantage or private monetary compensation. See the Legal Code for further information.

Image source should be attributed as specified in the full catalogue record. If no source is given the image should be attributed to Wellcome Collection.



Wellcome Collection  
183 Euston Road  
London NW1 2BE UK  
T +44 (0)20 7611 8722  
E [library@wellcomecollection.org](mailto:library@wellcomecollection.org)  
<https://wellcomecollection.org>

N. POZSGI ♦ Gr. GHYKA

# IMUNOGENETICA



IMUNOGENETICA

POZSGI

Monografia „IMUNOGENETICA” înmănunchează în ansamblu problemele rezultate din întrepătrunderea a două discipline considerate astăzi drept fundamentale, și anume, imunologia și genetica.

În acest cadru își găsesc locul diverse aspecte cum ar fi: recunoașterea macromoleculilor și celulelor străine de către organismele vii, precum și determinismul genetic al acestor procese de recunoaștere; de asemenea, controlul genetic al biosintezei anticorpilor, precum și diversele ipoteze ce caută să explice cum reușește un anumit organism să sintetizeze anticorpi specifici față de un număr atât de mare de antigene diferite.

Autorii au luat în considerare numeroasele etape ale răspunsului imun ce recunosc un control genetic, precum și perturbările ce pot apărea la nivelul acestor etape.

Defectele genetice în sinteza imunoglobulinelor sau în biosinteza complementului, ca și baza genetică a proceselor de autoagresiune, reprezintă alte probleme tratate care caută să explice mecanismul de producere a unor boli umane sau animale, cu alterări ale reacțiilor imune.

Lucrarea interesează atât pe imunologi, cât și pe cei ce se ocupă de genetică. Ea se adresează atât biologilor, cât și medicilor umani sau veterinari de diferite specialități — deopotrivă medicilor de laborator și clinicienilor specialiști în medicină internă sau în bolile contagioase.

207 F



22900375217

M. POLSKI

IMUNOGENETICA

IMUNOGENETICA



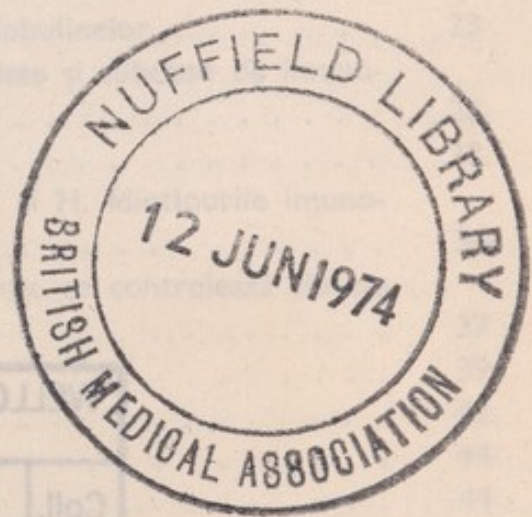
EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMANIA  
BUCURESTI, 1974



N. POZSGI

GR. GHYKA

# IMUNOGENETICA



EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA  
BUCUREȘTI, 1974

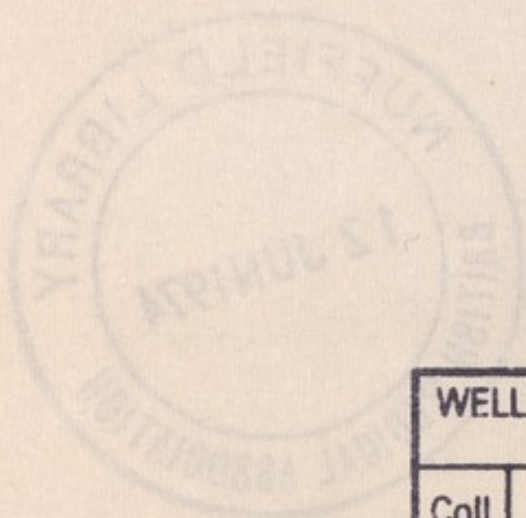
14422659

GR. GHYKA

Coperta de: *Ionel Vasile*

N. POZSGI

IMUNOGENETICA



WELLCOME INSTITUTE LIBRARY	
Coll.	welM0mec
Call	
No.	QW

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA  
str. Gutenberg nr. 3 bis, Sectorul 6, București



## CUPRINS

	<u>Pag.</u>
Introducere . . . . .	7
<i>Capitolul I</i>	
<b>Recunoașterea imunologică și determinismul ei genetic . . . . .</b>	<b>9</b>
<i>Capitolul II</i>	
<b>Determinismul genetic al imunoglobulinelor . . . . .</b>	<b>23</b>
Generalități asupra structurii imunoglobulinelor . . . . .	23
Variațiile regiunii C a lanțurilor H. Clase și subclase de imunoglobuline . . . . .	28
Variațiile regiunii C a lanțurilor L . . . . .	32
Regiunile variabile (V) ale lanțurilor L și H. Idiipurile imunoglobulinelor . . . . .	34
Evoluția filogenetică a sistemului genetic ce controlează sinteza imunoglobulinelor . . . . .	37
Alotipurile imunoglobulinelor umane . . . . .	39
Sistemul <i>Inv</i> . . . . .	42
Sistemul <i>Am</i> . . . . .	44
Sistemul <i>Gm</i> . . . . .	44
Sistemul <i>ISf</i> . . . . .	52
Biosinteza imunoglobulinelor . . . . .	53
Ipoteze asupra mecanismului prin care se realizează diversificarea specificității de antigen a situsului combinativ . . . . .	64
<i>Capitolul III</i>	
<b>Interacțiuni celulare în cursul elaborării răspunsului imun. Rolul posibil al acizilor nucleici în medierea acestor interacțiuni . . . . .</b>	<b>85</b>
Necesitatea interacțiunii dintre macrofage și celulele seriei limfoplasmocitare, în cursul elaborării răspunsului imun . . . . .	86
Rolul macrofagelor în stimularea răspunsului imun . . . . .	90
Interacțiuni între celulele imunologic competente în cursul elaborării răspunsului imun . . . . .	97

<i>Capitolul IV</i>	
Controlul genetic al reactivității imune față de diferite antigene . . . . .	111
<i>Capitolul V</i>	
Defecte genetice în sinteza imunoglobulinelor . . . . .	129
<i>Capitolul VI</i>	
Baza genetică a proceselor de autoagresiune . . . . .	146
<i>Capitolul VII</i>	
Deficiențe ereditare ale complementului . . . . .	154
Deficiențe ale sistemului complement la om . . . . .	157
Modificări genetic determinate ale complementului la animale . . . . .	162
<i>Capitolul VIII</i>	
Imunitatea de transplantare . . . . .	168
<i>Capitolul IX</i>	
Baza genetică a rezistenței naturale față de agenții infecțioși . . . . .	184
Immunogenetics (Summary) . . . . .	199

## Introducere

Imunogenetica reprezintă un domeniu foarte tânăr al biologiei, rezultat din întrepătrunderea preocupărilor de imunologie cu acelea privind aspectele geneticii formale sau ale celei moleculare. Pe de o parte, aceasta reprezintă rezultatul unor necesități de ordin practic, iar pe de altă parte a fost determinată de cercetările fundamentale asupra mecanismelor imunității.

În ceea ce privește necesitățile de ordin practic, acestea sînt nenumărate și, pentru a nu enumera decît cîteva, cităm observațiile care au arătat că receptivitatea la boli infecto-contagioase, grupele sanguine, antigenele țesuturilor utilizate în transplantare sau bolile de autoagresiune variază între diferite grupe de indivizi, fiind controlate genetic.

Importanța acestor constatări, precum și a studiilor aprofundate întreprinse rezultă limpede pentru nenumărate discipline din medicina umană — de la medicina internă, clinica bolilor infecto-contagioase și pînă la medicina legală.

Pe de altă parte, cercetările fundamentale asupra mecanismelor prin care este elaborat răspunsul imun au pus în evidență de asemenea multiple mecanisme genetice ce controlează acest răspuns la nivel celular.

Controlul alotipurilor imunoglobulinelor, interacțiunile celulare apărute în cursul reacțiilor imune, diferențierea, precum și diversificările celulare care explică variabilitatea acestor reacții au reclamat sau reclamă încă cercetări aprofundate de genetică, singurele în măsură să dea o explicație acestor mecanisme deosebit de importante pentru biologia organismelor.

Toate aceste considerente ne-au determinat să prezentăm o lucrare care să trateze despre problemele de graniță dintre imunologie și genetică, care — într-un cuvînt — alcătuiesc imunogenetica.

În alcătuirea planului de expunere a acestor probleme am căutat să respectăm o ordine firească, care începe cu nivelul mole-

cular al proceselor imune, discută apoi interacțiunile celulare apărute în cursul acestor procese și se termină cu considerații asupra controlului genetic al răspunsurilor imune la indivizi sau la grupe de indivizi.

Multitudinea problemelor care se încadrează în domeniul imunogeneticii și volumul imens al lucrărilor publicate în literatură ne determină, încă din primul moment, să precizăm că orice tentativă de epuizare a materialului bibliografic și problematic ar fi fost imposibilă.

Am căutat, prin urmare, să enunțăm problemele de bază dezbătute în cadrul imunogeneticii și să schițăm doar planul lor general de abordare.

Considerăm deci, lucrarea drept un început de drum, merit să acopere un gol existent în literatura medicală din țara noastră.

Sperăm că ea va folosi unui cerc cât mai larg de biologi și medici umani sau veterinari.

## Recunoașterea imunologică și determinismul ei genetic

Pătrunderea macromoleculor sau a celulelor străine în organisme vertebrate induce modificări ale reactivității celulare, urmată la rândul ei de un răspuns imun specific.

Aspectul cel mai impresionant al răspunsului imun, așa după cum au atras atenția pentru prima oară Burnet și Fenner (1949), este proprietatea celulelor implicate în acest răspuns de a discrimina propriul de străin.

Recunoașterea compușilor proprii (self) și deci, implicit, delimitarea lor strictă de compușii străini (nonself) asigură homeostazia unui anumit organism, permițând acestuia să răspundă în mod adecvat, prin declanșarea răspunsului imun, numai față de compușii nonself. Orice perturbare a acestei stricte delimitări ar duce fie la un răspuns imun, neadecvat, față de macromoleculele proprii, deci la autoagresiune, fie, dimpotrivă, la lipsa unei reacții imune de apărare față de macromoleculele străine, care pătrunzând în mediul intern al organismului perturbă homeostazia acestuia.

Capacitatea de recunoaștere a materialului străin nu este limitată însă numai la celulele interesate în răspunsul imun la vertebrate, ci merge foarte departe în filogenie, pînă la ființele unicelulare și metazoarele primitive (Bona și Ghyka, 1968).

Recunoașterea reprezintă o funcție biologică mult mai generală, proprie tuturor celulelor animale, inclusiv ființelor unicelulare, prin care se asigură homeostazia atît la nivel intracelular, cît și la nivel de macroorganisme, față de acțiunea „dezorganizatoare” a macromoleculor și celulelor din mediul înconjurător.

În acest sens, considerăm că în procesul biologic de recunoaștere pot fi deosebite mai multe categorii :

1. Recunoașterea „metabolică” existentă la toate tipurile de celule, legată de procesul de captare a materialului plastic sau biologic activ, „potrivit”, conform caracteristicilor metabolice ale

fiecărei celule. Acest tip de recunoaștere asigură menținerea homeostaziei intracelulare în raport cu tipurile și cantitatea de macromolecule „potrivite” captate.

2. Recunoașterea celulelor străine prin contact intercelular.

3. Recunoașterea la nivelul fagocitelor, legată de procesul de captare a materialului străin, particulat sau macromolecular.

4. Recunoașterea imunologică la nivelul celulelor imunologic competente.

**Recunoașterea metabolică.** Acest tip de recunoaștere poate fi considerat ca forma cea mai primitivă de discriminare legată de captarea materialului biologic cu rol plastic sau energetic, esențial pentru existența unei celule, indiferent dacă este vorba de o ființă unicelulară sau dacă celula intră în constituția unui organism. Acest proces se realizează în cursul endocitozei, care implică discriminarea între substanțele „potrivite” cerințelor nutritive și biologice conforme cu metabolismul celular și cele „nepotrivite”, asigurând homeostazia intracelulară. Această proprietate are drept consecință specificitatea procesului de captare care poate îmbrăca două aspecte :

a) *Discriminarea calitativă*, în sensul captării unei singure substanțe dintr-un amestec de mai mulți compuși. Astfel, de exemplu, procesul de pătrundere a aminoacizilor și a unor glucide prin peretele intestinal este mediat de „transportori”, care realizează totodată o discriminare a substanțelor captate. Acești factori prezintă o specificitate atât pentru un anumit tip de aminoacizi (există diferiți transportori pentru anumite grupe de aminoacizi), cât și față de stereoizomeria acestora (Tria și Barnabei, 1967).

b) *Discriminarea cantitativă*, în sensul captării de substanțe asemănătoare la rate diferite. La bacterii s-a arătat că, odată cu sinteza activă a enzimelor care prelucrează un anumit substrat (operonul dereprimat), se sintetizează și enzimele transportoare (permeazele), care sînt controlate de gene ce fac parte din același operon ; acești transportori asigură o captare preferențială la o rată crescută a substratului inductor (Jacob și Monod, 1961).

Din studiile lui Cohn și Parks (1967), efectuate asupra inductorilor de pinocitoză la macrofagele cultivate *in vitro*, reiese că există diferențe cantitative, exprimate prin numărul de pinozomi formați, pentru diferitele substanțe (proteine, aminoacizi, acizi nucleici, mucopolizaharide) capabile de a induce pinocitoza, fapt ce ar sugera că macrofagele pot discrimina natura substanțelor pinocitate.

Recunoașterea „metabolică” ar reprezenta deci funcția generală a celulelor de a discrimina din amestecul de substanțe ce le înconjură pe acelea „potrivite” cerințelor lor metabolice, atât din punct de vedere cantitativ, cât și calitativ. Această proprietate s-ar putea realiza prin existența la suprafața membranei a unor receptori alcătuiți din structuri chimice care pot să discrimineze și să fixeze numai anumite substanțe „potrivite”.

**Recunoașterea celulelor străine prin contact intercelular.** Această categorie cuprinde fenomenele de recunoaștere a celulelor „neasemănătoare” genetic, prin contactul direct intercelular fără participarea unor factori imunologici.

Spongierii oferă un exemplu al capacității celulelor individuale dintr-o colonie multicelulară de a recunoaște și răspunde selectiv la celulele străine. Această capacitate reiese în mod evident din experiențele de reagregare a celulelor spongioase, disociate, efectuată de Galtsoff (1952). Amestecând celule spongioase disociate de la diferite specii, s-a constatat că agregatele celulare care se formează sînt constituite din același tip de celule, ceea ce înseamnă că aceste celule posedă capacitatea de a discrimina propriile celule de celulele străine prin contact intercelular. Tratarea cu acid periodic a celulelor spongioase disociate duce la pierderea capacității de reagregare, de unde reiese că prezența unor compuși polizaharidici de la suprafața celulelor ar putea juca un rol important în acest proces (Moscona, 1963).

**Recunoașterea la nivel fagocitar.** Fagocitele, reprezentate de leucocitele circulante ale sîngelui și de macrofagele SRE, sînt celule care în cursul evoluției au suferit o specializare funcțională, intervenind în procesele de apărare imunologică, datorită capacității de captare a substanțelor străine sau proprii alterate. Mecanismele principale de captare a acestor substanțe antigenice de către leucocite sînt reprezentate de procesele de fagocitoză și pinocitoză. În cursul procesului de captare, fagocitele discriminează selful de nonself sau de selful alterat. Cameron (1932) a arătat că leucocitele din cavitatea celomică a rîmei captează numai microbii și hematiile sau spermatozoizii străini și nu fagocitează hematiile sau spermatozoizii proprii.

Urmărind pinocitoza diferitelor imunoglobuline (Ig) de către PMN de cobai, noi am constatat că acestea pinocitează la o rată

semnificativ mai mare imunoglobulinele heterologe decît cele omologe, iar acestea din urmă sînt pinocitate la o rată mai mare decît cele autologe.

Perkins și Leonard (1963) au arătat, în cazul macrofagelor de șoarece, că procentajul fagocitozei diferitelor specii de hematii este corelat cu gradul de înrudire dintre speciile donatoare de hematii și șoarece, și că aceste macrofage posedă o capacitate de a recunoaște și capta cu atît mai intens hematiile, cu cît acestea provin de la animale mai îndepărtate filogenetic.

Macrofagele din organele limfoide posedă de asemenea capacitatea de a discrimina substanțele străine de cele proprii. În ganglionul limfatic, antigenele sînt localizate în macrofagele medulare și macrofagele dendritice din foliculii limfatici, fapt constatat atît pentru antigenele corpusculare, cît și pentru cele macromoleculare (Ada și colab., 1964; Nossal, 1965; McDevitt și colab., 1966; Humphrey și Frank, 1967).

Mecanismul de captare a antigenelor solubile de către aceste celule este reprezentat de procesul de pinocitoză (Nossal și colab., 1968).

Ada și colab. (1964), utilizînd trei grupe de substanțe: a) antigene puternice (flageli și flagelină de *Salmonella adelaide*, serumalbumină de bou, feritină de cal, anatoxină difterică, eritrocite de pasăre); b) substanțe neantigenice (gelatină de vițel și insulină de bou); c) substanțe omologe (eritrocite, serumalbumină, gammaglobulină de șobolan), au constatat că diversele tipuri de substanțe sînt captate în concentrații diferite de către macrofagele sinusurilor medulare, în timp ce macrofagele dendritice captează numai substanțele străine antigenice. Apare deci că macrofagele foliculului limfatic, care sînt interesate cu precădere în răspunsul imun, posedă o capacitate crescută de a discrimina substanțele antigenice de cele neantigenice.

Fagocitele discriminează nu numai selful de nonself, ci și de selful alterat. Astfel se cunoaște că polimorfonuclearele captează și degradează endometrul hipertrofiat sau substanța nervoasă provenită din degenerescența senilă (Zilber, 1959).

Eritrocitele autologe tratate cu agenți chimici, cum ar fi acidul periodic sau lecitinaza, sînt fagocitate la rate semnificativ crescute față de cele autologe nealterate, de către PMN de cobai. De asemenea, imunoglobulinele autologe denaturate prin agenți fizici (termici, radiații: X, beta, gamma) sau chimici (nitrat de Pb sau de Hg) sînt pinocitate de către PMN la rate semnificativ crescute față de



cele autologe nealterate (Gavrilescu și colab., 1969). Pe de altă parte, este bine cunoscut rolul pe care îl joacă macrofagele în înlăturarea hematiilor îmbătrânite (Simith, 1958; Essner, 1960).

Vaughan și Boyden (1964) au dovedit prin testul de imunoaderență capacitatea macrofagelor de a discrimina eritrocitele proaspete de cele uzate sau îmbătrânite, prin păstrarea în diferite condiții *in vitro* (soluții și temperaturi diferite).

Care este mecanismul prin care fagocitele pot să discrimineze selful de nonself?

Procesul de fagocitoză este constituit în mod esențial din 3 etape: chemotactismul, captarea și degradarea substanțelor captate.

Inițial se considera că factorul esențial responsabil de specificitatea acestui proces s-ar datora diferențelor de încărcătură electrostatică dintre fagocite și substanțele captate.

Totuși, acestea nu pot fi considerate ca esențiale, deoarece:

a) compușii proprii care nu sînt fagocitați au încărcături electrostatice asemănătoare cu cele ale compușilor străini care sînt fagocitați; b) procesul chemotactic este activ pe o distanță mult mai mare decît forțele electrostatice dintre doi compuși.

Datele din ultimii ani au arătat că orice substanță fagocitată este acoperită de opsonine sau anticorpi naturali. Astfel, s-a arătat necesitatea serului pentru fagocitoza hematiilor alterate, de către celulele Kupffer, sau necesitatea opsoninelor pentru fagocitarea de către PMN a diferitelor substanțe străine, cum ar fi particulele de cărbune, bacterii, celule (Jenkin și Rowley, 1961; Jenkin și Karthingam, 1962; Rowley, 1962).

La nivelul macrofagelor, rolul opsoninelor sau al anticorpilor este îndeplinit de anticorpii citofili.

S-a demonstrat că anticorpii citofili de la suprafața macrofagelor de iepure, cobai, șoarece sînt responsabili de captarea specifică a antigenelor (Boyden și Sorkin, 1960; Boyden, 1966; Blazkowec și colab., 1965; Nelson și Mildenhall, 1967).

Opsoninele și anticorpii naturali de la suprafața macrofagelor dendritice din foliculul ganglionului limfatic interacționează cu antigenul, determinînd captarea acestuia. Acest fapt a fost evident demonstrat de Balfour și Humphrey (1964), care, studiind distribuția antigenului marcat prin autoradiografiere și a Ig prin metoda anticorpilor fluorescenți, au găsit că antigenul este prezent în ganglioni în celulele la suprafața cărora sînt prezente imunoglobulinele. Berken și Benacerraf (1966) au arătat că la cobai majoritatea anticorpilor

citofili fac parte din categoria 7S și că ei se pot atașa selectiv la macrofage printr-un situs de legătură situat pe fragmentul Fc al moleculei.

O excelentă lucrare care a pus în evidență rolul determinant al anticorpilor citofili în fixarea antigenelor de către macrofage a fost realizată de către Sulica, Haimovich și Sela (1971). Autorii au folosit drept complex antigenic un conjugat dinitrofenil (DNP)-bacteriofag, care se fixează pe macrofagele animalelor imunizate anti-DNP. Avantajul metodei experimentale constă în faptul că adăugarea unui exces de haptentă (DNP) în sistem determină desfacerea DNP-fagului de pe suprafața celulelor pe care acesta s-a fixat specific. În acest mod, numărul de DNP-fagi fixați pe o anumită celulă poate fi estimat, oferind posibilitatea de a număra receptorii specifici pentru un anumit antigen de pe celulele respective. În experiențele citate s-a utilizat azida de sodiu ca factor inhibitor al pinocitozei, pentru a împiedica pătrunderea intracelulară a antigenului fixat pe suprafața celulei. Se constată că macrofagele peritoneale bine spălate ce provin de la animalele care nu au în serul lor nici o urmă de anticorpi anti-DNP nu leagă pe suprafața lor DNP-bacteriofagul. Legarea DNP-fagului de suprafața macrofagelor devine însă notabilă la animalele neimunizate care posedă în ser anticorpi „naturali” anti-DNP și crește foarte mult la animalele imunizate antigruparea DNP. Dovada indiscutabilă a conversiei macrofagelor „normale” în macrofage „imune” care fixează DNP-fagii este realizată prin incubarea unor macrofage care nu pot fixa aceste complexe antigenice cu ser de la animale imune. După spălarea lor intensă, deci după îndepărtarea oricăror urme de anticorpi liberi în sistem, macrofagele „normale” fixează complexul DNP-bacteriofag. În concluzie, parte din anticorpii serici circulanți anti-DNP, având un caracter citofil, s-au fixat pe membrana macrofagelor și au determinat legarea antigenului complementar de suprafața celulei.

Aceste date îndreptățesc concluzia că procesul de recunoaștere la nivel fagocitar este mediat de opsonine sau de anticorpi naturali. Indiferent însă dacă opsoninele sau anticorpii naturali mediază procesul de recunoaștere, membrana leucocitară trebuie să joace un rol activ în acest proces. Astfel, într-o lucrare recentă am urmărit pinocitoza și fagocitoza a două substanțe străine — imunoglobulinele umane și eritrocitele de oaie (în prezența și absența serului specific) — de către PMN de cobai. Am constatat că după tratarea prealabilă a PMN cu acid periodic și sialidază, rata pinocitozei și a fagocitozei scade semnificativ față de rata constatată

la PMN netratate. Aceste date sugerează că la suprafața PMN există receptori cu o structură chimică alcătuită din heteropolizaharide conținând acid sialic, asemănătoare cu structura receptorilor de pe membrana hematiilor, leucocitelor și celulelor Ehrlich care asigură adsorbția mixovirusurilor pe aceste celule (Eyler și colab., 1962). Tratarea PMN de cobai cu acid periodic și sialidază alterează acești receptori, deprimând procesul de captare, indiferent dacă acesta este mediat de anticorpi specifici sau nu.

**Recunoașterea imunologică la nivelul celulelor imunologic competente.** Acest tip de recunoaștere este un proces preliminar, indispensabil, indiferent dacă răspunsul imun declanșat de acest stimul va fi de tip celular sau va determina sinteza anticorpilor. La vertebratele superioare s-a arătat că limfocitele imunologic competente posedă capacitatea de a recunoaște celulele neasemănătoare din punct de vedere genetic, alogenice sau heterogenice, prin contact intercelular.

Cercetările lui Möller și Möller (1966) au demonstrat că dacă limfocite normale provenind de la animale neimune sînt puse în contact cu celule neînrudite genetic, cum ar fi fibroblastele unui animal făcînd parte din altă specie, limfocitele determină un efect citotoxic, distrugînd fibroblastele străine, fără captarea prealabilă a acestora ca în cazul fagocitozei. În acest model experimental, limfocitele poartă numele de celule efectoare sau „agresori”, în timp ce celulele distruse, în speță fibroblaștii, sînt desemnate drept „celule țintă”. Este posibil ca glucidele de la suprafața limfocitelor să joace un rol important în recunoașterea celulelor străine, deoarece, după Gesner (1966), acestea pot constitui „zone de recunoaștere”, care pot fi degradate prin tratament cu glicozidaze.

Efectul citotoxic al limfocitelor asupra celulelor țintă se explică prin producerea unei limfotoxine care este secretată de către limfocit în momentul în care acesta recunoaște pe suprafața celulei țintă antigene de histocompatibilitate, deosebite de cele existente pe suprafața celulei agresoare. Limfotoxina produsă poate fi izolată din supernatantul culturilor celulare.

Ramseier (1971) a utilizat în experiențele sale amestecuri de reacție alcătuite din celulele agresoare ale unuia din părinți și celulele țintă ale hibridului  $F_1$ . Astfel, celulele agresoare vor recunoaște pe suprafața celulelor țintă ale hibrizilor  $F_1$  numai determinanții antigenici specificați de un singur set cromozomial, și anume de

setul cromozomial provenit de la părintele opus. Ca urmare a recunoașterii acestor determinanți antigenici nonsell, celulele agresoare vor elibera în mediul de cultură o substanță denumită de autori „produs de recunoaștere antigenică” PAR, care se poate izola și purifica. Inoculată intracutan la hamsteri, această substanță își manifestă efectul biologic prin mobilizarea unui mare număr de polimorfonucleare la locul de inoculare. Numărul de polimorfonucleare prezente este proporțional cu cantitatea de substanță PAR inoculată, permițând astfel o estimare cantitativă a fenomenului de citotoxicitate.

Procesul descris are implicații biologice importante, deoarece acest mecanism poate funcționa în eliminarea celulelor străine sau provenite din diferențieri aberante care ar tulbura homeostazia celulară.

Un sistem experimental analog a fost studiat în lucrările lui Mesrobeanu și colab. (1971), folosind drept celule efectoare limfocitele din ganglionul limfatic de cobai normal, iar drept celule țintă celule renale de cercopitec.

În ce privește recunoașterea determinanților antigenici străini, de către celulele producătoare de anticorpi, Burnet și Fenner (1949) au presupus de mult timp existența unor „self-markeri” prezenți în structurile unui organism prin intermediul cărora celulele formatoare de anticorpi discriminează selful de nonsell. Ulterior, Burnet (1959) — în teoria asupra selecției clonale — postulează că populația de celule formatoare de anticorpi este constituită din mai multe clone, fiecare clonă fiind capabilă să sintetizeze anticorpi specifici față de un singur determinant antigenic. Totalitatea clonelor dintr-un macroorganism ar putea acoperi toate configurațiile antigenice teoretic posibile. În cursul dezvoltării ontogenetice, clonele capabile să formeze anticorpi față de componentele proprii sînt deprimare funcțional. Macromoleculele autologe, proprii organismului, prezente în cantități mari în mediul intern al acestui organism, venind în contact încă din primul moment cu celulele limfoide imature vor determina o inhibiție a clonelor care ar putea sintetiza anticorpi împotriva acestor macromolecule. Rezultă o „paralizie funcțională” a clonelor corespunzătoare determinanților antigenici incluși în aria selfului, paralizie ce va dura atîta vreme cît în mediul intern există în mod continuu, în cantitate mare, fiecare din macromoleculele cuprinse în mulțimea componentelor autologe (Moraru și Sulica, 1969).

După Burnet, la suprafața celulelor formatoare de anticorpi există un număr mic de situsuri reactive, care se combină cu antigenul. Specificitatea acestor situsuri este caracteristică și aceeași pentru celulele care au derivat din același cap de clonă, fiind genetic determinată. Faptul că un determinant antigenic induce producerea anticorpilor corespunzători, specifici, la nivelul unei singure clone, implică necesitatea ca fiecare celulă dintr-o clonă anumită să discrimineze un singur antigen. Această proprietate rezultă din lucrările autorilor care au studiat numărul de anticorpi cu specificitate diferită sintetizați de către o singură celulă formatoare de anticorpi.

Nossal și Lederberg (1958), Nossal (1958) și White (1958) au arătat că o celulă formatoare de anticorpi expusă la două antigene sintetizează un singur tip de anticorpi. După Attardi și colab. (1964), o celulă ar fi capabilă să sintetizeze două tipuri de anticorpi, fapt explicat de posibilitatea ca celula să fie heterozigotă.

Nossal și colab. (1971) au constatat că acest lucru este un fapt excepțional, regula generală fiind că o anumită celulă produce anticorpi cu o singură specificitate antigenică.

Cercetările lui Green și colab. (1967), efectuate cu multă acuratețe tehnică asupra sintezei de anticorpi față de o haptenă reprezentată de 2,4-DNP-PLL (2,4-dinitrofenil-poli L-lizină), conjugată cu un purtător (serumalbumină de bou sau ovalbumină), au demonstrat că față de acest compus se sintetizează trei tipuri de anticorpi: față de determinantul antigenic al haptenei; față de determinantul antigenic al transportorului; față de determinantul antigenic care ia naștere prin conjugarea celor doi compuși.

Fiecare din aceste tipuri de anticorpi este sintetizat de plasmocite diferite.

În cursul procesului de sinteză a anticorpilor, informația antigenică trebuie să ajungă la nivelul celulelor formatoare de anticorpi. La acest nivel, fiecare clonă discriminează antigenul față de care are genetic determinată capacitatea de sinteză a anticorpului. Acest proces s-ar putea realiza: a) prin contactul direct cu antigenul, contact mediat sau nu de factori de recunoaștere reprezentați de anticorpi naturali (Nossal, 1965; Boyden, 1966), b) prin contactul cu ARN informațional (Fishman și colab., 1963; Adler și colab., 1966), sau cu un complex ARN-antigen (Friedman, 1963; Askonas și Rhodes, 1965), eliberat din macrofagele care au captat și prelucrat antigenul, fie c) după cum consideră mai recent Unanue și Cerottini (1970), printr-o interacțiune directă între macrofag care prezintă

fragmentele de antigen degradate legate pe suprafața membranei sale și limfocitul producător de anticorpi (vezi pentru date suplimentare capitolul privind „Interacțiuni celulare în cursul elaborării răspunsului imun”).

Capacitatea celulelor de a recunoaște determinanții antigenici se realizează prin intermediul unor factori de recunoaștere de pe suprafața celulelor formatoare de anticorpi care au o înaltă specificitate față de un singur determinant antigenic. Acești factori de recunoaștere sînt situați pe suprafața membranei celulare. Structura lor este identică sau parțial identică cu structura anticorpului produs de celula respectivă. Existența acestor receptori celulari de recunoaștere a fost dovedită prin experiențele făcute de Sulica și colab. (1971).

Spre deosebire de cele constatate la macrofage, unde legarea antigenului (DNP-bacteriofag) de celulă se făcea numai în prezența unor anticorpi circulanți anti-DNP, cu caracter citofil, în cazul celulelor splenice producătoare de anticorpi legarea complexului DNP-bacteriofag la aceste celule se face la aceeași rată, indiferent dacă în prealabil populația de limfocite a fost pusă în contact cu anticorpi anti-DNP sau nu. De aici concluzia că receptorii pentru haptena DNP de pe aceste celule nu apar ca urmare a interacțiunii celulelor cu anumiți anticorpi citofili, ci *există* pe suprafața celulară, ca structuri proprii funcționalității acestor celule.

Numărul total de receptori prezenți într-o populație de celule splenice a putut fi evaluat în acest model experimental și astfel s-a dovedit că el diferă în funcție de starea de imunitate a organismului respectiv. Cu alte cuvinte, la un animal imun numărul total de receptori sporește pe seama creșterii numărului de celule purtătoare și nu datorită creșterii numărului de receptori per celulă.

Prin intermediul anticorpilor antiimunoglobuline, cuplați cu coloranți fluorescenți, receptorii de pe suprafața limfocitelor au putut fi „colorați” (Loor și colab., 1972). S-a constatat astfel că acești receptori se găsesc într-un stadiu dinamic, în sensul că ei se pot mișca în planul membranei. Uneori, ei au fost observați ca fiind uniform repartizați pe suprafața celulei, alteori, dimpotrivă, ei se „aglutinează” la un pol al celulei, formînd o calotă.

Această mișcare este consecința unor mecanisme variate, printre care, pe lîngă simpla difuzie, mai apar și procese ce necesită metabolismul activ al celulei.

Se consideră că această microaglutinare a receptorilor este legată de starea funcțională a celulei, în sensul că macromolecula străină recunoscută și fixată pe aceste „insule” de receptori este mai

rapid incorporată intracelular prin pinocitoză, reprezentînd astfel un stimul intens pentru declanșarea răspunsului imun.

Se știe că în cursul rejecțiilor de grefe, organismul primitor răspunde la contactul cu celule histologic incompatibile atît prin sinteza unor anticorpi — anticelulele țintă ale grefei —, cît și prin reacții celulare, în cursul cărora celulele imunologic competente agresoare ale gazdeiucid și elimină celulele grefei.

Experiențele au arătat că specificitatea anticorpilor umorali și a imunității celulare este identică, prin urmare implicit structurile de pe suprafața celulelor agresoare care recunosc ținta (structuri de recunoaștere) ar trebui să fie identice cu structurile similare din molecula anticorpilor.

Ramseier și Lindemann (1972) au verificat această afirmație, arătînd că un ser imun anti-structuri de recunoaștere de pe celulele agresoare (deci anticelulă agresoare) blochează activitatea anticorpilor anticelulă țintă și invers, un ser imun preparat prin imunizarea animalelor cu anticorpi antițintă (deci ser anti-anticorpi) se leagă specific pe structurile de recunoaștere a celulelor agresoare, împiedicînd capacitatea lor de a recunoaște și deci de a produce substanțe PAR, în contact cu celule agresoare.

În ce privește răspunsul imun, aria selfului reprezintă pentru un anumit individ un caracter determinat genetic. Acest fapt rezultă din însuși caracterul constant în ontogenie al macromoleculelor sale proprii determinate de genotipul individului respectiv.

Această configurație a macromoleculelor proprii menținîndu-se constantă în cursul vieții unui individ, rezultă implicit că aria compuşilor străini față de care acesta va reacționa imunologic se va menține constantă în cursul vieții acestui individ.

Astfel, după izolarea și menținerea *in vitro* a unui compus autolog în condiții în care acesta nu-și modifică structura chimică, el este recunoscut drept self după o perioadă de timp variabilă. Așa, de exemplu, gammaglobulina de cobai congelată este recunoscută drept self de către celulele exudatului peritoneal (PMN) ale aceluiași cobai după o perioadă de timp de 90 de zile, echivalentă cu 30 de generații leucocitare, de la izolarea compusului autolog din organism (Gavrilescu și colab., 1969). De asemenea, specificitatea imunității de transplantare, care se dovedește a fi remarcabil constantă în cursul întregii perioade de viață a unui animal, pledează în favoarea acestei afirmații.

În cursul fuziunii gameților care duce la formarea oului, deci a unui nou individ, prin alăturarea celor două seturi cromozomiale

venite de la părinți, precum și din relațiile de dominanță — recesivitate apărute între cele două alele ale aceluiași locus, va lua naștere o nouă configurație macromoleculară. În cursul dezvoltării embrionare a individului ( $F_1$ ), celulele imunologice competente care ar putea reacționa față de determinanții macromoleculari proprii individului  $F_1$  vor fi funcțional reprimite (Burnet, 1959).

Oricum, aria selfului  $F_1$  va cuprinde o parte din compuşii incluși în aria selfului mamei și o parte din determinanții antigenici proprii tatălui. Datorită acestei reasortări a macromoleculor materne și paterne rezultă implicit că o parte din compuşii proprii ai ambilor părinți vor fi considerați drept nonsel de către hibridul  $F_1$ , care va reacționa imunologic față de acești compuşii.

De exemplu, din încrucișarea unor părinți cu genotipurile grupului sanguin A0 și B0 rezultă conform legilor mendeliene 25 % indivizi cu genotipul A0 ; 25 % indivizi B0 ; 25 % AB și 25 % 00, avînd respectiv fenotipurile grupului sanguin A, B, AB și 0.

Din punct de vedere imunologic indivizii A (cu genotip A0) consideră hematiile părintelui B0 drept nonsel și vor declanșa o reacție imună împotriva acestora ; și invers, copiii B0 vor considera hematiile părintelui A0 drept nonsel.

Numai 25 % din copii, cei cu configurația genetică AB, includ hematiile ambilor părinți în aria selfului, în timp ce în extrema opusă 25 % din indivizii  $F_1$  de grup 0 vor considera drept nonsel atât hematiile mamei, cît și ale tatălui și vor reacționa imunologic împotriva lor.

## BIBLIOGRAFIE

- ADA G., NOSSAL G.J.V., AUSTIN C.M., 1964, Austr. J. exp. Biol. med. Sci., **42**, 331.  
 ADLER F.L., FISHMAN M., DRAY S., 1966, J. Immunol., **97**, 554.  
 ASKONAS B.A., RHODES J.M., 1965, Nature, **205**, 470.  
 ATTARDI G., COHN M., HARIBATA K., LENNOX E.S., 1964, J. Immunol., **92**, 335.  
 BALFOUR B.M., HUMPHREY J.H., 1964, in *Germinal Centers in the Immune Response*, Springer Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, p. 81.  
 BERKEN A., BENACERRAF B., 1966, J. exp. Med., **123**, 119.  
 BLAZKOWEC A.A., SORKIN E., TURK J.L., 1965, Int. Arch. Allergy, **28**, 178.  
 BONA C., GHYKA GR., 1968, Microbiol. Parazitol., Epidemiol., **13**, 489.  
 BOYDEN S.V., SORKIN E., 1960, Immunology, **3**, 272.



- BOYDEN S.V., 1966, *Natural Antibodies and the Immune Response*, în *Advances in Immunology*, sub red., F.J. Dixon și J.H. Humphrey, Acad. Press, New York — Londra, vol. VI.
- BURNET F.M., FENNER F., 1949, *The Production of Antibodies*, Edit. MacMillan and Co., Melbourne.
- BURNET F.M., 1959, *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*, Vanderbilt Univ. Press.
- CAMERON W.R., 1932, *J. Path. Bact.*, **35**, 933.
- COHN Z.A., PARKS E., 1967, *J. exp. Med.*, **175**, 213.
- ESSNER E., 1960, *J. biophys. biochem. Cytol.*, **7**, 329.
- EYLER H.E., MADOFF A.M., BRODY V.O., ONCEY L.J., 1962, *J. biol. Chem.*, **237**, 1992.
- FISHMAN M., HAMMERSTROM R.H., BOUD V.P., 1963, *Nature*, **198**, 549.
- FRIEDMAN H., 1963, *Nature*, **149**, 502.
- GALTSOFF P.S., 1952, *J. exp. Zool.*, **42**, 183.
- GAVRILESCU N., GHYKA GR., SULICA A., BONA C., 1969, în *Cercetări de genetică*, Edit. didactică și pedagogică, București, p. 557.
- GESNER B.M., 1966, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **129**, 758.
- GREEN J., VASSALI P., NUSSENZWEIG W., BENACERRAF B., 1967, *J. exp. Med.*, **175**, 511.
- HUMPHREY J.H., FRANK M.M., 1967, *Immunology*, **13**, 87.
- JACOB FR., MONOD J., 1961, *J. mol. Biol.*, **3**, 318.
- JENKIN C.R., ROWLEY D., 1961, *J. exp. Med.*, **114**, 363.
- JENKIN C.R., KARTHINGAM K., 1962, *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, **156**, 1006.
- LOOR F., FORNI L., PERNIS B., 1972, *Eur. J. Immunol.*, **2**, 203.
- MCDEVITT H.O., ASKONAS B.A., HUMPHREY J.H., SCHECHTER J., SELA M., 1966, *Immunology*, **11**, 337.
- MESROBEANU I., BERCEANU ST., 1968, *Imunologie și imunopatologie*, Edit. medicală, București, p. 150.
- MESROBEANU L., GHEORDUNESCU VL., BRUCHER J., AUGUSTIN A., 1971, *Primul simpozion național de imunologie*, București, p. 44.
- MÖLLER G., MÖLLER E., 1966, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **129**, 735.
- MORARU I., SULICA A., 1969, în *Progrese recente în disciplinele imunologice*, sub red. N. Nestorescu, Edit. medicală, București, p. 93.
- MOSCONA A.A., 1963, *Proc. nat. Acad. sci. U.S.A.*, **49**, 742.
- NELSON M.D., MILDENHALL P., 1967, *Austr. J. exp. Biol. med. Sci.*, **45**, 113.
- NOSSAL G.J.V., LEDERBERG J., 1958, *Nature*, **181**, 1419.
- NOSSAL G.J.V., 1958, *Brit. J. exp. Path.*, **39**, 544.
- NOSSAL G.J.V., 1965, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **124**, 37.
- NOSSAL G.J.V., ABBOT A., MITCHELL J., 1968, *J. exp. Med.*, **127**, 277.
- NOSSAL G.J.V., WARNER N.L., HELLER L., 1971, *Cellular Immunology*, **2**, 41.
- PERKINS E.H., LEONARD M.R., 1963, *J. Immunol.*, **90**, 238.

- RAMSEIER H., 1971, Eur. J. Immunol., **1**, 433.
- RAMSEIER H., LINDEMANN J., 1972, Eur. J. Immunol., **2**, 109.
- ROWLEY D., 1962, in *Advances in Immunology*, sub red. W.H. Taliaferro și J.H. Humphrey, Acad. Press, New York — Londra, vol. II, p. 241.
- SMITH F., 1958, J. Path. Bact., **76**, 383.
- SULICA A., HAIMOVICH J., SELA M., 1971, J. Immunol., **106**, 721.
- TRIA E., BARNABEI D., 1967, Protoplasma (Wien), **63**, 1.
- UNANUE E.R., CEROTTINI J., 1970, J. exp. Med., **131**, 711.
- VAUGHAN R.B., BOYDEN S.V., 1964, Immunology, **7**, 118.
- WHITE R.G., 1958, Nature, **182**, 1383.
- ZILBER I.B., 1959, *Tratat de imunologie*, Edit. medicală, București.

## II

## Determinismul genetic al imunoglobulinelor

### GENERALITĂȚI ASUPRA STRUCTURII IMUNOGLOBULINELOR

Imunoglobulinele au un rol deosebit de important în imunologie, ele reprezentând în marea lor majoritate echivalentul biochimic al anticorpilor.

În serul uman, imunoglobulinele se găsesc situate în fracțiunea gammaglobulinelor. Rolul deosebit de important al acestor macromolecule a justificat cercetările foarte numeroase care le-au fost consacrate în ultimii ani. Aceste cercetări au stabilit că imunoglobulinele reprezintă o clasă de substanțe cu o variabilitate impresionantă în ce privește structura chimică și consecutiv funcțiile biologice îndeplinite.

Încercându-se o sistematizare a acestor nenumărate forme moleculare, se descriu astăzi diferite criterii pe baza cărora imunoglobulinele se pot împărți în funcție de:

- izotipul sau clasa imunoglobulinelor ;
- alotipul imunoglobulinelor ;
- variabilitatea impusă de specificitatea anticorpului în raport cu antigenul respectiv.

În ceea ce privește planul general de organizare al imunoglobulinelor trebuie menționat că toate sînt formate din două feluri de lanțuri polipeptidice, dintre care primul, format din aproximativ 214 aminoacizi, reprezintă lanțul scurt, notat L (light), și al doilea, format din 439 de aminoacizi, reprezintă lanțul greu, notat cu H (heavy). Lanțul L este legat la lanțul H printr-o legătură disulfidică realizată între două cisteine, și anume cisteina din poziția 213 pe lanțul H (considerînd aminoacidul 1 ca fiind situat la capătul amino-terminal al lanțului) și cea din poziția 214 pe lanțul L.

Acest dimer L—H constituie „unitatea” de structură a oricărei molecule de imunoglobulină, el reprezentînd — după cum au arătat

numeroase cercetări — și unitatea de funcție biologică, în sensul că alcătuiește un situs combinativ complet care se poate combina cu un determinant antigenic potrivit (Gheție, 1969).

Molecula imunoglobulinelor nu este însă niciodată alcătuită dintr-un singur dimer L-H, ci este formată din minimum doi, solidarizați între ei prin legături disulfidice care apar între cele două lanțuri H (fig. 1).

Deși, după cum se va arăta ulterior atît lanțurile L, cît și lanțurile H, mai ales, diferă foarte mult în ce privește structura lor, cu toate acestea într-o anumită moleculă de imunoglobulină, indiferent de numărul lor, lanțurile L și respectiv H vor fi toate de același fel.

Prin hidroliza cu papaină a imunoglobulinelor 7S (IgG), molecula anticorpilor este scindată prin ruperea lanțurilor H, în trei fragmente deosebite (fig. 2):

— Două fragmente, Fab, sînt formate din lanțul L în întregime și dintr-un segment de lanț H, denumit Fd. Fragmentul Fab cuprinde situsul combinativ al anticorpului, deci regiunea de legare a acestuia la antigen, sub forma unei „cavități” mărginite de partea aminoterminală a lanțurilor polipeptide L și Fd (din lanțul H);

— Părțile carboxiterminale ale lanțurilor H rămîn solidarizate între ele prin punțile disulfidice, alcătuiind astfel un singur fragment Fc.

Diverse alte modalități de fragmentare a imunoglobulinelor sînt ilustrate în figura 2. În afară de lanțurile polipeptidice, în molecula imunoglobulinelor se mai găsește și o cantitate mică (3—12 %) de carbohidrați, legați de fragmentul Fc.

Comparîndu-se între ele secvențele de aminoacizi ale diferitelor lanțuri L și H, s-a constatat că aceste lanțuri pot fi împărțite în ce privește secvența, în două regiuni deosebite.

O regiune situată în capătul aminoterminal al lanțului L, sau respectiv H, are secvența aminoacizilor extrem de variabilă de la o moleculă de anticorp la alta, ceea ce justifică denumirea de regiune V (variabilă).

Variabilitatea extrem de mare a secvenței acestei regiuni a fost pusă în legătură cu specificitatea de antigen a diferitelor molecule de anticorpi, cu atît mai mult cu cît tocmai regiunile V de pe lanțurile L și respectiv H sînt cele care delimitează situsul combinativ.

O a doua regiune situată înspre capătul carboxiterminal al lanțului L, sau H, are o secvență a aminoacizilor care diferă oarecum de la o moleculă de Ig la alta, dar mult mai puțin decît regiunile

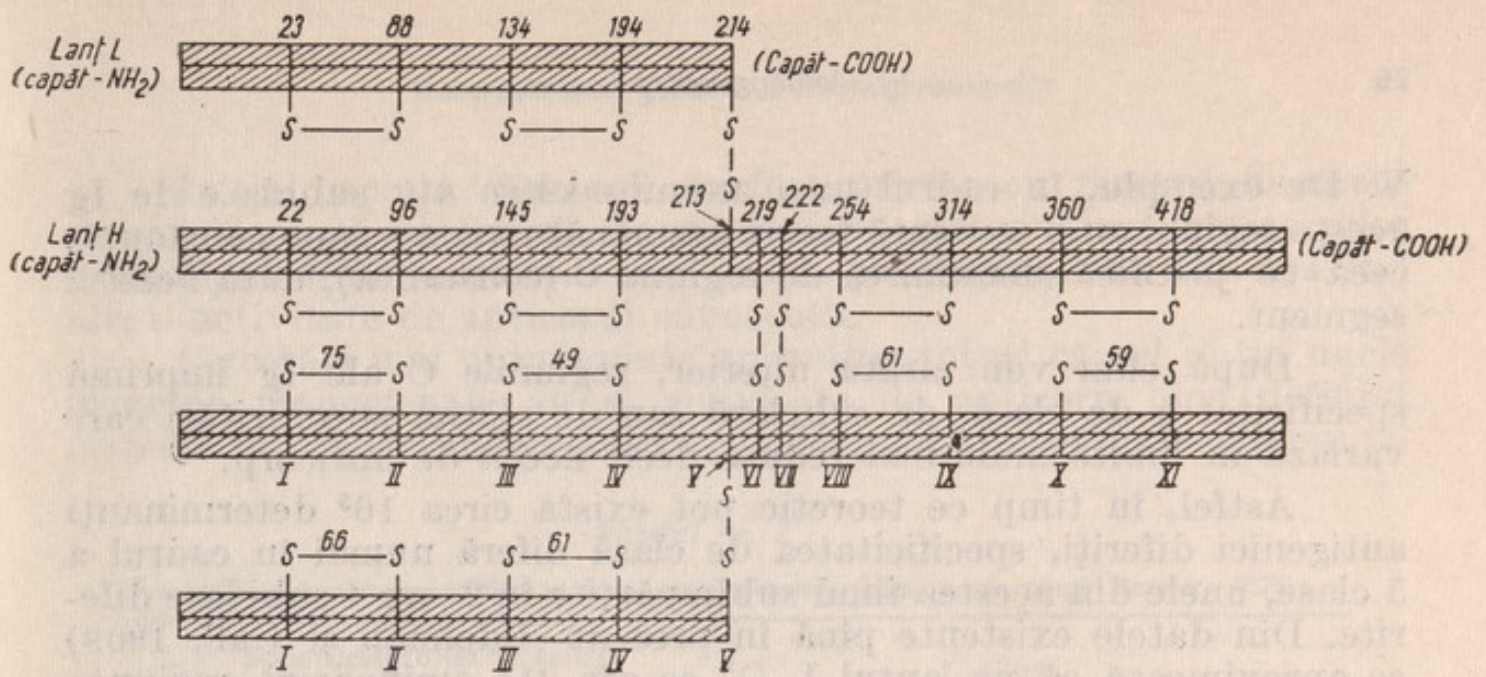


Fig. 1. — Legături disulfidice în proteina de mielom  $\gamma G_1$  (Eu) (după Edelman și Gall, 1969).

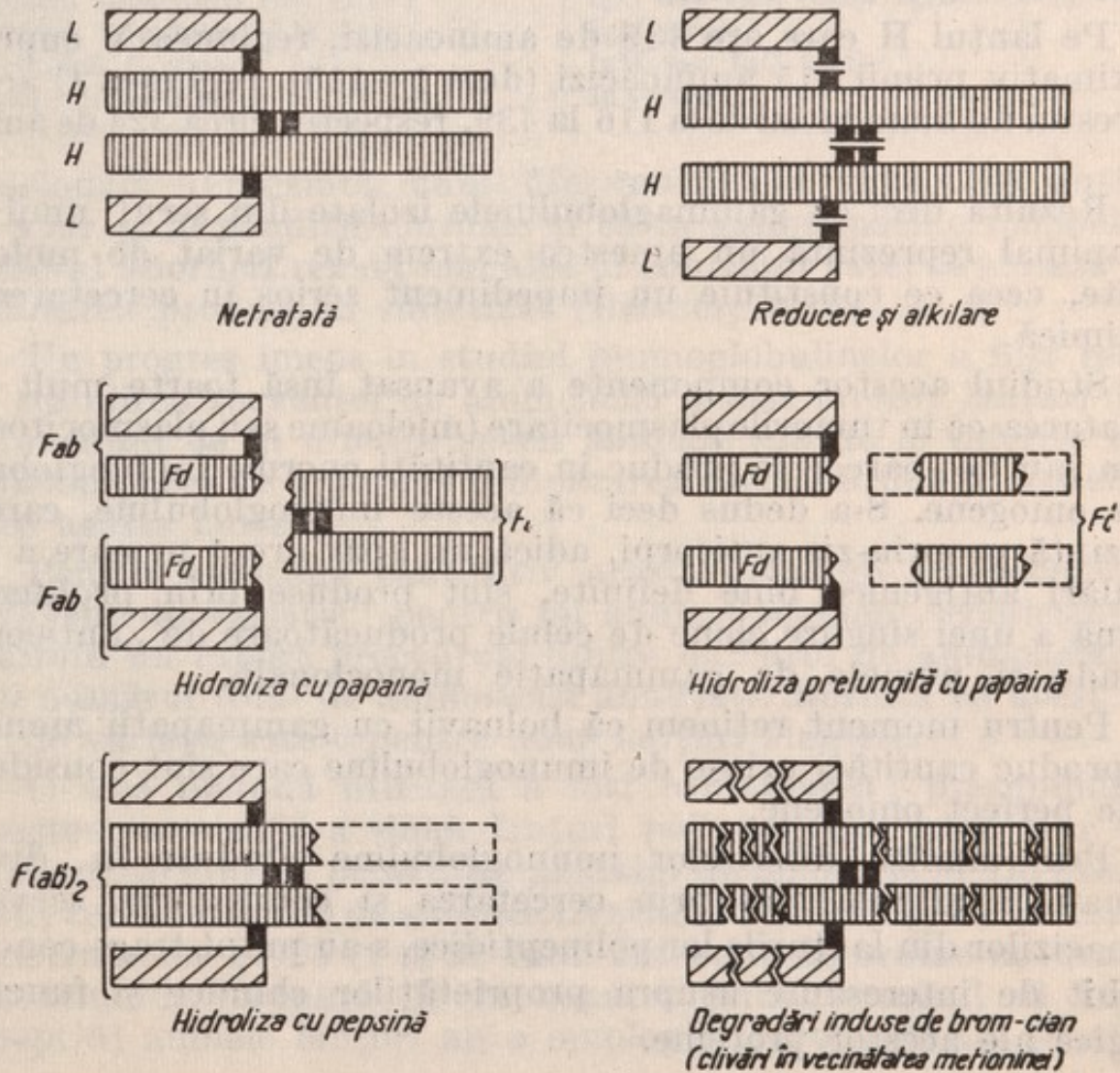


Fig. 2. — Diferite modalități de degradare ale moleculei de imunoglobulină (după Bernier, 1970).

V. De exemplu, în cadrul unei anumite clase sau subclase de Ig aceste regiuni au o secvență foarte asemănătoare, aproape constantă, ceea ce justifică denumirea de regiune C (constantă), dată acestui segment.

După cum vom arăta ulterior, regiunile C ale Ig imprimă specificitatea de clasă, de subclasă sau de alotip, specificități care variază în limite mult mai reduse decât aceea de anticorp.

Astfel, în timp ce teoretic pot exista circa  $10^5$  determinanți antigenici diferiți, specificitatea de clasă diferă numai în cadrul a 5 clase, unele din acestea fiind subîmpărțite în 2 sau 4 subclase diferite. Din datele existente pînă în prezent (Edelman și Gall, 1969) se aproximează că pe lanțul L ( $\lambda$ ) ce are 215 aminoacizi, regiunea V este cuprinsă între aminoacidul 1 și aproximativ 108, rămînînd ca regiunea C să acopere restul de aminoacizi, respectiv 108—215 (aproximativ tot 107 aminoacizi).

Pe lanțul H care are 439 de aminoacizi, regiunea V cuprinde aproximativ primii 115 aminoacizi (deci 1—115), regiunea C acoperind restul de aminoacizi de la 116 la 439, respectiv circa 324 de aminoacizi.

Rezultă deci că gammaglobulinele izolate din serul unui om sau animal reprezintă un amestec extrem de variat de molecule diferite, ceea ce constituie un impediment serios în cercetarea lor biochimică.

Studiul acestor componente a avansat însă foarte mult prin constatarea că în tumorile plasmocitare (mieloame sau plasmocitoame) de om sau de șoarece se produc în cantități enorme imunoglobuline foarte omogene. S-a dedus deci că aceste imunoglobuline, care nu reprezintă propriu-zis anticorpi, adică nu apar drept urmare a unei stimulări antigenice bine definite, sînt produse prin proliferarea malignă a unei singure clone de celule producătoare de „anticorpi”, de unde și numele de gammapatie monoclonală.

Pentru moment reținem că bolnavii cu gammapatii monoclonale produc cantități uriașe de imunoglobuline care sînt considerate chimic perfect omogene.

Prin analiza diferitelor imunoglobuline produse în diverse gammapatii și mai ales prin cercetarea și compararea secvenței aminoacizilor din lanțurile lor polipeptidice, s-au putut trage concluzii deosebit de interesante asupra proprietăților chimice și funcțiilor biologice ale acestor proteine.

Inițial, aceste concluzii au fost privite cu rezervă deoarece se considera că proteinele de mielom nu sînt analoge anticorpilor normali, ele fiind rezultatul unui proces patologic și mai ales neavînd nici o activitate de anticorpi cunoscută.

Cercetări mai aprofundate au arătat totuși că cel puțin unele proteine monoclonale au și activitate de anticorp bine definită (tabelul nr. 1), de unde s-a tras concluzia că fiecare imunoglobulină

Tabelul nr. 1

Activitatea de anticorp asociată cu unele imunoglobuline monoclonale (după Bernier, 1970)

Specificitate de anticorp anti —	Clasă
Streptolizină	IgG (om)
Benzeni substituiți (ex. DNP)	IgG sau IgM (om), IgA(șoarece)
Antigen I (aglutinină la rece)	IgM (om)
Globulină G umană	IgM sau IgG (om)
Lipoproteină umană	IgA (om)

monoclonală reprezintă unul din multiplele tipuri de anticorpi care apar și în condiții normale și că în gammapatiile monoclonale caracterul anormal rezidă mai ales în controlul ratei de sinteză decît în calitatea produsului sintetizat (Bernier, 1970).

Un progres imens în studiul imunoglobulinelor a fost realizat prin stabilirea secvenței de aminoacizi a mai multor lanțuri L sau H provenind de la diferite specii animale sau de la diferite cazuri de mielom, ceea ce a permis compararea asemănărilor și deosebirilor dintre aceste lanțuri.

Pentru a estima cantitativ aceste omologii s-a acceptat un „coeficient de variație” pentru un anumit segment, coeficient care reprezintă un raport procentual dintre numărul de aminoacizi diferiți și numărul total de aminoacizi analizați. Rezultă că acest coeficient de variație este 0 pentru două lanțuri identice.

O altă metodă utilizată a fost următoarea: presupunînd că cunoaștem secvența a două lanțuri polipeptidice, cum s-ar putea aranja aceste lanțuri pentru un „maxim de omologie”? De exemplu, un lanț cercetat are 50 de aminoacizi și al doilea 70 (fig. 3). Se constată că pentru zona 1—25 (1 și 25 fiind numerele de ordine naturală ale aminoacidului începînd de la capătul aminoterminal al lanțului polipeptid) ambele lanțuri au o omologie foarte ridicată (coeficient

de variație foarte mic). Regiunea 26—48 din lanțul mai scurt diferă total de regiunea 26—48 din lanțul mai lung. În schimb, aceeași regiune, 26—48, din lanțul scurt este foarte asemănătoare (are un coeficient de variație mic) cu regiunea 47—70 din lanțul lung. Aranjarea pentru un maxim de omologie arată că în cursul evoluției, lanțul scurt și cel lung au putut avea un ancestor comun care avea inițial 48 de aminoacizi.

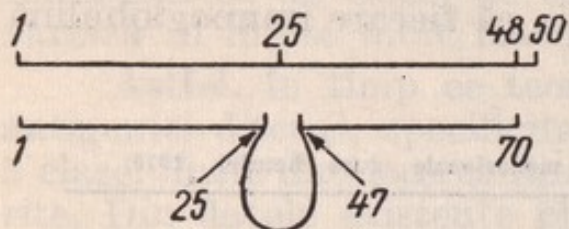


Fig 3. — Aranjarea pentru un maxim de omologie.

În situația prezentă lanțul scurt a suferit o inserție de 2 aminoacizi la capătul carboxiterminal și corespunzător gena care controlează sinteza sa a suferit o alungire a lanțului de ADN cu 6 nucleotide. În schimb,

lanțul lung a suferit o inserție de 22 de aminoacizi, după aminoacidul 25 (deci respectiv o alungire a ADN cu 66 de baze nucleotidice) care s-ar putea datora fie unei dedublări a segmentului 1—25, și în acest caz regiunea 26—47 ar trebui să semene mult cu regiunea 1—25, fie unui crossing-over inegal, fie pur și simplu unei translocări a unui alt segment genetic venit de pe alt cromozom.

#### VARIAȚIILE REGIUNII C A LANȚURILOR H. CLASE ȘI SUBCLASE DE IMUNOGLOBULINE

Deși încă puține lanțuri H au fost complet cercetate pentru secvența lor de aminoacizi, rezultă totuși că între aminoacizii 1 și aproximativ 115 se găsește o zonă cu o variabilitate mare a secvenței, alcătuind regiunea V, spre deosebire de segmentul cuprins între aminoacizii 116 și aproximativ 439, care prezintă o secvență mult mai constantă de la un lanț H la altul, alcătuind regiunea C.

În funcție de diferitele configurații pe care le poate lua secvența regiunii constante a lanțurilor H, acestea au fost subdivizate, pe de o parte, în izotipuri sau clase diferite și, pe de altă parte, în funcție de modul de transmitere genetică de la o generație la alta, în alo-tipuri diferite.

În ce privește izotipurile, lanțurile H umane se subdivid structural în mai multe categorii, denumite  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\delta$  și  $\epsilon$ .



Aceste categorii de lanț H imprimă specificitatea de clasă (izotip) a imunoglobulinelor, care vor fi respectiv denumite IgG, IgA, IgM, IgD și IgE.

Proprietățile diferitelor lanțuri H și corespunzător cele ale diferitelor clase de imunoglobuline umane au fost rezumate în tabelul nr. 2, după Bernier (1970).

Prin reacții imunochimice (imunoelectroforeza) s-a arătat însă, că pe baza antigenității lor, clasele de imunoglobuline pot fi subîmpărțite mai departe în subclase. Sensul molecular al subclaselor este determinat de faptul că în structura lanțurilor grele (de exemplu, gamma) există diferențe biochimice relativ mici, care nu depășesc limitele definite pentru clasa respectivă, totuși sînt suficiente pentru a se traduce imunoelectroforetic prin reacții de „identitate parțială” cu celelalte lanțuri gamma.

Aceste diferențe biochimice rezidă în diferențele de structură primară ale lanțurilor H.

Astfel s-au identificat 4 subclase în cadrul IgG, denumite IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> și IgG<sub>4</sub>.

Lanțurile grele ale diferitelor subgrupuri au similitudini structurale și antigenice care le încadrează toate în clasa IgG. Totuși, există între ele și deosebiri structurale care determină pe lângă diferențele de antigenitate și diferențe fizico-chimice sau biologice.

Astfel, după Natvig și colab. (1967), partea Fc a lanțului  $\gamma_3$  este foarte susceptibilă la papaină pe cînd același fragment din lanțul  $\gamma_2$  este hidrolizat foarte greu;

— subclasele diferă între ele prin numărul de punți disulfidice dintre lanțurile grele; apar astfel două punți în IgG<sub>1</sub> și IgG<sub>4</sub>, 4 punți în IgG<sub>2</sub> și cel puțin 3 în IgG<sub>3</sub> (Frangione și colab., 1969);

— fragmentele Fc din  $\gamma_4$  au o mobilitate electroforetică mult mai mare decît celelalte fragmente Fc din alte subgrupe;

— globulinele IgG<sub>2</sub> nu determină reacții de anafilaxie cutanată pasivă;

— globulinele IgG<sub>4</sub> nu pot fixa complementul.

În mod analog s-au descris pentru IgM două subclase diferite corespunzînd unor diferențe de lanț  $\mu$ , iar pentru IgA de asemenea două subclase diferite ce corespund unor diferențe ale lanțurilor  $\alpha$ .

După cum se va vedea, aceste deosebiri de structură dintre regiunile constante ale lanțurilor H, care justifică împărțirea imuno-

Tabelul nr. 2  
Proprietățile diverselor clase de imunoglobuline umane (Bernier, 1970)

Clasa	Concen- trația medie în ser (mg/100ml)	Greutate molecu- lară	S 20.w	Carbo- hidrați (g%)	Timp mediu de supravie- țuire T/2 (în zile)	Lanțul H			Formulă moleculară
						nume	greutate molecu- lară	număr de subclase	
IgG	1 240	150 000	6,8	3	23	$\gamma$	52 000	4	$\gamma_2\lambda_2$ sau $\gamma_2k_2$
IgA	280	170 000	7;10;14	8	5-6,5	$\alpha$	64 000	2	$(\alpha_2\lambda_2)_n$ sau $(\alpha_2k_2)_n$ $n = 1,2,3 \dots$
IgM	120	890 000	19	12	5,1-5,4	$\mu$	70 000	2	$(\mu_2\lambda_2)_5$ sau $(\mu_2k_2)_5$
IgD	3	150 000	6,2-7,0	-	2,8	$\delta$	50 000	necunoscut	$\delta_2\lambda_2$ sau $\delta_2k_2$
IgE	0,03	196 000	7,9	11	-	$\epsilon$	75 000	necunoscut	$\epsilon_2\lambda_2$ sau $\epsilon_2k_2$

globulinelor în clase și subclase este departe de a epuiza toate diferențele existente între moleculele de imunoglobuline.

Pe lanțurile H ale imunoglobulinelor, alte diferențe biochimice și acestea identificabile prin variații antigenice pot determina diverși markeri alotipici.

În ce privește sensul genetic al acestor configurații de lanț polipeptid notăm că în serul tuturor oamenilor se găsesc atât lanțuri  $\gamma$ , cât și lanțuri  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\delta$  și  $\epsilon$ .

Mai mult decât atât, în serul tuturor oamenilor se găsesc și lanțuri  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$  sau  $\gamma_4$ . De aici concluzia că izotipurile imunoglobulinelor, deci clasele și subclasele lor, nu segregă printre descendenți și nu variază în funcție de genotipul părinților. Prin urmare ele reprezintă polipeptide codificate de gene (cistroni) diferite, nonalelice, care se găsesc înscrise în genomul uman. În ce privește diferențele alotipice, acestea, după cum se va arăta ulterior s-au dovedit a fi corelate cu diferite subgrupe.

Astfel, factorii Gm 1, 2, 3, 4, 17 apar numai în moleculele  $\gamma_1$ , factorul Gm 23 în moleculele  $\gamma_2$  și factorii Gm 5,6,10,11,13,14,21 în cele  $\gamma_3$ .

Deși toți oamenii posedă lanțuri H,  $\gamma_2$ , numai unii dintre ei au pe lanțul  $\gamma_2$  determinantul alotipic Gm(23), în timp ce alții nu au acest marker alotipic și sînt notați Gm(-23).

S-a văzut că prezența sau absența factorului Gm(23) depinde de constituția genetică a părinților și în analize familiale se observă că acest caracter segregă printre descendenți.

Deci formele Gm(23) și Gm(-23) reprezintă alele ale unui aceluiași cistron  $\gamma_2$  situat în același locus pe cromozom.

Acceptînd că formele de lanț H (regiunea constantă)  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$  și  $\gamma_4$  sînt controlate de cistroni situați în locusuri diferite, ar fi de așteptat ca între alelele diferite ale acestor locusuri să apară recombinări prin crossing-over. Aceste recombinări vor putea fi detectate prin analiza markerilor alotipici corelați cu acești cistroni care am arătat că pot lua forme alelice multiple.

Într-adevăr, prin studii familiale asupra markerilor alotipici s-a putut arăta că asemenea crossing-overuri apar între diferitele locusuri ce codifică subclase diferite. Din analiza acestor recombinări se consideră că ordinea cistronilor pentru subgrupurile  $\gamma$ G este  $\gamma G_4 - \gamma G_2 - \gamma G_3 - \gamma G_1$  (Natvig și colab., 1967; Ropartz, 1971).

## VARIAȚIILE REGIUNII C A LANȚURILOR L

După cum am arătat, în constituția tuturor claselor de imunoglobuline se găsesc fie lanțuri L  $\lambda$ , fie lanțuri L  $\kappa$ , diferențele dintre acestea fiind determinate tot de diferențele de structură primară ale regiunii constante. Totodată, indiferent de individul investigat și de genomul părinților lui, în toate serurile umane s-au pus în evidență atât lanțuri  $\lambda$ , cât și lanțuri  $\kappa$ .

Rezultă că, în acest caz, gena care controlează regiunea C a lanțului  $\lambda$  și cea care controlează regiunea constantă a lanțului  $\kappa$  sînt nonalelice. Ele nu segregă printre descendenți.

Prin analiza secvenței de aminoacizi a diferitelor lanțuri  $\kappa$  și  $\lambda$  obținute din Ig normale sau de mielom s-au constatat însă în regiunea C o serie de variații care determină subdiviziuni în cadrul lanțurilor  $\kappa$  și respectiv  $\lambda$ .

Să examinăm semnificația genetică a acestor diferențe.

a) Pe lanțul  $\kappa$  în regiunea C, aminoacidul 191 — reprezentat prin leucină — a fost corelat cu alotipul Inv(1), în timp ce în aceeași poziție valina a fost corelată cu alotipul Inv (3).

După cum vom arăta mai amănunțit în subcapitolul „Alo-tipurile imunoglobulinelor”, aceste diferențe se transmit ereditar și segregă printre descendenți. Cu alte cuvinte, putem găsi indivizi care au numai lanțuri L $\kappa$  de forma Inv(1) sau numai lanțuri L $\kappa$  de forma Inv(3), după cum din căsătoria unor asemenea indivizi vor rezulta copii care au atât Inv(1), cât și Inv(3).

Deducem de aici că Inv(1) și Inv(3) sînt controlate de două forme alelice situate în același locus unic  $\kappa$ , pe cromozomii omologi ai unui heterozigot Inv<sup>1</sup>/Inv<sup>3</sup>.

b) În cadrul lanțurilor  $\lambda$ C (adică regiunea constantă) s-au descris de asemenea mai multe diferențe :

Astfel, lanțurile  $\lambda$  C care au aminoacidul 191 reprezentat prin lizină sînt desemnate Oz(+), pe cînd cele care au arginină în această poziție sînt desemnate Oz(-).

Diferențele Oz(+), Oz(-) se reflectă în antigenitatea lanțului  $\lambda$  și pot fi puse în evidență prin inhibiția hemaglutinării pasive determinate de serurile anti Oz(+) sau Oz(-). Pentru a cerceta semnificația genetică a acestei diferențe, Rivat și colab. (1971) au comparat markerul Oz cu un alt marker, Kern, care caracterizează aminoacidul

154 din același lanț  $\lambda C$ . Se știe că markerul Kern(+) are un rest de glicină 154, în timp ce Kern(-) are în această poziție serina.

Cercetînd 40 de proteine  $\lambda$  provenind din proteine Bence-Jones sau de mielom s-au observat următoarele combinații :

$C\lambda_1$  : Kern<sup>-</sup> Oz<sup>-</sup>                      154 Ser — 191 Arg.

$C\lambda_2$  : Kern<sup>-</sup> Oz<sup>+</sup>                      154 Ser — 191 Lys.

$C\lambda_3$  : Kern<sup>+</sup> Oz<sup>-</sup>                      154 Gly — 191 Arg.

Combinația Kern<sup>+</sup> Oz<sup>+</sup> nu a fost niciodată întîlnită, deci nu există independență perfectă de reasortare a celor doi markeri.

Pe de altă parte se știa (Edelman și Gall, 1969) că din serurile unor indivizi normali necorelați genetic se pot izola atît peptide Oz(+), cît și lanțuri Oz(-).

De aici concluzia că formele Oz(+) și Oz(-) nu se comportă ca alele, nu segregă între ele printre descendenți și deci lanțurile  $\lambda C$  Oz(+) și  $\lambda C$  Oz(-) sînt controlate fiecare de două gene nealelice care apar în genomul tuturor indivizilor.

Dacă luăm în considerare și markerul Kern situat pe același lanț  $\lambda C$ , vedem că există nu două ci trei gene deosebite care pot controla formele diferite de lanțuri  $\lambda C$ , respectiv  $C\lambda_1$ ,  $C\lambda_2$  și  $C\lambda_3$ .

Diferențele minime care le deosebesc pledează pentru afirmația că genele care le controlează sinteza au apărut prin triplarea unui locus inițial comun și au evoluat ulterior prin mutații puțin întinse, care au determinat modificări ale aminoacizilor din pozițiile 154 și 191 (Rivat și colab., 1971).

Rezultă că diferențele aminoacidului 191 de pe lanțurile  $\alpha$  corelate cu Inv(1) și Inv(3) reflectă diferențe alelice, în timp ce diferențele aminoacidului 191 de pe lanțul  $\lambda$  corelate cu markerul Oz(+) și Oz(-), precum și cele ale aminoacidului 154 (corelate cu markerul Kern) reflectă diferențe nonalelice, deci pun în evidență gene diferite.

Mai există în lanțul  $\lambda C$  și alte diferențe de secvență a căror semnificație genetică rămîne necunoscută încă, cum ar fi, de exemplu, proteina Mz care are valină în loc de alanină în poziția 183 și asparagină în loc de lizină în poziția 173.

## REGIUNILE VARIABILE (V) ALE LANȚURILOR L ȘI H. IDIOTIPURILE IMUNOGLOBULINELOR

Spre deosebire de regiunea constantă, regiunea variabilă a lanțului L, cuprinsă între aminoacizii 1 și aproximativ 108, s-a dovedit extrem de diversă în ce privește secvența aminoacizilor. De notat că această diversitate nu afectează anumiți aminoacizi cum ar fi cei implicați în legăturile disulfidice (cisteinele din pozițiile 23 și 88), care probabil că sînt indispensabili pentru înfășurarea specifică a lanțului LV și implicit pentru corecta funcționare a acestuia în cadrul situsului combinativ. În regiunea variabilă se găsesc deci segmente hipervariabile ce alternează cu segmente a căror secvență se menține constantă.

Deosebirile constatate în secvența lanțului LV rezidă în substituiri ale unui aminoacid cu un altul, precum și în mici diferențe de lungime.

Drept urmare, diferitele lanțuri LV umane analizate (în mod special cele provenite din proteine Bence-Jones sau de mielom) au fost împărțite în două mari grupe,  $V\lambda$  și  $V\kappa$ , fiecare fiind subdivizate la rîndul său pe baza segmentelor constante, în subgrupe (Edelman și Gall 1969). Astfel, lanțurile  $V\kappa$  din aceeași subgrupă au aceeași lungime, în timp ce lanțurile  $V\kappa$  din subgrupe diferite au lungimi diferite. S-au descris pînă acum 3 subgrupe de lanț  $V\kappa$  care se deosebesc între ele prin circa 40 de aminoacizi substituiți.

În cadrul aceleiași subgrupe lanțurile  $V\kappa$  diferă numai prin 10 aminoacizi substituiți. În mod analog s-au alcătuit subgrupe și pentru lanțurile  $V\lambda$ .

Este de așteptat ca, pe măsură ce noi secvențe vor fi analizate, numărul de variații descrise și implicit numărul de subgrupe să crească foarte mult.

Regiunea V a lanțurilor H ar putea fi subîmpărțită în subgrupe întocmai ca și regiunea V a lanțului L. Interesant este faptul că punctele de substituție, întocmai ca și la lanțul LV, respectă aproape aceiași anumiți aminoacizi cu funcție „strategică”. Faptul că distribuția substituirilor, precum și tipul de substituție sînt foarte asemănătoare în lanțul LV și în cel HV pledează pentru afirmația că regiunile V din lanțurile L și H au același tip de diversitate structurală și deci, probabil, aceeași bază genetică a diversității lor.

După cum am mai amintit, un progres important în studiul structurii chimice a situsului combinativ a fost realizat prin izolarea anticorpilor cu anumită specificitate de antigen, în stare pură.

Acest lucru a fost posibil fie prin utilizarea unor proteine de mielom, fie prin purificarea cu ajutorul imunosorbenților (Gheție și Micușan, 1966).

Pe de altă parte, investigarea mai aprofundată a situsului combinativ a progresat mult prin introducerea unor tehnici de marcarea aminoacizilor, care interacționează direct cu antigenul în cursul reacției antigen—anticorp. Aceste tehnici, cunoscute sub numele de „marcare prin afinitate” (affinity labelling), utilizează un determinant antigenic simplu, de tip haptenă, ce are pe suprafața sa anumite grupări chimice care, în momentul inclavării antigenului în situsul combinativ, se atașază la aminoacizii din situs ce intră direct în contact cu determinantul antigenic. Identificarea ulterioară a aminoacizilor din molecula anticorpului, modificați prin atașarea „marcajului” venit de pe determinantul antigenic, permite stabilirea poziției și naturii aminoacizilor din situsul combinativ care răspund de atașarea specifică a acestuia la antigen. Astfel, Weinstein și colab. (1969) au introdus folosirea derivaților de bromoacetyl ai unei haptene, cum ar fi dinitrofenilul (DNP), legată la un purtător, ca reactivi pentru marcarea prin afinitate a anticorpilor anti-DNP.

Aplicarea variată a acestor tehnici a arătat că dacă se izolează din serul unui animal anticorpi cu anumită specificitate de antigen, anti-A de exemplu, acești anticorpi se comportă ca antigene diferite față de anticorpii anti-B, C sau D, de același izotip, izolați din serul aceluiași animal. Cu alte cuvinte, serurile animalelor imunizate cu anticorpi anti-A reacționează specific numai cu acești anticorpi și nu și cu cei anti-B, C sau D. Calitatea anticorpilor anti-A de a se comporta antigenic diferit de anticorpii anti-B, C sau D a fost denumită *idiotip*, înțelegând prin aceasta specificitatea unei anumite structuri a situsului combinativ, pusă în evidență prin antigenicitatea ei deosebită (Oudin și Michel, 1969; Bordenave și Oudin, 1971).

Acest lucru a fost confirmat prin tehnica „marcării prin afinitate” care a arătat că aminoacizii marcați în situsul combinativ al anticorpilor anti-A diferă de aminoacizii marcați din structura situsului anti-B, produs de către același individ. Astfel, recent, Haimovich și colab. (1972) au analizat aminoacizii „cheie” ce interacționează cu antigenul din situsurile combinate ale unei proteine de mielom de șoarece (MOPC 315), cu activitate de anticorp anti-DNP. Anticorpii cu specificitate antibromoacetyl-N<sup>e</sup>-DNP-L-lizina (BADL) reacționează cu antigenul BADL prin intermediul lizinei din poziția 54, de pe lanțul H. Spre deosebire de aceasta anticorpii cu specifi-

tate anti-bromoacetyl-N<sup>1</sup>-DNP-etilendiamină (BADE) din aceeași proteină de mielom, reacționează cu complexul antigenic BADE prin intermediul tirozinei din poziția 34 situată pe lanțul L. Ambii aminoacizi sînt situați în regiunile hipervariabile ale segmentului V.

Prin aprofundarea investigațiilor s-a constatat însă că sensul noțiunii de idiotip ar trebui lărgit. Astfel s-a observat că anticorpilor cu anumită specificitate de antigen (fie anti-A), diferă de anticorpilor anti-B, C, D... pentru un anumit individ luat în considerare, dar diferă și de anticorpilor anti-A, deci cu aceeași specificitate de antigen, produși de alt individ.

Configurația idiotipică a anticorpilor anti-A este însă aceeași la indivizii unei anumite familii sau linii pure, deci această configurație se transmite genetic.

Astfel, în ce privește anticorpilor anti-DNP, Weinstein și colab. (1972) arată că în liniile AKR/J, DBA/2, CBA/LAC, *lizina* de pe lanțul H este aminoacidul predominant marcat din situsul combinativ, în timp ce la tulpinile C<sub>57</sub>BL/6 și SJJL, *tirozina* de pe lanțul L este aminoacidul predominant marcat din situsul combinativ.

Spre deosebire de aceasta în cazul liniilor BALB/c și A/J se constată că atât tirozina, cât și lizina sînt aproape egal marcate. Diferențe similare de idiotip de la o tulpină de șoareci la alta au fost constatate și de Eichmann (1972) pentru anticorpilor antipolizaharide streptococice. Rezultă deci că trebuie să considerăm idiotipurile ca niște markeri genetici ce caracterizează regiunea V de pe lanțurile L și H, deci implicit situsul combinativ al anticorpilor cu anumită specificitate.

Problemele discutate se referă la macroorganismul luat ca un întreg, adică la mulțimea tuturor imunoglobulinelor din serul unui individ. Această populație moleculară reprezintă însă un rezultat al activității unei multitudini de celule.

Perfecționarea tehnicilor imunochimice a permis să se cerceteze izotipul imunoglobulinelor sintetizate de către o singură celulă, constatîndu-se astfel că o singură celulă produce anticorpi cu o singură specificitate antigenică ce reprezintă imunoglobuline de un singur izotip, care au o singură formă alotipică.

Recent, prin tehnica hemolizei locale în gel, Nossal și colab. (1971) au confirmat afirmațiile lor anterioare, arătînd că totuși un număr foarte mic de aproximativ 1,5% celule pot produce simultan hemolizine de tip IgM și IgG. Nussenzweig și colab. (1968) au arătat



că pentru unul și același tip de specificitate de antigen, anticorpii anticomplexe dinitrofenil-serum albumină bovină (DNP—SAB) de tip  $\gamma_1$  și cei de tip  $\gamma_2$  sînt produși de celule diferite. Rezultă că deși în genomul celular apar codificate toate clasele și subclasele de imunoglobuline, la nivelul unei singure celule producătoare de anticorpi se exprimă fenotipic numai o alelă a unui cistron ce controlează o singură subclasă de anticorpi, celelalte gene alelice sau nonalelice fiind reprimare.

Deci, un anumit cistron dominant reprimă nu numai alela sa recesivă, ci și cistronii de subgrup, nonalelici. Fenomenul poartă numele de excludere alelică și de subgrup.

Mecanismul lui exact nu este încă lămurit și vom discuta mai amănunțit despre el în subcapitolul „Ipoteze asupra mecanismului prin care se realizează diversificarea specificității de antigen a situsului combinativ”. Evident că excluderea alelei omologe, precum și a celorlalte gene nonalelice, care controlează celelalte subgrupuri antrenează implicit și excluderea alotipurilor alelice și a celor nonalelice situate pe alte subgrupuri.

Fenomenul excluderii alelice și a subgrupului are loc nu numai pentru sistemul de gene ce controlează sinteza lanțurilor H, ci și pentru complexul de gene ce controlează lanțul L, în așa fel încît într-o celulă se sintetizează numai lanțuri  $\lambda$  sau numai lanțuri  $\kappa$  de un anumit subgrup și cu o singură specificitate alotipică.

## EVOLUȚIA FILOGENETICĂ A SISTEMULUI GENETIC CE CONTROLEAZĂ SINTEZA IMUNOGLOBULINELOR

Evoluția filogenetică a sistemului de gene ce controlează sinteza imunoglobulinelor a fost sugerată de o serie întreagă de constatări care se coroborează una pe alta într-un sistem coerent, foarte greu de realizat prin jocul întâmplării.

Vom descrie astfel câteva caracteristici ale diferitelor fragmente din molecula Ig, care reies din cercetările asupra secvenței lanțurilor L și H.

În ce privește lungimile acestor lanțuri se constată că lanțul  $L\lambda$ , de exemplu, are 215 aminoacizi, regiunea V fiind cuprinsă între aminoacizii 1 și 108, iar regiunea C fiind alcătuită din aminoacizii 109—215.

Mărimea regiunii VL este deci aproximativ egală cu mărimea regiunii CL (107—108 aminoacizi).

Lanțul H este format din 439 de aminoacizi —aproximativ dublul lanțului L. Și acest lanț prezintă o regiune variabilă (VH) formată din 115 aminoacizi, regiunea CH fiind constituită din restul de 324 de aminoacizi. Din aceste date se poate vedea că segmentul VH este aproximativ egal cu VL și că segmentul CH este aproape de trei ori mai mare decât regiunea CL.

Molecula de Ig se poate deci subîmpărți în zone oarecum egale între ele, schematizate de Edelman și Gall (1969), după cum se vede în figura 4. La o analiză atentă a secvențelor de aminoacizi a acestor

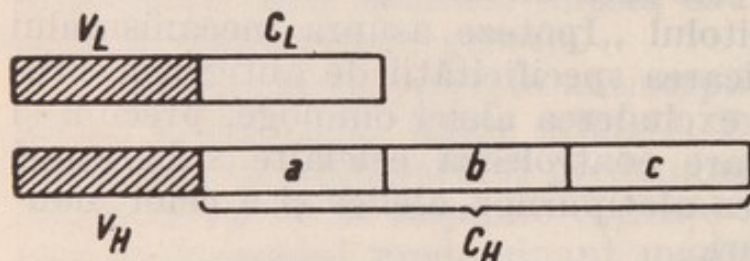


Fig. 4. — Regiuni omologe din molecula imunoglobulinelor (după Edelman și Gall, 1969).

zone se poate constata că toate cele șase zone diferite au asemănări foarte mari între ele. Astfel, într-una din imunoglobulinele IgG<sub>1</sub> analizate (desemnată sub numele de proteina Eu) s-a arătat că regiunile VH și VL au multe omologii.

În fiecare din aceste șase zone se regăsesc anumiți aminoacizi cu funcții strategice, care apar în aceleași poziții unul în raport cu celălalt. Așa, de exemplu, toate cele șase zone au fiecare câte două cisteine care asigură în fiecare zonă o punte disulfidică intralanț. După cum s-a putut observa din figura 1, numărul de aminoacizi ce separă cele două cisteine angajate în puntea disulfidică este aproape același pentru fiecare zonă. De exemplu, puntea disulfidică I-II (din segmentul VL) cuprinde 66 de aminoacizi; puntea III-IV (din segmentul CL), 61 de aminoacizi; puntea VIII-IX, corespunzând regiunii b de pe lanțul H, cuprinde 61 de aminoacizi, iar cea X-XI, corespunzătoare zonei c de pe același lanț, 59 de aminoacizi.

S-au constatat de asemenea omologii mari între :

- partea aminoterminală din fragmentul Fc (regiunea de omologie b) din Ig de om și de iepure care seamănă foarte mult;
- la om, partea carboxi terminală a fragmentului Fc (regiunea de omologie c) seamănă foarte mult cu regiunile C din lanțurile  $\lambda$  și  $\kappa$ ;

— de asemenea la om, regiunea CL seamănă foarte mult cu regiunea de omologie a (cuprinsă între aminoacizi 115—215) din lanțul H.

În concluzie, pe de o parte, regiunile VH și VL au asemănări foarte mari între ele și, pe de altă parte, regiunile a, b și c de pe lanțul H seamănă foarte bine între ele și la rîndul lor cu segmentul CL.

Din aceste date s-a dedus că moleculele de Ig în forma actuală derivă dintr-o unică genă primitivă care codifica un polipeptid de circa 110 aminoacizi. Printr-o duplicare inițială această genă primitivă a dat naștere lanțului L cu cele două segmente VL și CL. Ulterior, fie o duplicare a întregii gene L ( $2 \times (VL + CL)$ ), fie o triplare a segmentului genetic CL ( $VL + 3CL$ ) au dat naștere genei ce controlează lanțul H, care, după cum am arătat, este de două ori mai lung decît polipeptidul codificat de gena L. După cum vom prezenta în subcapitolul următor, „Alotipurile imunoglobulinelor umane”, printr-un mecanism de translocare, genele L și genele H s-au separat ulterior, ajungînd situate pe cromozomi diferiți.

În cursul evoluției filogenetice au urmat probabil multiplicarea genei L, ceea ce a dus la apariția cistronilor  $\kappa$ ,  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$ ,  $\lambda_3$ , și de asemenea multiplicarea cistronilor ce codificau lanțurile H, ceea ce a dus la apariția diferitelor clase (izotipuri) și subclase de lanț H.

Sensul biologic al acestei creșteri în complexitate a fost diversificarea funcțiilor fiziologice ale unui anticorp cu anumită specificitate antigenică. Astfel, de exemplu, un anticorp anti-X din clasa IgG este bivalent, fixează complementul, se poate fixa pe celulele țesuturilor străine și, datorită dimensiunilor sale mici, poate străbate placentă. Spre deosebire de acesta, anticorpii anti-X de tip IgM sînt pentavalenți, fixează complementul, dar nu pot traversa placentă și nu se pot fixa pe celule heterologe; anticorpii anti-X de tip IgA, purtînd piesa de transport (piesa T), pot fi secretați în salivă sau alte secreții, în schimb aceiași anticorpi, de tip IgE, se vor putea fixa pe celulele omologe, proprii făcînd deci parte din categoria reaginilor (Bernier, 1970).

## ALOTIPURILE IMUNOGLOBULINELOR UMANE

Ar fi fost de așteptat că inocularea imunoglobulinelor unui animal la un alt individ din aceeași specie să nu determine nici un efect imunologic, dacă aceste proteine — specifice de specie — ar fi identice de la un individ la altul.

Oudin și Dray (citați după Davis și colab., 1968), însă, au arătat că dacă se inoculează imunoglobulinele unui iepure la anumiți iepuri, aceștia din urmă produc anticorpi antiimunoglobulinele primului iepure. S-a tras concluzia că între imunoglobulinele iepurelui donator și aceleași molecule din animalele imunizate, există oarecare diferențe antigenice, care determină animalele ce au primit imunoglobuline să nu le recunoască drept self și prin urmare să reacționeze prin producere de anticorpi împotriva acestor macromolecule. Există deci o serie de determinanți antigenici care diferă de la imunoglobulina unui individ la cea a altor indivizi ce fac parte din aceeași specie.

S-a constatat că aceste diferențe antigenice se transmit ereditar, în sensul că descendenții donatorului produc întotdeauna imunoglobuline „antigenice” pentru anumite familii de animale din aceeași specie. Aceste diferențe de antigenitate ale diferitelor familii de imunoglobuline au fost denumite alotipuri.

Independent de descoperirea lui Oudin și Dray, Grubb și Laurell (1956) au observat de asemenea, la om existența unor diferențe de antigenitate a imunoglobulinelor, analoge alotipurilor descrise la iepure.

Aceste diferențe, transmise ereditar, sînt desemnate în literatura de specialitate, cel mai des, sub numele de markeri genetici ai imunoglobulinelor la om (Grubb, 1970).

În lucrarea prezentă insistînd mai ales asupra controlului genetic multiplu al imunoglobulinelor, am arătat că noțiunea de marker este foarte variabilă și pînă într-un anumit punct aceasta se poate suprapune și claselor sau subclasselor de imunoglobuline ori regiunilor V sau C ale lanțurilor L și H, care de asemenea recunosc un control genetic.

De aceea, pentru a deosebi acești variați markeri de cei referitori la specificitatea de antigen sau de izotip a imunoglobulinelor vom denumi acești determinanți alotipuri, deși ne referim la imunoglobulinele umane.

De altfel, într-o lucrare recentă, Ropartz (1971) descrie acești determinanți sub numele de alotipia imunoglobulinelor umane.

Identificarea diverselor „familii” de imunoglobuline antigenice diferite, deci a diferitelor alotipuri umane se face în principiu fie prin reacția de inhibiție a hemaglutinării, fie prin reacții de imunoprecipitare în tub sau în gel.

În ceea ce privește prima reacție, aceasta se folosește pe departe cel mai frecvent și comportă trei faze distincte:

— Învelirea hematiilor (Rh+) cu anticorpi incompleți anti-Rh care au un alotip oarecare, x.

— Aglutinarea acestor hematii prin serul antialotip (anticorpi anti-x). Serurile antialotipuri umane provin de la oamenii în serurile cărora s-au pus în evidență anticorpi antiimunoglobuline umane. Acești anticorpi apar fie în condiții patologice, cum ar fi poliartrita cronică evolutivă și, în acest caz, serurile conțin factori reumatoizi și sînt desemnate prin Ragg (rheumatoid agglutinators), fie de la indivizi normali care, transplacentar sau prin perfuzii multiple, au fost izoimunizați și, în acest caz serurile sînt desemnate prin SNagg (normal serum agglutinators).

— Adăugarea imunoglobulinelor de testat în acest sistem determină fie aglutinarea hematiilor, ceea ce demonstrează că Ig de testat au un alotip diferit de x, notat (-x), fie dimpotrivă inhibarea hemaglutinării, ceea ce arată că Ig cercetată este de alotip x și prin urmare leagă anticorpii anti-x care nu se vor mai putea fixa pe hematii.

Cîteva alotipuri, cum ar fi Gm, 5,21 și 23, au putut fi puse în evidență prin reacții de precipitare cu seruri anti-Gm 5,21 sau 23 produse pe iepuri sau pe maimuță (Natvig și colab., 1967).

Recomandăm pentru o descriere mai aprofundată a tehnicilor de identificare lucrările lui Grubb (1970) și Ropartz (1971). Indiferent de reacția luată în considerare s-au constatat însă trei aspecte deosebite, și anume că :

a) Există multiple familii de imunoglobuline umane antigenice diferite, deci există multiple alotipuri.

b) Aceste alotipuri se subîmpart în mai multe categorii sau sisteme, corespunzînd unor diferențe antigenice localizate pe lanțurile L sau pe lanțurile H de diferite izotipuri.

Astfel, după cum se vede din tabelul nr. 3, determinanții alotipici din complexul Gm sînt situați pe lanțurile H din clasa IgG, deci pe lanțurile  $\gamma$ , cei din sistemul Inv sînt situați pe lanțurile  $\kappa$ , sistemul Am a fost corelat cu lanțurile  $\alpha$  (deci apare exclusiv în IgA) și determinantul Isf, descris mai recent, pune încă probleme deosebit de complexe, el fiind situat întocmai ca și sistemul Gm pe lanțurile  $\gamma$ , deși este cu totul diferit și ascultă de un control genetic aparte față de Gm.

c) Un anumit alotip al unui individ se transmite ereditar descendenților lui, deci se comportă ca un caracter controlat genetic.

Drept urmare s-a convenit să se noteze alotipul respectiv prin cifre arabe mari, de exemplu, Inv (1) sau Gm(2), ceea ce corespunde cu prezența fenotipică a antigenului corespunzător pe imunoglobulinele cercetate, iar gena ce controlează acest fenotip prin indicativul  $Inv^1$  respectiv  $Gm^2$ .

Tabelul nr. 3

Corelația dintre alotipurile umane și lanțul  
imunoglobulinelor

Sistem	Lanț				
	$\alpha$	$\gamma$	$\mu$	$\lambda$	$\kappa$
Gm	—	+	—	—	—
Inv	—	—	—	—	+
Isf(1)	—	+	—	—	—
Am	+	—	—	—	—

După cum se va vedea ulterior, notația Inv sau Gm arată clasa de alotipuri luate în considerare, respectiv unde, pe ce lanț și în ce clasă sau subclasă apare alotipul respectiv.

## SISTEMUL Inv

Este situat pe lanțurile ușoare de tip  $\kappa$ , avînd trei determinanți antigenici diferiți  $Inv(1)$ ,  $Inv(2)$  și  $Inv(3)$ . Aceste denumiri noi, recomandate pe plan internațional de O.M.S., corespund denumirilor mai vechi  $Inv\ 1$ ,  $Inv\ a$  și  $Inv\ b$ .

Acești determinanți antigenici pot deci să apară la toate clasele de imunoglobuline, asociate cu diferite tipuri de lanț H.

Cercetările de genetică au arătat că cei trei determinanți antigenici sînt controlați de trei alele deosebite,  $Inv^1$ ,  $Inv^{1,2}$  și  $Inv^3$ , în diferite combinații. De exemplu, genotipul  $Inv^1/Inv^3$  determină un fenotip  $Inv\ (1, -2, 3)$  sau genotipul  $Inv^3/Inv^3$  determină fenotipul  $Inv\ (-1, -2, 3)$ . Fenotipul  $Inv\ (-1, 2, 3)$  nu a fost niciodată întîlnit, iar fenotipul foarte rar observat  $Inv\ (-1, -2, -3)$  ar putea apărea fie datorită existenței unei alele care controlează un produs încă necunoscut  $Inv^-$ , fie prin inhibiția expresiei uneia din alelele clasice ale locusului Inv.

Raportul diferitelor fenotipuri Inv variază în cadrul unor populații deosebite din punct de vedere rasial. Astfel Inv (1) apare la aproximativ 20 % din caucazieni (rasa albă), în timp ce la indienii din America de Sud apare la 94 % din indivizi. Inv (3) apare la 95 % din caucazieni, în timp ce 82 % din negrozii care au fenotip Inv (1) sînt heterozigoți  $Inv^1/Inv^3$ .

Diferența antigenică dintre Inv (1) și Inv (3) este datorată unei transpoziții a unei leucine respectiv în valină, în poziția 191. Această diferență minimă de un singur aminoacid poate fi explicată printr-o mutație punctiformă. Astfel, după Grubb (1970), transpoziția leucinei în valină ar putea fi realizată printr-unul din următoarele schimbări de codoni ce implică o singură bază azotată: CUA→GUA; CUU→GUU; CUG→GUG sau CUC→GUC.

Pînă în prezent nu se cunoaște care este diferența biochimică ce explică factorul Inv(2).

Este interesant de menționat că proteinele de mielom  $\gamma_2\kappa$  sau  $\gamma_4\kappa$  exprimă în reacțiile serologice foarte slab sau deloc specificitatea lor antigenică Inv, spre deosebire de proteinele  $\gamma_1\kappa$  și  $\gamma_3\kappa$  care manifestă foarte puternic acest caracter fenotipic.

Rezultă că, deși determinantul antigenic Inv este situat pe lanțul  $\kappa$ , acest determinant nu se exprimă deloc sau se exprimă foarte slab ca atare. Manifestarea sa fenotipică deplină necesită interacțiunea acestui lanț cu lanțul H și deci structura cuaternară intactă a moleculei proteice, această manifestare fiind influențată de felul lanțului H la care se găsește legat lanțul L. Este un exemplu deosebit de grăitor al interacțiunii dintre produsele controlate de gene diferite, ceea ce determină nuanțări fine ale exprimării fenotipice a unui caracter genetic determinat.

În ce privește exprimarea acestui fenotip la nivelul macroorganismului, indivizii  $Inv^1$  nu au decît lanțuri  $\kappa$  cu leucină în poziția 191, deci Inv (1). În schimb, heterozigoții  $Inv^1/Inv^3$  au printre imunoglobulinele lor atît lanțuri  $\kappa$  cu leucină în poziția 191, dar și lanțuri  $\kappa$  cu valină în poziția 191, adică de tip Inv(3).

În concluzie, la nivelul macroorganismului, alele  $Inv^1$  și  $Inv^3$  sînt codominante.

În schimb, mai multe cercetări făcute pe proteine de mielom, deci implicit produse de către o singură clonă celulară, au arătat că, la acești heterozigoți, proteinele erau fie Inv(1,—3), fie Inv (—1,3), dar niciodată Inv (1,3).

Rezultă că la nivelul unei singure celule producătoare de imunoglobuline și implicit în toate celulele aparținînd aceleiași clone, ambele

lanțuri L au același alotip Inv și, mai mult decât atât, ambele lanțuri reprezintă produsul unei singure alele considerate dominantă, care exclude alela opusă (recesivă). Acest fenomen de excludere alelică, constatat și pentru sistemul Gm, care este descris în literatură sub numele de haploidism funcțional, a fost pus în evidență și la imunoglobulinele de șoarece, șobolan sau de iepure (Ropartz, 1971).

#### SISTEMUL Am

A fost pus în evidență de Vyas, Perkins și Fudenberg (1968), în urma constatării unor accidente anafilactice apărute după transfuzii repetate și determinate de apariția unor anticorpi anti-IgA în organismul celor transfuzați.

Sistemul Am este situat pe lanțurile grele  $\alpha_2$ , deci apare exclusiv în IgA<sub>2</sub>. El se transmite după legi mendeliene de la o generație la alta, fiind controlat de o singură genă autosomală.

Din punct de vedere fenotipic s-au descris pînă în prezent doi factori antigenici diferiți, Am (1) și Am(2).

Nu se știe dacă Am(1) și Am(2) sînt variații alelice ale unei aceleiași poziții în secvența nucleotidică a ADN, cu alte cuvinte, dacă Am(1)=Am(-2) și reciproc Am(-1)=Am(2), sau dacă ele exprimă diferite secvențe ale unor poziții deosebite din lanțul polipeptidic  $\alpha_2$ .

Kunkel și colab., precum și Van Loghem și colab. (citați după Ropartz, 1971) au arătat că există un lincaj strîns între alela Am<sup>2</sup> și sistemul Gm, de unde concluzia că genele ce controlează sinteza lanțurilor H de izotip  $\alpha$  sînt situate pe același cromozom și foarte apropiate de genele ce controlează lanțurile H de izotip  $\gamma$ .

#### SISTEMUL Gm

Spre deosebire de sistemul Inv și Am, sistemul Gm reprezintă o categorie de determinanți alotipici situați pe lanțurile grele ale Ig ce fac parte din clasa IgG, deci pentru lanțurile  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$  și  $\gamma_4$ .

Sistemul Gm este cel mai complex sistem alotipic investigat la om. Adîncirea studiului lui și odată cu aceasta descoperirea a tot mai multor forme antigenic diferite au adus informații de mare valoare asupra structurii imunoglobulinelor și a controlului lor gene-



tic S-au descris astfel 25 de determinanți diferiți, anterior notați prin litere mici, iar mai recent desemnați după recomandarea O.M.S. prin cifre, după cum se vede din tabelul nr. 4.

Tabelul nr. 4

## Nomenclatura alotipurilor din sistemul Gm (după Ropartz, 1971)

Nomenclatura numerică	Nomenclatura originală	Nomenclatura numerică	Nomenclatura originală
Gm (1)	Gm(a)	Gm(14)	Gm(b <sup>4</sup> )
Gm (2)	Gm(x)	Gm(15)	Gm(A)
Gm(3) = (4)	Gm(b <sup>w</sup> ) = (b <sup>2</sup> )	Gm(16)	Gm(t)
Gm(4) = (3)	Gm(f)	Gm(17)	Gm(z)
Gm(5) = (12)	Gm(b) = (b <sup>1</sup> )	Gm(18)	Ro <sub>2</sub>
Gm (6)	Gm(c)	Gm(19)	Ro <sub>3</sub>
Gm (7)	Gm(r)	Gm(20)	Gm(z)
Gm (8)	Gm(e)	Gm(21)	Gm(g)
Gm (9)	Gm(p)	Gm(23)	Gm(n)
Gm(10) = (13)	Gm(b <sub>α</sub> ) = (b <sup>3</sup> )	Gm(24)	Gm(c <sub>5</sub> )
Gm (11)	Gm(b <sub>β</sub> )	Gm(25)	Gm(Bet)
Gm(12) = (5)	Gm(b <sub>γ</sub> ) = (b) = (b <sup>1</sup> )		
Gm(13) = (10)	Gm(b <sup>3</sup> ) = (b <sub>α</sub> )		

Notă : Gm(22) sau Gm(y) nu figurează în tabel dat fiind că Kunkel a demonstrat că această specificitate este identică cu forma „non-a”.

Deosebiriile dintre diferiții determinanți antigenici Gm se explică prin modificări ale secvențelor de aminoacizi din lanțurile H. Aceste modificări de secvență ar putea fi determinate prin recombinări intragenice, dar, după cum arată Grubb (1970), în cele mai multe cazuri diferențele se datoresc transpoziției unui aminoacid în altul, modificare ce se poate realiza prin înlocuiri ale unui singur nucleotid din tripletele ce codifică acești aminoacizi. Acest argument face ca mutațiile punctiforme să apară drept cauza mai probabilă ce determină variațiile alotipice din sistemul Gm.

Astfel, pentru exemplificare, Gm(4) s-a dovedit a fi deosebit de Gm(-4) prin transpoziția argininei din poziția 214, respectiv în lizină. Această modificare se poate realiza respectiv printr-una din următoarele mutații punctiforme : AGA (Arginină) → AAA (lizină) sau AGG → AAG.

Gm(5) poartă un rest fenilalanină care este substituit în Gm(21) prin tirozină. Și această substituție necesită o modificare a unei singure baze din codonul UUU → UAU sau UUC → UAC.

În mod analog, Gm(1) sau Gm(a) specificat prin secvența Arg—Asp—Glu—Leu în pozițiile 355—358 este înlocuit în Gm(non-a) prin secvența Arg—Glu—Glu—Met. Ambele modificări necesită de asemenea mutații punctiforme, fiind determinate de următoarele schimburi :

Asp→Glu cînd GAC→GAG sau GAU→GAA  
și Leu→Met cînd CUG→AUG sau UUG→AUG.

Inițial s-a crezut că această variație de doi aminoacizi ar putea reprezenta un argument pentru transformarea Gm(a) în Gm(non-a) prin crossing-over intragenic (Natvig și colab., 1967).

Studii filogenetice au arătat totuși că această modificare s-a produs prin două mutații punctiforme apărute pe trepte diferite de evoluție a speciilor.

Astfel secvența Gm(a), Asp—Glu—Leu apare și în IgG a gorilelor și a cimpanzeilor, dar nu în IgG de la babuini și maimuțe *Rhesus*. În schimb, la aceste ultime specii s-a descoperit un peptid cu secvența Glu—Glu—Leu. Este deci probabil că această ultimă secvență a evoluat de la maimuțele inferioare prin hominide către om, divergent, pe de o parte suferind mutația punctiformă Glu→Asp care a determinat secvența Asp—Glu—Leu caracteristică Gm(a), pe de altă parte prin mutația punctiformă Leu→Met care a determinat secvența Glu—Glu—Met caracteristică pentru Gm(non-a).

Cercetările privind secvența lanțurilor grele din molecula imunoglobulinelor au determinat foarte exact localizarea determinantilor antigenici Gm pe aceste lanțuri.

Astfel, după cum se vede din figura 5, factorii Gm 1, 2, 9, 18 și 20 se găsesc situați în segmentul Fc al lanțurilor grele, spre deosebire de Gm 4 și 17 care apar în segmentul Fd al aceluiași lanțuri H din moleculele de IgG<sub>1</sub>. În moleculele IgG<sub>2</sub> și IgG<sub>3</sub> lanțurile H au factori Gm 23, respectiv Gm 5 și 21 situați în segmentul Fc.

Ca și în cazul factorilor Inv, anumiți factori Gm, cum ar fi Gm4 și Gm17, depind de structura cuaternară a moleculei de IgG, în sensul că antigenitatea lor se exprimă în molecula întregă sau în fragmentul Fab, dar nu poate fi regăsită folosind numai lanțul H în formă purificată, deci desprins de lanțul L. O descoperire importantă, făcută de Kunkel și colab. (citați după Grubb, 1970) și ulterior aprofundată de Natvig și colab. (1967) prin analiza corelației dintre determinantii Gm și diferitele subgrupuri de IgG, a arătat că fiecare subclasă de IgG poartă anumiți determinanți antigenici.

Astfel, după cum se poate vedea din tabelul nr. 5, determinanții Gm 1, 2, 3, 4 și 17 apar numai pe lanțul H din molecula IgG<sub>1</sub>. Factorul Gm 23 apare numai pe lanțurile  $\gamma_2$ , iar factorii Gm 5, 6, 10, 11, 13, 14, 21 exclusiv pe lanțurile  $\gamma_3$ . Recent s-a pus în evidență un determinant alotipic și pe lanțul  $\gamma_4$ . Acesta este denumit „ $\gamma_4$  non-a” și se

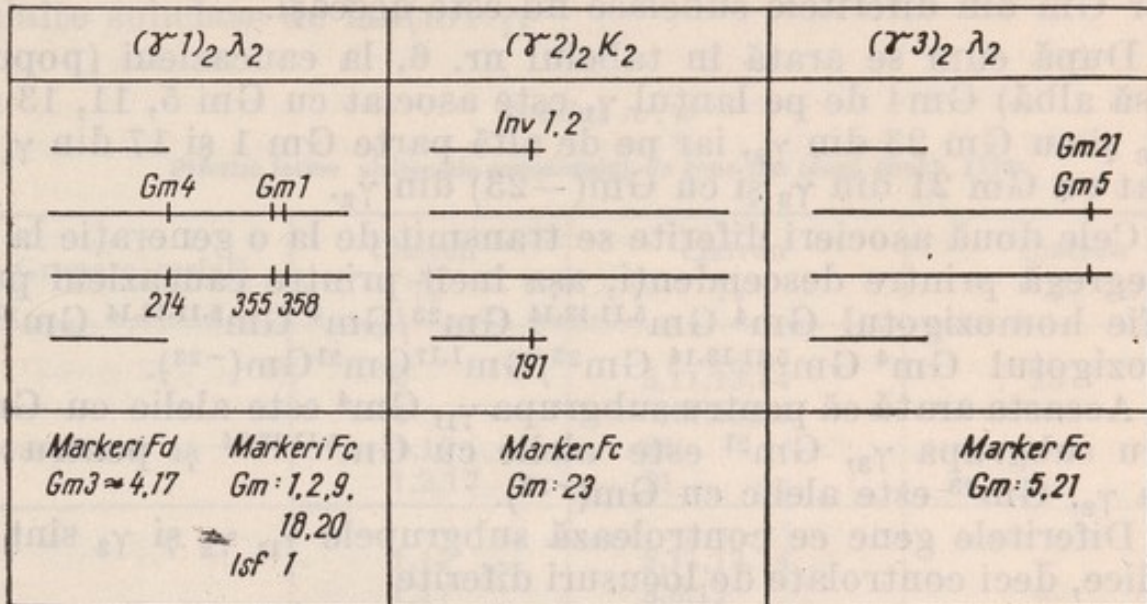


Fig. 5. — Poziția variațiilor de aminoacizi corelați cu alotipurile imunoglobulinelor, în modelul Porter (după Grubb, 1971).

Tabelul nr. 5

Corelații dintre subclasele IgG și factorii Gm din proteinele de mielom (după Grubb, 1970)

Subclasa	Factorii Gm
$\gamma_1$	1,2,3,4,17
$\gamma_2$	23
$\gamma_3$	5,6,10,11,13,14,21
$\gamma_4$	„ $\gamma_4$ non-a”

deosebește de determinantul „non-a” (Gm-1) de pe lanțul  $\gamma_1$  prin secvența aminoacizilor din pozițiile 355—358. În timp ce Gm „non-a” de pe lanțul  $\gamma_1$  are secvența Arg—Glu—Glu—Met, secvența Gm „ $\gamma_4$  non-a” este Glu—Glu—Glu—Met (Natvig și Turner, 1971).

Această constatare ne permite să distingem lanțurile unei anumite subclase prin determinarea unui anumit alotip.

Pe de altă parte, cercetînd distribuția acestor factori genetici din diferite subclase de imunoglobuline printre diverse colectivități, această caracteristică a permis obținerea unor informații asupra controlului genetic al lanțurilor  $\gamma$  din diferite subclase.

Astfel s-a constatat că în diversele grupări rasiale asociate factorilor Gm din diferitele subclase nu este aceeași.

După cum se arată în tabelul nr. 6, la caucazieni (populații de rasă albă) Gm4 de pe lanțul  $\gamma_1$  este asociat cu Gm 5, 11, 13 și 14 din  $\gamma_3$  și cu Gm 23 din  $\gamma_2$ , iar pe de altă parte Gm 1 și 17 din  $\gamma_1$  este asociat cu Gm 21 din  $\gamma_3$  și cu Gm(-23) din  $\gamma_2$ .

Cele două asocieri diferite se transmit de la o generație la alta, dar segregă printre descendenți, așa încît printre caucazieni putem găsi fie homozigotul  $Gm^4 Gm^{5,11,13,14} Gm^{23}/Gm^4 Gm^{5,11,13,14} Gm^{23}$ , fie heterozigotul  $Gm^4 Gm^{5,11,13,14} Gm^{23}/Gm^{1,17} Gm^{21} Gm^{(-23)}$ .

Aceasta arată că pentru subgrupa  $\gamma_1$ , Gm<sup>4</sup> este alelic cu Gm<sup>1,17</sup>, pentru subgrupa  $\gamma_3$ , Gm<sup>21</sup> este alelic cu Gm<sup>5,11,13,14</sup> și pentru subgrupa  $\gamma_2$ , Gm<sup>23</sup> este alelic cu Gm<sup>(-23)</sup>.

Diferitele gene ce controlează subgrupele  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  și  $\gamma_3$  sînt însă nealelice, deci controlate de locusuri diferite.

Aceasta pentru că, indiferent de determinanții Gm purtați, un individ anumit are atît lanțuri  $\gamma_1$ , cît și  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$  și  $\gamma_4$ . Pe de altă parte însă, pentru că s-a constatat că în diferite grupări rasiale asocierea factorilor Gm din diferitele subclase nu este aceeași. Deci putem deosebi între aceste grupări rasiale recombinări diferite între alelele locusurilor  $\gamma_1$  și  $\gamma_2$  sau  $\gamma_3$ . Or, recombinările pot apărea numai între segmentele nonalelice de pe doi cromozomi vecini.

Un exemplu ilustrativ este transmiterea ereditară a Gm(1) și Gm(5) la negri și caucazieni. În timp ce la negri Gm(1) și Gm(5) se transmit în „bloc” de la o generație la alta (Steinberg și colab. citați după Grubb-1970), la caucazieni Gm(1) segregă printre descendenți față de Gm(5). De aici, concluzia că la negri Gm(1) controlat de cistrorul  $\gamma_1$  și Gm(5) controlat de cistrorul  $\gamma_3$  se găsesc pe același cromozom, în timp ce la caucazieni Gm<sup>1</sup> este situat pe celălalt cromozom omolog față de Gm<sup>5</sup> *ca și cum ar fi alelice*, de unde și denumirea acordată de unii autori de pseudoalele. Nonalelismul lor, deci faptul că Gm<sup>1</sup> și Gm<sup>5</sup> reprezintă locusuri diferite pe cromozom, este dovedit însă de coexistența lor pe *același cromozom* la negri.

În concluzie, lanțurile H din diversele subgrupe  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$  și  $\gamma_4$  sînt controlate de cistroni diferiți, care pot apărea sub două sau trei forme alelice deosebite.

În tabelul nr. 6 sînt înșiruite diferitele forme alelice ale celor trei cistroni  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  și  $\gamma_3$ .

Faptul că nu se cunosc încă mai mulți markeri Gm pentru  $\gamma_4$  a făcut imposibilă determinarea formelor sale alelice și însăși existența unui cistron separat  $\gamma_4$  este indusă din constatările făcute pentru celelalte subclase de lanțuri  $\gamma$ .

Tabelul nr. 6

Diferite forme alelice ale complexului de gene Gm (după Grubb, 1970)

Grupare rasială	Cistron $\gamma_1$	Cistron $\gamma_3$	Cistron $\gamma_2$
Caucazieni	4	5,11,13,14	23
	4	5,11,13,14	—
	1,17	21	—
	1,2,17	21	—
Negroizi	1,17	5,11,13,14	—
	1,17	5,6,11	—
	1,17	5,6,11,14	—
	1,17	11,13	—
Mongoloizi	1,17	11,13	—
	1,4	5,11,13,14	23

Asocierile dintre diversele forme Gm din diferiții cistroni  $\gamma$  sînt extrem de stabile, ceea ce denotă că cele trei locusuri,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  și  $\gamma_3$ , sînt foarte strîns lincate, fapt care a justificat denumirea lor de complexe de gene.

Lincajul lor strîns face ca procesul de crossing-over să fie foarte mic, adică pentru un om care are un timp de generație mare (aproximativ 25 de ani) și dă naștere unor frații relativ mici, noile recombinări apar extrem de rar.

Există dovezi care arată că diversele complexe de gene constatate în cadrul grupărilor rasiale, au apărut prin crossing-over și nu prin mutație sau prin supresie genică. Următoarele constatări pledează în favoarea acestei afirmații :

— Observarea unor complexe de gene rare (18 din 5 000 de indivizi) care ar fi putut rezulta prin crossing-overuri între genele  $\gamma_1$  și  $\gamma_3$  sau  $\gamma_3$  și  $\gamma_2$  (Natvig și colab., 1967 ; 1968).

— Constatarea că diferențele dintre complexe de gene ce caracterizează fiecare rasă diferă prin substituții ale unuia sau ale mai multor aminoacizi situați în două sau mai multe locuri diferite din același lanț polipeptid. Astfel, alela  $Gm^{1,17}$  pentru  $\gamma_1$ , apare asociată cu alela pentru  $\gamma_3$ ,  $Gm^{21}$ , în cazul caucazienilor și cu  $Gm^{5,11,13,14}$ , în cazul negrozilor.

Or diferența dintre alelele  $Gm^{21}$  și  $Gm^{5,11,13,14}$  implică o modificare de minimum un aminoacid în 4-5 puncte deosebite, ceea ce face improbabilă mutația ca factor care să genereze aceste asocieri diferite între alelele  $\gamma_1$  și  $\gamma_3$ .

Din distribuția diferitelor asocieri de alele  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  și  $\gamma_3$  observate printre diferitele rase, precum și din studiul complexelor de gene rare remarcate printre familiile de caucazieni, Natvig și colab. (1967) au dedus următoarea ordine de aranjare a cistronilor în complexul de gene  $\gamma$ : începînd de la extremitatea corespunzătoare capătului carboxiterminal și mergînd înspre capătul aminoterminal se găsește cistronul  $\gamma_1$ , după care urmează  $\gamma_3$ ,  $\gamma_2$  și  $\gamma_4$  (fig. 6).

Un alt argument în favoarea acestei aranjări a complexului de gene  $\gamma$  este furnizat de următoarea observație.

Steinberg, Muire și McIntire (citați după Ropartz, 1971) au descris un individ caucazoid care nu avea nici o specificitate alotipică, nici pentru  $\gamma_1$  și nici pentru  $\gamma_3$ . Din punct de vedere imunochimic s-a constatat că în serul acestui individ nu apăreau nici lanțuri  $\gamma_1$  și nici lanțuri  $\gamma_3$ , ci numai molecule hibride de imunoglobulină care aveau lanțuri H formate din partea aminoterminală de tip  $\gamma_3$  și partea carboxiterminală, deci segmentul Fc, de tip  $\gamma_1$ . Acest lanț hibrid ar putea să provină dintr-un crossing-over inegal intragenic, în genele  $\gamma_3$  și  $\gamma_1$  cu pierderea unui fragment și formarea unei noi gene  $\gamma_3-\gamma_1$ , precum și a unei alele  $Gm^{1,17,4}$   $Gm^{21,5}$   $Gm^{23}$  încă nedetectată (fig. 7).

Întocmai ca și pentru sistemul Inv și în cazul sistemului Gm la nivelul macroorganismului se constată că se produc atît lanțuri  $\gamma_1$ , cît și lanțuri  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$  și  $\gamma_4$ , deci funcționează toate genele din complexul  $\gamma$ , iar în fiecare subclasă  $\gamma$  se exprimă ambele alele. De exemplu, în serul unui heterozigot pentru gena  $\gamma_1$ , cum ar fi  $Gm^4/Gm^{1,17}$ , vom găsi atît lanțuri Gm(4), cît și lanțuri Gm(1,17).

Deci la nivelul macroorganismului, cele două alele sînt codominante. În schimb, la nivelul unei singure celule producătoare de anticorpi se va constata fenomenul excluderii alelice, deci se vor sintetiza numai lanțuri  $\gamma_1$  Gm(4), sau numai Gm(1,17), precum și fenomenul excluderii de subgrup, deci celula va sintetiza numai

lanțuri  $\gamma_1$ , suprimind funcționalitatea celorlalte gene pentru alte clase sau subclase de lanț H.

Stabilitatea genetică a sistemelor Gm și Inv s-a dovedit a fi foarte mare. Acest lucru contrastează puternic cu variabilitatea mare

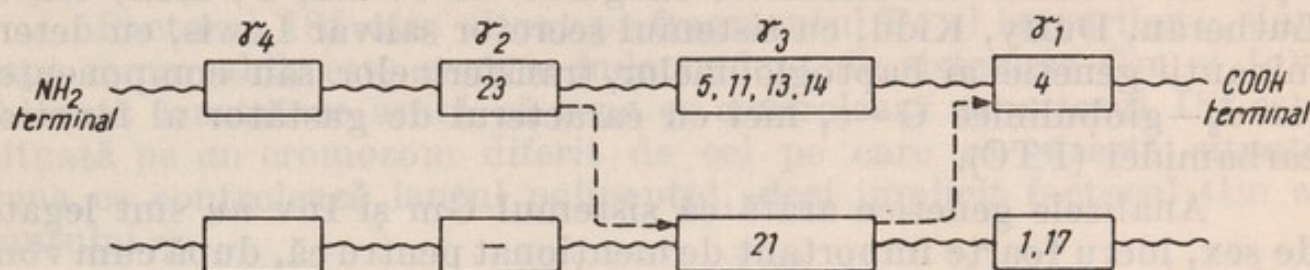


Fig. 6. — Ordinea genelor  $\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4$  din complexul de gene  $\gamma$  de pe cromozom (după Natvig și colab., 1967). Săgeata punctată arată modalitățile de crossing-over ce duc la apariția complexelor de gene rare.

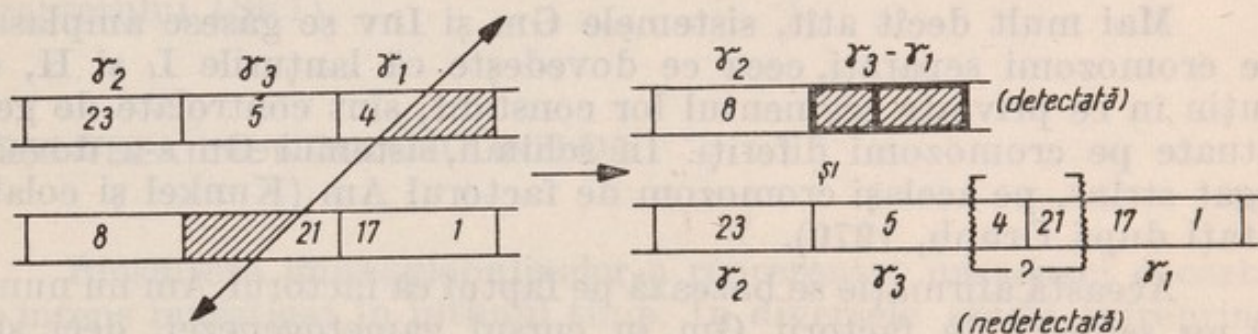


Fig. 7. — Recombinarea intragenică ce duce la apariția unui lanț hibrid  $\gamma_1-\gamma_3$  (după Ropartz, 1971; modificat).

a situsurilor combinate ale anticorpilor și este cu atât mai frapant cu cât o serie de determinanți, cum ar fi Gm (3) (4) și Gm (17), se cunosc a fi localizați în fragmentul Fd pe care se găsește și regiunea variabilă a lanțurilor H.

Dovezi în favoarea stabilității sistemelor Gm și Inv au fost aduse de cercetări care au arătat că :

— tipurile Gm și Inv ale unui individ sînt remarcabil de constante toată viața, nefiind afectate de variațiile stării imune a acestui individ ;

— prin studii familiale s-a dovedit că aceste sisteme se transmit de la o generație la alta cu rigurozitate perfectă ;

— în sfîrșit, gemenii monoziگوți s-au dovedit a fi invariabili concordanți pentru toți factorii investigați.

În ce privește raportul dintre sistemele Gm și Inv, pe de o parte, și alte sisteme genetice studiate la om, pe de altă parte, după datele colecționate de Grubb (1970), determinanții genetici ai imunoglobulinelor umane nu s-au dovedit a fi legați genetic și nici asociați fenotipic cu vreunul din sistemele sanguine ABO, Rh, P, Kell, MNS, Lutheran, Duffy, Kidd, cu sistemul secretor salivar Lewis, cu determinanții genetici ai haptoglobinelor, transferinelor sau componentelor  $\alpha_2$ -globulinice G-c, nici cu caracterul de gustător al fenotio-carbamidei (PTC).

Analizele genetice arată că sistemul Gm și Inv *nu* sînt legate de sex, lucru foarte important de menționat pentru că, după cum vom arăta ulterior, răspunsul imun prin producere de anticorpi este sigur influențat de un factor încă necunoscut situat pe cromozomul X, după cum o dovedesc o serie de boli autoimune și mai ales existența unei forme de agammaglobulinemie genetic transmisibilă *legată* de cromozomul X (vezi capitolele respective).

Mai mult decît atît, sistemele Gm și Inv se găsesc amplasate pe cromozomi separați, ceea ce dovedește că lanțurile L și H, cel puțin în ce privește segmentul lor constant, sînt controlate de gene situate pe cromozomi diferiți. În schimb, sistemul Gm s-a dovedit legat strîns, pe același cromozom de factorul Am (Kunkel și colab., citați după Grubb, 1970).

Această afirmație se bazează pe faptul că factorul Am nu numai că nu segregă de factorii Gm în cursul gametogenezei, deci sînt situați pe același cromozom dar că la 13 cupluri cu 41 descendenți nu s-a constatat nici un recombinant pentru cele două sisteme.

Rezultă că genele ce controlează diversele clase de lanțuri H, în mod special ne referim la genele pentru lanțul  $\alpha_2$  și cele pentru lanțurile  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$  și  $\gamma_4$ , sînt înșiruite foarte aproape pe un același cromozom.

#### SISTEMUL ISf

Un alt determinant genetic situat pe imunoglobulinele umane IgG<sub>1</sub> a fost descris mai recent și desemnat sub numele de ISf.

Cele două fenotipuri posibile determinate de acest factor sînt ISf(1) și ISf(-1); ele se transmit ereditar, mendelian unifactorial și sînt implicate în determinarea șocurilor posttransfuzionale cu sînge de la indivizi ISf(1) la primitori ISf(-1).



O particularitate deosebită a acestui determinant alotipic este faptul că el se exprimă fenotipic variat în funcție de vârsta individului, mai ales la caucazoizi. Astfel, după Ropartz (1971), apare la 25 % din caucazoizii între 1 și 20 ani, la 40 % între 21 și 60 ani și la 60 % peste 70 ani.

Factorul ISf este situat pe fragmentul Fc al lanțurilor  $\gamma_1$  dar, fapt remarcabil, este genetic independent de sistemele Gm și Inv. Această constatare arată că gena ce controlează caracterul ISf este situată pe un cromozom diferit de cel pe care se găsește situată gena ce controlează lanțul polipeptid, deci implicit factorul Gm al lanțului  $\gamma$ .

Aceasta argumentează presupunerea lui Ropartz și colab. (citați după Ropartz, 1971) și Moraru și colab. (1971) că gena ISf codifică o enzimă responsabilă de grefarea unei grupări glucidice pe lanțul  $\gamma_1$ , gruparea glucidică și nu secvența lanțului polipeptid reprezentând determinantul antigenic responsabil de exprimarea caracterului ISf(1).

## BIOSINTEZA IMUNOGLOBULINELOR

Biosinteza imunoglobulinelor a reprezentat un aspect deosebit de intens investigat în ultimul timp. În diversele studii întreprinse în legătură cu această problemă au fost rînd pe rînd utilizate drept indicatori ai sintezei imunoglobulinelor fie specificitatea de alotip, fie specificitatea de izotip, sau specificitatea de antigen.

Acești indicatori au fost urmăriți *in vivo* sau *in vitro* prin diverse tehnici experimentale, cum ar fi culturile celulare (Adler și colab., 1966; Fishman și colab., 1964; Tarrab și colab., 1971), hemoliza locală în gel (Nossal și colab., 1971), sau sistemele acelulare (Jächerts 1966, 1967, 1968; Shapiro și colab., 1966a).

**Celulele implicate în sinteza imunoglobulinelor.** A. P l a s - m o c i t u l. Astăzi este unanim admis faptul că linia plasmocitară reprezintă principala linie celulară implicată în procesul de formare a anticorpilor. O serie de observații și dovezi experimentale au confirmat aceste fapte.

— După administrarea unui antigen se constată în splină și în ganglionii limfatici o proliferare plasmocitară. Nivelul maxim al

acestei proliferări corespunde apariției anticorpilor specifici în ser și creșterii corespunzătoare a gammaglobulinelor.

— Plasmocitomu uman sau cel murin sînt însoțite întotdeauna de o hipergammaglobulinemie, în timp ce la bolnavii cu agammaglobulinemie se constată că reacția celulară la un antigen dat nu este însoțită de proliferare plasmocitară.

— Cantitatea de anticorpi care poate fi extrasă dintr-un țesut este proporțională cu gradul proliferării plasmocitare.

— Plasmocitul este o celulă care are un conținut foarte ridicat în acid ribonucleic și un reticul endoplasmic de tip R foarte bine dezvoltat. Aceste elemente sînt caracteristicile principale ale celulelor în care are loc un proces intens de sinteză a proteinelor.

Există însă și o serie de dovezi experimentale directe care confirmă rolul plasmocitelor în sinteza imunoglobulinelor. Astfel:

— Evidențierea anticorpilor prin reacția de imunofluorescență, utilizînd seruri antigammaglobulină marcate cu fluorocromi.

— Evidențierea prezenței anticorpilor, utilizînd ser antigammaglobulinic marcat cu feritină. Aplicînd această metodă, Petris și colab. (1963), Petris și Karlsbad (1965) și Rifkind și colab. (1962) au constatat la microscopul electronic prezența anticorpilor în plasmocite și precursorii lor, la nivelul reticulului endoplasmic al acestora.

— Aplicarea tehnicii de hemoliză locală în gel (Jerne) a arătat de asemenea că anticorpii sînt sintetizați în plasmocite. Bussard (1967, 1971) a dovedit formarea lor *de novo*, deoarece apariția lor era inhibată prin puromicină sau actinomycină D, inhibitori caracteristici fie metabolismului proteic, fie transcrierii mesajului genetic conținut în genomul celular.

B. L i m f o c i t u l a fost considerat ca producător de anticorpi încă de la primele cercetări efectuate cu scopul de a elucidă tipul de celule implicate în anticorpogeneză.

Faptele care pledau în favoarea acestei ipoteze erau următoarele :

— limfocitele din limfa aferentă a ganglionilor limfatici stimulați cu un anumit antigen conțineau anticorpi specifici față de acesta ;

— titrul anticorpilor serici crește după administrarea de agenți limfolitici, cum ar fi razele X, azot-iperita, cortizonul și ACTH ;

— evidențierea formării de anticorpi în limfocite menținute în camere de difuziune și introduse la animale izologe ;

— evidențierea formării de anticorpi în țesutul limfatic provenit de la animale imune, cultivat *in vitro* și stimulat secundar.

În ciuda acestor argumente, două fapte esențiale se ridicau împotriva implicării limfocitelor în anticorpogeneză: absența unei organizări subcelulare caracteristice celulelor sintetizatoare de proteine (reticulul endoplasmic în limfocite este slab dezvoltat), precum și neevidențierea anticorpilor în aceste celule.

Studiile din ultimii ani au depășit și aceste obstacole, reușind să demonstreze sinteza de imunoglobuline de către limfocitele cultivate *in vitro*.

Stimularea producerii de anticorpi de către limfocitele imune, *in vitro*, se realizează însă numai după tratarea acestor celule cu fitohemaglutinină sau cu antigenul specific.

S-a observat că acest tratament induce inițial o dediferențiere a limfocitelor care suferă o transformare blastică, după care ulterior celulele blastice se vor transforma în celule din seria plasmocitelor, producătoare de anticorpi. Acest proces este însoțit de importante modificări morfologice, dintre care cele mai însemnate sînt următoarele:

— creșterea numărului de lizozomi (Diengdoh și Türk, 1965), organite celulare care au un rol important în endocitoză;

— creșterea numărului de ribozomi și dezvoltarea reticulului endoplasmic, care prezintă mai multe vacuole și cisterne;

— dezvoltarea aparatului Golgi la nivelul căruia s-a evidențiat prin tehnica de imunofluorescență prezența anticorpilor.;

— existența unui ciclu celular de sinteză a ADN, pus în evidență prin creșterea ratei de captare a timidinei tritiate (Sulica și colab., 1971; Tarrab și colab., 1971).

Chessin și colab. (1968) au arătat că *in vitro* limfocitele umane circulante pot sintetiza de asemenea imunoglobuline de diverse izotipuri.

**Biosinteza moleculelor de imunoglobuline.** Biosinteza anticorpilor urmează etapele esențiale ale biosintezei oricăror proteine controlate genetic. Rezultă deci că informația genetică codificată în molecula ADN va fi transcrisă mai întâi în cursul sintezei unei molecule complementare de ARN-m. Acest mesager migrează apoi de la nivelul nucleului pînă în citoplasmă, unde se realizează „lectura” sa după legarea la ribozomi.

Spre deosebire de sinteza altor proteine însă, sinteza imunoglobulinelor este declanșată de un semnal, constituit de stimulul antigenic. Etapele descrise reprezintă deci faze ce urmează intro-

ducerii antigenului în organism. Aceste etape duc în final la apariția anticorpilor specifici, în raport cu antigenul care le-a declanșat sinteza.

Secvența lor convențională ar fi următoarea :

1. *Intensificarea biosintezei ADN în celulele formatoare de anticorpi ca urmare a stimulării antigenice.* Pătrunderea antigenului în organism este urmată de o succesiune de modificări celulare în organele limfoide. Încă după primele ore de la administrarea antigenului se constată o proliferare a celulelor blastice care atinge maximul în a treia zi. Aceste celule, în urma a 7-8 diviziuni, suferă un proces de maturizare și diferențiere, dând naștere plasmocitelor care încep să apară în ziua a treia, concomitent cu apariția anticorpilor serici.

Faza proliferativă celulară care se datorează acțiunii mitogene a antigenului asupra celulelor din linia limfoplasmocitară se caracterizează prin sinteza ADN, pe cînd faza productivă corespunzătoare maturizării plasmocitelor și biosintezei de anticorpi, prin creșterea sintezei de ARN.

Primele observații efectuate asupra creșterii conținutului în acizi nucleici în organele limfoide, în urma stimulării antigenice, au fost efectuate prin determinări microchimice și prin colorații histochimice, Ehrlich și colab. (1949) au constatat că există un paralelism între conținutul total de ADN din ganglionii limfatici și creșterea în greutate a acestora în primele zile de la administrarea antigenului. Corelarea determinărilor microchimice cu datele histologice arată că, în primele 4 zile cînd apare o creștere a conținutului în ADN, reacția celulară caracterizată printr-o multiplicare a celulelor reticulare tinere și a celulelor blastice este cea mai intensă.

Schooley și Berman (1960), Mäkelä și Nossal (1962), Sulica și colab. (1971a), Tarrab și colab. (1971) au arătat de asemenea că în urma stimulării antigenice în celulele blastice din organele limfoide are loc o sinteză de ADN, acestea încorporînd activ timidina tritiată. Aceste celule sînt precursorii plasmocitelor și, după Miller (1965), ele sînt localizate atît în corticala, cît și în medulara ganglionilor limfatici. Celulele blastice cu sinteză activă de ADN se găsesc și în centrul germinativ (Cottier și colab., 1964). Rezultă că răspunsul imun prin sinteză de anticorpi nu poate avea loc în lipsa sintezei de ADN indusă de efectul mitogenic al antigenului.

Astfel, O'Brien și Coons (citați după Askonas și Williamson, 1969) au studiat efectul inhibitorilor sintezei ADN, cum ar fi bromodezoxiuridina, asupra răspunsului imun *in vitro* al unei culturi de

celule de ganglioni limfatici provenită de la animale imunizate cu două antigene diferite A și B. S-a constatat că adăugarea de bromodezoxiuridină odată cu antigenul A blochează răspunsul imun față de acest antigen. Dacă se îndepărtează însă bromodezoxiuridina și se adaugă în aceeași cultură antigen B, producerea de anticorpi anti-B se desfășoară nestinjenită.

Toate aceste date arată clar că în cursul perioadei de proliferare celulară, consecutivă stimulării antigenice, are loc o sinteză de ADN în celulele blastice precursorale ale celulelor formatoare de anticorpi. Maturizarea acestor celule în plasmocite este însoțită de oprirea sintezei. În cromatina nucleilor celulelor din constituția țesuturilor vertebratelor, ADN se găsește complexat cu histonele. Proteinele bazice care solidarizează segmentele de ADN din cromatidă nu permit desfășurarea funcției de matrice a ADN, nici pentru sinteza de ADN realizată de polimeraza ADN și nici pentru sinteza de ARN realizată de ARN-polimerază. Black și Ansley (1965), utilizând colorația cu argint amoniacal și Fast green alcalin, au demonstrat scăderea histonelor în nucleii limfocitelor după injecția de antigen. S-au emis mai multe ipoteze în legătură cu această pierdere de histone în urma stimulării antigenice, dar pînă în prezent nu există dovezi care să argumenteze diferitele puncte de vedere.

2. *Intensificarea biosintezei de ARN în celulele formatoare de anticorpi ca urmare a stimulării antigenice.* În urma pătrunderii antigenului în organism, sinteza intensă de ADN în celulele formatoare de anticorpi are sensul multiplicării genomurilor celulare ce poartă informația genetică necesară sintezei imunoglobulinelor. Pentru sinteza anticorpilor această informație trebuie însă transmisă la ribozomi prin intermediul ARN-m. Rezultă deci că etapa de biosinteză a ADN va fi urmată de o etapă în care se produce o sinteză intensă de ARN. Începînd din a 4-a — a 6-a zi de la administrarea antigenului, moment ce corespunde și apariției anticorpilor în ser, reacțiile histochemice, precum și determinările biochimice au indicat creșterea ARN în organele limfoide formatoare de anticorpi (Fagraeus, 1948; Harris și Harris, 1949; Makinodan și colab., 1954).

Cercetările biochimice care au utilizat ca metodă de studiu a metabolismului ARN încorporarea citidinei sau a uridinei tritiate au arătat intensificarea sintezei ARN în celulele formatoare de anticorpi după stimularea antigenică (Kornguth și colab., 1965; Newsome, 1965).

Cottier și colab. (1964) au arătat că intensificarea sintezei de ARN în celulele limfoide începe cu 2 zile înainte de apariția anti-

corpilor în ser. Procesul de dediferențiere a limfocitelor sub acțiunea fitohemaglutininei sau a streptolizinei este de asemenea însoțit de o sinteză crescută de ARN (Cooper și Rubin, 1965). Intensificarea sintezei de ARN în celulele limfoido-plasmocitare, fapt evidențiat atât de datele histochemice, cât și de cele biochimice, explică funcția acestor celule în procesul imun, respectiv în sinteza imunoglobulinelor (anticorpilor).

### 3. *Caracteristicile ARN-m din celulele formatoare de anticorpi.*

Biologia moleculară acceptă pentru demonstrarea existenței unui ARN mesager câteva probe de bază care pun în evidență cele două particularități funcționale specifice acestor macromolecule, și anume : a) inhibarea producerii acestui tip de ARN prin substanțe cum ar fi actinomicina D, care blochează transcrierea ARN pe matricea ADN prin inhibarea funcției ARN-polimerazei dependentă de ADN ; b) detectarea prin reacții de hibridizare ADN-ARN a unor secvențe specifice, complementare, caracteristice unui anumit lanț polipeptid, și c) capacitatea de a funcționa ca matrice pentru sinteza unui lanț polipeptid specific și deci capacitatea de a forma polizomi.

a) În ce privește prima probă, experiențele lui Simley și colab. (1964), precum și cele ale lui Tawde și colab. (1966) au pus în evidență inhibiția sintezei de anticorpi atât *in vivo*, cât și *in vitro* prin administrarea de actinomicină D. Recent, Bussard (1971) a confirmat acest lucru, arătând că actinomicina D inhibă ireversibil formarea de hemolizine antihematie de oaie detectate într-o populație de celule splenice prin tehnica hemolizei locale în gel. După acest autor, durata de viață funcțională a ARN mesager specific pentru sinteza hemolizinei este de 4 ore, deși această cifră variază mult de la o celulă producătoare de anticorpi la alta. În cazul blocării sintezei anticorpilor prin actinomicină D, sinteza ARN-m ce codifică sinteza imunoglobulinelor pare a fi cel mai probabil inhibată, deși în acest tip de experimente nu poate fi exclusă și inhibiția sintezei ARN ribozomal sau de transfer, ori a altor molecule ARN-m importante pentru funcționalitatea celulelor.

b) Referitor la detectarea unor specii noi de ARN cu o secvență specifică, după conversiunea celulelor neimune în celule producătoare de anticorpi, o serie de lucrări au arătat inițial că prin reacții de hibridizare ADN-ARN se pot pune în evidență specii noi de ARN (Rajka și Cohen, 1968).

Ulterior însă, alți cercetători au confirmat parțial aceste rezultate, arătând că într-adevăr apar specii noi de ARN, dar că secvența

acestor specii nu diferă în funcție de un anumit antigen, deci nu pot fi considerate drept molecule de ARN mesager ce codifică sinteza unui anticorp cu o specificitate antigenică dată.

Noile secvențe ale moleculelor ARN ar putea fi puse mai degrabă în legătură cu comutarea globală a celulelor de la stadiul de celulă neimună la cel de celulă producătoare de anticorpi (Church și colab., 1968). Controversa menționată a fost în bună parte întreținută de o dificultate de ordin tehnic, în sensul că prin metodele cunoscute reacția de hibridizare ADN-ARN este încă prea puțin sensibilă pentru a putea sesiza diferențe de secvență pe o porțiune de aproximativ 300 de baze azotate (adică numărul aproximativ de aminoacizi din porțiunea variabilă a unui lanț L sau H, înmulțit cu 3), în raport cu întregul genom al unui macroorganism.

c) În ce privește capacitatea ARN-m de a funcționa ca matrice în biosinteza imunoglobulinelor există o serie de lucrări care afirmă că au reușit să se sintetizeze anticorpi specifici în sisteme acelulare, prin incubarea unui amestec format din ARN — se presupune mesager —, ribozomi, precum și din celelalte componente implicate în biosinteza lanțurilor polipeptidice, printre care ARN de transfer, enzime activatoare de pH 5 (aminoacil-ARN-t sintetaza) și aminoacizi (Jächerts, 1966, 1967, 1968). Din păcate, pentru moment, aceste lucrări nu au fost încă confirmate și de alți cercetători.

Cu toate acestea, datele prezentate converg pentru a argumenta afirmația că ARN care folosește ca matrice pentru biosinteza lanțurilor L și H din molecula imunoglobulinelor este un ARN mesager, care se sintetizează prin copierea unui fragment din molecula ADN.

4. *Biosinteza lanțurilor polipeptidice din molecula imunoglobulinelor.* După intensificarea sintezei ADN și apoi a ARN, determinată de stimularea antigenică, în celulele formatoare de anticorpi urmează sinteza propriu-zisă a moleculelor de imunoglobulină. Ca și în cazul altor proteine, biosinteza lanțurilor polipeptidice din molecula imunoglobulinelor se realizează prin asamblarea și apoi legarea aminoacizilor liberi pe matricea constituită din ARN-mesager. Acest proces are loc la nivelul unor agregate de ribozomi solidarizate printr-un filament de ARN-m, deci la nivelul polizomilor.

Faptul că sinteza anticorpilor are loc la nivelul ribozomilor este argumentat de următoarele date experimentale :

— Prezența de anticorpi specifici în fracțiunile microzomiale izolate din organele limfoide de la animalele imunizate.

Askonas și Humphrey (1958) au arătat că fracțiunea microzomială din splina și măduva osoasă, provenite de la iepuri hiper-

imunizați, conținea anticorpi legați, care erau detașați după tratare cu diferiți agenți, cum ar fi ultrasunetele, incubarea cu RNA-ază la 37°C, tripsină, chimotripsină, dezoxicholat. Feldman și colab. (1960) au dovedit prezența de anticorpi față de hematiile de oaie sau de cal în fracțiunea microzomală preparată din ganglionii limfatici, proveniți de la iepurii imunizați cu aceste antigene.

— Încorporarea mai activă a aminoacizilor în ribozomii grei extrași din splinele iepurilor imunizați comparativ cu cei extrași din splinele animalelor neimunizate. Pagoulatos (1966) a demonstrat în sisteme acelulare încorporarea mai activă a aminoacizilor în preparatele microzomiale provenite de la animale imunizate comparativ cu cele normale.

— Demonstrarea cu ajutorul metodei anticorpilor marcați cu feritină a prezenței anticorpilor în reticulul endoplasmic din celulele formatoare de anticorpi.

Rifkind și colab. (1962) au studiat cu ajutorul metodei anticorpilor antigammaglobulină marcați cu feritină localizarea intracelulară a gammaglobulinelor produse de plasmocitomul murin linia 5563.

Acești autori au constatat că gammaglobulinele se găsesc în reticulul endoplasmic, și anume în veziculele cu suprafața rugoasă. Feritina este observată nu numai la nivelul cisternelor, ci și pe ribozomii liberi situați în matricea citoplasmatică extracisternică.

În sfârșit, Bussard (1971) a arătat că puromicina, inhibitor specific al biosintezei lanțurilor polipeptidice la nivelul ribozomilor, reușește să blocheze sinteza hemolizinelor antihematice de oaie detectate prin tehnica hemolizei locale în gel (Jerne).

S-a constatat că lanțurile L și H se sintetizează separat pe polizomi diferiți. Acest fapt a fost dovedit prin diverse modele experimentale care pot fi sistematizate, după Askonas și Williamson (1969), în felul următor :

a) Izolarea polizomilor pe care se sintetizează lanțurile de imunoglobuline în celulele de plasmocitom, prin precipitarea acestora selectiv cu ser anti-lanț L și anti-lanț H, a permis caracterizarea agregatelor care sintetizează lanțuri polipeptidice născînde. Williamson și Askonas (1967) au utilizat în experiențele lor celule din plasmocitomul murin linia 5563, în timp ce Shapiro, Scharff, Maizel și Uhr (1966) au folosit o altă linie de plasmocitom, MPC 11.

Ambele lucrări au ajuns la concluzii similare, și anume că lanțurile H se sintetizează pe polizomi grei cu constantă de sedimentare



300 S, avînd 16—18 ribozomi care sînt solidarizați de o moleculă mai lungă de ARN-m.

Spre deosebire de aceștia, lanțurile L sînt sintetizate pe polizomi mai ușori, cu constanta de sedimentare 180 S. Acești polizomi sînt formați din 5—6 ribozomi, care deci sînt solidarizați de un filament de ARN-m mai scurt decît cel ce controlează sinteza lanțului H.

b) Marcarea în pulsuri a peptidelor născînde constă în marcarea lanțului polipeptid cu un izotop radioactiv pe durate diferite de timp, după care aceste lanțuri polipeptidice nou sintetizate, care au încorporat în variate momente izotopul radioactiv, sînt izolate și purificate. Dacă se consideră că lanțul L și respectiv H sînt sintetizate ca lanțuri întregi și nu rezultă din alăturarea cap la cap a unor lanțuri mai mici, evident că în momentul întreruperii sintezei proteice, pe lîngă lanțurile gata sintetizate care au marcajul încorporat pînă la capătul carboxiterminal, un număr de lanțuri se găsesc încă în curs de sinteză și un alt număr de lanțuri de-abia au început să asambleze aminoacizii capătului lor aminoterminal.

Într-adevăr, experiențele au constatat un gradient continuu de radioactivitate specifică, care este maxim în porțiunea aminoterminală și descrește pe măsură ce se apropie de regiunea carboxiterminală.

De aici concluzia că lanțul L și respectiv H au un singur punct de inițiere a sintezei, situat în capătul amino, și că de la acest punct de inițiere sinteza continuă parcurgînd tot lanțul pînă la încheierea sa cu capătul carboxiterminal.

Rezultă că atît regiunea V, cît și regiunea C a unui lanț L sau H sînt codificate în secvența aceleiași molecule de ARN mesager. Acest fapt determină anumite consecințe care impun unele restricții în ce privește mecanismul prin care se produce variabilitatea anticorpilor (vezi subcapitolul respectiv).

c) Un alt grup de dovezi în favoarea acestui punct de vedere este observația că markerii genetici umani, situați pe porțiunea Fd(Gm4) și cei situați în porțiunea Fc(Gm20), de pe lanțul  $\gamma_1$  (deci lanțul H din IgG<sub>1</sub>), se transmit genetic întotdeauna concomitent ca și cum o singură genă ar codifica întregul lanț H ( $\gamma_1$ ). Este deci foarte probabil că atît regiunea V (situată în segmentul Fd, cît și regiunea C situată în segmentul Fc, cel puțin în cazul lanțurilor  $\gamma$ , să fie controlate de una și aceeași genă. O singură observație pare a contrazice acest punct de vedere.

S-a constatat că trei clase de imunoglobuline de iepure, IgG, IgA și IgM, poartă aceiași markeri alotipici în segmentul Fd a lanțurilor lor H (respectiv  $\gamma$ ,  $\alpha$  și  $\mu$ ).

Această constatare impune o concluzie diametral opusă, și aume că segmentul Fd, cuprinzând regiunea V a lanțurilor  $\gamma$ ,  $\alpha$  și  $\mu$ , este controlată de una și aceeași genă și că alte trei gene codifică în acest caz segmentele Fc caracteristice pentru clasele IgG, IgA și IgM.

Produsele controlate de aceste gene, lanțuri Fd H și Fc H, ar urma să se sudeze cap la cap și aceasta ori în cursul formării lanțului polipeptid H, fapt care pare improbabil datorită argumentelor experimentale expuse la punctele a) și b), ori, fapt ciudat, prin legarea cap la cap a celor două molecule de ARN mesager ce codifică segmentul Fd și respectiv Fc, urmînd ca aceste molecule juxtapuse să formeze o unică matrice pentru sinteza unui lanț H întreg.

O altă explicație pentru această observație experimentală este că, în cursul dezvoltării somatice a individului, genele V inițial separate de genele C ajung printr-un mecanism de translocăție să se alăture una alteia, așa încît transcrierea ARN-m se face de-a lungul unei singure gene rezultate din contopirea cistronilor V și C (vezi subcapitolul care urmează referitor la ipoteze privind mecanismele variabilității situsului combinativ).

Dat fiind că, după cum am arătat anterior, marea majoritate a celulelor producătoare de anticorpi sintetizează cîte o singură clasă și subclasă de imunoglobuline (Nussenzweig și colab., 1968); această translocăție are sensuri deosebite în diferitele celule capete de clonă. Astfel, într-o clonă translocăția are sensul „genă V”  $\rightarrow$  „genă C $\gamma$ ”, în altă clonă, „genă V”  $\rightarrow$  „genă C $\mu$ ”, și în altă clonă, „genă V”  $\rightarrow$  „genă C $\alpha$ ”.

Observația experimentală rămîne însă în discuție pentru că, după cum arată Askonas și Williamson (1969), determinarea alotipurilor se bazează pe identificarea cu seruri anti-alotip care pot revela determinanți antigenici compleși, încă necunoscuți. Astfel, după Pernis și colab. (1968), s-ar putea ca alotipurile comune detectate în segmentul Fd al lanțurilor H de tip  $\alpha$ ,  $\mu$  și  $\gamma$  de iepure să fie determinate de carbohidrați sau alte molecule atașate pe lanț după desprinderea polipeptidelor de pe ribozomi.

Deși pînă în prezent nu se știe dacă într-adevăr alotipurile identice de pe lanțurile  $\alpha$ ,  $\mu$  și  $\gamma$  de iepure se datoresc exclusiv unor carbohidrați, totuși Schubert (1970) a arătat că atît în cazul

IgM, cât și al IgA provenite din plasmocitoamele de șoarece, carbohidrații sînt atașați numai pe lanțurile H la cel puțin două minute după eliberarea acestor lanțuri de pe ribozomi. Mai mult decît atît, numai lanțurile la care s-a legat deja carbohidratul pot fi excretate extracelular sub formă de imunoglobuline.

5. *Asamblarea imunoglobulinelor complete.* Experiențele lui Askonas și Williamson (1967) au arătat că inițial se desprind lanțurile L de pe polizomii ușori, așa încît în orice moment în celulele producătoare de anticorpi se poate detecta un exces de lanțuri L libere. Pentru a urmări dinamica asamblării lanțurilor L și H și formarea moleculelor IgG complete, autorii au recurs la experiențe de tip „pulse-chase” (marcare în pulsuri și îndepărtarea marcajului).

Cu alte cuvinte, celulele de ganglion limfatic sînt incubate perioade de timp scurt (5—10 minute) cu un aminoacid radioactiv, după care marcajul radioactiv este îndepărtat și celulele sînt incubate în continuare cu același aminoacid însă nemarcat de data asta. Rezultă că lanțurile L sau H sintetizate la 5 minute după adăugarea aminoacidului marcat au încorporat acest marcaj în molecula lor. După 5 minute de la îndepărtarea izotopului, noile lanțuri L sau H sintetizate nu mai sînt marcate, în schimb primele lanțuri L sau H marcate pot fi găsite în moleculele de IgG complet asamblate sau în curs de asamblare. Din aceste experiențe s-a tras concluzia că există o sinteză „echilibrată” de lanțuri L și H, cu alte cuvinte se sintetizează atîtea lanțuri H cîte sînt necesare pentru a forma molecule de imunoglobulină complete, cu lanțurile L deja existente.

Sinteza lanțului L precede deci cu puțin și controlează sinteza lanțului H, dat fiind că în celulă nu s-au găsit niciodată lanțuri H libere. Dacă este așa, ar trebui ca puntea disulfidică L—H să se formeze foarte curînd sau chiar pe polizomul pe care se sintetizează lanțurile H. Or s-a văzut că în celule nu apar niciodată intermediari de tipul L—H. În schimb s-au găsit sub formă liberă intermediari de tipul H—H și de tipul L—H—H.

În concluzie, două căi diferite pot duce la asamblarea moleculelor de IgG (Askonas și Williamson, 1969) :

a) dimerizarea lanțurilor H, cu formarea intermediarului H—H, se produce atîta vreme cît lanțurile grele sînt încă legate de polizomi și ulterior acești intermediari H—H sînt desprinși de pe polizom odată cu atașarea unui lanț L ;

b) dimerizarea lanțurilor H are loc după ce aceste lanțuri se desprind de pe ribozom și ajung în cisternele reticulului endoplasmic,

după care acești intermediari H—H se leagă succesiv la câte un lanț L, formînd intermediari L—H—H și apoi molecule de IgG complete L—H—H—L.

După cum se va arăta în capitolul „Defecte genetice în sinteza imunoglobulinelor”, în cursul transformărilor maligne ale celulelor sintetizatoare de imunoglobuline, adeseori echilibrul dintre sinteza lanțurilor L și cea a lanțurilor H este rupt în așa fel încît în ser pot apărea produși intermediari, incomplet asamblați sau chiar lanțuri libere.

Prin încrucișarea artificială a găinilor de Guineea (*Numida meleagris*) (Nu) cu cocoșul domestic (Ga) s-au obținut hibridi în serul cărora au putut fi investigați determinanții antigenici parentali situați pe moleculele IgG (7S) (Oriol și colab., 1972). S-a constatat astfel că 9—20 % din aceste molecule au atît lanțuri L, cît și lanțuri H de tip Ga; 6—12 % au atît lanțuri L, cît și lanțuri H de tip Nu și 59—77 % din imunoglobulinele 7S sînt formate din lanțuri L de tip Nu și lanțuri H de tip Ga sau invers.

Această constatare dovedește încă o dată existența unor gene pentru lanțul H diferite de genele pentru lanțul L.

Rezultatele experiențelor arată că, în fiecare celulă în parte, excluderea aleică funcționează independent pentru genele lanțurilor L sau H, fără o preferință semnificativă pentru genele unuia din părinți. De asemenea, aceste date arată că asamblarea moleculelor de imunoglobuline hibride complete are loc în celulele producătoare de anticorpi și că nu există o asociere preferențială între lanțurile L și H de aceeași origine parentală. Transmiterea genetică a antigenelor parentale la hibridi Nu × Ga este asemănătoare cu transmiterea alo-tipurilor caracteristice lanțurilor L și H din moleculele imunoglobulinelor de iepure.

#### IPOTEZE ASUPRA MECANISMULUI PRIN CARE SE REALIZEAZĂ DIVERSIFICAREA SPECIFICITĂȚII DE ANTIGEN A SITUSULUI COMBINATIV

Specificitatea și totodată variabilitatea extrem de largă a anticorpilor față de diferiți determinanți antigenici reprezintă particularități ce caracterizează răspunsul imun. Întrebarea care se pune este dacă o celulă sintetizează molecule de imunoglobulină

avînd o singură specificitate de antigen sau, dimpotrivă, dacă o celulă poate sintetiza anticorpi cu specificități diferite în funcție de antigenul care induce răspunsul imun. Inițial, răspunsul la această problemă a fost teoretic, datele experimentale lipsind în bună măsură, și el a împărțit lumea imunologilor în două grupuri care susțineau două categorii de teorii diametral opuse.

Teoriile „instructive” susțineau că o celulă poate produce anticorpi de diferite specificități, în funcție de antigenul care induce sinteza acestor anticorpi. Cu alte cuvinte, ajuns pe suprafața celulei sau intracelular, un determinant antigenic oarecare „modelează” situsul combinativ al anticorpilor pe măsura sa sau, altminteri spus, instruește celula să producă anticorpi cu specificitate corespunzătoare.

Spre deosebire de acestea, teoriile „selective” susțineau că fiecare celulă poate sintetiza numai un singur tip de anticorp cu anumită specificitate de antigen. În consecință, în populația de celule formatoare de anticorpi a unui organism imunologic matur se găsesc tot atâtea clone (familii) de celule, cîți determinanți antigenici diferiți există în natură. Numărul acestor determinanți a fost estimat a fi aproximativ de ordinul  $10^5$ . Odată introdus antigenul în organism, acesta va trebui să „selecțieze” clona de celule producătoare de anticorpi cu specificitate corespunzătoare. Clona selectată va începe să se multiplice datorită acțiunii mitogene a antigenului și, ca urmare a acestei multiplicări, numărul de celule care sintetizează anticorpi specifici va crește considerabil.

În consecință, după teoriile instructive realizarea specificității de anticorp reprezintă un caracter epigenetic, care deci poate fi modificat în variate feluri în cursul vieții unei celule producătoare de anticorpi. Spre deosebire de acestea, teoriile selective sînt teorii genetice care consideră că specificitatea de antigen este predeterminată pentru o anumită clonă și că ea se transmite de la o generație la alta, în cadrul acestei clone indefinit, fără modificări.

În cele ce urmează ne vom ocupa îndeosebi de teoriile selective, pentru că acestea ridică probleme genetice deosebite și mai ales pentru că în ultimii ani cele mai multe date converg pentru a le socoti drept teoriile cele mai concordante cu realitatea.

Principalul contraargument adus teoriilor instructive îl reprezintă faptul că prin reacții foarte fine care pot detecta cantități foarte mici de anticorpi s-a văzut că în organismul unui animal există celule potențial producătoare de anticorpi, sau chiar anticorpi circulanți (așa-numiții anticorpi naturali), specifici față de antigene

cu care organismul nu a intrat niciodată în contact (Haimovich și colab., 1970; Jormalainen și Mäkelä, 1971). Concluziile acestor lucrări se aseamănă cu experiențele lui Luria și Delbrück, care au dovedit la bacterii originea preadaptativă a mutațiilor. (Hayes, 1968). Rezultă deci că specificitatea de antigen preexistă la nivelul moleculei de anticorp, înainte ca celulele ce sintetizează imunoglobulina să fi venit în contact cu antigenul respectiv; deci, situsul combinativ al anticorpului nu se modelează sub influența antigenului.

Pe de altă parte, după cum am arătat, s-a dovedit experimental că o singură celulă produce anticorpi ce aparțin unei singure clase și subclase, care poartă un singur determinant alotipic pe lanțul L și numai un anumit alotip pe lanțul H.

Aceste date arată că o clonă celulară, imunologic matură, are deja restricții fenotipice importante, atât în raport cu genele alelice, cât și în raport cu cele nonalelice de clasă și subclasă, deși în genomul ei această clonă poartă codificate toate clasele și subclasele, precum și toți determinanții alotipici transmiși ereditar prin linia germinativă de la părinți. Mai mult decât atât, cercetări asupra unor celule obținute de la animale imunizate concomitent cu două antigene diferite (care nu dau reacții încrucișate) au arătat că cele mai multe celule sintetizează anticorpi cu o singură specificitate de antigen, un număr foarte mic de celule producând anticorpi deosebiți cu cel mult două specificități antigenice diferite (Green și colab., 1966; Lennox și Cohn, 1967).

Hijmans și colab. (1972) au investigat recent prin imunofluorescență răspunsul imun față de complexul antigenic poli DL-alanil-serumalbumină de om. În acest complex molecular, fragmentul poli DL-alanină și cel de serumalbumină umană se comportă ca antigene separate. Autorii au constatat că în cursul fazei tardive a răspunsului imun nu se observă nici o celulă producătoare de anticorpi care să aibă specificitate de antigen față de ambele componente antigenice ale moleculei.

Aceste date au reprezentat o dovadă experimentală importantă în favoarea teoriilor selective, ele argumentând puternic faptul că o celulă producătoare de anticorpi sintetizează imunoglobuline cu o singură specificitate de antigen, predeterminată înainte de apariția antigenului în macroorganismul respectiv. Rezultă că dezvoltarea sistemului imun la un macroorganism implică două etape deosebite.

a) În cursul unei prime etape, o celulă primitivă (stem-cell) încă nediferențiată, care nu este imunologic competentă, suferă o serie de modificări genetice, în urma cărora în cursul mai multor

diviziuni celulare se realizează *diversitatea* specificității de antigen, de fiecare dată alta, pentru fiecare celulă cap de clonă rezultată din acest proces. În literatura de specialitate anglo-saxonă, această etapă poartă denumirea de „commitment”, termen pe care l-am putea traduce prin „inițiere”. Clonele rezultate prin diferențiere sînt formate din celule imunologic competente care au o specificitate de antigen strictă și care deci pot reacționa în cazul cînd intră în contact cu antigenul specific, prin declanșarea răspunsului imun (Jerne, 1971).

b) În cursul unei a doua etape, ca urmare a diversificării, urmează un proces de selecție care urmărește inhibiția funcțională a clonelor ce sintetizează anticorpi împotriva determinanților antigenici proprii. Clonele corespunzătoare determinanților antigenici străini (nonself) rămîn genetic stabile, păstrînd aceeași specificitate de antigen. În momentul apariției antigenului în organism, acesta selectează clona producătoare de anticorpi specifici și, acționînd asupra acesteia, declanșează răspunsul imun.

În ce privește modalitatea de selecție de către antigen a celulelor corespunzătoare, am arătat anterior („Recunoașterea imunologică și determinismul ei genetic”) că o serie de cercetări au dovedit existența unor „receptori” specifici situați pe suprafața celulelor imunologic competente, care reprezintă un fel de „carte de vizită” a acestei celule (Boyden, 1966 ; Sulica și colab., 1971b). În cazul celulelor B (producătoare de anticorpi) acești receptori au o structură identică sau foarte asemănătoare cu structura imunoglobulinelor secretate de către celula respectivă și reprezintă primele mici cantități de anticorpi produși, care în loc să fie antrenați în torentul circulator se acolează pe suprafața celulei. Evident că, în acest proces de acolare, constituția membranei celulare joacă un rol important; anumite membrane care nu pot fixa moleculele de imunoglobuline pe suprafața lor, fiind deci lipsite de receptori, nu vor putea fi selectate de către antigen ei convertite spre producerea activă de anticorpi. Drept urmare, macroorganismul respectiv va fi incapabil să răspundă prin sinteză de anticorpi față de anumite antigene.

Structura suprafeței membranelor celulare este însă în bună măsură determinată de prezența antigenelor de histocompatibilitate, aceste antigene fiind controlate genetic de anumite locusuri denumite locusuri de histocompatibilitate (la șoarece locusul major de histocompatibilitate este denumit H-2). Astfel s-ar putea explica corelația constatată dintre unele tipuri de membrană celulară, genetic controlate de anumite locusuri de histocompatibilitate, și incapacitatea

celulelor producătoare de anticorpi de a răspunde față de un antigen anumit (vezi capitolul „Controlul genetic al reactivității imune față de diferite antigene”).

*Ipoteza translocării* (Edelman și Gall, 1969). Mai multe ipoteze diferite au încercat să explice diversificarea specificității de antigen a anticorpilor, deci procesul de inițiere, prin diverse evenimente genetice, cum ar fi mutația sau recombinarea, apărute la nivelul liniilor somatice sau germinative.

Indiferent de ipoteza luată în considerare, un fapt frapantă însă deosebit în analiza lanțurilor proteice din constituția imunoglobulinelor, și anume că atât lanțurile L, cât și cele H conțin o regiune extrem de variabilă a secvenței de aminoacizi (regiunea V), care este legată de o regiune relativ constantă în ceea ce privește secvența (regiunea C).

Întrebarea care se ridică imediat este: cele două fragmente, respectiv V și C, sînt codificate de o singură moleculă de ARN-m, deci la nivelul ribozomului ele se sintetizează una în continuarea celeilalte sau, dimpotrivă, provin din legarea cap la cap a unui lanț polipeptid V și a unui lanț C, independent sintetizate?

Aceasta pentru că este foarte greu de imaginat un mecanism de diversificare, oricare ar fi natura lui, care să afecteze la nivelul genomului jumătate din genă (în cazul lanțului L) sau un sfert de genă (în cazul lanțului H), menajînd însă perfect restul genei ce codifică porțiunea C a lanțului polipeptid. Dimpotrivă, ar fi mult mai plauzibil ca cele două gene să reprezinte entități separate, avînd caracteristici proprii, gena C fiind puțin afectată prin mutații sau recombinări, spre deosebire de gena V care ar fi extrem de instabilă într-un moment al evoluției ontogenetice sau filogenetice (Burnet, 1966).

Prin analogie cu acest punct de vedere s-au descris la diferite specii de bacterii sau de plante (porumb) (Serra, 1966) gene foarte intens afectate de mutații, denumite gene „hipermutabile”. Totuși, după cum am arătat anterior, cercetările privind mecanismul biosintezei imunoglobulinelor la nivelul polizomilor au dovedit că atât lanțurile L, cât și cele H se sintetizează neîntrerupt de la capătul aminoterminal, de unde începe regiunea V, și pînă la capătul carboxiterminal prin care se încheie regiunea C.

Aceste rezultate sugerează deci că ambele feluri de lanțuri sînt codificate de o singură genă L și respectiv H, care ar putea fi notată  $L_{(VC)}$  și  $H_{(VC)}$ .



Cele două puncte de vedere, în aparență contradictorii, au fost puse de acord de către o ipoteză recentă care admite că inițial pe linia germinativă există separat gene Hc și Lc, care codifică diferitele clase și subclase ale porțiunii constante din lanțurile H și L. După Jerne (1971), numărul acestor gene structurale C nu depășește cifra de 20.

Pe de altă parte, există separat gene V ce codifică porțiunile variabile ale lanțurilor. Pentru fiecare clasă și subclasă de lanțuri L și H ar exista deci o subgrupă separată de gene V.

Numărul acestor gene V nu este exact determinat. După unii autori, susținători ai ipotezei liniei germinative, în genomul gameților există în fiecare subgrupă de gene V ( $V_{\kappa}$ ,  $V_{\lambda}$  și  $V_H$ ) tot atâtea gene, câți determinanți există în natură. Mulțimea acestor gene codifică astfel oricare tip de situs combinativ posibil.

La extrema cealaltă, susținătorii teoriilor recombinării sau ale mutației somatice consideră că există în genomul liniei germinative numai un număr mic de gene V structurale (în total câteva duzini), care abia ulterior, prin evoluția liniilor somatice, în cursul ontogeniei vor suferi o amplă diversificare (Jerne, 1971).

După Edelman și Gall (1969), numărul relativ mare al genelor V din genomul liniilor somatice ale celulelor primitive rezultă prin duplicarea unui număr mai mic de gene inițial existente în genomul gameților. În această condiție, genele rezultate din duplicare au tendința să se desprindă de pe cromozom, formînd astfel fragmente de genom cu individualitate proprie (epizomi), care se pot integra apoi pe un alt cromozom. În acest caz, prin mutații sau recombinări somatice, survenite în cursul diferențierii celulelor primitive nereactive la antigen, în fiecare cap de clonă „inițiată” imunologic competentă va apărea o altă genă V, codificînd o altă specificitate de antigen.

Abia după ce cistronii V s-au diversificat, urmează translocarea unuia din cistronii V pe cromozomul ce conține genele C în așa fel, încît gena V, alăturată unei anumite gene C, va fuziona cu aceasta din urmă, alcătuiind un complex genetic stabil VC, care codifică un singur lanț polipeptid L sau H (fig. 8).

Se admite că cistronii V, spre deosebire de genele C, conțin în capătul secvenței lor nucleotidice un triplet de inițiere, care permite ARN-polimerazei-ADN-dependente să înceapă să copieze gena completă VC și implicit să poată sintetiza lanțuri L sau H întregi.

Evident că în fiecare celulă vor fi necesare două translocări deosebite, una a genei  $V_L$  alături de cistronul  $C_L$  și a doua a genei

$V_H$  pe un cistron  $C_H$ . În diferite celule, alți cistroni  $V_L$  sau  $V_H$  cu diferite specificități de antigen se vor transloca pe alți cistroni  $C_L$ , sau respectiv  $C_H$ , cu alte specificități de izotip sau alotip, din variatele combinații posibile rezultând în fiecare caz altă clonă ce sintetizează un anticorp cu altă specificitate de antigen, de izotip

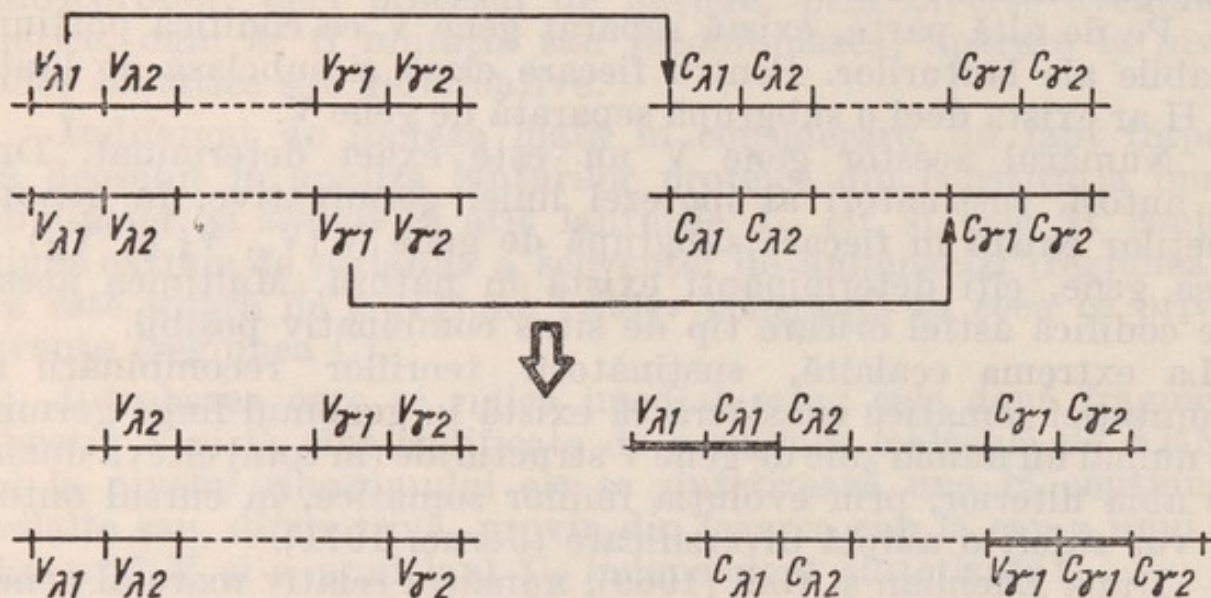


Fig. 8. — Translocarea cistronului V alături de cistronul C.

și de alotip. Pentru ca celula respectivă să sintetizeze o moleculă de imunoglobulină completă, va fi însă necesar ca atât gena  $V_L$ , cât și gena  $V_H$  translocată să codifice aceeași specificitate de antigen.

Ipoteza translocăției modifică puternic corespondența clasică dintre un cistron și un lanț polipeptid, acceptînd că în această situație doi cistroni pot controla sinteza unui singur lanț polipeptid (Edelman și Gally, 1967; Hood și Ein, 1968; Gally și Edelman, 1970).

Ipoteza translocăției se acordă bine cu mai multe particularități ale răspunsului imun. Ea poate explica:

— stabilitatea clonei rezultate pentru o singură specificitate de antigen. Odată ce s-a produs translocăția genelor  $V_L$  și  $V_H$ , această formă genetic nouă se va transmite în cursul diviziunilor celulare la toți descendenții clonei, avînd o aceeași specificitate de antigen codificată în genom;

— de asemenea, excluderea alotipului alelic și excluderea de subgrup, dat fiind că este extrem de improbabil ca simultan doi cistroni  $V_L$  și doi cistroni  $V_H$  cu aceeași specificitate de antigen să fie translocați pe regiunile  $C_L$  sau pe cele  $C_H$ , care codifică două clase

sau subclase diferite, ori două alotipuri diferite. Drept rezultat, celula somatică imunologic competentă este *funcțional haploidă*, ea avînd un singur complex  $V_L C_L$  și un singur complex  $V_H C_H$  (fig. 8).

Toți descendenții acestei celule vor produce anticorpi cu același izotip și același alotip.

Teoria translocării nu precizează însă, pe de o parte, de ce nu se produce o translocăție inversă a genei C pe cistronul V corespunzător și, pe de altă parte, care este mecanismul care împiedică, de exemplu, un cistron  $V_\lambda$  să se integreze la capătul unei gene  $C_\kappa$  (Edelman și Gall, 1969).

Ipoteza translocării nu se referă însă la modalitatea prin care un organism ajunge să aibă în genomul celulelor sale producătoare de anticorpi un număr atît de mare (circa  $10^5$ ) de gene V diferite. Acest fapt a căutat să fie explicat de o serie de alte teorii, cronologic emise înainte de teoria translocăției și pe care le vom sistematiza în continuare.

*Ipoteza evoluției liniei germinative* (Dreyer și Bennet, 1965; Nolan și Margoliash, 1968) consideră că fiecare moleculă de anticorp de o anumită clasă și subclasă și cu anumită specificitate de antigen este codificată de gene situate pe cromozomii liniei germinative. Prin urmare vor exista înscrise în genomul gameților gene separate ce controlează lanțuri  $\gamma_1$  anti antigen-A,  $\gamma_1$  anti-B,  $\gamma_1$  anti-C... și așa mai departe pînă la epuizarea tuturor determinanților antigenici, aceeași situație fiind repetabilă pentru toate clasele și subclasele de lanț L și respectiv de lanț H.

Ipoteza liniei germinative nu necesită translocarea genelor V pentru a explica sinteza lanțurilor de imunoglobuline.

Totalitatea acestor gene al căror număr este imens se transmite ereditar de la un individ la altul, așa încît diversificarea genelor care controlează biosinteza anticorpilor reprezintă un eveniment treptat elaborat în cursul nenumăratelor generații care alcătuiesc linia evolutivă a speciei luate în considerare.

În cursul dezvoltării ontogenetice, pe linie somatică urmează un proces selectiv de deblocare a anumitor gene, care se vor exprima fenotipic prin sinteza de anticorpi.

Condiția restrictivă în acest caz este că pentru fiecare clonă de celule imunologic competente se va putea exprima fenotipic numai o anumită genă ce codifică o moleculă de imunoglobulină cu un anumit subgrup și cu o anumită specificitate de antigen.

Contraargumentul major întâmpinat de această ipoteză este observația că, în cadrul unui singur genom, un număr prea mare de gene ar trebui să fie afectate sintezei imunoglobulinelor.

Astfel, după Edelman și Gall (1969), dacă se consideră limita superioară pentru numărul de celule capete de clonă ce produc anticorpi diferiți ca fiind  $10^{10}$  și dacă oricare lanț L se poate împerechea cu oricare lanț H, atunci ar fi necesare  $10^5$  gene pentru fiecare lanț.

Dacă însă există restricții de împerechere, adică un anumit lanț L se poate împerechea numai cu un anumit lanț H, atunci vor fi necesare  $10^{10}$  gene deosebite, active în  $10^{10}$  capete de clonă deosebite. Un alt contraargument la această teorie este faptul că este foarte greu de imaginat cum acționează factorii de mediu în cursul evoluției speciei, pentru a putea selecta indivizii care sintetizează anticorpi din clase și subclase diferite cu aceeași specificitate de antigen.

După cum remarcă Edelman și Gall (1969), descoperirea unor markeri genetici (alotipici) mai ales în stare homozigotă, situați în regiunile V ale lanțului L sau ale lanțului H, ar contrazice puternic acest model, pentru că ar fi greu de imaginat cum s-au selectat în evoluția speciei gene atât de variabile în ce privește specificitatea de antigen, păstrând însă un fragment din fiecare genă, care corespunde determinantului alotipic, constant pentru toate aceste gene.

În sfârșit, testarea experimentală a acestei ipoteze s-ar putea face comparând genele din liniile somatice cu cele din liniile germinative. Astfel, dacă toate genele unei linii somatice producătoare de anticorpi sînt prezente și în liniile germinative ale individului respectiv, hibridarea ARN extras din liniile somatice ale celulelor imunologic competente, cu ADN (din spermatozoizi, de exemplu) ar trebui să fie perfectă. Dimpotrivă, dacă printr-un mecanism oarecare apar în liniile somatice gene noi, care codifică specificitatea situsului combinativ, atunci ARN extras din celulele producătoare de imunoglobuline ar trebui să aibă secvențe nucleotidice suplimentare care să se poată detecta prin hibridizare. Or, după cum am arătat anterior mai ales pentru macroorganisme, tehnicile de hibridizare ADN—ARN sînt încă departe de perfecțiunea cerută pentru verificarea acestor afirmații teoretice.

Recent, Sher și Cohn (1972) au investigat anticorpul produs de șoarecii din linia BALB/c, drept răspuns la imunizarea cu carbohidrați de pneumococ C. Acești anticorpi sînt specifici față de determinantul antigenic fosforilcolină din structura polizaharidului.

Experiențele acestor cercetători duc la concluziile că :

— Transmiterea ereditară a idiotipului este dominantă și determinată de o genă situată pe cromozomul ce poartă locusul alotipului lanțului H și de o a doua genă ce segregă independent de prima și care ar fi leagată de locusul de histocompatibilitate H-2.

Aceste experiențe sugerează că configurația regiunilor V ale lanțurilor H, și posibil ale lanțurilor L, cel puțin în cazul anticorpilor de șoarece anti-fosforilcolină, este codificată de genele din linia germinativă.

— Pe de altă parte, toți determinanții antigenici ai anticorpilor, recunoscuți de serurile anti-idiotip sînt situați pe regiunea Fab a moleculei de anticorp, atît pe lanțul L, cît și pe lanțul H. Acești determinanți idiotipici prezenți pe moleculele IgM anti-fosforilcolină sînt similari cu idiotipul unei proteine de plasmocitom IgA, care apare la unele familii de șoareci din aceeași linie și care are aceeași specificitate anti-fosforilcolină. Această constatare pledează pentru faptul că determinanții antigenici ai regiunii V sînt purtați de Ig din diferite clase și reprezintă deci un argument experimental important în favoarea translocării genelor ce controlează cistronul V, alături de genele ce controlează fragmentul C din diferite grupe sau subgrupe.

Dificultățile întîmpinate de ipoteza evoluției liniei germinative sînt evitate de teoriile care susțin că pe linie germinativă se transmit de la o generație la alta un număr relativ mic de gene ce codifică numai clasele și subclasele diferitelor lanțuri L și H și implicit alotipurile acestora.

În cursul evoluției ontogenetice, pe liniile somatice se produc la un moment dat o serie de modificări genetice care determină diversificarea genomurilor din celulele implicate în răspunsul imun. Această modificare genetică se va repeta deci la fiecare generație din nou, pentru fiecare individ în parte.

Potter, Appella și Geisser (1965) considerau că variația neobișnuită a anticorpilor poate fi datorată unui număr relativ redus de gene care se exprimă fenotipic variat, datorită faptului că, în celule diferite, un același ARN mesager este citit altfel, din cauza unor molecule de ARN-t neobișnuite, care pentru un același codon includ în lanțul polipeptid aminoacizi diferiți.

Autorii considerau că enzimele de activare pot fi responsabile de legarea unor aminoacizi diverși pe un același tip de ARN-t, în

funcție de o anumită celulă. Evident că odată ce condițiile metabolice ale celulei cap de clonă sînt fixate, celulele-fiice vor moșteni aceste condiții, așa încît vor citi mereu în același fel mesajul genetic. Teoria respectivă pare azi foarte improbabilă pentru că s-a constatat că, în molecula anticorpilor, unul și același aminoacid poate apărea fie în poziții foarte stabile, fie, dimpotrivă, în poziții în care este adeseori substituit de alți aminoacizi.

*Ipoteza recombinării somatice* (Edelman și Gally, 1967; Whitehouse, 1967; Smithies, 1967) acceptă de asemenea că pe linie germinativă se transmit ereditar un număr mic de gene care controlează sinteza diferitelor lanțuri din structura imunoglobulinelor cu clasele și subclasele lor. În cursul ontogeniei, la un moment dat, în liniile celulelor primitive se produc o serie de recombinări între aceste gene diferite, care au loc mai ales în regiunea ce codifică porțiunea variabilă a lanțurilor. Drept urmare, într-un număr relativ redus de generații celulare va apărea o diversificare destul de mare a secvențelor nucleotidice din regiunile V pentru a explica în acest fel variabilitatea largă a situsurilor combinate.

Teoria propusă de Smithies (1967) se bazează pe analiza secvențelor de aminoacizi cunoscute pentru regiunea V a unui mare număr de proteine Bence-Jones sau de mielom, obținute de la om sau de la șoarece. Ea încearcă să explice trei particularități diferite constatate prin compararea acestor secvențe, și anume :

1. Observația că în regiunile V, provenind de la indivizi deosebiți sau chiar de la specii diferite, în anumite poziții „cheie” se mențin întotdeauna aceiași aminoacizi. Această particularitate este, foarte probabil, explicată de rolul strategic al acestor aminoacizi în desfășurarea secundară a lanțurilor sau în legăturile dintre lanțuri, cum ar fi pozițiile ocupate de cisteină. Rezultă deci că acești aminoacizi invariabil situați în anumite poziții au fost selectați ca atare, pentru că orice alt aminoacid situat în acest punct ar fi compromis funcția generală de anticorp a moleculei.

2. În alte puncte ale secvenței găsim, dimpotrivă, aminoacizi hipervariabili, care se schimbă de la o specie la alta și de la o proteină analizată la alta. Aceste poziții *hipervariabile* sînt probabil asociate tocmai cu specificitatea de antigen a situsului combinativ.

3. În sfîrșit, mai pot să apară secvențe întregi de 2—3—4 aminoacizi care diferă de la o moleculă la alta. Acest tip de variabilitate „în bloc” este probabil tot asociată cu specificitatea de antigen și în orice caz este foarte greu de explicat ca fiind rezultatul unei

mutații. Drept urmare, Smithies (1967) propune următorul model care ar explica particularitățile de secvență constatate (fig. 9).

Variabilitatea genelor structurale somatice care codifică biosinteza anticorpilor se poate explica printr-o recombinare intracromozomală între două gene nonalelice, una fiind denumită genă com-

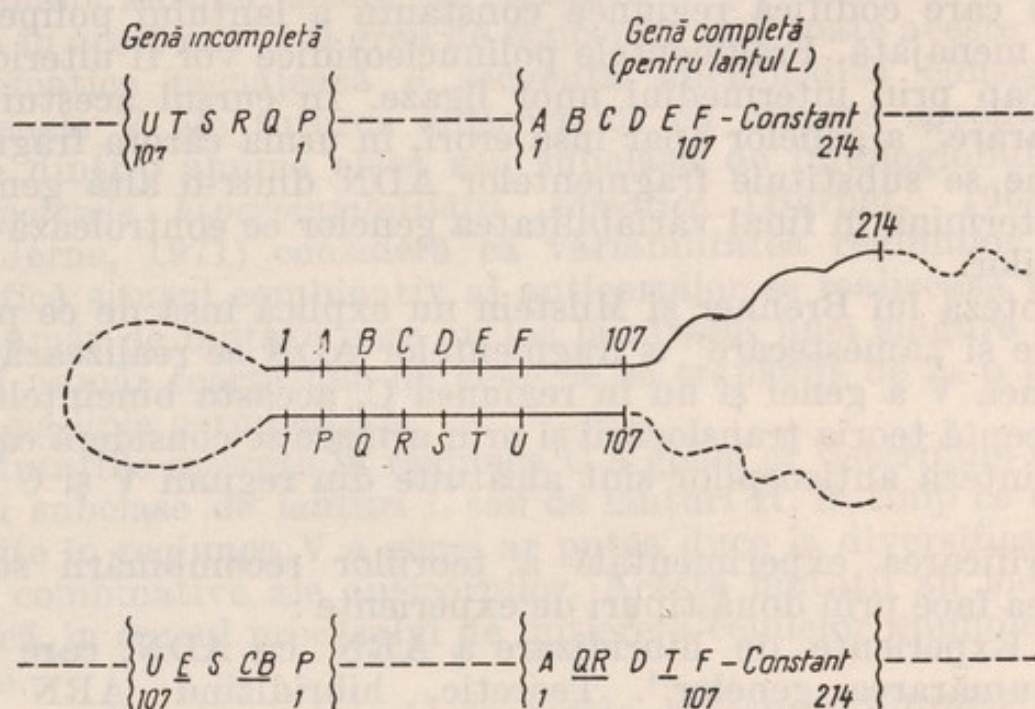


Fig. 9. — Ipoteza recombinării somatice (după Smithies, 1967).

pletă V—C (master gene), iar a doua, similară dar nu identică cu prima, denumită genă incompletă V (scrambler gene). În cursul diviziunilor mitotice, la un moment dat, cromozomul respectiv se poate bucla în așa fel, încât cele două gene se alătură una de alta, deci fac o sinapsă, în părțile lor omologe, V. Între segmentele alăturate se produce recombinarea care determină formarea unor secvențe nucleotidice foarte diferite în regiunea V a genei complete (V—C). Se înțelege că, în aceste condiții, un individ heterozigot pentru genele complete și incomplete va ajunge la o variabilitate anumită mult mai curînd decît un homozigot.

Teoria lui Smithies prevede că aceste tipuri de recombinări ar trebui să aibă loc pentru toate clasele și subclasele de imunoglobuline în parte, pentru fiecare din ele existînd o genă completă și una incompletă. În schimb, ea exclude crossing-overurile între genele de subgrupuri diferite.

O altă teorie analogă oarecum celei expusă de Smithies a fost emisă de către Brenner și Milstein (1966). După acești autori, într-un moment anumit al ontogeniei, ADN din constituția genelor ce codifică anticorpii se rupe în fragmente mici, datorită unor nucleaze care atacă ADN la jumătatea genei, și se deplasează apoi treptat spre capătul corespunzător regiunii V a lanțului polipeptid. Partea de ADN care codifică regiunea constantă a lanțului polipeptid ar fi astfel menajată. Fragmentele polinucleotidice vor fi ulterior lipite cap la cap prin intermediul unor ligaze. În cursul acestui proces de „reparare” a genelor apar însă erori, în urma cărora fragmentele unei gene se substituie fragmentelor ADN dintr-o altă genă, ceea ce va determina în final variabilitatea genelor ce controlează sinteza anticorpilor.

Ipoteza lui Brenner și Milstein nu explică însă de ce procesul de rupere și „amestecare” a fragmentelor ADN se realizează numai în regiunea V a genei și nu în regiunea C, aceasta bineînțeles dacă nu se acceptă teoria translocării și prin urmare se consideră că genele pentru sinteza anticorpilor sînt alcătuite din regiuni V și C în continuare.

Verificarea experimentală a teoriilor recombinării somatice s-ar putea face prin două tipuri de experiențe :

— Experiențe de hibridizare a ARN cu ADN, care ar permite „numărarea genelor”. Teoretic, hibridizînd ARN produs de celule imunologic mature — deci sintetizat sub controlul genelor recombinante, cu ADN produs de celulele imature imunologic, care nu au suferit încă recombinarea — ar trebui să se poată vedea dacă ARN are un număr de gene „noi”, deci un număr de secvențe nucleotidice care nu se potrivesc exact cu secvența ADN. Or, din păcate, după cum s-a arătat anterior, tehnicile de hibridare, mai ales la macroorganisme, sînt încă departe de asemenea perfecțiune.

— Descoperirea în celulele țesuturilor limfoide a unor enzime care să joace un rol în crossing-over, respectiv endonucleaze și polinucleotid ligaze, ar putea de asemenea argumenta posibilitatea unor recombinări multiple la nivel somatic. Or, asemenea enzime au fost deja identificate în țesuturile limfoide (Edelman și Gall, 1969).

În concluzie, ipotezele recombinării somatice consideră că apariția genelor ce codifică clasele și subclasele lanțurilor L și H s-a făcut prin mutații și recombinări survenite la nivelul liniei germinative. Diversificarea situsurilor combinate ale acestor clase și subclase, avînd drept rezultat anticorpi cu specificitate de antigen diferită, se realizează însă la nivelul liniei somatice. Rezultă deci



că toate produsele genelor apărute în urma recombinării sînt imunoglobuline cu o clasă și subclasă definită, dar că nu toate aceste gene codifică anticorpi, respectiv că anumite proteine codificate au o secvență de lanț V (deci un situs combinativ) care nu se potrivește cu nici un determinant antigenic din natură. Teoria recombinării somatice ar fi serios contracarată, în cazul în care s-ar descoperi un determinant alotipic situat în regiunea V pe lanțul L sau H, dat fiind că în acest caz ar fi greu de conceput cum toate aceste recombinații somatice menajează o secvență nucleotidică constantă, pe toate genele V ale tuturor anticorpilor cu diferite specificități de antigen dintr-o anumite clasă sau subclasă de imunoglobuline.

*Ipotezele hipermutabilității somatice* (Burnet, 1966; Cohn, 1968; Jerne, 1971) consideră că variabilitatea regiunilor genetice ce codifică situsul combinativ al anticorpilor se realizează printr-un mare număr de mutații care au loc la nivelul unei singure gene sau al unui număr foarte mic de gene ce se transmit de la o generație la alta pe linie germinativă.

Mutațiile apărute în regiunea C a genei ar determina diferitele clase și subclase de lanțuri L sau de lanțuri H, în timp ce mutațiile survenite în regiunea V a genei ar putea duce la diversificarea situsurilor combinate ale anticorpilor. Aceste mutații au loc pe linie somatică, în cursul procesului de inițiere a celulelor imunologic competente.

În ordine cronologică, ipotezele hipermutabilității somatice au fost primele ipoteze emise pentru a explica variabilitatea specificității de antigen a anticorpilor. Ele reprezintă cel mai simplu model, care nu invocă mecanisme genetice deosebite și care postulează existența unui număr foarte mic de gene afectate sintezei anticorpilor în genomul gameților.

Ca urmare a hipermutabilității celulelor primitive, neinițiate, vor apărea deci celule capete de clonă, reactive la antigen, care sînt însă genetic stabile, deci care transmit celulelor-fiice mereu aceeași configurație a situsului combinativ.

Trebuie precizat că dacă ipoteza hipermutabilității acceptă mecanismul translocării genelor V, atunci ea este relativ plauzibilă. În cazul cînd acest mecanism ar fi neconcordanț cu realitatea și ar exista în genom gene VC întregi, este foarte greu de explicat de ce acest fenomen de hipermutabilitate afectează numai o parte din genă (sectorul V), păstrînd constantă cealaltă parte, C, a *aceleiași* gene. Mai mult decît atît, chiar în cazul regiunilor V, după cum am mai arătat, există un număr de aminoacizi care apar întotdeauna

în anumite poziții. Astfel, regiunile V din lanțurile  $\kappa$  posedă circa 20 de aminoacizi, ce nu apar substituiți, printre care cisteina ce ocupă un rol „strategic” pentru formarea punților disulfidice. Persistența acestor aminoacizi „cheie” este foarte greu de explicat în condițiile unor mutații.

Un alt fapt de observație, greu de explicat prin mutageneză, este „variabilitatea în bloc” a unei succesiuni de mai mulți aminoacizi. De asemenea, unii autori au arătat printr-o serie de analize matematice că rata de mutație ar trebui să fie deosebit de înaltă, pentru ca într-un număr relativ redus de diviziuni să se acopere toată diversitatea de situs combinativ necesară pentru a corespunde tuturor determinanților antigenici din natură.

Astfel, după Edelman și Gall (1969), o estimare aproximativă arată că numai 1 din 10 000 de produse ale unei mutații întâmplătoare în fiecare genă V, pentru subgrupurile lanțurilor  $\kappa$ , ar duce la o secvență care să semene cu cele observate experimental. Or, sînt necesare circa  $10^5$  secvențe corecte de lanț pentru a acoperi toată mulțimea antigenelor din natură.

Indiferent însă de aceste cifre, la o rată de mutație mare, un mecanism de selecție suficient de intens exercitat de determinanții antigenici ar putea explica apariția în timp scurt și persistența unui număr corespunzător de celule cap de clonă, care să asigure toate variantele de situs combinativ necesare.

Pînă în prezent nu s-a constatat însă nici o modalitate prin care antigenele străine ar putea selecta lanțurile corecte din moleculele imunoglobulinelor, în cursul dezvoltării ontogenetice a sistemului imun. Mai mult, după cum am mai arătat, celulele imunologic competente apar independent de prezența antigenului în organism.

Ipotezele hipermutabilității somatice acceptă deci că un număr foarte mare de lanțuri polipeptidice vor fi lipsite de capacitatea de a funcționa ca anticorpi sau vor fi chiar lipsite de caracteristicile imunoglobulinelor, aceasta drept urmare a faptului că sînt produse în celule care conțin în genom mutații neadecvate în regiunile V sau C. După cum am arătat, numai un număr foarte mic din aceste mutații întâmplătoare pot codifica imunoglobuline corect sintetizate care să aibă și funcție de anticorp.

Redăm în continuare, după Edelman și Gall (1969), un tabel care rezumă principalele implicații ale ipotezelor ce caută să explice mecanismele de diversificare ale situsului combinativ al anticorpilor (tabelul nr. 7).

În concluzie, pînă în prezent nu există un argument categoric în favoarea vreuneia din cele trei mari grupe de ipoteze propuse pentru a explica variabilitatea anticorpilor.

Tabelul nr. 7

Implicații ale ipotezelor asupra diversificării situsului combinativ al anticorpilor

Ipoteze	Originea mutației ce duce la apariția genelor pentru sinteza imunoglobulinelor	Originea selecției genelor pentru sinteza imunoglobulinelor	Originea diversificării situsului combinativ	Sînt toate produsele genelor imunoglobuline ?	Sînt toate produsele genelor anticorpi ?
Ipoteza liniei germinative	în linia germinativă	în evoluția filogenetică	în evoluția filogenetică	da	da
Ipoteza recombinației somatice	în linia germinativă	în evoluția filogenetică	în linia somatică	da	nu
Ipoteza mutației somatice	în linia somatică	în linia somatică	în linia somatică	nu	nu

Franek (citat după Sela, 1971) a tras concluzia că „cele mai sigure teorii sînt parțial de linie germinativă, parțial somatice”. Indiferent însă dacă variabilitatea regiunii V apare prin mutație sau recombinare, pe linie somatică sau germinativă, ideea acceptată însă pe scară din ce în ce mai largă este că translocarea cistronului V, alături de gena C, reprezintă procesul esențial al etapei de inițiere, prin care o celulă multipotentă, primitivă, se diferențiază în celulă formatoare de anticorpi, cu o singură specificitate de antigen.



Spre deosebire de ipoteza liniei germinative, ipotezele recombinației sau ale mutației somatice acceptă deci că un număr mare de gene, în urma diversificării lor, vor codifica niște lanțuri polipeptidice care nu pot funcționa ca anticorpi. Aceste celule purtătoare

ale unor gene „nereușite” vor trebui eliminate din circuitul organismului.

Care este deci factorul care selectează capetele de clonă ce pot sintetiza anticorpi activi în răspunsul imun? După teoria selecției clonale, emisă de Burnet (1959), antigenele prezente în organism sînt responsabile de selecția acestor clone. Constituenții proprii organismului (antigenele self), în cantitate mare, vor determina o paralizie funcțională a clonelor ce sintetizează anticorpi împotriva acestor antigene, în timp ce, cantitățile mai mici de antigene străine vor selecta și menține active clonele ce produc anticorpi corespunzători acestor determinanți antigenici.

Principalul contraargument adus acestei teorii este că ea presupune că *toți* determinanții antigenici străini sînt prezenți în organism în momentul în care se produce inițierea capetelor de clonă imunologic competente, fapt care, după cum s-a arătat, nu este exact.

Pentru a remedia acest inconvenient, Jerne (1971) a propus o nouă ipoteză, care tinde să explice mecanismul de selecție ce decurge concomitent cu procesul de inițiere.

Teoria lui Jerne acceptă că în genomul liniei germinative există un număr mic de gene structurale V, care codifică situsul combinativ al unor anticorpi specifici împotriva antigenelor de histocompatibilitate proprii speciei respective și implicit proprii organismului. Paradoxal deci, aceste gene Vs (s = self antigene de histocompatibilitate) coexistă în genomul gameților odată cu genele de histocompatibilitate ce vor codifica tocmai antigenele corespunzătoare. În cursul procesului de inițiere, celulele primitive neinițiate vor suferi un impuls (hormonal?) la nivelul timusului sau al măduvei osoase, în urma cărora se vor divide rapid. Odată cu aceste diviziuni apar o serie de mutații care vor modifica o genă sau o pereche de gene V, în acest fel diversificîndu-se numărul de celule cap de clonă a căror genă V codifică anticorpi cu specificitate de antigen diferită.

Selecția postulată de Jerne se face tocmai invers față de cea imaginată de Burnet, și anume celulele care *nu* vor suferi mutația cistronilor V vor fi reținute în timus sau în măduva osoasă, datorită potrivirii dintre antigenele de histocompatibilitate ale acestor țesuturi și receptorii celulelor limfoide care reprezintă anticorpii specifici împotriva acestor antigene, codificați de genele Vs. Celulele cap de clonă care au suferit mutația vor trece mai departe în circuitul sistemului imun, anticorpii produși de aceste celule nemaifiind potriviți cu antigenele tisulare proprii.

Celulele imunologice competente care nu au suferit mutația genelor V alcătuiesc deci clonele „interzise”, potențial capabile să sintetizeze anticorpi împotriva țesuturilor proprii organismului. Aceste clone „interzise” nu vor fi lăsate să intre în circuitul general, deci să populeze organele limfoide secundare (splina, ganglionii limfatici), ele fiind distruse.

Spre deosebire de genele V, genele C sînt menținute constante, pentru că orice mutație a acestora neafectînd gena V va determina o clonă ce va fi reținută în țesutul în care se produce inițierea. Pot intra deci în circuitul general al sistemului imun numai clonele foarte rare, care au suferit mutații atît în gena C, cît și în gena V.

Ipoteza lui Jerne nu este corelată cu translocarea genei V alături de cistronul C, deși această modificare genetică ce explică excluderea alelică și de subgrup este necesară pentru ca selecția să poată opera asupra unei clone celulare care are deja gene VC complete ce codifică o moleculă de imunoglobulină întregă.

## BIBLIOGRAFIE

- ADLER F.L., FISHMAN M., DRAY S., 1966, *J. Immunol.*, **97**, 554.  
 ASKONAS B.A., HUMPHREY J.H., 1958, *Biochem. J.*, **68**, 252.  
 ASKONAS B.A., WILLIAMSON A.R., 1967, *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, **32**, 223.  
 ASKONAS B.A., WILLIAMSON A.R., 1969, *Antibiotica et Chemoterapia*, **15**, 64.  
 BERNIER G.M., 1970, *Progr. Allergy*, **14**, 1.  
 BLACK M.M., ANSLEY H.R., 1965, *J. cell. Biol.*, **26**, 201.  
 BORDENAVE G., OUDIN J., 1971, *Ann. Inst. Pasteur*, **120**, 265.  
 BOYDEN S.V., 1966, *Natural Antibodies and the Immune Response*, în *Advances in Immunology*, sub red. F.J. Dixon și J.H. Humphrey, Acad. Press, New York — Londra, vol. VI.  
 BRENNER S., MILSTEIN C., 1966, *Nature*, **211**, 242.  
 BURNET M.F., 1959, *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*, Vanderbilt Univ. Press.  
 BURNET M.F., 1966, *Nature*, **210**, 1308.  
 BUSSARD A., 1967, *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, **32**, 465.  
 BUSSARD A., 1971, *Primul simpozion național de imunologie*, București,  
 CHESSIN L.M., GLADE P.R., ASOFSKY R., BAKER P.D., REISFELD R., TERRY W., 1968, *J. Immunol.*, **101**, 458.  
 CHURCH R.P., STORB U., MCCARTHY B.J., WEISER R.S., 1968, *J. Immunol.*, **101**, 399.

- COHN M., 1968, in *The nucleic Acids in Immunology*, sub red. O.J. PLESCIA și W. BRAUN, Springer Verlag, Berlin — Heidelberg — New York.
- COOPER H.L., RUBIN A.D., 1965, *Lancet*, 7415, 723.
- COTTIER H., ODARTCHENKO N., KEISER G., HESS N., STONER R.D., 1964, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **113**, 612.
- DAVIS B.D., DULBECCO R., EISEN H.N., WOOD W.B.Jr., 1968, *Microbiology*, Harper and Row Publ., New York, partea a II-a, cap. 14, p. 423.
- DIENGDOH J.V., TURK J.L., 1965, *Nature*, **207**, 1405.
- DREYER W.J., BENNETT J.C., 1965, *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **54**, 864.
- EDELMAN G.M., GALLY J.A., 1967, *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **57**, 353.
- EDELMAN G.M., GALL W.E., 1969, *Annu. Rev. Biochem.*, **38**, 415.
- EHRICH W.E., DROBKN D.L., FORMAN C., 1949, *J. exp. Med.*, **80**, 157.
- EICHMANN K., 1972, *Eur. J. Immunol.*, **2**, 301.
- FAGRAEUS A., 1948, *J. Immunol.*, **58**, 1.
- FELDMAN M., ELSON P., GLOBERSON A., 1960, *Nature*, **185**, 317.
- FISHMAN L.M., VAN ROOD J.J., ADLER F.L., 1964, *Proceedings Symposium Molecular and-Cellular Basis of Antibody Formation*, Praga, p. 491.
- FISHMAN M., ADLER F.L., 1967, *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, **32**, 343.
- FRANGIONE B., MILSTEIN C., FRANKLIN E.C., 1969, *Nature*, **221**, 149. >
- GALLY J.A., EDELMAN G.M., 1970, *Nature*, **227**, 341.
- GHEȚIE V., MICUȘAN V., 1966, *Analiza imunochimică*, Edit. Academiei, București, p. 289.
- GHEȚIE V., 1969, in *Progrese recente în disciplinele imunologice*, sub red. N. NESTORESCU, Edit. medicală, București, p. 67.
- GREEN I., VASSALLI P., BENACERRAF B., 1966, *J. exp. Med.*, **125**, 527.
- GRUBB R., LAURELL A.B., 1956, *Acta path. microbiol. scand.*, **39**, 390.
- GRUBB R., 1970, *The Genetic Markers of Human Immunoglobulins*, Springer Verlag, Berlin — Heidelberg — New York.
- HAIMOVICH J., TARRAB R., SULICA A., SELA M., 1970, *J. Immunol.*, **104**, 1033.
- HAIMOVICH J., EISEN H.N., HURWITZ E., GIVOL D., 1972, *Biochemistry*, **11**, 2389.
- HARRIS T.N., HARRIS SUSANNE, 1949, *J. exp. Med.*, **90**, 169.
- HAYES W., *The genetics of bacteria and their Viruses*, 1968, Blackwell Scientific Publications, Oxford și Edinburg, partea a V-a, cap. 9, p. 179.
- HIJMANS W., SCHUIT H.R.E., TEIKO J., SCHECHTER J.M., 1972, *Eur. J. Immunol.*, **2**, 1.
- HOOD L., EIN D., 1968, *Nature*, **220**, 764.
- JÄCHERTS D., 1966, *Z. med. Mikrobiol. u. Immunol.*, **152**, 262.
- JÄCHERTS D., 1967, *Z. med. Mikrobiol. u. Immunol.*, **153**, 250.
- JÄCHERTS D., 1968, *Z. med. Mikrobiol. u. Immunol.*, **154**, 1.
- JERNE N.K., 1971, *Eur. J. Immunol.*, **1**, 1.
- JORMALAINEN S., MÄKELÄ O., 1971, *Eur. J. Immunol.*, **1**, 471.

- KORNGUTH S.E., ANDERSON J.W., LEDINSKY J., THOMPSON G.H., 1965, *Exp. Cell. Res.*, **37**, 650.
- LENNOX E.S., COHN M., 1967, *Annu. Rev. Biochem.*, **36**, 365.
- MAKINODAN T., RUTH R.F., WOLFE H.R., 1954, *J. Immunol.*, **72**, 45.
- MÄKELÄ, O., NOSSAL G.J.V., 1962, *J. exp. Med.*, **115**, 231.
- MILLER J.J., 1965, *Austr. J. exp. Biol. med. Sci.*, **43**, 107.
- MORARU I., DUMITRESCU M. ȘT., POPESCU S., 1971, *Primul simpozion național de imunologie*, București, p. 45.
- NATVIG J.B., KUNKEL H.C., LITWIN S.D., 1967, *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, **32**, 173.
- NATVIG J.B., KUNKEL H.G., YOUNT W.J., NIELSEN J.C., 1968, *J. exp. Med.*, **128**, 763.
- NATVIG J. B., TURNER W. M., 1971, *Clin. exp. Immunol.*, **8**, 685.
- NEWSOME J., 1965, *Nature*, **206**, 1013.
- NOLAN C., MARGOLIASH E., 1968, *Annu. Rev. Biochem.*, **37**, 727.
- NOSSAL G.J.V., WARNER N.L., HELLER L., 1971, *Cell. Immunol.*, **2**, 41.
- NUSSENZWEIG V., GREEN I., VASSALLI P., BENACERRAF B., 1968, *Immunology*, **14**, 601.
- ORIOLE R., BARBIER J., BIOZZI C., 1972, *Eur. J. Immunol.*, **2**, 105.
- UDIN J., MICHEL M., 1969, *J. exp. Med.*, **130**, 595.
- PAGOULATOS C.N., 1966, *Ann. Inst. Pasteur*, **110**, 497.
- PERNIS B., TORRIGIANI G., AMANTE L., KELUS A.S., CEBRA J.J., 1968, *Immunology*, **14**, 445.
- PETRIS DE, KARLSBAD J., PERNIS B., 1963, *J. exp. Med.*, **117**, 849.
- PETRIS DE, KARLSBAD J., 1965, *J. cell. Biol.*, **26**, 759.
- POTTER M., APPELLA E., GEISSER S., 1965, *J. mol. Biol.*, **14**, 361.
- RAJKA K., COHEN E.P., 1968, *Nature*, **217**, 720.
- RIFKIND R.A., OSSERMAN E.F., HSU C., MORGAN C., 1962, *J. exp. Med.*, **116**, 423.
- RIVAT L., RIVAT C., ROPARTZ C., HESS M., 1971, *Primul simpozion național de imunologie*, București, p. 57.
- ROPARTZ C., 1971, *Bull. Inst. Pasteur*, **69**, 107.
- SCHOOLEY C.J., BERMAN I., 1960, *Blood*, **XVI**, 1133.
- SCHUBERT D., 1970, *J. mol. Biol.*, **51**, 287.
- SELA M., 1971, *FEBS Letters*, **19**, 181.
- SERRA J.A., 1966, *Modern Genetics*, Acad. Press, New York — Londra, vol. II, p. 325.
- SHAPIRO A.L., SCHARFF M.B., MAIZEL G.V., UHR J.W., 1966 a, *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **56**, 216.
- SHAPIRO A.L., SCHARFF M.B., MAIZEL G.V., UHR J.W., 1966 b, *Nature*, **211**, 243.
- SHER A., COHN M., 1972, *Eur. J. Immunol.*, **2**, 319.
- SIMLEY D.J., HEARD J.G., ZIFF M., 1964, *J. exp. Med.*, **119**, 881.
- SMITHIES D., 1967, *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, **32**, 161.
- SULICA A., TARRAB R., HAIMOVICH J., SELA M., 1971 a, *Eur. J. Immunol.*, **1**, 236.
- SULICA A., HAIMOVICH J., SELA M., 1971, b, *J. Immunol.*, **106**, 721.

- TARRAB R., SULICA A., HAIMOVICH J., SELA M., 1971, *Eur. J. Immunol.*, **1**, 231.
- TAWDE S., SCHARFF M.D., UHR G.W., 1966, *J. Immunol.*, **96**, 1.
- VYAS C.N., PERKINS H.A., FUDENBERG H.H., 1968, *Lancet*, *7563*, 312.
- WEINSTEIN J., WILCHEK M., GIVOL D., 1969, *Biochi, Biophys. Res. Commun.*, **35**, 694.
- WEINSTEIN J., GIVOL D., STRAUSBACH P., 1972, *Eur. J. Immunol.*, **2**, 186.
- WHITEHOUSE H.L.K., 1967, *Nature*, **215**, 371.
- WILLIAMSON A.R., ASKONAS B.A. 1967, *J. mol. Biol.*, **23**, 201.



## III

## Interacțiuni celulare în cursul elaborării răspunsului imun. Rolul posibil al acizilor nucleici în medierea acestor interacțiuni

Răspunsul prin sinteză de anticorpi, indus de un anumit antigen, reprezintă rezultatul interacțiunii unor multiple tipuri de celule. În cadrul acestor interacțiuni distingem :

- interacțiuni între celule ce captează și degradează antigenul, deci celule de tip macrofag și celule care sintetizează anticorpi specifici față de acest antigen (celule din linia limfoplasmocitară);
- interacțiuni între diverse categorii de celule de tip limfoplasmocitar.

Toate aceste modalități de cooperare celulară reprezintă din punct de vedere genetic fenomene deosebit de interesante, întrucât în urma acestor cooperări se produc o serie de diferențieri sau de dediferențieri celulare care au ca efect remodelări în exprimarea fenotipică a unui aceluiași genom.

Cu alte cuvinte, diverse linii celulare făcând parte din același macroorganism (deci avînd același genom) își modifică în interval de cîteva generații segmentele ADN care se exprimă fenotipic, cum ar fi, de exemplu activarea cistronilor care codifică sinteza imunoglobulinelor.

Cooperarea celulară extrem de complexă ce apare în cursul elaborării răspunsului imun este în prezent intens studiată, implicațiile largi ale acestor fenomene fiind în bună măsură încă neclărite.

Un număr mare de lucrări susțin că, în cursul acestor interacțiuni celulare, acizii nucleici au un rol important în transmiterea informației antigenice de la o celulă la alta.

Pe de altă parte, alți autori contestă vehement acest rol, așa încît pentru moment problema rămîne încă controversată.

De aceea, în cele ce urmează vom trece în revistă argumentele și contraargumentele aduse în problema implicării acizilor nucleici în procesele de cooperare intercelulară.

## NECESITATEA INTERACȚIUNII DINTRE MACROFAGE ȘI CELULELE SERIEI LIMFOPLASMOCITARE, ÎN CURSUL ELABORĂRII RĂSFUNSULUI IMUN

Cercetări recente au stabilit că în timp ce captarea și degradarea antigenului au loc la nivelul macrofagelor și al polimorfonuclearelor, sinteza anticorpilor are loc în celule deosebite, respectiv celulele liniei limfoplasmocitare.

S-a ridicat deci problema modalității prin care stația de captare a antigenului transferă informația antigenică la nivelul stației de sinteză a anticorpilor.

Încă din 1963, Fishman și Adler constată că extracte de macrofage care au captat bacteriofag  $T_2$  pot stimula *in vitro*, în celulele de ganglioni limfatici provenite de la animale neimunizate, formarea de anticorpi anti-fag  $T_2$ .

Fenomenul era cu atât mai interesant, cu cât fagul  $T_2$  sau un alt antigen, cum ar fi hemocianina, în contact direct cu celulele de ganglion limfatic nu reușeau să inducă sinteza de anticorpi specifici.

S-a considerat deci că, după captarea antigenului, macrofagele elaborează un factor, denumit inițial „factorul Fishman”, care transferă informația antigenică la celulele sintetizatoare de anticorpi. Ulterior, Fishman constată că factorul respectiv este constituit din ARN.

Pornind de la aceste constatări, prin diverse modele experimentale, s-a încercat lămurirea mecanismului transmiterii informației antigenice de la macrofag la limfocit.

În marea lor majoritate, aceste cercetări au căutat să stabilească în sisteme de culturi celulare sau de fragmente de organ condițiile în care antigenul adăugat acestor culturi reușea să inducă sinteza unor anticorpi specifici.

În cele ce urmează vom menționa diversele modele experimentale utilizate, precum și concluziile care s-au degajat din studiul lor.

*Inducția anticorpilor în culturi de limfocite.* Observațiile lui Fishman și Adler (1963) au fost confirmate și completate de cercetările lui Moore și Schoenberg (1968). Folosind ca antigen feritina, acești autori au arătat că adăugarea antigenului, direct în cultura de limfocite (obținute din ganglioni limfatici), poate induce sinteza

anticorpilor antiferitină, numai în cazul când limfocitele proveneau de la animale imunizate. În schimb, stimularea sintezei de anticorpi în celule neimune — deci răspunsul primar — poate fi obținută numai dacă în sistemul respectiv sînt prezente și macrofagele.

*Inducția anticorpilor în culturi de celule splenice.* Spre deosebire de rezultatele studiilor asupra limfocitelor din ganglionii limfatici, mai mulți autori au arătat că antigenul poate stimula sinteza de anticorpi, dacă este pus în contact direct cu o suspensie de celule splenice neimune.

Astfel, Mishell și Dutton (1967) și Dutton și Mishell (1967) au arătat că hematiile de oaie incubate cu celulele de splină induc sinteza de hemolizine puse în evidență prin metoda Jerne (hemoliza locală în gel) (Jerne, 1963).

Aceste rezultate duc la concluzia că un contact direct între antigen și celule splenice neimune este suficient pentru ca acestea să sintetizeze anticorpi specifici, ceea ce la prima vedere ar pleda pentru afirmația că macrofagul nu este în mod necesar un intermediar în producerea anticorpului.

Concluzia nu este corectă însă, întrucît celulele obținute prin dilacerarea țesutului splenic sînt de tipuri foarte variate. Astfel Mosier (1967), în studiile lui asupra unui sistem Mishell-Dutton, a arătat că populația celulară poate să fie separată în două tipuri celulare: o populație de tip macrofagic care aderă de suprafața sticlei și o altă populație de tip limfocitar neaderentă la sticlă. Când se adaugă antigen la aceste două populații separate se constată că aproape nici o celulă nu este convertită la sinteza de anticorpi. Când se adaugă antigen însă la un amestec alcătuit din cele două populații, se constată din nou apariția celulelor formatoare de anticorpi.

*Inducția de anticorpi în culturi de celule provenite din exsudate peritoneale.* Lucrările lui Bussard (1966), Bussard și Lurie (1967) și Bussard (1967) au arătat de asemenea că formarea anticorpilor antihematie de oaie, de către celulele de exsudat peritoneal de șoarece neimun, incubate cu antigen *in vitro*, necesită cooperarea între mai multe tipuri celulare diferite.

Lucrările lui Unanue și Askonas (1976, 1968) au adus informații deosebit de importante asupra rolului pe care îl joacă macrofagele în cursul elaborării răspunsului imun, prin sinteză de anticorpi *in vivo*. Autorii au cercetat răspunsul imun indus de către diferite antigene, cum ar fi hemocianina, cu greutate moleculară mare, de *Mega-*

*thura crenulata*, și hemocianina, cu greutate moleculară mică, de *Maia squinado*.

Concluziile lor pot fi rezumate după cum urmează :

a) Elaborarea unui răspuns imun, cel puțin față de anumite antigene, necesită interacțiunea dintre macrofag și limfocit.

Astfel, inocularea hemocianinei de *Maia squinado*, marcată cu  $^{131}\text{I}$ , înglobată în macrofage, nu determină nici un răspuns imun la animale iradiate cu raze X în doze care distrug toată populația limfoplasmocitară. Deci, pentru stimularea sintezei de anticorpi macrofagele care au captat antigenul trebuie să vină în contact cu limfocitele, singurele în măsură să sintetizeze imunoglobuline.

Un argument suplimentar în favoarea acestei afirmații este observația aceluiași autori că răspunsul imun este restabilit, dacă odată cu macrofagele care au captat antigenul se inoculează la iepurii iradiați și o suspensie de celule de ganglioni limfatici, ce va repopula organismul primitivului cu celule producătoare de anticorpi.

b) Administrarea antigenului înglobat în macrofag determină un răspuns imun care nu diferă în ce privește dinamica sa de răspunsul imun determinat prin inocularea antigenului ca atare.

De aici, concluzia autorilor că antigenul nu suferă la nivelul macrofagului modificări importante care să ducă la schimbări ale calităților sale imunogene.

Mai exact, s-a constatat că tipul de anticorpi sintetizați depinde de cantitatea de antigen folosită în răspunsul primar (indiferent dacă administrat ca atare sau înglobat în macrofage).

Astfel, cantitățile mici de antigen (administrat sub formă intracelulară în doză de 0,002—0,02  $\mu\text{g}$  per animal) determină sinteza exclusivă a anticorpilor 19 S; cantități mai mari de antigen determină sinteza unor cantități mai mari de anticorpi 19 S, dar și de anticorpi 7 S.

c) S-au constatat însă diferențe în intensitatea răspunsului imun după cum antigenul a fost administrat la animal, ca atare sau înglobat în macrofage (vezi rezumatul acestor observații în tabelul nr. 8). Astfel, hemocianina de *Maia squinado* (cu greutate moleculară mică), administrată ca atare la șoareci în primoinoculare determină un răspuns primar foarte slab. Răspunsul devine însă mult mai intens (de 3—40 de ori), dacă aceeași doză de antigen este inoculată sub formă intracelulară, înglobată în macrofage.

În ce privește răspunsul secundar s-au constatat de asemenea diferențe, în sensul că șoarecii imunizați primar cu hemocianină liberă în *doze mici* (0,2—0,01  $\mu\text{g}$ ) răspund mult mai puternic după administrarea în rapel a aceluiași doze de hemocianină înglobată în macrofage, decât cei ce au primit pentru a doua oară antigenul

Tabelul nr. 8

Efectul imunogen al diferitelor antigene administrate la animal ca atare sau înglobate în macrofage (Unanue și Askonas, 1968)

Antigen	Imunizare primară	Imunizare secundară	Efect
Hemocianină cu greutate moleculară mică; răspuns primar slab	antigen liber	—	martor
	antigen intracelular	—	crescut
	antigen liber (doză mică)	antigen liber (doză mică)	martor
	<i>idem</i>	antigen intracelular (doză mică)	crescut
	antigen liber (doză mare)	antigen liber (doză mare)	martor
	<i>idem</i>	antigen intracelular (doză mare)	identic cu martorul
Hemocianină cu greutate moleculară mare; răspuns primar intens	antigen liber	—	martor
	antigen intracelular	—	identic cu martorul
	antigen liber	antigen liber	martor
	<i>idem</i>	antigen intracelular	crescut

ca atare. În schimb, dacă primoimunizarea s-a făcut după administrarea unei *doze mari* de antigen administrat ca atare (1  $\mu\text{g}$ ), răspunsul secundar este același, indiferent dacă în rapel s-a administrat aceeași doză de antigen (1  $\mu\text{g}$ ), ca atare sau înglobat în macrofage.

Deci creșterea imunogenității unui anumit antigen înglobat în macrofag pare a fi o funcție legată de momentul administrării

acestui antigen (răspuns primar sau secundar) și de condițiile imunizării anterioare (doză mare sau mică de antigen pătruns în organismul animalului).

Stimularea răspunsului imun în cazul administrării antigenului înglobat în macrofage depinde însă și de tipul de antigen luat în considerare.

În toate aceste experiențe, efectul imunogen sporit era anulat, dacă se administrau animalului macrofagele omorite prin îngheț-dezghet, după înglobarea antigenului. Deci creșterea imunogenității se datora macrofagelor vii, care puteau stabili rapid un contact celular direct cu limfocitele.

După Unanue și Askonas (1967, 1968), cazurile particulare în care antigenul determină un răspuns imun sporit după înglobarea lui în macrofag s-ar datora unor funcții nespecifice ale macrofagelor, care păstrează anumite fragmente antigenice sau chiar antigenul întreg sub o formă nedegradată, protejându-l astfel de distrugerii enzimatice pînă ce acesta se fixează la nivelul limfocitelor.

Unanue și Askonas (1968) au arătat că macrofagul reține pe suprafața membranei celulare o mică cantitate din hemocianina încorporată (circa 10%) într-o formă care nu este rapid catabolizată și care ar permite astfel interacțiunea ulterioară cu celulele limfoide, confirmînd astfel observațiile mai vechi ale lui Garvey și Campbell (1957) și Kölsch și Mitchison (1968).

## ROLUL MACROFAGELOR ÎN STIMULAREA RĂSPUNSULUI IMUN

Inițial s-a considerat că după captarea și degradarea antigenului, macrofagul sintetizează o fracțiune de ARN mesager care codifică în secvența nucleotidelor sale o informație specifică pentru fiecare antigen în parte.

Acest ARN mesager este reponsabil în ultimă instanță de transmiterea informației antigenice de la macrofag către celulele producătoare de anticorpi, el declanșînd în aceste celule sinteza unor anticorpi specifici, corespunzători informației aduse de către antigen (Adler și colab., 1966; Fishman și Adler, 1967; Pinchuck și colab., 1968; Bell și Dray, 1969; Fishman, 1969).

O altă categorie de cercetători au arătat însă că ARN izolat din macrofage după captarea și degradarea antigenului nu este un

ARN mesager, deci nu are o secvență a nucleotidelor specifică fiecărui antigen în parte, dar că totuși din macrofage se poate izola o fracțiune de ARN care este complexată la resturile antigenice și care stimulează sinteza de anticorpi la nivelul celulelor din seria limfoplasmocitară (Gottlieb și colab., 1967; Gottlieb, 1968, 1969). În acest caz, complexul antigen-ARN, denumit „super antigen”, manifestă o imunogenitate mult crescută în raport cu o cantitate echivalentă de antigen necomplexat (Askonas și Rhodes 1964, 1965).

Până în prezent nu se poate însă afirma că, *in vivo*, rolul macrofagului în stimularea răspunsului imun rezidă într-adevăr în complexarea resturilor antigenice degradate la molecula de ARN.

Aceasta pentru că acizii nucleici stimulează sinteza anticorpilor și pe cale nespecifică. În acest caz, secvența nucleotidelor, deci informația conținută în lanțurile de acizi nucleici, extrase din surse foarte diferite, nu joacă nici un rol, diversele preparate de acizi nucleici avînd același efect.

Braun (1964), precum și Braun și Nakano (1967) constată că inocularea la șoareci a unui amestec format din hematii de oaie și complexe de serumalbumină bovină și acizi poliadenilici (poli A), poliuridilici (poli U) sau policitidilici (poli C) duce la o scurtare a perioadei de inducție și la creșterea numărului de splenocite formatoare de plaje de hemoliză în placa Jerne. După acești autori, acizii poli A și poli C par a acționa ca niște stimulatori care accelerează activitatea nucleotidkinazei.

Este greu de determinat *in vivo* mărimea exactă a lungimii optime a fragmentului activ, pentru că în mediul intern al animalului se găsesc în cantitate mare enzime care depolimerizează acizii nucleici (endo sau exonucleaze). Totuși se consideră, pe baza unor studii cu oligomeri sintetici definiți, că lungimea optimă pentru stimularea răspunsului imun este de 2–6 nucleotide (Braun și colab., 1968). Experiențele acestor cercetători sugerează că diverși agenți citotoxici captați de către macrofage *in vivo* pot distruge celulele în care se găsesc, eliberînd din resturile acestora oligonucleotide stimulative ale răspunsului imun. Prin acest mecanism, agenții citotoxici ar acționa ca adjuvanți în momentul cînd sînt asociați cu un antigen oarecare. Dintre substanțele citotoxice cu rol de adjuvant menționăm: endotoxinele, micobacteriile (adjuvant Freund) fluorouracildeoaxiribozidul, tetraclorura de carbon, colchicina sau silicea cristalină. Însăși reacția dintre antigen și celulele producătoare de anticorpi, cu anticorpi

legați de membrană (cell-bound), determină un efect citotoxic, cu eliberarea de oligonucleotide stimulative ale răspunsului imun.

S-a constatat că *in vivo* efectul stimulator al răspunsului imun este determinat de oligonucleotidele dublu sau multiplu helicoidale, în timp ce oligomerii unihelicoidali sînt inactivi.

*In vitro*, situația este inversă, oligonucleotidele unifilamentoase fiind stimulative, în timp ce oligomerii dublu filamentoși determină un efect inhibitor asupra răspunsului imun.

Această afirmație a fost verificată prin studii cu oligonucleotide sintetice. S-a constatat că oligomerii poli A—poli U sau poli C—poli G au un efect puternic stimulator *in vivo*. În schimb, homopolimerii unifilamentoși poli A, poli G, poli U sau poli C nu au un efect stimulator.

Efectul stimulator *in vivo* re apare însă dacă homopolimerii se asociază la homopolimerul complementar, realizînd astfel un dublu helix, sau se complexează cu serumalbumină bovină metilată. Această observație duce la concluzia că, în forma dublu elicoidală sau complexată la o proteină, *in vivo*, oligonucleotidele nu pot fi distruse de către nucleazele mediului intern, avînd astfel șanse să ajungă intacte la celulele producătoare de anticorpi.

Experiențele lui Braun au arătat că efectul acizilor nucleici în stimularea răspunsului imun suplinește un efect similar determinat *in vivo* de către macrofage. Astfel, de exemplu, la șoarecii C<sub>57</sub>B<sub>1</sub>, nou-născuți, care obișnuit nu răspund prin sinteză de anticorpi față de hematiile de oaie, se poate determina un răspuns imun față de acest antigen, dacă se transferă macrofage de la șoareci adulți. Un rezultat similar se obține dacă în locul macrofagelor de șoarece adult se inoculează șoarecilor nou-născuți antigenul (hematii de oaie) asociat cu polinucleotide dublu elicoidale activatoare, ceea ce compensează în acest fel deficitul de funcție a macrofagelor imature.

Pe de altă parte, alți autori neagă faptul că, după degradarea antigenului, macrofagul are capacitatea de a complexa fragmente antigenice la un lanț polinucleotidic și deci ca, *in vivo*, acest complex reprezintă factorul ce transferă informația antigenică de la macrofag la limfocit (Unanue și Askonas, 1967, 1968; Roelants și Goodman, 1968, 1969; Unanue și Cerottini 1970 a, b; Roelants și colab., 1971).

După părerea lui Unanue și Askonas (1968), rolul macrofagului ar consta deci în faptul că :

— prezintă celulelor limfoplasmocitare antigenul sub forma unor concentrații locale înalte, asigurînd astfel un contact intim între antigen și celulele imunocompetente ;



— asigură în acest mod persistența antigenului un timp mai îndelungat în contact cu celulele producătoare de anticorpi.

Experiențele acestor autori arată că etapa de captare a antigenului de către macrofage nu este necesar a fi urmată în orice condiții de o etapă de prelucrare și creștere a imunogenității lui, eventual prin cuplare la un ARN.

Argumente împotriva unei cuplări active a resturilor antigenice cu un ARN imunogen, ca funcție specifică macrofagului indispensabilă declanșării unui răspuns imun, provin și din experiențele lui Roelants și Goodman (1968, 1969) și Roelants și colab. (1971).

Pentru a stabili natura legăturii dintre antigen și ARN izolat din celule de exsudat peritoneal, acești autori au studiat capacitatea de complexare la ARN după înglobarea intracelulară a mai multor substanțe (considerate „antigene”) printre care : acid poli $\gamma$ -D-glutamic, poli $\alpha$ -D-glutamic, dextran, dextran acid, imunoglobulină umană, testosteron, estradiol, acid DL-glutamic, acid L-glutamic. S-a constatat că complexarea la ARN de macrofag nu depinde de faptul că substanța folosită este imunogenă sau nu.

Dintre moleculele testate, numai cele cu grupări încărcate negativ s-au putut lega la ARN. Pentru o anumită cantitate de „antigen” asocierea este proporțională cu cantitatea de ARN.

Raportul „antigen”/ARN nu variază cu temperatura (între 2 și 80°C), cu timpul de incubare, dacă omogenatele acelulare sînt tratate cu pronază, sau cînd incubarea cu „antigen” se face în prezența a 0,5 % dodecil sulfat de sodiu. În schimb, în prezența a 0,01 M EDTA se observă o diminuare cu 50 % a legării „antigenului” la ARN. Aceste rezultate duc la concluzia că formarea complexelor nu se datorează unei reacții enzimaticе.

Adăugarea antigenului la suspensia de macrofage nu modifică rata de încorporare a  $^{14}\text{C}$  uridinei în ARN ; deci, prezența „antigenului” nu determină sinteza unui ARN specific, necesar pentru formarea complexelor. Autorii dovedesc că acidul poli $\gamma$ -D-glutamic se poate asocia și cu ARN provenit de la celulele He—La, deci un antigen poate forma complexe și cu ARN de la alte celule decît macrofagele. Legarea „antigenului” la ARN are loc numai în prezența  $\text{Mg}^{2+}$ , iar disocierea complexului reușește în urma dializelor prelungite față de soluții de EDTA (care fixează ireversibil  $\text{Mg}^{2+}$ ).

Prin cele două legături ale sale,  $\text{Mg}^{2+}$  formează deci o punte care leagă proteina, indiferent de antigenitatea ei, la ARN.

În consecință, asemenea complexe pot apărea *in vivo*, dar ele nu reprezintă o activitate specifică a macrofagului legată de inițierea

răspunsului imun, după cum susțin Gottlieb (1968, 1969) și Fishman (1967, 1969), aceasta pentru că legarea unei proteine oarecare la o moleculă de ARN prin intermediul unor ioni bivalenți ar putea avea loc în orice celulă vie.

În concluzie, după acești autori (Unanue și Askonas, 1967, 1968; Roelants și Goodman, 1968, 1969) macrofagul, pe lângă funcția de catabolism a antigenului – evitând în acest fel o supraaglomerare a antigenului în organism –, prezintă o funcție imunologică nespecifică, deteminată de faptul că menține pentru un timp îndelungat antigenul într-o formă mai mult sau mai puțin nedegradată.

Acest antigen nedegradat, fixat pe suprafața celulei, va fi „prezentat” limfocitelor. Prin contact direct cu receptorii specifici limfocitari, antigenul astfel prezentat induce în celulă sinteza anticorpului specific. Trebuie precizat cu această ocazie că autorii menționați confirmă faptul că, prin complexarea la antigene, ARN potențează mult imunogenitatea acestora. Ceea ce diferă în acest caz este interpretarea acestor experiențe, ei considerând că *in vivo* nu are loc complexarea antigenului degradat la ARN imunogen. După acești autori, complexe puse în evidență de Gottlieb, Fishman și alții ar fi rezultate ale distrugerilor celulare apărute în momentul extragerii fracțiunilor ARN imunogene (Roelants și colab., 1971).

După părerea lor deci, efectul macrofagului este total nespecific. Singura nuanță de specificitate este determinată de antigenul nedegradat fixat la suprafața celulei, care va „alege” dintre limfocitele înconjurătoare și va interacționa exclusiv cu limfocitele ai căror receptori sînt complementari antigenului. În acest caz însă se ridică o problemă semnalată chiar de autorii citați: dacă rolul macrofagului se limitează la menținerea antigenului sub formă nedegradată, un timp mai îndelungat și la o concentrație locală relativ mai înaltă, se pune întrebarea dacă aceste condiții nu ar putea fi temporar realizate de către antigenul liber prin alipirea lui direct pe limfocite. În acest caz, rolul macrofagului în sistemele de inducție a anticorpilor *in vitro* ar putea fi înlocuit cu ușurință printr-un aport direct de antigen în concentrații corespunzătoare. Or, după cum am arătat, necesitatea indispensabilă a macrofagelor pentru a determina inițierea sintezei de anticorpi în culturi de celule arată că rolul acestor celule în stimularea diviziunii, a sintezei ARN și a sintezei proteinelor în celulele producătoare de anticorpi este mai complex.

Într-adevăr, recent s-a demonstrat că macrofagele activează proliferarea liniilor celulare formatoare de anticorpi.

Sjöberg și colab. (1972) au arătat că, în culturi de celule limfoide stimulate cu un antigen (hematii), sinteza ADN este foarte redusă. Dacă însă în aceste culturi se adaugă și celule de exsudat peritoneal aderente la sticlă (macrofage), atunci sinteza ADN crește foarte mult în celulele limfoplasmocitare stimulate de către antigen și consecutiv sinteza de anticorpi este maximă.

Rolul macrofagelor în stimularea diviziunii celulelor formatoare de anticorpi este confirmat de aceiași autori, care au observat că dacă în culturi de limfocite lipsite de macrofage se introduc ipopolizaharide de *E. coli*, care stimulează direct proliferarea celulelor B (producătoare de anticorpi), răspunsul imun față de hematii este restaurat.

Sub acest raport se înțelege de-abia acum de ce acizii nucleici pot suplini activitatea macrofagelor în stimularea răspunsului imun deoarece, după cum vom arăta ulterior, întocmai ca și macrofagele, acizii nucleici joacă un rol important în stimularea proliferării celulelor producătoare de anticorpi.

Shearer și colab. (1971) au arătat că polinucleotidul poli A—U, administrat odată cu antigenul sintetic (T, G)-Pro-L<sup>1</sup>, reușește să inducă un răspuns imun la liniile de șoarece DBA/1 și DBA/2, care altminteri sînt genetic incapabile să răspundă prin sinteză de anticorpi față de acest antigen.

Mai mult decît atît, titrul anticorpilor anti (T, G)-Pro-L, sintetizați de către șoarecii din linia DBA/1, este identic cu titrul anticorpilor induși de către (T,G)-Pro-L la șoarecii din linia SJL, care răspund bine față de acest antigen. În schimb, asocierea poli A—U la același antigen nu induce o creștere semnificativă a titrului anti (T,G)-Pro-L la tulpina SJL.

S-a constatat însă că asocierea poli A—U la un alt antigen sintetic (T,G)-A-L<sup>2</sup> nu reușește să stimuleze imunogenitatea acestui antigen la tulpina de șoareci C<sub>3</sub>H/HeJ, care sînt genetic nereactivi la (T,G)-A-L.

Aceste rezultate arată efectul poli A—U de creștere a imunogenității unor polipeptide sintetice la șoarecii genetic nereactivi

---

<sup>1</sup>(T, G)-Pro-L = polimer sintetic format dintr-un schelet de poliprolină ce poartă lanțuri laterale din poli-L-lizină, la capetele cărora se găsesc secvențe scurte de tirozină (T) și acid glutamic (G).

<sup>2</sup> (T, G)-A-L este similar cu (T, G)-Pro-L, avînd însă poliprolina înlocuită de lanțuri de polialanină.

față de aceste antigene depinde nu atât de o anumită linie de șoareci, ci mai ales de un anumit polipeptid luat în considerare.

Aceiași autori au arătat că poli A—U induce o stimulare a diviziunii celulelor precursorare pentru sinteza anticorpilor, provenite din măduva osoasă (celule B).

Răspunsul imun redus al șoarecilor la (T,G)-Pro-L poate fi însă crescut și prin administrarea macrofagelor din exsudatul peritoneal, prelevate de la aceeași linie de șoareci și preincubate 1 oră la 37°C cu acest polimer.

Rolul macrofagelor în creșterea imunogenității acestui antigen a fost demonstrat de către Shearer și colab. (1971) printr-o altă serie de experiențe, în care șoarecii din linia DBA/1 au fost iradiați în doze ce asigură distrugerea tuturor celulelor imunologic competente. Sistemul imun al acestor șoareci iradiați a fost apoi reconstituit prin inocularea unui anumit număr de timocite (celule T), celule de măduvă osoasă (celule B) și de macrofage de exsudat peritoneal, prelevate de la șoareci din aceeași linie DBA/1, neimunizați. Administrarea unui număr diferit de celule din fiecare categorie permite observarea efectului exercitat de către fiecare tip celular după inocularea acestor animale „restaurate” cu diferite antigene.

S-a constatat că răspunsul șoarecilor DBA/1 „reconstituiți” cu un anumit număr de celule B, față de (T,G)-Pro-L, este de fiecare dată crescut, dacă în amestecul de reconstituire se adaugă și macrofage peritoneale.

Coroborînd aceste date cu cele obținute de Sjöberg, putem deci trage concluzia că macrofagul reprezintă o celulă care, fixînd pe suprafața ei antigenul ca atare sau degradat, asigură un contact direct, intens și prelungit între antigen și celula imunologic competentă. În afară de aceasta, însă, macrofagele exercită un efect de stimulare a diviziunii celulelor B, deci a precursorilor celulelor formatoare de anticorpi. Acest efect, al cărui mecanism intim nu este încă cunoscut, este necesar pentru elaborarea unui răspuns imun optim.

După cum au arătat Shearer și colab. (1971), polinucleotidele, cum ar fi poli A—U, exercită cel puțin în anumite cazuri, ca, de exemplu, răspunsul imun al șoarecilor DBA/1 față de antigenul sintetic (T,G)-Pro-L, un efect asemănător funcției macrofagelor, adică stimulează proliferarea și activitatea limfocitelor B.

## INTERACȚIUNI ÎNTRE CELULELE IMUNOLOGIC COMPETENTE ÎN CURSUL ELABORĂRII RĂSPUNSULUI IMUN

Cercetările din ultimii ani au arătat că liniile limfoplasmocitare implicate în răspunsul imun reprezintă o populație foarte eterogenă în ceea ce privește funcțiile acestor celule.

Am arătat anterior că o anumită clonă, derivată dintr-o singură celulă imunologic competentă, răspunde prin sinteză de anticorpi împotriva unui singur determinant antigenic (vezi capitolul „Determinismul genetic al imunoglobulinelor”).

În rezumat, după Roitt și colab. (1969), fiecare clonă de celule imunologic competente se poate împărți, în ce privește rolul funcțional și momentul intervenției în răspunsul imun, în diferite populații celulare (fig. 10).

*Limfocitele mici „reactive la antigen”* (antigen-sensitive cells) sînt celule care ar putea răspunde la stimulul antigenic, dar care momentan sînt inerte, pentru că nu sînt angajate în răspunsul imun.

Contactul dintre un anumit antigen și limfocitele reactive la antigenul respectiv determină transformarea acestora în „celule activate” (primed cells), care suferă o serie de modificări ce caracterizează răspunsul imun primar. Echivalentul morfologic al acestei transformări este relativ bine cunoscut astăzi. Atît *in vitro*, cît și *in vivo* se constată că după stimularea antigenică o serie de celule mici cu aspect de limfocite, care ca atare sînt inerte și nu se divid, suferă o dediferențiere și încep să se dividă activ, producînd *celule de tip blastice*.

Dediferențierea blastică poate fi indusă nu numai de contactul limfocitelor mici cu antigenul, ci și de alte substanțe, cum ar fi fitohemaglutinina (PHA) care acționează însă nespecific asupra unei multitudini de limfocite cu specificitate antigenică diferită. Celulele blastice vor suferi ulterior o nouă diferențiere în celule mature care intervin efectiv în reacția imună, de unde și numele de *celule efectoare*. Nu se cunosc pînă în prezent nici factorii ce induc o asemenea diferențiere și nici procesele moleculare intracelulare care explică diferențierea celulelor blastice în celule efectoare.

Amintim doar că aceste tranziții, limfocit mic „reactiv la antigen” — celulă blastică — celulă efectoare, reprezintă fenomene care rețin astăzi atenția unui număr mare de cercetători, ce consideră

că ele reprezintă un model experimental foarte bun pentru cercetarea diferențierii și dediferențierii celulare în general.

Ca urmare a specializării funcționale a celulelor efectoare, acestea intervin direct (Roitt și colab., 1969):

— fie în răspunsul imun prin producere de anticorpi, sintetizând efectiv imunoglobuline specifice. Morfologic aceste celule aparțin seriei plasmocitare;

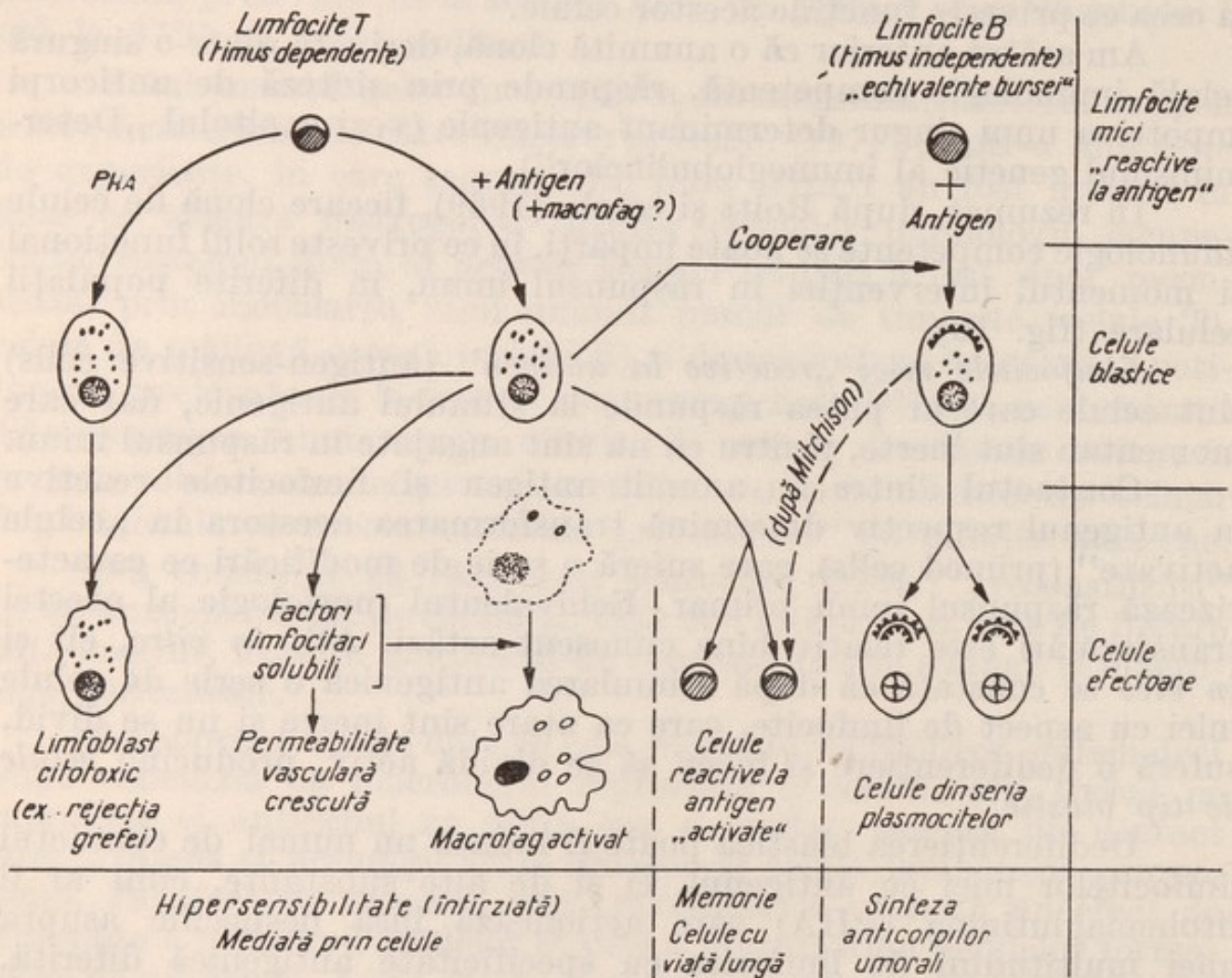


Fig. 10. — Interacțiuni între celulele imunologic competente în cursul elaborării răspunsului imun (după Roitt și colab., 1969; modificat).

— fie în răspunsul imun imediat prin celule și, în acest caz, aceste celule vor fi implicate în diferite reacții celulare citotoxice, cum ar fi rejecția de greafă. Sub raport morfologic aceste celule, denumite în literatura anglo-saxonă celule „ucigașe” sau „agresoare” (killer cells), au un aspect de limfoblast;

— fie, în sfârșit, se diferențiază în celule cu aspect de limfocite mici, denumite celule de memorie (memory cells), care păstrează memoria antigenului ce a indus toate aceste evenimente. Celulele de memorie reacționează prompt la reidentificarea antigenului specific, printr-o modalitate încă insuficient precizată, care însă determină un răspuns mult mai intens și mult mai rapid, avînd caracterele răspunsului imun secundar.

După părerea altor autori, celulele de memorie nu ar face parte din categoria celulelor efectoare, ci ar trebui considerate ca niște celule speciale din categoria celulelor blastice (Sterzl și Silverstein, 1967; Byers și Secarz, 1968).



Experiențele în care s-au folosit drept imunogeni antigene complexe formate prin conjugarea unor molecule mici, haptene, cu macromolecule naturale sau sintetice, au scos în evidență o serie de particularități ale răspunsului imun prin sinteză de anticorpi antihaptenă, care depind de molecula de purtător (carrier). Printre aceste efecte, descrise în literatură sub numele de efecte de purtător (carrier effects), reținem în cele ce urmează :

1) Conjugatul purtător-haptenă (P-Hp) nu poate induce sinteza de anticorpi anti-Hp decît în măsura în care purtătorul este prin el însuși imunogenic (deci induce singur anticorpi anti-P) în raport cu organismul imunizat (vezi în capitolul „Controlul genetic al reactivității imune față de diferite antigene”, descrierea amănunțită a experiențelor lui Levine, Green și Benacerraf).

2) Dacă un animal este imunizat primar cu un conjugat  $P_1$ -Hp și apoi secundar cu alt conjugat  $P_2$ -Hp, în care  $P_1$  diferă de  $P_2$ , se constată că răspunsul secundar prin anticorpi anti-Hp este mai redus decît dacă rapelul este făcut cu un conjugat  $P_1$ -Hp similar celui ce a indus răspunsul primar (Mithison, 1971 a, b).

Studiul atent al acestor efecte a îndreptățit concluzia că un antigen oarecare poate induce un răspuns primar prin sinteză de anticorpi, numai în cazul în care posedă minimum doi determinanți antigenici identici sau diferiți. În acest din urmă caz, unul din determinanți poate fi reprezentat de către o haptenă. În aceste condiții, antigenul se fixează simultan pe două limfocite „reactive la antigen”, prin intermediul receptorilor de pe membrana celulară. Una din celule reprezintă un precursor al celulei formatoare de anticorpi, sau prescurtat AFP (de la forma engleză : antibody-forming-cell-pre-

cursors), cealaltă, fiind o celulă de un tip particular, care nu produce ea însăși anticorpi, în schimb declanșează propriu-zis răspunsul imun, ajutînd celula AFP să se diferențieze într-o celulă efectoare activ producătoare de anticorpi (fig. 11).

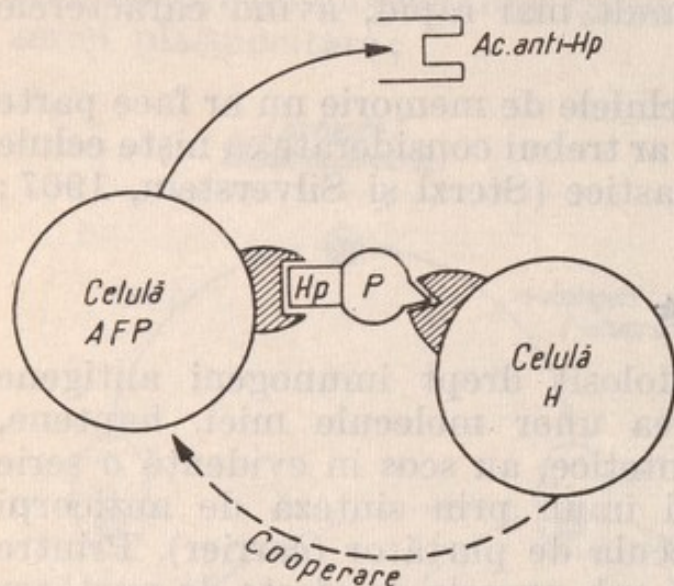


Fig. 11. — Cooperarea dintre celula H și celula AFP ce declanșează răspunsul imun cu formare de anticorpi antihaptenă (*Hp*=haptenă; *P* = purtător).

Fenomenul respectiv poartă numele de cooperare celulară (cellular cooperation), iar celulele ce ajută la declanșarea răspunsului imun sînt denumite celule ajutătoare sau prescurtat celule H (helper cells).

Cercetări anterioare asupra dezvoltării ontogenetice a sistemului imun arătasera că celulele limfoide care participă la răspunsul imun, deci celule imunologic competente, se pot subîmpărți în două mari categorii, după locul unde se produce inițierea lor : pe de o parte, o populație de celule B care provin din măduva osoasă (bone marrow), iar pe de altă parte o populație de celule T, sau timus dependente care derivă din timus.

După Jerne (1971) timusul și măduva osoasă, precum și bursa lui Fabricius (în cazul păsărilor) reprezintă centrele unde s-ar produce inițierea, deci diferențierea celulei primitive, în celule capete de clonă, reactive la antigen.

Rezultă că celulele originare, nediferențiate (stem-cells), care iau naștere în măduva osoasă, pot suferi procesul de inițiere fie în măduvă, fie migrează în timus, unde se diferențiază în celule imunologic competente T. Din aceste puncte, celulele „reactive la antigen”



vor migra în organele limfoide secundare, populând aceste țesuturi cu proporții variate de celule B și T. După Raff și Owen (1971), la șoareci (liniile CBA și Balb/c) se găsesc în timus 100 % celule T. Celulele T apar de asemenea printre limfocitele ductului toracic în proporție de 80—85 %, în limfocitele sanguine 70 %, în ganglionii limfatici 65—70 %, în splină 30—35 %, printre limfocitele peritoneale 30—35 % și în plăcile Peyer în proporție de 20—25 %.

Cercetările lui Roitt și colab. (1969), Britton și colab. (1971), Mitchison (1971 a, b, c), asupra cooperării celulare în cursul elaborării răspunsului imun prin sinteză de anticorpi, au arătat că :

— Precursorii celulelor formatoare de anticorpi (AFP) sînt celule de tip B, în timp ce celulele ajutătoare H fac parte din celulele T.

— Celulele H nu produc anticorpi, dar alcătuiesc cu celulele AFP un tandem care este activat (primed) simultan de stimulul antigenic primar ( $P_1$ -Hp). Restimularea cu o haptенă legată la alt purtător ( $P_2$ -Hp) induce un răspuns secundar mai slab, pentru că celula H specifică anti- $P_2$  este abia de data aceasta activată, în timp ce celula AFP, specifică anti-Hp, reacționează la un rapel.

— Celulele H sînt mai rezistente decît celulele AFP la iradiere sau la droguri. Ele rezistă mai bine la transplantarea într-un șoarece semialogen, care deci se deosebește de animalul donator prin antigenul de histocompatibilitate H-2 codificat de o singură alelă (vezi capitolul „Imunitatea de transplantare”).

— Atît celulele H, cît și cele AFP păstrează memoria imunologică.

— Cooperarea intercelulară nu este mediată de un proces nespecific sau farmacologic.

— Anticorpul specific anti P-Hp nu pot compensa lipsa celulelor H în cooperare (Mitchison, 1971 b).

— Nu toate antigenele induc un răspuns imun prin cooperarea celulară. Sub acest raport, antigenele se pot împărți în două categorii : a) antigene timus dependente, cum ar fi serumalbumina bovină, care necesită cooperarea celulelor T și B pentru inducerea de anticorpi specifici ; timectomia neonatală reduce considerabil răspunsul imun față de aceste antigene ; b) antigene timus independente, cum ar fi hemocianina de *Maia squinado* sau polizaharizii pneumococici care nu necesită cooperarea celulară, ori, altfel spus, care declanșează răspunsul imun prin alte mecanisme ce suplinesc această cooperare (Mitchison, 1971 b ; Roelants și Askonas, 1971).

O serie de substanțe stimulează selectiv diviziunea liniilor celulare T sau B.

Astfel, concanavalina A reprezintă un mitogen numai pentru celulele T, în timp ce lipopolizaharizi din *E. coli* activează selectiv diviziunea celulelor B. În această calitate, lipopolizaharizii pot suplini efectul celulelor T în stimularea celulelor B. Astfel, se știe că răspunsul imun la hematii este timodependent. Sjöberg și colab. (1972) au constatat că hematiile cuplate pe suprafața lor cu lipopolizaharizi transformă răspunsul imun antihematie într-un răspuns timo-independent.

Diviziunea celulelor B poate fi totuși stimulată și de către concanavalina A, dar numai în prezența unor factori umorali eliberați în culturile *in vitro* de către celulele T (Anderson și colab., 1972).

În concluzie, celulele reactive la antigen din seria T se pot dediferenția, transformându-se în celule blastice fie în mod nespecific, sub influența fitohemaglutininei, filtratelor de stafilococ, streptolizinei sau a serului antilimfocitar, fie în mod specific, sub influența antigenului ca atare sau prelucrat în prealabil de către macrofag. Această celulă blastică derivată din seria T fie cooperează în calitate de celulă ajutătoare cu celulele din seria B, fie produce anumiți factori limfocitari solubili, care au roluri multiple în răspunsul imun, printre care notăm „activarea” macrofagelor sau creșterea permeabilității vasculare (vezi fig. 10).

Prin diferențierea celulelor blastice T în celule efectoare, apar limfocite mici „de memorie” sau celule de tip limfoblastic, implicate în distrugerea celulelor străine organismului, cum ar fi grefele.

Sub influența celulelor blastice din seria T, celulele blastice din seria B se diferențiază în celule efectoare, producătoare de anticorpi, cu aspect de plasmocite, sau — după Mitchison (1971 a, b) — se pot diferenția și în celule cu memorie imunologică.

Din cele expuse rezultă că pentru elaborarea răspunsului imun, sînt necesare interacțiuni celulare multiple. Care este substratul biochimic al acestor interacțiuni și, mai ales, cum se menține și se transmite strict specificitatea antigenică în cursul acestor procese de diferențiere și dediferențiere celulară?

În literatură există o problemă extrem de controversată care pornește de la o serie de lucrări ce au arătat că acizii nucleici extrași din splina sau ganglionii limfatici ai unui animal imunizat pot induce biosinteza de anticorpi specifici, deci un răspuns imun la animale neimune.

Pe marginea acestor lucrări se ridică întrebarea: sînt oare implicați acizii nucleici în procesele de cooperare intercelulară și, prin urmare, pot ei — ca substrat material al acestor relații — să substituie anumite evenimente celulare declanșate în mod normal de către antigen?

*Conversia celulelor splenice neimune în celule producătoare de anticorpi prin ARN extras din splină sau din ganglioni limfatici proveniți de la animale imune.* Cohen (1967) realizează această conversie prin incubarea timp de 15 minute la 37°C, a unei suspensii de celule splenice neimune de șoarece, cu ARN extras din splina de șoareci imunizați cu hematii de oaie. Ca urmare, celulele splenice neimune încep să producă hemolizine. Producția acestor anticorpi este pusă în evidență prin tehnica hemolizei locale în gel (Jerne).

În condițiile arătate anterior se observă că inducția de hemolizine nu este abolită prin tratarea ARN cu pronază, tripsină sau amilază. RN-aza în doze foarte mici scade semnificativ, nu însă total, capacitatea de conversie a ARN.

Rezultate asemănătoare au fost obținute de Sulica, Ghyka și Gheție (1968), lucrînd cu splenocite de iepure. În experiențele citate, numărul de plaje crește odată cu mărirea cantității de acizi nucleici pînă la o limită, dincolo de care el rămîne constant. Inducția nu a putut fi obținută cu acizi nucleici extrași din splinele animalelor neimune. Specificitatea tipului de anticorpi produși de către celulele de splină convertite este dovedită de faptul că în placa Jerne nu apar plaje de hemoliză, dacă în loc de hematii de oaie se utilizează hematii de om sau de șobolan.

Într-o altă serie de experiențe, Mosier și Cohen (1968) au incubat de data aceasta celule *neimune* de splină sau de exsudat peritoneal cu hematii de oaie. După incubare, timp de 30 minute la 37°C, se extrage ARN și acesta este pus în contact cu celule neimune de splină sau de exsudat peritoneal de șoarece. Prin tehnica Jerne se constată că indiferent dacă ARN provine din celule de splină sau de exsudat peritoneal, acesta induce în celulele neimune (respectiv de splină sau de exsudat peritoneal) sinteza de hemolizine.

Efectul biologic nu este observat în cazul în care ARN este tratat cu RN-ază sau cînd celulele neimune sînt puse în contact cu ARN extras de la celule neimune care nu au venit în contact cu antigenul. Din experiențele autorilor citați rezultă că, în cursul celor 30 minute în care timp celulele de splină sau de exsudat peritoneal au venit în contact cu antigenul, ARN-ul acestor celule dobîndește o

capacitate biologică nouă, de a converti celule neimune la sinteza de anticorpi.

Experiențe similare care folosesc același model experimental au fost realizate de Abramoff și Brein (1968). Avantajul acestor experiențe rezidă în faptul că formarea anticorpilor este urmărită un timp mai îndelungat (3—5 zile) în culturi de celule.

Acești autori au extras cu fenol ARN din splina de pui imunizați cu hematii de oaie. Acest ARN este inoculat în culturi de celule de splină neimună; după diferite intervale de timp se pun în evidență anticorpi hemolitici prin tehnica Jerne. Încă din primele 3—6 ore, după inocularea ARN se constată un număr de centre formatoare de plaje (CFP) semnificativ mai mare decât în plăcile de control (celule de splină care nu au fost puse în contact cu ARN). Numărul celulelor convertite la sinteza de anticorpi crește treptat pînă la 72 de ore, după care începe să scadă. Autorii subliniază existența unui raport optim între cantitatea de ARN inoculată și numărul de celule splenice din sistem.

Atît cantitățile mai mici, cît și cantitățile ce depășesc acest prag determină o scădere a numărului de celule formatoare de hemolizine. În experiențele citate, tratarea ARN cu RN-ază de pancreas bovin nu determină o abolire a răspunsului, ci numai o întîrziere a apariției lui, precum și o reducere a intensității sale. Acest rezultat contrazice în aparență datele comunicate de Cohen, după care tratarea ARN „imun” cu RN-ază duce la distrugerea efectului de conversie a celulelor de splină în celule formatoare de anticorpi. Totuși, în experiențele sale, Cohen a urmărit formarea plajelor de hemoliză pentru un timp mult mai scurt (2—3 ore), moment la care, într-adevăr, nu se observă diferențe notabile față de martor. În schimb, tratarea ARN imun extras din splină de pui cu un ser de pui hiperimun antihematie de oaie inhibă complet conversia celulelor neimune. Mai mult decât atît, după incubarea cu ARN imun, titrul serului de pui antihematie de oaie scade.

Datele prezentate arată că cel puțin în experiențele lui Abramoff și Brein (1968) conversia celulelor de splină neimune în celule formatoare de hemolizine se datorește în primul rînd unui rest antigenic degradat, asociat la ARN.

Este de notat faptul că acest rest antigenic este mult potențat în ce privește calitățile sale imunogene de prezența ARN, dat fiind că în preparatele folosite de acești autori la 100  $\mu$ g ARN se detectează numai 4—6  $\mu$ g proteină.

În ce privește izotipul imunoglobulinelor sintetizate în sistemele experimentale în care celulele de splină neimune sînt convertite la sinteza de anticorpi prin ARN extras din splină, lucrările lui Cohen (1967) sau cele ale lui Abramoff și Brein (1968) nu fac nici o mențiune specială. În schimb, există anumite informații cu privire la aceasta, provenite din lucrările lui Herscovitz și Stelos (citați după Fishman, 1969).

Acești autori au pus în evidență sinteza de anticorpi, în culturi de fragmente de splină neimună, după expunerea lor la ARN extras din spline imune sau din macrofage neimune care au captat bacteriofag. Un fapt deosebit de interesant semnalat de acești autori este acela că anticorpii sintetizați după contactul cu un anumit tip de ARN diferă în ce privește sensibilitatea lor la mercaptoetanol. Astfel, ARN extras din macrofage peritoneale induce sinteza unor anticorpi rezistenți și a altor anticorpi sensibili la mercaptoetanol, deci respectiv de tip 7 S și 19 S.

În schimb, ARN extras din spline imune induce sinteza unor anticorpi exclusiv rezistenți la mercaptoetanol, deci de tip 7 S.

Bell și Dray (1969) extrag ARN din ganglionii limfatici ai iepurilor imunizați cu hematii de oaie. Aceste preparate de ARN convertesc celulele de splină provenite de la animale neimune în celule activ producătoare de hemolizine specifice, puse în evidență prin tehnica hemolizei în gel (Jerne). ARN extras de la animale normale sau imunizate cu hematii de gîscă sau de iepure nu induce formarea de hemolizine antioaie. Centrele formatoare de plaje de hemoliză dispar după încorporarea de 2-mercaptoetanol în plăci, de unde concluzia că anticorpii induși de către ARN imunogen sînt de tip 19 S (IgM).

Capacitatea biologică a ARN este distrusă după tratare cu RN-ază dar nu cu DN-ază sau tripsină.

Dacă iepurii imuni donatori de ARN au un alotip diferit de iepurii de la care provin celulele convertite la sinteza de hemolizine, se constată că anticorpii IgM induși au un alotip similar cu cel al donatorului de ARN și *nu* cu cel caracteristic celulelor splenice convertite, de unde concluzia autorilor că acest ARN poartă în secvența nucleotidelor sale nu numai informația referitoare la antigen, ci și informația referitoare la alotipul anticorpilor, pe care îl impune celulei convertite.

Într-o serie de lucrări, Ghyka și colab. (1969 a, b) au constatat că acizii nucleici (ARN și ADN) izolați din splinele șoarecilor imuni-

zați anti-*Bordetella pertussis* reușesc să inducă și *in vivo*, prin inoculare la șoareci neimuni, sinteza de aglutinine antipertussis. Rezultatele au arătat că nivelul aglutininelor antipertussis crește odată cu cantitatea de acizi nucleici inoculată pînă la un platou, dincolo de care cantități mai mari de acizi nucleici nu mai determină nici un efect. Reinocularea unei noi doze de nucleoproteină la trei săptămîni după prima stimulare induce din nou o creștere a titrului aglutinant antipertussis, dar acest titru nu este semnificativ mai înalt decît cel constatat după prima inoculare, cum ar fi de așteptat în cazul unui răspuns imun secundar tipic, indus de resturile antigenice eventual complexate la acizii nucleici.

Rezultă că preparatele de acizi nucleici induc în celulele imunologice competente de fiecare dată „din nou” sinteza de aglutinine, după care clonele respective nu mai păstrează nici o „memorie” imunologică a stimulului anterior.

Mitsuhashi și colab. (1968), Kawakami și colab. (1969 a, b), Kurashige și colab. (1970) au studiat un model experimental în care ARN extras din splina cobailor imunizați cu anatoxină difterică induce sinteza de anticorpi specifici antitoxină difterică, după inocularea la cobai neimuni. Concluzia acestor autori este că preparatele de ARN biologic active din experiențele lor sînt lipsite de resturi antigenice, deci informația antigenică ar fi purtată de însăși structura macromoleculei de ARN.

În esență, cercetătorii japonezi își sprijină afirmațiile lor pe cîteva probe, dintre care enumerăm pe scurt :

a) Faptul că efectul de inducție a biosintezei de anticorpi este distrus prin tratarea cu RN-ază a ARN extras din splina animalelor imunizate. Enzimele proteolitice nu distrug această capacitate biologică.

b) Faptul că reinocularea acestor preparate de ARN nu determină la animale o creștere semnificativă a titrului anticorpilor induși, în raport cu titrul înregistrat după prima inoculare de ARN, așa cum ar fi de așteptat în cazul în care resturi de proteină antigenică, complexate la ARN, ar fi determinat sinteza anticorpilor printr-un răspuns imun primar.

c) Se imunizează un animal B cu hematii extrase dintr-un animal A, de aceeași specie, dar genetic diferit de B. Dacă se inoculează ARN extras din splina animalului hiperimunizat B, la animalele A, se constată la acestea din urmă sinteza unor auto-anticorpi anti-hematii. Situația respectivă exclude în bună măsură posibilitatea ca

resturi din hematiile A, care ar contamina ARN extras din splina imună B, să se comporte ca antigene după inocularea la animalul A, dat fiind că ele nu pot avea calitate antigenică în raport cu organismul care le-ar recunoaște drept compuși proprii.

În concluzie, reținem că splina sau ganglionii limfatici reprezintă un conglomerat de celule foarte diverse în care, deși predomină seria limfoplasmocitară, apar totuși și multe alte tipuri celulare având roluri variate în imunitate.

Tocmai de aceea, experiențele citate ridică două modalități de interpretare diferite :

— ARN biologic activ provine în întregime din macrofage și în acest caz avînd atașate resturi antigenice, după cum demonstrează Abramoff și Brein (1968), el transferă de la macrofagul donator la celula imunologic competentă a animalului primitor informația antigenică necesară sintezei de anticorpi printr-o modalitate comentată anterior, sau

— ARN biologic activ provine din limfocitele imune ale donatorului.

În acest ultim caz se ridică întrebarea dacă este posibil un proces de „transformare” a celulei neimune producătoare de anticorpi într-o celulă imună prin ARN. Și dacă este așa, acizii nucleici „imuni”, care realizează această conversie, poartă ei oare codificată în secvența nucleotidelor lor informația antigenică ? Sau, dimpotrivă, acționează nespecific avînd atașați la ei un fragment de antigen a cărui imunogenitate crește mult prin complexarea la acizii nucleici ?

Diversi autori, printre care Kurashige și Mitsuhashi (1972), consideră că într-adevăr ARN extras din celulele imunologic competente poartă o informație relativă la specificitatea de antigen codificată în secvența nucleotidelor sale.

Acești autori comunică faptul că ARN izolat din splinele șoarecilor imunizați cu flageli de *Salmonella* stimulează la șoarecii neimunizați celulele de memorie imunologică în așa fel, încît inocularea ulterioară a acestor animale cu antigen flagelar induce un răspuns secundar tipic.

Actinomicina D inhibă capacitatea acestor preparate de ARN de a stimula memoria imunologică, de unde concluzia autorilor că ARN imun este funcțional ca atare în lipsa oricăror resturi antigenice și, de asemenea, că el este capabil de a se autoreplica activ în celulele primitoare.

Cei mai mulți cercetători contestă însă acest punct de vedere.

După Mitchison (1971 a, b), cooperarea dintre celulele H și celulele AFP nu pare a implica un transfer de informație. În schimb, cercetări recente au arătat că polinucleotidele sintetice sau naturale în asocieră cu antigenul specific joacă un rol în procesul de cooperare dintre celulele B și T.

Astfel, Mozes și colab. (citați după Diamantstein și colab., 1971 a, b, c) au arătat că un defect genetic controlat în sinteza anticorpilor, localizat la nivelul celulelor B, poate fi corectat de un polinucleotid sintetic.

Diamantstein și colab. (1971, a, b, c) au dovedit că polianionii în general și deci implicit acizii nucleici au un efect adjuvant dacă se administrează la animalele imunizate, odată cu antigenul respectiv. În experiențele acestor cercetători, șoareci adulți timentomizați sînt iradiați cu doze care distrug integral populația de celule limfoplasmatice. După 4 ore de la iradiere, animalele primesc celule de măduvă singeneică (celule B), iar după două săptămîni sînt imunizate cu hematii de oaie ca atare sau asociate cu polianioni (dextran, sulfat, acid poliacrilic).

Se constată că șoarecii care au primit antigenul odată cu polianionii produc anticorpi antihematiei de tip IgM și IgG, în timp ce animalele ce au primit exclusiv hematii nu pot forma anticorpi.

În concluzie, polianionii și deci acizii nucleici sînt capabili să înlocuiască funcția celulelor ajutătoare din seria T.

Mecanismul acestui efect este încă necunoscut. După Diamantstein și colab., el s-ar putea explica în felul următor :

— fie că celulele T produc și eliberează un factor (polianionic?) ce acționează în cursul cooperării celulare asupra celulelor B și care este înlocuit la șoarecii lipsiți de celule T prin acizii nucleici exogeni, administrați odată cu antigenul ;

— fie că polianionii pot induce diferențierea și/sau proliferarea unui tip deosebit de celule prezente printre celulele măduvei, a căror acțiune poate înlocui funcția ajutătoare a celulelor T.

Indiferent de mecanismul de acțiune postulat, rezultă că acizii nucleici au în orice caz un efect nespecific, corelat cu calitatea lor de polianioni, care se manifestă prin potențarea puternică a imunogenității antigenului administrat.

Acest efect se exercită prin intensificarea cooperării dintre celulele T și B sau, eventual, prin suplinirea efectului ajutător al celulelor T în activarea celulelor B.



## BIBLIOGRAFIE

- ABRAMOFF P., BREIN N., 1968, *J. Immunol.*, **100**, 1210.
- ADLER F.L., FISHMAN M., DRAY S., 1966, *J. Immunol.*, **97**, 554.
- ANDERSON J., MÖLLER G., SJÖBERG O., 1972, *Eur. J. Immunol.*, **2**, 99.]
- ASKONAS B.A., RHODES J.M., 1964, *Proceedings Symposium Molecular and Cellular Basis of Antibody Formation*, Praga, p. 503.
- ASKONAS B.A., RHODES J.M., 1965, *Nature*, **205**, 470.
- BELL CL., DRAY S., 1969, *J. Immunol.*, **103**, 1196.
- BRAUN W., 1964, *Proceedings Symposium Molecular and Cellular Basis of Antibody Formation*, Praga, p. 525.
- BRAUN W., NAKANO M., 1967, *Science*, **157**, 819.
- BRAUN W., NAKANO M., JARASKOVA L., YAJIMA Y., JIMENEZ L., 1968, in *The nucleic Acids in Immunology*, sub red. O.J. PLESCIA și W. BRAUN, Springer Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, p. 347.
- BRITTON S., MITCHISON N.A., RAJEWSKI K., 1971, *Eur. J. Immunol.*, **1**, 65.
- BUSSARD A.E., 1966, *Science*, **153**, 887.
- BUSSARD A.E., LURIE M., 1967, *J. exp. Med.*, **125**, 873.
- BUSSARD A.E., 1967, *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, **32**, 465.
- BYERS V.S., SECARZ E.E., 1968, *J. exp. Med.*, **128**, 715.
- COHEN E.P., 1967, *Nature* **213**, 462.
- DIAMANTSTEIN T., WAGNER B., BEYSE J., ODENWALD M., SCHULTZ G., 1971a, *Europ. J. Immunol.*, **1**, 335.
- DIAMANTSTEIN T., WAGNER B., BEYSE J., ODENWALD M., SCHULTZ G., 1971 b, *Europ. J. Immunol.*, **1**, 340.
- DIAMANTSTEIN T., WAGNER B., L'AGE-STEHR J., BEYSE [J., ODENWALD M., SCHULTZ G., 1971 c, *Europ. J. Immunol.*, **1**, 302.
- DUTTON R.W., MISHILL R.I., 1967, *J. exp. Med.*, **126**, 443.
- FISHMAN L.M., ADLER F.L., 1963, *Immunopathology IIIrd International Symposium*, La Jolla, California, Schwabe and Co., Publishers, Basel, p. 79.
- FISHMAN L.M., ADLER F.L., 1967, *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, **32**, 343.
- FISHMAN M., 1969, *Annu. Rev. Microbiol.*, **23**, 199.
- GARVEY J.S., CAMPBELL D.H., 1957, *J. exp. Med.*, **105**, 361.
- GHYKA GR., DAVID C., ANGHEL-DUMITRESCU CL., 1969 a, *Rev. roum. Biochim.*, **6**, 213.
- GHYKA GR., ANGHEL-DUMITRESCU CL., DAVID C., 1969 b, *Arch. roum. Path. exp. Microbiol.*, **28**, 445.
- GOTTLIEB A.A., GLISIN V.R., DOTY P., 1967, *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.*, **57**, 1849.
- GOTTLIEB A.A., 1968, in *The nucleic Acids in Immunology*, sub red. O.J. PLESCIA și W. BRAUN, Springer Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, p. 471.
- GOTTLIEB A.A., 1969, *Science*, **165**, 595.

- JERNE N.K., 1963, *Science*, **140**, 405.
- JERNE N.K., 1971, *Europ. J. Immunol.*, **1**, 1.
- KAWAKAMI M., KITAMURA K., MIKAMI H., MITSUHASHI S., 1969, a, *Jap. J. Microbiol.*, **13**, 9.
- KAWAKAMI M., KITAMURA K., MIKAMI H., MITSUHASHI S., 1969 b, *Jap. J. Microbiol.*, **13**, 247.
- KÖLSCH E., MITCHISON N.A., 1968, *J. exp. Med.*, **128**, 1059.
- KURASHIGE S., KITAMURA K., AKAMA K., MITSUHASHI S., 1970, *Jap. J. Microbiol.*, **14**, 41.
- KURASHIGE S., MITSUHASHI S., 1972, *J. Immunol.*, **108**, 1034.
- MISHELL R.I., DUTTON R.W., 1967, *J. exp. Med.*, **126**, 423.
- MITCHISON N.A., 1971 a, *Eur. J. Immunol.*, **1**, 10.
- MITCHISON N.A., 1971 b, *Eur. J. Immunol.*, **1**, 18.
- MITCHISON N.A., 1971 c, *Eur. J. Immunol.*, **1**, 68.
- MITSUHASHI S., KURASHIGE S., KAWAKAMI M., NOJIMA T., 1968, *Jap. J. Immunol.*, **12**, 261.
- MOORE R.D., SCHOENBERG M.D., 1968, *Nature*, **219**, 297.
- MOSIER D.E., 1967, *Science*, **158**, 1573.
- MOSIER D.E., COHEN E.P., 1968, *Nature*, **219**, 969.
- PINCHUCK P., FISHMAN M., ADLER F.L., MAURER P.H., 1968, *Science*, **160**, 194.
- RAFF M.C., OWEN J.J.T., 1971, *Eur. J. Immunol.*, **1**, 27.
- ROELANTS G.E., GOODMAN J.W., 1968, *Biochemistry*, **7**, 1432.
- ROELANTS G.E., GOODMAN J.W., 1969, *J. exp. Med.*, **130**, 557.
- ROELANTS G.E., GOODMAN J.W., McDEVITT H.O., 1971, *J. Immunol.*, **106**, 1222.
- ROELANTS G.E., ASKONAS B.A., 1971, *Eur. J. Immunol.*, **2**, 151.
- ROITT I.M., TORRIGIANI G., GREAVES M.F., BROSTOFF J., PLAYFAIR J.H.L. 1969, *Lancet*, **7616**, 367.
- SHEARER G.M., MOZES E., SELA M., 1971, in *Progress in Immunology*, sub red. B. AMOS, Acad. Press, New York, p. 509.
- SJÖBERG O., ANDERSON J., MÖLLER G., 1972, *Eur. J. Immunol.*, **2**, 326.
- STERZL J., SILVERSTEIN A.M., 1967, in *Advances in Immunology*, sub red. F. DIXON și J.H. HUMPHREY, Acad. Press, New York — Londra, vol. VI, p. 429.
- SULICA A., GHYKA GR., GHEȚIE V., 1968, *Rev. roum. Biochim.*, **5**, 145.
- UNANUE E.R., ASKONAS B.A., 1967, *J. Ret. Endoth. Soc.*, **4**, 440.
- UNANUE E.R., ASKONAS B.A., 1968, *J. exp. Med.*, **127**, 915.
- UNANUE E.R., CEROTTINI J., 1970 a, *Sem. in Hematol.*, **7**, 225.
- UNANUE E.R., CEROTTINI J., 1970 b, *J. exp. Med.*, **131**, 711.

## IV

## Controlul genetic al reactivității imune față de diferite antigene

De mult se cunoaște variabilitatea extraordinară a speciilor animale în răspunsul lor imun față de un antigen dat.

Numeroase date demonstrează că răspunsul imun al unui anumit animal se găsește sub control genetic. Astfel, Scheibel (1943) a constatat existența unor linii de cobai, dintre care unele răspund prin sinteză de anticorpi la anatoxina difterică, în timp ce alte linii nu răspund.

De asemenea s-a constatat că în cazul încrucișării întâmplătoare (spontane) de animale de experiență apar indivizi care răspund la inocularea unui antigen prin sinteză de anticorpi și indivizi care nu răspund prin sinteză de anticorpi. Astfel, printre șoarecii crescuți la întâmplare s-au observat diferențe transmisibile genetic în ce privește răspunsul lor la albumina serică bovină (Sobey și colab., 1966). Alte cercetări făcute pe cobai au arătat că există tulpini imunologic reactive (responders) față de un anumit determinant antigenic al moleculei de insulină, pe când alte tulpini nu reacționează prin formare de anticorpi (nonresponders) (Arquilla și Finn, 1963, 1965).

Studiile făcute cu substanțe imunogene (cum ar fi, de exemplu, polipeptidele sintetice conjugate cu haptene, cu o structură simplă bine definită) au dat posibilitatea de a urmări felul în care factorii genetici controlează capacitatea unui animal de a recunoaște ca antigen o anumită moleculă și de a reacționa față de aceasta prin sinteza de anticorpi specifici (Sela și colab., 1962, Maurer, 1963).

Calitatea de a produce anticorpi specifici față de aceste molecule simple se constată a fi transmisă de o genă autosomală dominantă, în timp ce producerea de anticorpi față de antigenele complexe se dovedește a fi controlată de mai multe gene și deci se comportă ca un caracter plurifactorial. Aceste gene au fost denumite gene Ir (de la forma engleză „immune response”).

S-a constatat că animalele ce posedă o anumită genă Ir reacționează intens față de un anumit antigen dat, atît prin producere de

anticorpi, cât și prin reacții celulare și invers, animalele lipsite de aceste gene nu răspund nici prin sinteză de anticorpi și nici prin reacții celulare față de aceste antigene.

În general, reactivitatea imunologică a fost investigată utilizând trei categorii de antigene :

I) polipeptide sintetice cu un număr limitat de aminoacizi identici sau diferiți, eventual cuplate cu haptene, cum ar fi gruparea dinitrofenil (DNP) ;

II) antigene native slabe, înțelegînd prin aceasta molecule proteice care diferă puțin de proteinele similare ale animalului imunizat ;

III) proteine native, puternic antigenice, utilizate însă în doze mici, care permiteau deosebirea dintre un animal imunologic reactiv și unul nereactiv.

Drept urmare s-au identificat o serie de gene ce controlează răspunsul imun față de diferite antigene, la două specii animale intens investigate, cobaiul și șoarecele. De asemenea, în aceste modele experimentale s-au putut stabili relațiile dintre genele Ir și cele care controlează locusurile de histocompatibilitate, precum și tipul celulelor imunologic competente la nivelul cărora se exprimă fenotipic aceste gene (Benacerraf și McDevitt, 1972).

I. În ce privește prima categorie de antigene, numeroase cercetări au căutat să stabilească care este minimul de proprietăți necesare pentru a înzestra o moleculă cu capacitatea de a provoca sinteza de anticorpi la un animal. S-a urmărit astfel rolul pe care îl joacă forma și mărimea moleculei sau locul fiecărui aminoacid în moleculă.

S-a observat că tirozina este un aminoacid important pentru imunogenitatea moleculei. De asemenea, că determinantul antigenic urmărit trebuie să fie situat direct pe suprafața moleculei și să nu fie ascuns printre înfășurările lanțului polipeptid.

În general se constată că forma generală a moleculei nu pare a fi un factor de importanță majoră în determinarea imunogenității. Aceasta pentru că atât polimerii liniari, cât și cei ramificați pot fi deopotrivă imunogeni.

În schimb, anumite caractere structurale ale moleculei au un rol important în calitatea imunogenă a macromoleculelor proteice. Astfel, de exemplu, în timp ce homopolimerii unui anumit aminoacid nu sînt antigenici pentru șoarece, iepure, cobai, sau om, copolimerii alcătuiți din două feluri de aminoacizi, GL (acid glutamic și lizină) sau GA (acid glutamic și arginină), nu sînt antigenici la șoarece,

dar sînt buni imunogeni pentru unele tulpini de iepure sau de cobai (Maurer 1963; Levine și Benacerraf, 1965).

Spre deosebire de acesta, copolimerii formați din trei feluri de aminoacizi sînt excelenți imunogeni și pentru șoarece.

Pentru a studia răspunsul imun la polimeri sintetici s-au folosit linii consangvine de șoareci. Astfel, șoarecii liniilor A, C<sub>57</sub>BL/6, B<sub>6</sub>AF<sub>1</sub>, C<sub>3</sub>H/He, BALB/c, în urma inoculării cu polipeptide sintetice formate din două feluri de aminoacizi, nu răspund prin formare de anticorpi, dar răspund foarte bine la copolimeri care conțin, de exemplu, glutamil-lizina și 5% molecule de alanină (Glu<sub>57</sub> Lis<sub>38</sub> Ala<sub>5</sub> sau prescurtat GLA<sub>5</sub>).

Spre deosebire de aceștia șoarecii liniilor C<sub>57</sub>B<sub>1</sub>A/Jax, CBA nu răspund nici la aceste polipeptide formate din trei feluri de aminoacizi (Pinchuck și Maurer, 1965 a, b). Prezența anticorpilor a fost pusă în evidență prin reacția de hemaglutinare pasivă.

Prin încrucișarea liniilor reactive cu cele nereactive la GLA<sub>5</sub>, s-a constatat că gena ce controlează răspunsul imun față de GLA<sub>5</sub> este autosomală și dominantă. Mai recent s-a studiat reactivitatea șoarecilor față de un alt terpolimer format din acid L-glutamic, L-alanină și 10% L-tirozină (GAT<sub>10</sub>). Și răspunsul imun față de GAT<sub>10</sub> este controlat de o genă dominantă autosomală.

McDevitt și Sela (1965) au cercetat răspunsul diverselor linii de șoareci la un antigen polipeptid sintetic format dintr-un schelet de poli-L-lizina ce poartă lanțuri laterale de poli-DL-alanină (prescurtat A-L). Acest polimer nu se comportă ca antigen prin inoculare la șoareci, dar determină formarea anticorpilor, deci devine imunogen dacă la extremitățile lanțurilor laterale i se adaugă secvențe scurte aleatoare cu tirozină și acid glutamic (prescurtat (T, G) — A — L).

Imunogenitatea este menținută dacă în locul tirozinei în acest polipeptid se introduce histidină (H, G) — A — L sau fenil-alanină (Phe, G) — A — L. Imunizarea cu (T, G) — A — L în adjuvant Freund dă însă răspunsuri diferite la diverse tulpini de șoareci. Astfel, șoarecii liniei CBA dau un răspuns foarte slab în anticorpi, pe cînd șoarecii liniei C<sub>57</sub>BL/6 dau un răspuns foarte puternic.

Generația F<sub>1</sub> rezultată din încrucișarea celor două tulpini oferă un răspuns de intensitate intermediară. Din încrucișarea reversă F<sub>1</sub> × CBA, 50% din descendenți vor reacționa la (T, G) — A — L în tocmai ca și F<sub>1</sub>, iar 50% vor fi slab reactivi ca și linia CBA.

Încrucișarea reversă dintre indivizii F<sub>1</sub> și linia parentală C<sub>57</sub>BL/6 determină indivizi dintre care 50% au un fenotip F<sub>1</sub>, iar 50% răs-

pund puternic ca și linia C<sub>57</sub>BL/6 la antigen. Rezultă deci că diferența cantitativă în capacitatea de răspuns prin sinteză de anticorpi la polipeptidul (T,G)—A—L, este controlată de o singură genă autosomală, alela reactivă fiind dominantă.

Dacă tirozina din polipeptidul (T, G)—A—L este înlocuită cu histidina, se constată că răspunsul liniilor consangvine de șoareci la acest antigen este total diferit de răspunsul la (T, G)—A—L. După cum se vede în tabelul nr. 9, linia C<sub>57</sub>BL/6 răspunde intens față de antigenul (T,G)—A—L, în timp ce linia CBA răspunde slab sau nu răspunde deloc.

Tabelul nr. 9

Procentul de șoareci din diferite linii pure ce produc anticorpi față de două polipeptide antigenice

Polipeptid	Tulpina de șoareci	
	CBA	C <sub>57</sub> BL/6
(T,G)—A—L	10—30	80—100
(H,G)—A—L	10—40	0

Spre deosebire de aceasta, față de polipeptidul (H, G)—A—L linia C<sub>57</sub>BL/6 nu reacționează deloc, în timp ce, proporțional, linia CBA este considerată reactivă. De aici, concluzia că diferența genetică dintre aceste două linii consangvine se reduce la controlul sintezei de anticorpi față de un singur determinant antigenic din tot polipeptidul considerat. Acest determinant antigenic este limitat la diferența tirozină-histidină.

Rezultă că reactivitatea imunologică a șoarecilor față de antigenele ramificate (T,G)—A—L, (H,G)—A—L sau (Phe, G)—A—L este controlată de gene dominante autosomale, situate într-un locus denumit Ir—1, diferit de locusul GLA<sub>5</sub> sau GAT<sub>10</sub>.

Nu se știe încă dacă locusul Ir—1 reprezintă o singură genă cu multiple alele sau dacă acest locus este format din trei gene strâns legate, deși această ultimă alternativă este cea mai plauzibilă. Genele locusului Ir—1 controlează fenotipic un caracter *cantitativ*, respectiv intensitatea răspunsului imun față de aceste antigene, spre deosebire de gena GAT<sub>10</sub> care controlează un răspuns imun de tip *tot sau nimic* (McDevitt și colab., 1971; Benacerraf și McDevitt, 1972).

Cercetările au arătat că reactivitatea imunologică nu este corelată nici cu izotipul anticorpilor anti (T,G)-A-L și nici cu alo-tipul lor (O.M.S., 1968).

Gena care controlează reactivitatea imunologică față de (T,G)-A-L și (H,G)-A-L, deci gena Ir-1, este situată chiar în locusul principal de histocompatibilitate, H-2, al șoarecilor, deci este amplasată pe cromozomul 9 (McDevitt și colab., 1971). Șoarecii de tipul H-2<sup>b</sup> (linia C<sub>57</sub>) răspund bine la (T,G)-A-L și foarte slab la (H,G)-A-L, în timp ce tulpinile cu tipul H-2<sup>k</sup> (linia CBA) răspund slab la (T,G)-A-L (McDevitt și Chinitz, 1969). Studiile de cartografiere genetică au arătat că singurii recombinanți dintre regiunea H-2 și gena Ir-1 sînt în realitate rezultați din crossing-overuri produse în interiorul regiunii H-2, între segmentul stîng „D” al acestei regiuni și segmentul drept „K” al aceleiași regiuni (Benacerraf și McDevitt, 1972).

Răspunsul față de GAT<sub>10</sub> este de asemenea legat de acest locus de histocompatibilitate, șoarecii H-2<sup>a</sup>, H-2<sup>b</sup>, H-2<sup>d</sup> și H-2<sup>k</sup> fiind puternic reactivi față de acest antigen (Martin și colab., 1971).

Interesant este faptul că nu toate genele ce controlează reactivitatea imunologică sînt amplasate în sau aproape de locusul H-2. Astfel, gena care controlează răspunsul imun al șoarecilor la un antigen sintetic foarte asemănător cu (T, G)-A-L, în care însă alanina a fost înlocuită cu prolina, sau pe scurt (T,G)-Pro-L nu este legată de locusul de histocompatibilitate H-2 (McDevitt și Benacerraf, citați după Braley și Freeman, 1971).

Și la cobai s-a constatat existența unui control genetic asupra reactivității imunologice față de antigene polipeptide sintetice. Cobaii liniei Hartley crescuți la întîmplare, inoculați cu un conjugat 2,4-dinitro-fenil-poli-L-lizină (2,4-DNP-PLL) împreună cu adjuvant Freund, recunosc acest conjugat ca antigen într-o proporție de aproximativ 35% (Kantor și colab., 1963; Pinchuck și Maurer, 1965 a, b; Maurer și Pinchuck, 1968). Animalele care reacționează față de acest antigen produc anticorpi antihaptenă (2,4-DNP) și prezintă și fenomene cutanate de hipersensibilitate întîrziată față de DNP-PLL sau numai față de PLL, deși în acest ultim caz reacțiile cutanate sînt mult mai reduse (Levine și colab., 1968). Printre cobaii liniei Hartley crescuți la întîmplare, 65-75% din indivizi nu prezintă hipersensibilitate întîrziată la DNP-PLL și nici nu produc anticorpi față de haptenă. Prin selecție s-au izolat două linii consangvine diferite, dintre care tulpina 2 s-a arătat a fi 100% reactivă, pe cînd tulpina 13 este 100% nereactivă imunologic (Levine, 1964 a,b).

S-a observat că părinții nereactivi dau în 100 % din cazuri urmași nereactivi, iar prin încrucișarea părinților imunologic reactivi între ei apar aproximativ 80 % descendenți reactivi. Se consideră ca heterozigoți cobaii care dau cel puțin un urmaș nereactiv. Caracterul genetic nu este legat de sex. Capacitatea de a răspunde imunologic față de conjugatele DNP—PLL la cobai s-a dovedit a fi controlată genetic de un singur factor mendelian dominant autosomal (Levine și Benacerraf, 1964 ; Levine și colab., 1968). Pentru a confirma această afirmație s-au studiat urmașii împerecherilor reverse între cobai reactivi heterozigoți și cobai imunologic nereactivi. S-a constatat într-adevăr apariția unor descendenți, dintre care aproximativ 50 % sînt reactivi, iar 50 % nu reacționează la DNP—PLL. Gena autosomală dominantă ce controlează răspunsul imun față de DNP—PLL este denumită gena PLL (Levine și colab., 1968). Ea este situată foarte aproape de locusul major de histocompatibilitate al cobaiului (Sela, 1971).

Expresia fenotipică a acestei gene controlează sinteza anticorpilor specifici față de haptena cuplată numai la polipeptidul sintetic PLL, dat fiind că virtual 100 % din cobaii nereactivi pot răspunde la diverse haptene, cum ar fi DNP sau benzilpeniciloil (BPO) cuplate la un alt purtător proteic oarecare. Pe de altă parte, specificitatea PLL și nu a haptenei, în exprimarea răspunsului imun, controlat de gena discutată, reiese și mai limpede din următoarea experiență.

Cobai crescuți la întîmplare au fost inoculați cu un amestec în adjuvant de PLL conjugată cu una din haptenele structural diferite : DNP, BPO, 5-dimetilaminonaftalen sulfonil și p-toluen sulfonil. Cobaii reactivi au prezentat testul tegumentar și seric pozitiv la toate cele patru conjugate H—PLL, în timp ce cobaii nereactivi nu prezintă hipersensibilizare și nici nu produc anticorpi față de nici unul din cele 4 conjugate (Levine și colab., 1968). Gena PLL controlează răspunsul imun față de poli-L-lizină (PLL), poli-L-arginină (PLA), la copolimeri de acid glutamic și lizină (GL) și la conjugate ale acestor polipeptide cu haptene, cum ar fi DNP—PLL. Gena PLL apare la toți cobaii liniei 2 și lipsește la toți cobaii liniei 13.

O altă genă, denumită GA, ce apare la cobaii liniei 2 și nu la cei din linia 13, controlează răspunsul imun față de un copolimer liniar de acid L-glutamic și L-alanină ( $\text{Glu}_{60}\text{Ala}_{40}$ ).

În sfîrșit, gena GT controlează răspunsul la un copolimer format din acid L-glutamic și L-tirozină ( $\text{Glu}_{50}\text{Tir}_{50}$ ).



Spre deosebire de genele PLL și GA, gena GT apare la cobaii liniei 13 și nu la cei din linia 2. Genele ce controlează răspunsul imun la PLL, GA și GT nu se moștenesc independent. Astfel, genele PLL și GA apar strâns legate la cobaii tulpinii 2 sau la cei Hartley.

Faptul că un număr foarte redus din animalele acestor două linii răspund la PLL, dar nu la GA, reprezintă o dovadă a unui crossing-over între aceste gene și implicit argumentează neidentitatea lor.

La cobaii Hartley încrucișați întâmplător, gena GT segregă continuu de genele PLL și GA, ceea ce arată o relație de alelism sau de pseudoalelism între gena GT, pe de o parte, și genele PLL și GA, pe de altă parte.

Întocmai ca și la șoarece, genele PLL, GA și GT s-au dovedit a fi legate de locusul major de histocompatibilitate al cobaiului (Benacerraf și McDevitt, 1972).

II. În ce privește categoria antigenelor proteice native, slabe, s-a descoperit în ultimul timp că mai multe tipuri de răspuns imun sînt controlate la șoarece sau cobai de către gene Ir. Astfel, notăm după Benacerraf și McDevitt (1972):

— capacitatea anumitor tulpini de șoarece de a sintetiza anticorpi față de anumite antigene eritrocitare, Ea-1<sup>a</sup>, ale șoarecilor sălbatici;

— capacitatea femelelor din anumite tulpini de șoarece de a rejecta grefe de piele de mascul singeneic, deci de a recunoaște antigene de histocompatibilitate legate de cromozomul Y;

— capacitatea de a recunoaște și elabora un răspuns imun față de antigene de histocompatibilitate H2-2 sau H-13;

— capacitatea de a produce anticorpi față de determinanții alotipici ai anumitor proteine de mielom IgA;

— rejectia celulelor de măduvă osoasă de către primitori iradiați.

III. În ce privește răspunsul imun controlat genetic față de antigene proteice native, puternice, s-a cercetat efectul imunizant al unor doze mici de albumină umană sau bovină la diverse linii pure de cobai sau efectul ovalbuminei și a serumalbuminei bovine (SAB) la șoareci (Ellman și colab., 1971; Green și colab., 1972).

La cobai, gena ce controlează răspunsul imun la SAB (gena SAB<sub>1</sub>) este diferită de genele PLL și GA, fiind însă situată împreună cu aceste gene pe același cromozom (Benacerraf și colab., 1971).

Toate genele Ir implicate în controlul răspunsului imun la antigenele menționate sînt legate de locusurile de histocompatibi-

litate majore, H la cobai și H — 2 la șoarece, cu excepția genei ce controlează răspunsul șoarecilor la antigenele eritrocitare ale șoarecilor sălbatici, care este legată de locusul minor H — 3 sau de cel H — 6, și de gena care controlează răspunsul imun la antigenul H — 13, care este legată de locusul de histocompatibilitate H — 3.

Astfel, Vaz și Levine (1970) au constatat că răspunsul imun anti diferite haptene, cum ar fi benzilpeniciloil sau DNP cuplate la gammaglobulina bovină, este foarte intens la șoareci de tip H — 2<sup>a</sup> (tulpina A/He) și H — 2<sup>k</sup>, în timp ce la liniile de șoareci H — 2<sup>b</sup>, H — 2<sup>d</sup> sau H — 2<sup>q</sup> nu s-au detectat anticorpi antihaptenă.

Kölsch (citat după Sela, 1971) a arătat că, în schimb, gena ce controlează răspunsul imun al anumitor linii de șoarece față de bacteriofagul fd nu este legată de locusul H — 2.

Recent s-a investigat controlul genetic al răspunsului imun față de antigenele polizaharidice, cum ar fi cele de pneumococ sau streptococ. Genele Ir ce controlează reactivitatea imună față de carbohidrații streptococici A și C nu sînt legate de locusul de histocompatibilitate H — 2 (Eichmann, 1972). Braley și Freeman (1971) au arătat că și răspunsul imun față de polizaharidele pneumococice de tip III este genetic controlat la șoarece. Capacitatea de răspuns la aceste polizaharide apare mult mai intensă la liniile de șoareci consangvine BALB/c și C<sub>3</sub>H, spre deosebire de liniile C<sub>57</sub>BL/6, DBA/2 și BDF<sub>1</sub> care răspund mult mai slab.

Încrușișarea indivizilor din linii puternic reactive cu indivizi din linii slab reactive arată că în generația F<sub>1</sub> alela pentru reactivitate este dominantă asupra alelei nereactive.

Acest caracter genetic nu este controlat de un locus asociat cu locusul H — 2, dat fiind că tulpinile DBA/2 și BALB/c, care răspund diferit la antigenele de tip III, fac parte ambele din grupul de histocompatibilitate H — 2<sup>d</sup>.

Pe de altă parte, șoarecii cu antigene de histocompatibilitate diverse, de tip H — 2<sup>d</sup> sau H — 2<sup>k</sup>, răspund foarte intens sau, dimpotrivă, nu răspund deloc la aceste antigene.

**Expresia fenotipică a genelor Ir.** Capacitatea de a reacționa la (T,G) — A — L, poate fi transferată unei linii incapabile de a reacționa la acest antigen (de exemplu, linia C<sub>3</sub>H), prin transfer de celule splenice de la hibridi F<sub>1</sub>(C<sub>3</sub>H × C<sub>57</sub>BL/6) la indivizi C<sub>3</sub>H iradiați.

Această experiență arată că exprimarea fenotipică a genelor Ir se realizează direct la nivelul celulelor implicate în răspunsul imun

fie ele macrofage, fie celule limfoplasmocitare formatoare de anticorpi.

Inițial s-a crezut că macrofagele sînt celulele care determină incapacitatea anumitor linii de șoarece de a răspunde la un anumit antigen, ele neavînd enzimele necesare pentru a degrada antigenul în mod corespunzător.

Ulterior s-a văzut însă că nu macrofagele determină reactivitatea animalelor la un anumit antigen, deoarece degradarea complexelor haptenă-PLL de către macrofagele de cobai este întru totul identică atît *in vivo*, cît și *in vitro*, indiferent dacă aceste celule provin de la animale reactive sau nereactive.

S-a constatat că, *in vitro*, extractele de splină provenind de la indivizi reactivi și nereactivi degradează într-o măsură similară complexul haptenă-PLL și chiar rata cu care macrofagele înglobează prin pinocitoză acest conjugat este întru totul identică la cobaii reactivi și la cei nereactivi.

Rămînea deci logic ca expresia fenotipică a genelor Ir să se realizeze la nivelul celulelor imunologic competente din seriile limfoplasmocitare.

După cum s-a arătat, cobaii homozigoți pentru alela nereactivă a genei PLL, în urma inoculării de H-PLL (haptenă — poli-L-lizină), nu produc anticorpi și nu prezintă nici hipersensibilitatea față de acest compus. Totuși, în anumite condiții, DNP-PLL se poate comporta ca antigen și la aceste animale nereactive.

Astfel, cobaii genetic incapabili de a recunoaște antigenicitatea DNP-PLL pot forma anticorpi anti-DNP cînd sînt imunizați cu un complex format din DNP-PLL încărcată pozitiv, cuplată la albumină străină (serumalbumină bovină) încărcată negativ. În acest caz, apare un nivel înalt de anticorpi anti-DNP, deși animalele nu vor manifesta starea de hipersensibilitate întîrziată față de DNP-PLL care apare caracteristic la cobaii genetic reactivi (Paul și colab., 1966; Green și colab., 1967, 1968 a, b; Plescia și colab., 1968).

Rezultă că diverșii compuși administrați se comportă diferit în funcție de condiția genetică a animalelor imunizate.

În cazul cobailor reactivi, DNP reprezintă haptena care legată la purtător, respectiv la PLL, alcătuiește un complex imunogen. La cobaii nereactivi, acest compus nu este imunogen. El poate însă funcționa în întregime drept haptenă, de vreme ce prin legarea lui la un alt purtător, imunogen prin el însuși, în cazul de față SAB, complexul (DNP-PLL)SAB, determină sinteza de anticorpi

anti-DNP. Imunogenitatea acestui complex este condiționată de antigenicitatea serumalbuminei bovine (SAB), care reprezintă o proteină „străină” față de cobai, fapt dovedit prin constatarea că legarea DNP—PLL la polianioni neantigenici nu mai induce deloc sinteza de anticorpi anti-DNP.

O altă observație experimentală, care confirmă acest punct de vedere, este faptul că animalele nereactive, devenite tolerante pentru SAB, nu mai determină sinteza de anticorpi anti-DNP după imunizarea cu (DNP—PLL)SAB.

Green și colab., (1966 a, b) au arătat că, indiferent dacă animalele imunizate sînt reactive, sau nu, respectiv dacă imunogenul era reprezentat de DNP—PLL sau de (DNP—PLL)SAB, anticorpii anti-DNP au aceeași afinitate față de DNP și aceeași specificitate parțială pentru PLL. Acești anticorpi nu se pot lega la molecula de proteină, deci nu prezintă nici o specificitate anti-SAB (Levine, 1964 a, b). Aceste observații sînt înregistrate și confirmate de constatarea aceluiași autori (Levine și colab., 1968; Green și colab., 1968 a) că chiar la animalele nereactive la care purtătorul SAB este strict necesar pentru inducerea anticorpilor anti—DNP, anticorpii anti—DNP și anticorpii anti—SAB sînt întotdeauna sintetizați de celule separate.

Din cele expuse rezultă că un sistem de celule imunologic competente poate să răspundă prin sinteză de anticorpi față de un anumit compus, numai dacă îndeplinește două condiții diferite :

1) Recunoaște acest compus, drept „antigen” și ca urmare determină declanșarea (processing) reacției imune, față de acest antigen. Pentru a îndeplini această condiție, molecula imunogenă trebuie să aibă următoarele calități :

— să fie un compus „străin” (nonself) în raport cu sistemul de celule imunologic competente cu care vine în contact ;

— să aibă o anumită dimensiune moleculară, prag, în lipsa căreia, reacția imună nu poate fi declanșată.

Odată ce declanșarea răspunsului imun a avut loc, urmează îndeplinirea celei de-a doua condiții, și anume :

2) Inducerea sintezei de anticorpi specifici față de macromolecula antigenică.

În cazul experiențelor lui Green și colab. (1968 a) și ale lui Benacerraf și colab. (1967), cele două condiții se pot disocia în diferite circumstanțe, ca de exemplu :

— haptena (H) reprezintă un determinant antigenic care poate induce sinteza anticorpilor specifici, deci îndeplinește condiția 2, dar

singură nu îndeplinește condiția 1, adică nu poate activa răspunsul imun.

— complexul haptenă-purtător (H—P) îndeplinește în schimb ambele condiții, adică poate declanșa mai întâi reacția imună și induce apoi diferite tipuri de răspuns, cum ar fi hipersensibilitatea întârziată sau producerea de anticorpi.

Se observă însă că acest complex H—P are o valoare relativă în funcție de sistemul celular luat în considerare. Astfel, pe un fond genetic R (reactiv), care răspunde imunologic la PLL, complexul H—PLL determină producerea de anticorpi anti-haptenă; în schimb, pe un fond genetic N (nereactiv) care nu recunoaște PLL ca antigen, complexul H—PLL trebuie legat la SAB (antigenică de data aceasta pentru individul N), pentru a îndeplini condiția 1, deci pentru a declanșa răspunsul imun și, drept urmare, a induce sinteza de anticorpi anti-H (condiția 2).

Relativitatea acestui raport complex imunogen/sistem celular se rezumă la faptul că un complex imunogen nu poate fi definit ca atare decât în momentul în care măcar o componentă a acestui complex este antigenică *per se*, adică îndeplinește singură, în raport cu macroorganismul imunizat, cele două condiții enunțate.

Aceste constatări ar putea fi explicate în două moduri diferite.

Una și aceeași celulă îndeplinește singură ambele condiții. Cu alte cuvinte, o anumită celulă recunoaște complexul H—P drept un antigen (diferit de antigenul P), care reprezintă un compus nonspecific, cu o dimensiune moleculară suficientă pentru a declanșa răspunsul imun, și, ca urmare, *aceeași celulă* activată produce anticorpi specifici față de acest antigen H—P (fig. 12 a). Ar fi de așteptat, în acest caz, ca anticorpii anti-haptenă, deci anti-H, să aibă o specificitate ceva mai complexă, adică pe lângă specificitatea anti-H să posede și specificitate anti-purtător (anti-P) sau, cel puțin, anti o parte din macromolecula P, care spațial se găsește strâns apropiată de haptena H. Receptorul specific de pe suprafața celulei producătoare de anticorpi ar fi prin urmare un receptor anti-DNP și în plus anti-PLL la cobaii genetici reactivi (R) și anti-SAB la cobaii nereactivi (N), prezența acestui ultim receptor fiind strict necesară pentru declanșarea răspunsului imun în această celulă. Cu toate acestea, anticorpii anti-DNP, produși de cobaii nereactivi imunizați cu (DNP—PLL)SAB, sînt identici cu anticorpii produși de cobaii reactivi imunizați numai cu DNP—PLL și nu au nici o specificitate anti-SAB. Pe lângă aceasta, anticorpii anti-DNP sînt produși de celule diferite de celulele ce sintetizează anticorpi anti-SAB.

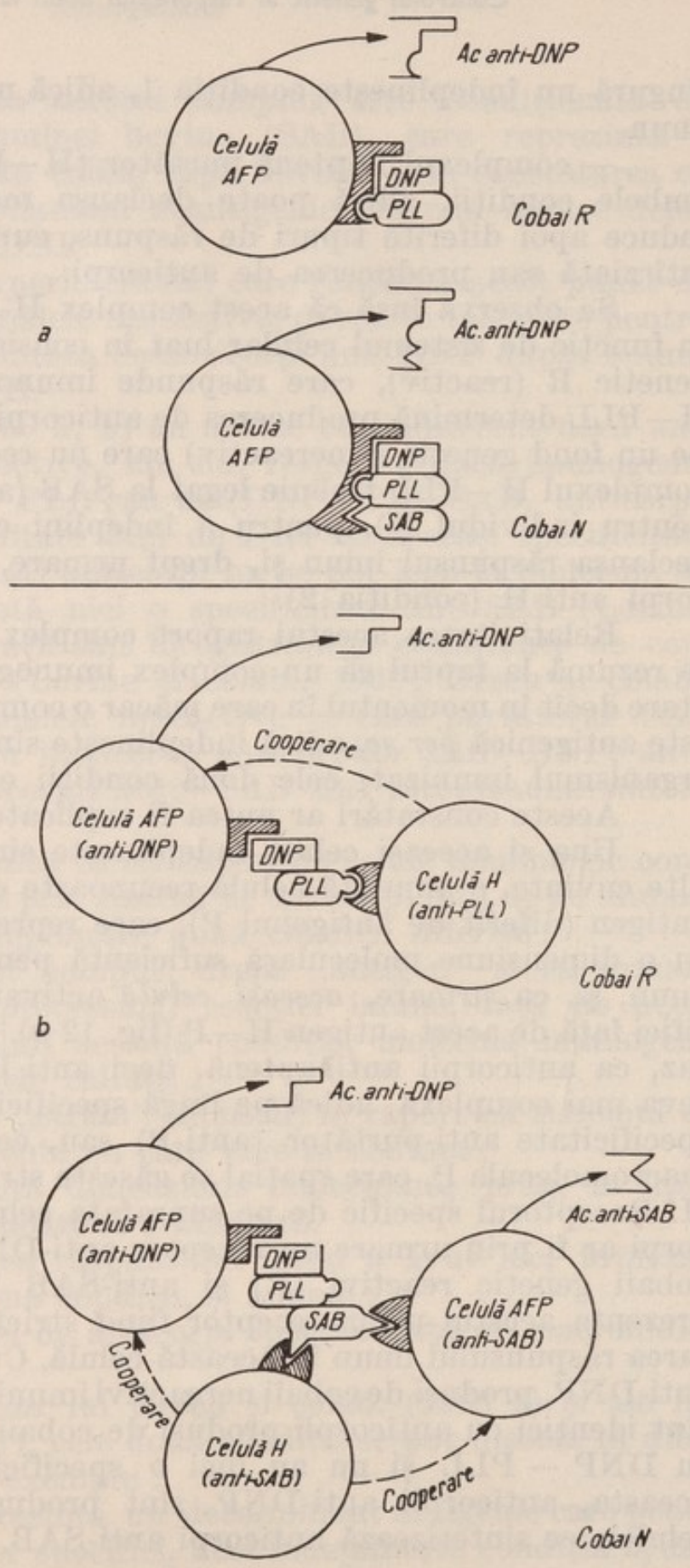


Fig. 12. — Modele diferite de declanșare a răspunsului imun prin sinteză de anticorpi.

a. Ipoteza interacțiunii exclusive dintre antigen și celula producătoare de anticorpi.

b. Ipoteza cooperării celulare (interacțiunea dintre antigen și două tipuri de celule reactive la antigen).

Cobaii R = cobaii reactivi la DNP-PLL; cobaii N = cobaii nereactivi la DNP-PLL; SAB = serumalbumină bovină; DNP = dinitrofenil; PLL = poli-L-lizina.

A doua modalitate de explicare a rezultatelor prezentate consideră că cele două condiții, recunoașterea antigenicității și declanșarea răspunsului imun (1) și sinteza de anticorpi specifici față de antigen (2), sînt perfect independente și îndeplinite de două celule limfoide diferite care cooperează între ele.

Conform acestui model, molecula purtătorului este mai întîi recunoscută de către celulele H (helper cells). Aceste celule fixează antigenul pe suprafața lor și îl „prezintă” limfocitelor precursore ale celulelor formatoare de anticorpi, denumite și celule AFP (antibody forming cells precursors).

Odată cu fixarea antigenului pe receptorii specifici ai celulelor AFP, celulele H declanșează transformarea precursorilor în plasmocite activ producătoare de anticorpi.

În cazul experiențelor citate, la cobaii nereactivi, o celulă H, avînd receptori corespunzători fragmentului SAB, recunoaște complexul (DNP—PLL)SAB drept antigen, îl leagă pe suprafața ei prin intermediul fragmentului SAB și îl prezintă atît celulelor AFP specifice anti-DNP, cît și celor specifice anti-SAB. Drept urmare, atît celulele precursore anti-SAB, cît și cele anti-DNP vor fi activate spre celule independente producătoare de anticorpi, anti-SAB și anti-DNP (fig. 12 b).

Acest ultim model s-a dovedit cel corespunzător realității, fapt argumentat și de cercetările recente care au pus în evidență necesitatea cooperării dintre celulele timus-dependente (T), cu rol de celule H, și cele derivate din măduvă (B), ce reprezintă celule AFP, pentru elaborarea răspunsului imun (vezi subcapitolul „Interacțiuni între celulele imunologic competente în cursul elaborării răspunsului imun”).

Rezultă că atît animalele reactive, cît și cele nereactive la DNP—PLL au celule care sintetizează anticorpi anti-DNP, deci conțin în genomul lor informația necesară sintezei acestor anticorpi.

Ceea ce deosebește aceste animale este prezența celulelor H, reactive la antigenul PLL, care apare la cobaii ce poartă gena PLL și lipsa acestor celule la cobaii homozigoți pentru cealaltă alelă a acestei gene. La acestea din urmă, stimularea celulelor producătoare de anticorpi anti-DNP nu se poate face decît prin intermediul altor celule H, care recunosc drept imunogen seralbumina bovină din complexul (DNP—PLL)SAB (Mitchison, 1971 a, b).

Experiențe similare făcute la șoareci nereactivi la (T,G)—A—L au dus la rezultate identice, care arată că, la liniile nereactive, celulele T nu pot recunoaște antigenicitatea acestui compus, prin urmare

nu pot fixa acest antigen pe receptorii de pe suprafața lor și implicit nu pot activa celulele B corespunzătoare.

Alte dovezi experimentale argumentează de asemenea faptul că expresia fenotipică a genelor Ir se realizează la nivelul celulelor T. Astfel, ori de câte ori gena Ir funcționează în raport cu un anumit antigen dat, acest antigen induce nu numai sinteza de anticorpi specifici, ci și hipersensibilitatea întârziată, ceea ce dovedește faptul că celulele T specifice sînt capabile de un răspuns imun mediat prin celule.

Recent, McDevitt și colab. (1971) au constatat că dacă se exclude adjuvantul Freund (utilizat în primele experiențe) și animalele sînt imunizate cu (T,G)—A—L, în soluție apoasă, atunci în *răspuns primar* atît șoarecii reactivi, cît și cei nereactivi dau un titru similar de anticorpi 19 S. Abia în *răspunsul secundar*, diferența dintre animalele reactive și cele nereactive apare din nou, oglindită prin titrul anticorpilor 7 S, ceea ce dovedește că expresia fenotipică a genelor Ir controlează mai ales cantitățile de anticorpi 7 S produse în *răspunsul secundar*. Aceste diferențe pot fi făcute să dispară dacă înainte de imunizare animalele reactive sînt timectomizate, iradiate și restaurate exclusiv cu celule B (de măduvă osoasă) singeneice. Spre deosebire de aceasta, îndepărtarea timusului la animalele genetic nereactive nu are nici un efect asupra titrului indus de (T,G)—A—L în soluție apoasă. Aceste experiențe confirmă faptul că și animalele nereactive posedă celule AFP, care în *răspunsul primar* pot fi activate direct de către antigen pentru a sintetiza anticorpi 19 S (Grumet, 1971). În schimb, la aceste animale, celulele T și mai ales celulele de memorie ale acestei serii sînt cu totul deficitare.

Green și colab. (1972) consideră că și cobaii genetic nereactivi la doze reduse de SAB poartă o deficiență a celulelor T, care nu recunosc această moleculă drept antigen, și prin urmare nu o fixează pe suprafața lor.

O părere oarecum deosebită asupra exprimării fenotipice a genelor Ir este argumentată de experiențele lui Gershon și colab. (1973). Acești autori au investigat activarea celulei T după contactul cu antigenul, activare care are ca rezultat o diferențiere blastică și implicit o sinteză sporită de ADN pusă în evidență prin creșterea cantității de timidină  $^3\text{H}$  încorporată.

S-a constatat că și la animalele nereactive, contactul dintre antigen și celulele T induce accelerarea sintezei ADN. Astfel, după contactul timocitelor de șoareci nereactivi la GAT (tulpina DBA/1; H—2<sup>a</sup>) cu antigenul corespunzător, s-a detectat la nivelul timocitelor o sinteză semnificativ mai înaltă de ADN. Aceasta dovedește faptul



că celulele T recunosc totuși antigenul ca atare și prin urmare reacționează la fixarea sa pe receptori.

Ceea ce deosebește celulele T de la animalele nereactive ar fi însă afinitatea prea mare a receptorului față de antigen. În acest caz, celula T cu antigenul puternic fixat pe suprafața ei va deveni imunologic paralizată și deci nu va mai putea coopera, împreună cu antigenul, în activarea celulei B.

După Gershon și colab. (1973), influența locusului de histocompatibilitate asupra expresiei fenotipice a genei Ir se explică prin faptul că diferitele configurații modelate de antigenele de histocompatibilitate pe suprafața membranei modifică în chip variat afinitatea receptorilor față de antigen.

Astfel, o afinitate potrivită a receptorului față de antigen ar determina un răspuns imun corect la animalele reactive. La cele nereactive, afinitatea prea intensă a receptorilor față de antigen determină paralizia imunologică a celulelor T și respectiv incapacitatea lor de a coopera cu celulele B.

Există totuși o serie de date experimentale care arată că, cel puțin în anumite cazuri, exprimarea fenotipică a genelor Ir se face la nivelul celulelor B. Shearer și colab. (1971) au inoculat un polipeptid sintetic (Phe, G)—Pro—L (fenil-alanină și acid glutamic legate la un schelet de poliprolină și lizină) în adjuvant Freund, la două linii pure de șoareci. Linia DBA/1 răspunde prin sinteză de anticorpi față de fragmentul (Phe, G), în timp ce șoarecii liniei SJL sintetizează anticorpi specifici anti-(Pro—L). Imposibilitatea de a sintetiza anticorpi anti-(Pro—L), în primul caz, și anti-(Phe, G), în al doilea, se datorește faptului că în splina acestor animale nu există celule reactive la antigen, deci care să poarte pe suprafața lor receptori specifici anti-(Pro—L) sau respectiv anti-(Phe, G). Lipsa acestor celule reactive la antigen se face pe seama populației celulare derivate din măduva osoasă, deci de tip B.

O situație similară a fost raportată de Skarova și Riha (1969). Acești autori au investigat diferențele genetice controlate în ce privește sinteza de anticorpi la șoareci imunizați cu două haptene diferite: acid para-aminobenzoic (PAB) și acid sulfanilic, legate de o aceeași moleculă de purtător (gammaglobulina bovină). Diferențele în răspunsul imun antihaptenă nu se datoresc deci imunogenității moleculei purtătorului, ci exclusiv imunogenității diferite a celor două haptene față de două linii de șoareci genetic deosebite. Și în acest caz, exprimarea fenotipică a celor două gene Ir se face mai cu seamă.

la nivelul celulelor B, acestea fiind responsabile de reactivitatea sau de nereactivitatea imunologică antihaptenă.

Importanța structurii chimice a imunogenului în exprimarea defectelor genetice la nivel celular este ilustrată de observațiile lui Shearer și colab. (1971), care au arătat că nereactivitatea șoarecilor SJL față de determinantul antigenic (Phe, G) este determinată de un defect situat exclusiv la nivelul celulelor B, atunci când cei doi aminoacizi sînt atașați unui purtător poli-L-prolină, în timp ce dacă aceiași aminoacizi sînt atașați la poli-DL-alanină, nereactivitatea este determinată de o deficiență situată atît la nivelul celulelor B, cît și la nivelul celulelor T.

Mecanismul prin care genele Ir controlează răspunsul imun față de un anumit antigen, indiferent dacă acest control se exprimă fenotipic la nivelul celulelor T sau B, rămîne încă nelămurit.

S-a presupus că genele Ir ar putea juca un rol direct sau indirect în modelarea segmentelor variabile ale lanțurilor L și H. Cu alte cuvinte, la un animal reactiv, față de un anumit antigen, gena Ir controlează sinteza unui situs combinativ corespunzător, apt pentru o legare corectă cu antigenul. Existența unor situsuri combinate adecvate ar asigura implicit existența unor receptori funcționali cel puțin pe suprafața celulelor din seria B.

O altă posibilitate este ca gena Ir și, alături de ea, antigenele codificate de locusurile de histocompatibilitate să influențeze *afinitatea* receptorilor de pe suprafața celulelor imunologic competente față de antigen. Această ultimă alternativă susținută de experiențele recente ale lui Gershon și colab. (1973) pare mai plauzibilă în stadiul actual al cunoștințelor noastre.

Indiferent de modalitatea concretă de intervenție a genelor Ir în reglarea reactivității imunologice, după cum remarcă Benacerraf și McDevitt (1972), este foarte probabil că acest tip de control genetic poate juca un rol important în susceptibilitatea genetic transmisă a omului și a animalelor la o varietate de boli.

#### BIBLIOGRAFIE

- ARQUILLA E.R., FINN J., 1963, Science, **142**, 400.  
ARQUILLA E.R., FINN J., 1965, J. exp. Med, **122**, 771.  
BENACERRAF B., GREEN I., PAUL W.E., 1967, Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol., **32**, 569.

- BENACERRAF B., BLUESTEIN G.H., GREEN I., ELMAN L., 1971, în *Progress in Immunology*, sub red. B. Amos, Acad. Press, New York, p. 485.
- BENACERRAF B., McDEVITT H.O., 1972, *Science*, **175**, 273.
- BRALEY H.C., FREEMAN M.J., 1971, *Cell. Immunol.*, **2**, 73.
- EICHMANN K., 1972, *Eur. J. Immunol.*, **2**, 301.
- ELLMAN L., GREEN I., BENACERRAF B., 1971, *J. Immunol.*, **107**, 382.
- GERSHON R.K., MAURER H.P., MERRYMAN F.C., 1973, *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.*, **70**, 250.
- GREEN I., PAUL W.E., BENACERRAF B., 1966 a, *J. exp. Med.*, **123**, 859.
- GREEN I., VASSALI P., BENACERRAF B., 1966 b, *J. exp. Med.*, **125**, 527.
- GREEN I., PAUL W.E., BENACERRAF B., 1967, *J. exp. Med.*, **126**, 959.
- GREEN I., LEVINE B.B., PAUL W. E., BENACERRAF B., 1968 a, în *The nucleic Acids in Immunology*, sub red. O.J. Plescia și W. Braun, Springer Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, p. 288—299.
- GREEN I., PAUL W.E., BENACERRAF B., 1968 b, *J. exp. Med.*, **127**, 43.
- GREEN I., PAUL W.E., BENACERRAF B., 1972, *J. Immunol.*, **109**, 457.
- GRUMET C.F., 1971, *Fed. Proc.*, **30**, 469.
- KANTOR P.S., OJEDA A., BENACERRAF B., 1963, *J. exp. Med.*, **117**, 55.
- LEVINE B.B., OJEDA A., BENACERRAF B., 1963, *J. exp. Med.*, **118**, 953.
- LEVINE B.B., 1964, a *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **116**, 1127.
- LEVINE B.B., 1964 b, *Nature*, **202**, 1009.
- LEVINE B.B., BENACERRAF B., 1964, *J. exp. Med.*, **120**, 955.
- LEVINE B.B., BENACERRAF B., 1965, *Science*, **147**, 517.
- LEVINE B.B., GREEN I., BENACERRAF B., 1968, în *The nucleic Acids in Immunology* sub red. O.J. PLESCIA și W. BRAUN, Springer Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, p. 277—287.
- MARTIN W. J., MAURER H. P., BENACERRAF B., 1971, *J. Immunol.*, **107**, 715.
- MAURER P. H., 1963, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **113**, 553.
- MAURER P. H., PINCHUCK P., 1968, în *The nucleic Acids in Immunology*, sub red, O. J PLESCIA și W. BRAUN, Springer Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, p. 301—317.
- McDEVITT H. O., SELA M., 1965. *J. exp. Med.*, **122**, 517.
- McDEVITT H. O., CHINITZ A., 1969, *Science*, **163**, 1207.
- McDEVITT H. O. BECHTOL B. K., GRUMET C. F., MITCHELL F. G., WEGMANN G. T., 1971, în *Progress in Immunology*, sub red. B. Amos, Acad. Press, New York, p. 495.
- MITCHISON N. A., 1971 a, *Eur. J. Immunol.*, **1**, 10.
- MITCHISON N. A., 1971 b, *Eur. J. Immunol.*, **1**, 18.
- PAUL W. E., SISKIND G. W., BENACERRAF B., 1966, *J. exp. Med.*, **123**, 689.
- PINCHUCK P., MAURER P. H., 1965 a, *J. exp. Med.*, **122**, 665.
- PINCHUCK P., MAURER P. H., 1965 b, *J. exp. Med.*, **122**, 673.

- PLESCIA O. J., RAO C. V., CURTIS S., JOHNSTON V., NOLTENIUS H., 1968, in *The nucleic Acids in Immunology*, sub. red. O. J. PLESCIA și W. BRAUN, Springer Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, p. 319 — 329.
- SCHEIBEL I. F., 1943, *Acta path. microbiol. scand.*, **20**, 464.
- SELA M., TUCHES SARA, ARNON RUTH, 1962, *Biochem. J.*, **85**, 223.
- SELA M., 1971, *FEBS Letters*, **19**, 181.
- SHEARER M. G., MOSES E., SELA M., 1971, in *Progress in Immunology*, sub red. B. AMOS, Acad. Press, New York, p. 509.
- SKAROVA B., RIHA J., 1969, *Folia Microbiol.*, **14**, 364.
- SOBEY W. R., MAGRATH J. M., REISNER A. H., 1966, *Immunology*, **11**, 511.
- VAZ N. M., LEVINE B. B., 1970, *Science*, **168**, 852.
- \* \* \* O. M.S., 1968, *Aspects génétiques de la réponse immunitaire*, Série de rapports techniques, 402.

## Defecte genetice în sinteza imunoglobulinelor

Din cele expuse pînă acum rezultă că biosinteza imunoglobulinelor reprezintă un lanț de procese biochimice care sînt coordonate în cea mai mare măsură de aparatul genetic al celulelor producătoare de anticorpi.

Prin urmare, anomaliile sintezei imunoglobulinelor reprezintă alterări situate în ultimă analiză la nivelul aparatului genetic al acestor celule.

În raport cu existența unui individ, obișnuim să clasificăm perturbările sintezei imunoglobulinelor în: genetice și dobîndite.

Anomaliile genetice sînt moștenite de la antecesori, se manifestă în tot sau aproape în tot decursul existenței individului și sînt uneori transmise de acest individ la descendenți.

Avem de-a face deci cu o perturbare (mutație) germinativă, care se transmite din generație în generație pe linia individului considerat ca macroorganism.

Includem în schimb în cadrul perturbărilor „dobîndite” anomaliile care au apărut la un moment dat în viața unui individ, determinate de acțiunea unui factor cunoscut, sau cel mai adesea necunoscut, care nu apar la antecesori și care nu se transmit la descendenți.

În realitate vom vedea că și aceste cazuri așa-zis „dobîndite” sînt datorate cel mai des unor perturbări la nivelul aparatului genetic al liniei somatice interesate în producerea unuia sau mai multor tipuri de imunoglobuline. Acest defect genetic se transmite din generație în generație la nivelul unei linii somatice, sub forma unei anomalii (mutații) a genomului celular, cum este cazul malignizării survenite în cazul plasmocitoamelor.

În funcție de tabloul clinic și de aspectul citologic și imunologic, distingem boli cu supraproducție și boli cu producție scăzută de imunoglobuline.

**Afecțiuni cu supraproducție de imunoglobuline.** Aceste afecțiuni sînt descrise în literatură sub numele de boli imunoproliferative (Levin și Ritzman, 1965; Mellors, 1966), întrucît apar drept consecință a unei proliferați anormale a tipurilor de celule implicate în sinteza imunoglobulinelor (limfoplasmocite), sau de gammapatii, întrucît în serul oamenilor și animalelor bolnave se evidențiază apariția unor paraproteine cunoscute și sub numele de componente M, care din punct de vedere fizico-chimic se încadrează în clasa gammaglobulinelor.

După cum am mai arătat, paraproteinele nu reprezintă propriu-zis anticorpi, în sensul că nu apar drept urmare a unei stimulări antigenice bine definite, ci sînt produse prin proliferarea malignă a unei singure clone de celule producătoare de anticorpi.

Drept urmare, paraproteinele reprezintă imunoglobuline foarte pure din clasele IgG, IgA, IgD sau IgE, care înlocuiesc în serul indivizilor bolnavi de mielom diversitatea enormă de imunoglobuline, caracteristică indivizilor normali.

Tumori plasmocitare similare s-au descris și la șoarece, aceste tumori fiind transplantabile de la un individ la altul. Prin puritatea lor imunochimică paraproteinele au reprezentat un material extrem de important pentru studiul imunoglobulinelor. Pe acest material s-au putut determina secvențele de aminoacizi ale diferitelor lanțuri L sau H, sau au fost descriși noi determinanți alotipici care datorită purității proteinelor de mielom au putut fi corelați cu anumite grupe și subgrupe de imunoglobuline.

Inițial, aceste concluzii au fost privite cu rezervă, considerîndu-se că proteinele produse de mioame nu sînt întru totul identice anticorpilor normali, ele fiind rezultatul unui proces patologic și mai ales neavînd nici o activitate de anticorp cunoscută. Ulterior însă s-a văzut că cel puțin unele proteine monoclonale au o activitate de anticorp bine definită. Astfel, din tabelul nr. 1 reiese că s-au descris proteine secretate de plasmocitoame care au activitate fie anti-streptolizină, fie antigrupări benzenice substituie (ex. dinitrofenil), antigammaglobulină umană, sau antilipoproteină umană (Bernier, 1970). Din aceste lucrări s-a tras concluzia că cel puțin în anumite cazuri, paraproteinele reprezintă unul din multiplele tipuri de anticorpi ce apar și în condiții normale și că în gammapatii caracterul anormal rezidă mai mult în controlul ratei de sinteză decît în produsul sintetizat.

În lucrări mai recente, autorii încearcă să lege diferitele tulburări în sinteza imunoglobulinelor de sistemele limfoplasmocitare T sau B (vezi subcapitolul „Interacțiuni între celulele imunologic competente în cursul elaborării răspunsului imun”). În acest sens se consideră că mieloamele multiple reprezintă proliferări maligne ale unor clone de celule B (Roitt și colab., 1969).

În cadrul afecțiunilor cu supraproducție de imunoglobuline se deosebesc boli în cursul cărora se sintetizează în exces Ig complete, deci alcătuite din lanțuri L și H în proporție normală, și boli în cursul cărora apare un asincronism în sinteza celor două tipuri de lanțuri din structura imunoglobulinelor. În acest din urmă caz va apărea un exces de lanțuri H sau L libere.

1. *Afecțiuni cu supraproducție de Ig complete.* Aceste afecțiuni traduc o stare în cursul căreia se mențin sincronizarea normală a lanțurilor L și H, precum și posibilitatea asamblării corecte a celor două lanțuri. Conform cu teoria inițial postulată de către Burnet și ulterior confirmată experimental, fiecare celulă poate sintetiza un singur izotip de Ig, deci există clone separate pentru fiecare izotip posibil.

Acest fapt duce la afirmația că supraproducția unui singur izotip anumit va fi determinat de proliferarea neobișnuită a unei singure clone, corespunzătoare, în timp ce supraproducția de mai multe izotipuri diverse de imunoglobulină va apărea drept efect al proliferării dezordonate a mai multor clone celulare diferite. Până în prezent nu s-a putut stabili o corespondență precisă între supraproducția unui anumit izotip și proliferarea unei celule morfologic bine determinată.

Tocmai acest aspect morfologic incert și controversat a determinat pe Dameshek (citat după Ritzmann și Levin, 1968) să adopte o nomenclatură funcțională; după acest autor, plasmocitele se pot deci subîmpărți în funcție de Ig produsă, identificată biochimic, în imunocite gamma-G, imunocite gamma-A, imunocite gamma-D și imunocite gamma-M.

Într-un sens mai larg, acești termeni sînt aplicabili oricărui imunocit producător de imunoglobulină, indiferent de caracteristicile lui morfologice.

Ca urmare, printre alterările cu supraproducție de imunoglobuline complete (Imhof și colab., 1966) se descriu:

— gammapatii policlonale în cursul cărora apare o supraproducție simultană a tuturor izotipurilor;

— gammapatii monoclonale în cursul cărora apare supra-producția unui singur izotip de imunoglobulină.

Între aceste extreme se descriu gammapatii diclonale sau triclonaie, în cursul cărora se evidențiază biosinteza crescută a două sau respectiv trei izotipuri diferite.

În cadrul gammapatiilor monoclonale se descriu afecțiuni cu supraproducție de IgM, cunoscute în literatură sub numele de macroglobulinemie Waldenström sau supraproducție de IgA, IgG sau IgD, fiecare reprezentând o variantă a mielomului multiplu.

## 2. Afecțiuni cu supraproducție de Ig incomplet sintetizate.

În cazul acestor afecțiuni se constată un decalaj în sinteza lanțurilor, astfel încât pot apărea libere fie lanțuri H, ca în cazul bolii lanțurilor grele, fie lanțuri L, care datorită dimensiunilor lor mici trec prin filtrul renal și se elimină în urină, sub formă de proteine Bence-Jones.

După Williamson, tipul de mielom Bence-Jones (boala excesului de lanțuri ușoare L) poate fi considerat ca un fel de antipod al bolii Franklin (boala lanțurilor H); ambele reprezintă efectul unor încercări nereușite a plasmocitului malignizat de a produce o imunoglobulină patologică întreagă, alcătuită atât din lanțuri L, cât și din lanțuri H.

În cursul acestor mielomatoze există deci o suprimare a exprimării fenotipice a genei structurale L sau a celei H. Cea mai bună dovadă a suprimării expresiei fenotipice a genelor pentru lanțul H a fost adusă de Potter și Kuff (1964), care, din mai multe tumori de mielom de șoarece ce sintetizau originar atât lanțuri L, cât și lanțuri H, au izolat prin transplantări de la un animal la altul sublinii tumorale care formau numai lanțuri L.

Askonas și Williamson (1969) au arătat că o asemenea sublinie (47 B) nu are polizomi grei, caracteristici pentru ARN-m ce codifică lanțurile H, spre deosebire de linia tumorală originală, (47 A) care sintetiza ambele lanțuri L și H și care prezenta atât polizomi grei, cât și polizomi ușori.

Există însă alte linii tumorale la care expresia fenotipică a genei pentru lanțul L este suprimată.

Astfel, Finegold, Fahey și Granger (1967) au studiat o linie celulară de limfom Burkitt care produce și secretă numai lanțuri  $\mu$ .

Seligman și Rambaud (1969) au descris boala lanțurilor  $\alpha$ . Aceasta apare în cadrul unor limfoame maligne (plasmocito-sarcoame),



proteina anormală fiind un lanț H- $\alpha$  care reacționează imunoelectroforetic cu serul anti-IgA<sub>1</sub>. Fapt caracteristic, aceste lanțuri tind a se polimeriza spontan atât *in vivo*, cât și *in vitro*, polimerii rezultând din lanțuri legate între ele prin punți —S—S—.

Proteina anormală se elimină relativ puțin în urină, probabil datorită tendinței de polimerizare, în schimb se poate detecta în saliva unora dintre pacienți.

O serie de experiențe tind să demonstreze că proteina anormală H- $\alpha$  poate lega „piesa secretoare”, ceea ce ar explica apariția ei în salivă.

Cercetările citologice au arătat că celulele cu proliferare malignă produc lanțurile patologice H- $\alpha$ , în schimb nu produc lanțuri L, ceea ce duce implicit la afirmația că, contrar regulii generale acceptate, lanțurile H se pot elibera în acest caz de pe polizomi în lipsa lanțurilor L.

O altă perturbare în sinteza imunoglobulinelor poate să apară prin greșeli în ansamblarea lanțurilor L și H.

După Askonas și Williamson (1969), acestea sînt determinate de gene L sau H care au anumite regiuni suprimate sau au o secvență nucleotidică alterată, așa încît ele codifică lanțuri polipeptidice care poartă defecte în secvența aminoacizilor implicați în legăturile dintre lanțuri. Astfel, de exemplu, Potter și Kuff (1964) au descris în linia de plasmocitom de șoarece (47 A) sublinii celulare ce formează și secretă numai jumătăți de molecule (de tip L—H).

Aceasta sugerează că regiunea implicată în punțile disulfidice dintre lanțurile grele lipsește sau este defectă în lanțurile H sintetizate de aceste linii tumorale.

Un alt exemplu îl reprezintă anumite cazuri de oameni ce suferă de *boala lanțurilor grele- $\gamma$* , care pare a fi determinată tot de un defect al genei ce controlează lanțurile H. Prahl (1967) a arătat că unul din pacienții suferind de această boală producea un lanț H care cuprindea o jumătate carboxiterminală (porțiunea Fc) normală și avea la capătul aminoterminal cîțiva aminoacizi identici cu cei din capătul aminoterminal al lanțurilor  $\gamma$  normale de om.

Acest lanț anormal prezintă deci o deleție largă situată în fragmentul Fd, care afectează și zona unde se găsesc cisteinele implicate în legătura H—H și care determină sinteza unui lanț scurt, solubil, care este secretat de către celulă.

Cercetarea celulelor implicate în sinteza anticorpilor a arătat că în cele mai multe cazuri celulele afectate nu pot sintetiza deloc lanțuri ușoare (Franklin, 1971).

Recent s-a descris *boala lanțurilor grele  $\mu$* . Aceasta apare rareori, la pacienți cu leucemie limfoidă cronică.

Proteinele patologice care caracterizează această afecțiune sînt reprezentate, pe de o parte, de proteinele Bence-Jones, care sînt eliminate în urină, iar pe de altă parte, de o proteină serică, ce nu apare în urină și care sub raport imunoelectroforetic reacționează cu serul antilanțuri  $\mu$  (Franklin, 1971). S-a văzut că această proteină reprezintă un fragment de lanț  $\mu$  cu o greutate moleculară aproximativ de 55 000. Faptul că acești pacienți produc atît lanțuri  $\mu$ , cît și lanțuri ușoare arată că celulele afectate pot sintetiza ambele tipuri de lanțuri, dar acestea nu pot fi asamblate probabil din cauza unei deleții care implică regiunile fragmentului Fd și zona ce conține cisteinele implicate în legăturile dintre lanțurile  $\mu$  și L.

Perturbările genetice cu producere asincronă de lanțuri L sau H au fost asemănată cu situațiile ce apar în patologia hemoglobinelor. Astfel, în mod normal există un sincronism între sinteza lanțurilor  $\alpha$  și  $\beta$  din structura hemoglobinei.

În anumite cazuri de talasemie apare însă sinteza asincronă cu exces fie de lanț  $\alpha$ , fie de lanț  $\beta$  (Baglioni, 1963).

Astăzi se consideră că parte din bolile imunoproliferative iau naștere în urma unor perturbări genetice. La baza acestor perturbări stau foarte probabil diverse mutații survenite pe liniile somatice sau pe cele germinative (Imhof și colab., 1966 ; Dammaco și Clausen, 1966 ; Gavrilesco și colab., 1969).

Argumentele ce stau la baza acestei afirmații sînt multiple.

Informația modificată din genomul celulelor alterate este foarte stabilă. Transplantele celulare în serie, de plasmocitoame de șoarece, au dovedit menținerea aceleiași configurații de sinteză a gammaglobulinelor. După numeroase treceri de la un șoarece la altul, aceste linii celulare continuă să sintetizeze același tip structural de imunoglobulină (Osserman, 1964).

Numeroase gammapatii s-au găsit asociate cu variate anomalii cromozomiale. În macroglobulinemia Waldenström, Blake (1966) și alți autori descriu apariția unor extracromozomi de două tipuri, cu centromer median și cu centromer submedian, asemănători cu cromozomii perechii 1 sau 2. După acești autori, extracromozomul ar putea fi derivat din perechea a doua printr-o inversiune pericen-

trică, în cursul căreia s-a pierdut o cantitate mai mare sau mai mică din materialul cromozomial al brațului lung.

Alți autori (Spengner și colab., 1966) argumentează în plus originea somatică a mutației prin observația acelorași anomalii cromozomiale care realizează însă un mozaic de celule normale — anormale.

Observații similare au fost descrise și în cazuri de mielom. În toate cele 3 tipuri de gammapatii monoclonale cunoscute s-au observat anomalii frecvente ale cromozomului 12.

Seligman (1966) observă creșterea incidenței acestor afecțiuni odată cu creșterea vârstei, după o curbă similară celei semnalate în bolile de autoagresiune de către Burch (1963, 1964) și Burch și Rowell (1963, 1966), iar Axelsson și Hällen (1966) întăresc asemănarea geneticii formale a acestor două grupe mari de boli prin perturbare de mecanism imun, arătând că gammapatiiile predomină la femei (vezi capitolul „Baza genetică a proceselor de autoagresiune”).

Gammapatiiile mai pot fi determinate însă și de perturbări genetice survenite pe liniile germinative. În acest caz, alterarea genotipică ar determina la individul purtător o predispoziție față de boală sau chiar boala. Prin studii statistice s-a confirmat incidența familială ridicată a hipergammaglobulinemiilor policlonale și transmisibilitatea lor de la o generație la alta (Axelsson și Hällen, 1966; Leonhardt, 1964).

Incidența intrafamilială crescută a fost observată și în macroglobulinemia Waldenström (Spengner și colab., 1966, Seligman, 1966). Analiza modului de transmitere ereditară a acestei afecțiuni indică o alterare genetică localizată pe un autozom (Seligman, 1966).

În concluzie, declanșarea bolilor imunoproliferative pare a recunoaște drept cauză perturbarea controlului homeostatic al sintezei imunoglobulinelor, datorită unor mutații somatice care apar pe un teren predispus, purtător al unei mutații germinative (Spengner și colab., 1966; Seligman, 1966).

**Afecțiuni cu producție scăzută a imunoglobulinelor.** În cadrul bolilor cu producție scăzută de imunoglobuline pot fi incluse afecțiunile în care perturbarea mecanismelor de sinteză a imunoglobulinelor determină fie reducerea concomitentă a tuturor tipurilor de imunoglobuline, fie reducerea anumitor tipuri cu menținerea constantă sau creșterea compensatorie a celorlalte izotipuri.

Redăm în tabelul nr. 10 o enumerare și succintă descriere a bolilor genetice cu scăderea imunoglobulinelor, alcătuită de comitetul de experți O.M.S., în această problemă (O.M.S., 1968).

## Clasificarea afecțiunilor cu carențe imunitare

Sindrom	Caracteristici histopatologice			Număr de limfocite circulante
	timus	plasmocite	diverse	
Agammaglobulinemie infantilă cu transmitere recesivă legată de sex (boala Bruton)	normal	absente	—	normal
Agammaglobulinemie alimfocitară autosomală cu transmitere recesivă (limfocitoftizia esențială a lui Glanzmann și Rinkler, sau agammaglobulinemia de tip Swiss) (Hitzig și Willi, 1961)	timus hipo plazic adesea necoborit; lipsa celulelor limfoide și a corpusculilor lui Hassall	absente	lipsa limfocitelor în țesuturi	foarte scăzut
Timom cu agammaglobulinemie (sindromul Good)	hipertrofie timică de tipul celulei epiteliale fusiforme a stromei	scăzute sau absente	—	scăzut; scăderea este progresivă, atingând valori extrem de mici
Insuficiența selectivă a IgA (Rokey și colab., 1964)	normal	lipsa plasmocitelor producătoare de IgA	—	normal
IgM, IgG, IgD, IgE	încă necunoscute			
Hipogammaglobulinemia tranzitorie a copilului	?	scăzute	—	normal
Carențe imunitare cu trombopenie și eczemă (sindromul Wiskott-Aldrich) (Stiehm și McIntosh, 1967)	normal	normal prezente	scăderea progresivă a limfocitelor din regiunile paracorticale dependente de timus	scădere progresivă

nr. 10

(după O.M.S., 1968)

Deficiențe ale imunoglobulinelor	Anomalii imunologice		Mecanism genetic	Observații
	răspunsuri umorale	răspunsuri mediate prin celule		
scăderea masivă a tuturor claselor	lipsă sau insuficiență gravă în răspunsul la orice antigen	normale	legată de cromozomul X	infecții recurente cu patogeni piogeni extracelulari
scăderea tuturor claselor	lipsa sau insuficiența răspunsurilor la toate antigenele (caracter constant)	răspuns slab la toate antigenele	autosomal recesiv	indivizii bonlavi nu depășesc vârsta copilăriei
scăderea netă a tuturor claselor	răspunsuri deficitare la toate antigenele	răspunsuri deficitare la toate antigenele	se discută existența unui factor genetic	absența constantă sau scăderea masivă a eozinofilelor în măduvă și în sânge, uneori se asociază și aplazia eritroblastică
lipsa IgA serice și din secreții; celelalte Ig normale	normale cu excepția anticorpilor IgA	normale	necunoscut; anumite cazuri se transmit autosomal recesiv	bronșite, sinuzite, enteropatii; unii indivizi afectați nu au tulburări clinice
mai ales scăderea IgG	în general scăzute sau abolite	normale	boală familială?	pot prezenta mai târziu titruri reduse de IgG (subnormale)
întotdeauna apare o modificare a Ig, dar clasa afectată și gradul modificării diferă (apar adesea scăderea IgM și creșterea IgA)	răspunsuri deficitare numai față de anumite antigene (lipsa izohemaglutininelor și lipsa răspunsurilor față de antigenele de membrană glucidice)	răspunsuri deficitare numai față de anumite antigene (variabile)	transmitere recesivă legată de cromozomul X	tulburări asociate; eczemă și trombocitopenie

Sindrom	Caracteristici histopatologice			Număr de limfocite circulante
	timus	plasmocite	diverse	
Ataxie telangiectazie (sindrom Louis Barr) (Peterson șicolab., 1966) (Epstein și colab., 1966)	tip embrionar fără organizare în zone corticale și medulare ; nu apar corpusculi Hassall	variabile	scăderea limfocitelor în zonele ce depind de timus	ușoară scădere
Deficiența primitivă a imunoglobulinelor, nelegată de sex, cu apariție și forme clinice variabile (aberații primitive ale imunoglobulinelor) ; în această categorie sint incluse : — insuficiențele primare „dobândite” ; — disgammaglobulinemiile ; — formele congenitale „nelegate de sex” din nomenclaturile precedente (Barth și colab., 1965)	?	în general scăzute, dar în măsură variabilă	hiperplazie reticulară ; hiperplazie amigdaliană ; rareori hiperplazie gigantofoliculară a ganglionilor limfatici și a splinei	în general normal
Carență imunitară ereditară cu limfopenie	hipoplazie timică ; scăderea însemnată a celulelor limfoide și a corpusculilor Hassall	variabile	scăderea considerabilă a limfocitelor tisulare, deși se mențin centre de aglomerări limfocitare în splină și în ganglionii limfatici	reduc, de intensitate variabilă
Limfopenie cu transmitere autosomală recesivă cu imunoglobuline și plasmocite normale (sindromul Nezelof) (Fulginiti și colab., 1966)	hipoplazie timică, lipsa celulelor limfoide și a corpusculilor Hassall	prezente normal	scăderea masivă a limfocitelor tisulare	reduc

(continuare)

Deficiențe ale imunoglobulinelor	Anomalii imunologice		Mecanism genetic	Observații
	răspunsuri umorale	răspunsuri mediate prin celule		
in general scăderea Ig, dar clasa afectată și gradul modificării sint variabile; adesea apare lipsa IgA	răspunsuri deficitare numai față de anumite antigene (variabile)	răspunsuri deficitare numai față de anumite antigene (constante)	transmitere autosomală recesivă	tulburări asociate; ataxie cerebeloasă progresivă; disgenezie ovariană; telangiectazie a tuturor țesuturilor, care apare uneori tardiv
apare întotdeauna o scădere a Ig, dar clasa afectată și natura modificărilor sint variabile	răspunsuri deficitare numai față de anumite antigene (constante)	răspunsuri deficitare față de anumite antigene (variabile)	transmitere autosomală recesivă posibilă în unele cazuri; poate fi multifactorială	ar putea reprezenta o entitate clinică complexă din care se vor separa forme diferite, definite fiecare printr-o altă etiologie și prin alte caractere genetice
scăderea Ig și prezența constantă a unei anomalii, dar tipul și intensitatea modificărilor sint variabile	răspunsuri deficitare numai față de anumite antigene (constante)	răspunsuri deficitare numai față de anumite antigene (constante)	transmitere recesivă legată de cromozomul X sau autosomală	frecvente decese prin infecții micotice sau virale în prima copilărie
prezența normală a tuturor Ig	prezență de anticorpi, dar răspunsuri încă insuficient studiate	lipsa sau reducerea puternică a răspunsurilor la toate antigenele (constante)	transmitere autosomală recesivă	ar putea fi considerată ca o entitate aparte, dar poate reprezenta o formă simetric opusă agammaglobulinemiei de tip Swiss

Tabelul nr. 10

Sindrom	Caracteristici histopatologice			Număr de limfocite circulante
	timus	plasmocite	diverse	
Aplazia timică (sindromul Di George)	lipsa evoluției epiteliului arcurilor branhiiale 3 și 4; lipsa timusului	Normal prezente	lipsa paratiroidelor; nu apar limfocite în zonele paracorticale dependente de timus; prezența centrilor germinativi	redus în mod variabil; uneori se găsesc în limite normale

1. *Afecțiuni cu scăderea sincronă a tuturor izotipurilor de imunoglobuline.* În această categorie putem distinge o serie de entități care recunosc un determinism genetic.

— Agammaglobulinemia de tip Bruton, caracterizată prin scăderea masivă a celor patru tipuri de imunoglobuline, care se transmite legat de sex și recesiv (Fudenberg și Franklin, 1963; Burtin și colab., 1964). Gena implicată în controlul acestei afecțiuni pare a se găsi pe cromozomul X la cel puțin trei unități de recombinare de gena ce controlează sinteza antigenului eritrocitar Xg(a) (Sanger și Race, 1963; Rosen și colab., 1965).

Siegal și colab. (1971) au arătat că o serie de copii de sex masculin cu agammaglobulinemie legată de X și cu concentrații de imunoglobuline serice foarte reduse nu au imunoglobuline legate de membrană, deci receptori pe suprafața limfocitelor circulante.

— Agammaglobulinemia de tip Swiss, în care imunoglobulinele dispar aproape în întregime, afecțiune care se transmite autosomal și recesiv (Hitzig și Willi, 1961).

— O altă entitate imunoclinică este sindromul Good, respectiv agammaglobulinemia care apare în anumite timoame și se manifestă de asemenea prin reducerea cantității tuturor tipurilor de imunoglobuline. Nu există încă dovezi precise asupra faptului că această boală este genetic determinată. S-ar putea ca de la o generație la alta să se transmită numai o predispoziție genetică pentru această afecțiune (O.M.S., 1968). În orice caz este foarte probabil că această



(continuare)

Deficiențe ale imunoglobulinelor	Anomalii imunologice		Mecanism genetic	Observații
	răspunsuri umorale	răspunsuri mediate prin celule		
prezența normală a tuturor Ig	rămân de precizat, dar aparent numeroase răspunsuri sînt deficitare	lipsa de răspuns la orice antigen (constantă)	nimic nu dovedește un mecanism genetic	în general boala este diagnosticată în perioada neonatală și denumită tetania nou-născutului

afecțiune rezultă dintr-o serie de modificări genetice care duc la o „transformare” a țesutului timic, realizînd o dispariție a timocitelor normale și înlocuirea lor prin celule de tip epitelial fusiform.

2. *Afecțiuni cu reducerea anumitor izotipuri de imunoglobuline și cu menținerea normală sau creșterea compensatoare a celorlalte izotipuri.* În cadrul acestei categorii distingem mai multe entități clinice diferite (vezi tabelul nr. 10), fiecare dintre acestea fiind caracterizată mai mult sau mai puțin constant prin reducerea unei anumite clase de imunoglobuline.

Astfel, reducerea selectivă a IgA poate să apară în cadrul unui sindrom transmisibil ereditar în anumite familii printr-un mecanism autosomal recesiv (Rokey și colab., 1964).

O scădere similară a IgA se constată adesea și în ataxie — telangiectazie (sindromul Louis Barr), în care perturbările imunologice sînt asociate cu o ataxie cerebeloasă progresivă, disgenezie ovariană, telangiectazii ale tuturor țesuturilor. Sindromul Louis Barr se transmite de la o generație la alta autosomal recesiv (Peterson și colab., 1965, 1966; Epstein și colab., 1966; McKusick și Gross, 1966; Oppenheim și colab., 1966; Rosen și colab., 1966).

Spre deosebire de „scăderea selectivă a IgA”, acest sindrom prezintă tulburări imunologice mult mai intense și mai variate, în cursul cărora apar deficiențe atît în răspunsurile imune mediate prin sinteza de anticorpi, cît și în cele mediate prin celule.

Reducerea IgG apare în cursul „hipogammaglobulinemiei tranzitorii a copilului”, avînd drept efect o reducere a răspunsurilor imune prin sinteză de anticorpi și deci o creștere a receptivității indivizilor afectați la infecții bacteriene și virale. Afecțiunea este trecătoare. Incidența ei crescută în cadrul anumitor familii sugerează că ar apărea pe fondul unei predispoziții transmisibile ereditare.

În sfîrșit, reducerea IgM apare foarte adesea concomitent cu o creștere de IgA, în cursul sindromului Wiskott-Aldrich. Afecțiunea determină o alterare intensă a răspunsurilor imune atît în ce privește răspunsurile mediate prin sinteza de anticorpi, cît și în ce privește răspunsurile mediate prin celule.

Eczema și trombocitopenia apar drept fenomene însoțitoare în cadrul acestui sindrom transmisibil ereditar ca un caracter recesiv, legat de cromozomul X.

Reducerea anumitor izotipuri de imunoglobuline caracterizează și alte entități clinice cu transmitere ereditară, redate în tabelul nr. 10. Menționăm că această clasificare se bazează pe cercetări imunologice și genetice încă incomplete și prin urmare ea este departe de a fi definitivă. Astfel, agammaglobulinemiile și formele „congenitale” ale deficiențelor primitive ale imunoglobulinelor din nomenclaturile mai vechi au fost încadrate într-un același grup, avînd drept criteriu comun faptul că se transmit ereditar autosomal.

După însăși părerea comitetului de experți O.M.S. în problemele de imunogenetică, un studiu mai atent al acestor afecțiuni va duce probabil la separarea lor în mai multe grupe deosebite care diferă prin etiologia sau prin caracterul transmiterii lor ereditare.

Cercetări recente care au pus în evidență necesitatea interacțiunilor dintre sistemele celulare diferite, B și T, în cursul elaborării răspunsului imun, permit încadrarea defectelor genetice cunoscute într-unul din aceste sisteme.

Astfel, după Roitt și colab. (1969), agammaglobulinemia de tip Bruton reprezintă o deficiență genetică ce afectează selectiv sistemul de celule B, dat fiind că răspunsurile dependente de timus, cum ar fi ~~rejecția~~ de greafă, sînt perfect normale, deci sistemul T este indemn. Un mecanism patogenetic similar caracterizează și reducerea selectivă a IgA (Good și colab., 1971).

La extrema opusă se găsește sindromul Di George (aplazia timică), unde sistemul B este normal și în consecință toate clasele de Ig apar în concentrație normală, în timp ce sistemul T este puternic afectat, avînd drept urmare alterarea răspunsurilor legate de imunitatea celulară. Insuficiența răspunsurilor imune prin anticorpi

s-ar datora în acest caz nu imposibilității celulelor B de a produce anticorpi, ci lipsei de cooperare între sistemele T și B.

În schimb, alte categorii de imunodeficiențe, cum ar fi cea asociată ataxiei — telangiectaziei, sindromul Wiskott-Aldrich sau carențele imunitare autosomale recesive, implică afectarea simultană a sistemelor T și B (Good și colab., 1971).

Rezultă deci că și în cazul bolilor cu producție scăzută de imunoglobuline, ca și în cazul celorlalte două grupe mari de afecțiuni imune — boli prin autoagresiune și boli imunoproliferative —, mutațiile spontane somatice sau cele germinative pot fi recunoscute drept cauze ale acestor perturbări ale mecanismelor imunologice de apărare. În ce privește caracterul acestor mutații, studiile sînt încă destul de imprecise și afirmațiile făcute țin în mare parte de domeniul ipotezei de lucru. Un fapt extrem de important este însă observația că o serie întregă de afecțiuni cu scăderea imunoglobulinelor recunosc o transmitere genetică legată de cromozomul X, deci ar fi determinate prin mutații apărute pe acest cromozom. Or, după cum am arătat în subcapitolul „Alotipurile imunoglobulinelor umane”, genele ce controlează lanțurile H și cele ce controlează lanțurile L nu sînt situate pe cromozomii de sex. Care este deci factorul genetic situat pe cromozomul X și cum influențează el direct sinteza tuturor claselor și subclaselor de imunoglobuline?

Răspunsurile la aceste întrebări nu sînt încă lămurite. S-ar putea ca pe acest cromozom să se găsească o genă reglatoare care să controleze la distanță, prin intermediari citoplasmatici de tip represori, exprimarea fenotipică a genelor autosomale ce controlează sinteza lanțurilor L și H.

## BIBLIOGRAFIE

- ASKONAS B.A., WILLIAMSON A.R., 1969, *Antibiotica et Chemotherapia*, **15**, 64.
- AXELSSON U., HÄLLEN J., 1966, *Acta med. scand.*, **179**, Suppl. 445, 97.
- BAGLIONI C., 1963, în *Molecular Genetics*, sub red. J.H. Taylor, Acad. Press, New York, partea I, p. 405.
- BARTH F.W., ASOFSKY R., LIDDY T., TANAKA Y., ROWE S.D., FAHEY L.J., 1965. *Amer. J. Med.*, **39**, 319.
- BERNIER G.M., 1970, *Progr. Allergy*, **14**, 1.
- BLAKE N.N., 1966, *Austr. ann. med.*, **15**, 162.
- BURCH P.R.J., 1963, *Lancet*, *7293*, 1253.
- BURCH P.R.J., 1964, *Lancet*, *7357*, 479.

- BURCH P.R.J., ROWELL M.R., 1963, *Lancet*, 7306, 507.
- BURCH P.R.J., ROWELL M.R., 1966, *Lancet*, 7455, 170.
- BURTIN P., BUFFÉ D., GRABAR P., 1964, *Ann. Inst. Pasteur*, **106**, 519.
- DAMMACO F., CLAUSEN J., 1966, *Acta med. scand.*, **179**, 755.
- EPSTEIN W.L., FUDENBERG H.H., REED B.W., BADER E., SELDGWICK R.P., 1966, *Int. Arch. Allergy*, **30**, 15.
- FINEGOLD J., FAHEY J.L., GRANGER H., 1967, *J. Immunol.*, **99**, 839.
- FRANKLIN E.C., 1971, in *Progress in Immunology*, sub red. B. Amos, Acad. Press, New York, p. 745.
- FUDENBERG H., FRANKLIN L.C., 1963, *Ann. intern. Med.*, **58**, 171.
- FULGINITI W.A., HATHAWAY W.E., PEARLMAN D.S., BLACKBURN W.R., REIQUAM C.R., GITHENS J.H., CLAMAN H.N., KEMPE C.H., 1966, *Lancet*, 7453, 5.
- GAVRILESCU N., SULICA A., GHYKA Gr., 1969, in *Cercetări de genetică*, Edit. didactică și pedagogică, București, p. 68.
- GOOD A.R., BIGGAR D.W., PARK H.B., 1971, in *Progress in Immunology*, sub red. B. AMOS, Acad. Press. New York, p. 699.
- HITZIG W.H., WILLI H., 1961, *Schweitz. med. Wschr.*, **91**, 1625.
- IMHOF J.W., BOLLIEUX R.E., MUH N.A., POEN H., 1966, *Acta med. scand.*, **179**, Suppl. 445, 102.
- LEONHARDT T., 1964, *Acta med. scand.*, **176**, Suppl. 416, 5.
- LEVIN W.C., RITZMAN S.E., 1965, *Annu. Rev. Med.*, **16**, 187.
- MCKUSICK Y.A., GROSS H.F., 1966, *J. amer. med. Ass.*, **195**, 1739.
- MELLORS R.C., 1966, *Blood*, **27**, 871.
- OPPENHEIM J.J., BARLOW M., WALDHAM A.T., BLACK B.J., 1966, *Brit. med. J.*, **2**, 330.
- OSSERMAN F.F., 1964, *Ann.N.Y., Acad. Sci.*, **113**, 627.
- PETERSON R.D.A., COOPER M.D., GOOD R.A., 1965, *Amer. J. Med.*, **38**, 579.
- PETERSON R.D.A., COOPER M.D., GOOD R.A., 1966, *Amer. J. Med.*, **41**, 342.
- POTTER M., KUFF E.L., 1964, *J. mol. Biol.*, **9**, 537.
- PRAHL J.W., 1967, *Nature*, **215**, 1386.
- RITZMANN S.E., LEVIN W.C., 1968, in *Laboratory Notes*, sub red. H.R. DETTELBACH și S.E. RITZMANN, Hoechst Pharmaceutical Co., Kansas City, p. 9.
- ROCKEY H.J., HANSON A.L., HEREMANS F.J., KUNKEL G.H., 1964, *J. Lab. clin. Med.*, **63**, 205.
- ROITT I.M., GREAVES M.F., TORRIGIANI G., BROSTOFF J., PLAYFAIR J.H.L., 1969, *Lancet*, 7616, 367.
- ROSEN F.S., GOTOFF S.P., CRAIG J.M., RITCHIE J., JANEWAY C.A., 1966, *New Engl. J. Med.*, **272**, 18.
- ROSEN F.S., HUTCHISON G.B., ALLEN F.M., 1965, *Vox Sang.*, **10**, 729.
- SANGER R., RACE R.R., 1963, *Lancet*, 7286, 859.

SELIGMAN M., 1966, *Acta med. scand.*, **179**, Suppl. 445, 140.

SELIGMAN M., RAMBAUD J.C., 1969, în *Topics in basic Immunology*, sub red. M. SELA și M. PRYWES, Acad. Press, New York, p. 17.

SIEGAL F.P., PERNIS B., KUNKEL H.G., 1971, *Eur. J. Immunol.*, **1**, 482.

SPENGLER G.A., LIEBNER H. RIVA G., 1966, *Acta med. scand.*, **179**, Suppl. 445, 132.

STIEHM E.R., McINTOSH R.M., 1967, *Clin. exp. Immunol.*, **2**, 179.

\* \* O.M.S., 1968, *Aspects génétiques de la réponse immunitaire*, Série de rapports techniques, 402.

## VI

Baza genetică a proceselor  
de autoagresiune

După cum s-a arătat în primul capitol, din punct de vedere imunologic macroorganismele reacționează exclusiv față de macromoleculele sau de celulele străine, în mod normal orice compus autolog nefiind imunogen în raport cu propriul lui organism. De asemenea, s-a arătat că odată constituită aria „selfului”, în cursul dezvoltării ontogenetice a sistemului imun, aceasta se menține constantă în cursul vieții macroorganismului luat în considerare.

După izolarea și menținerea *in vitro* a unui compus autolog, în condiții în care acesta nu-și modifică structura chimică, el este recunoscut ca atare după o perioadă de timp variabilă. Astfel, gammaglobulina de cobai congelată este recunoscută drept self de către celulele exsudatului peritoneal (polimorfonucleare) ale aceluiași cobai, după o perioadă de 90 de zile, echivalentă cu 30 de generații leucocitare, de la izolarea compusului autolog din organism (Gavrilescu și colab., 1969 a).

În ce privește liniile limfoplasmocitare formatoare de anticorpi, așa după cum s-a arătat, dezvoltarea ontogenetică a sistemului imun implică într-o primă etapă un proces de diferențiere a celulelor primitive nereactive la antigen în celule imunologic competente reactive la antigen (antigen-sensitive cells). Fiecare celulă derivată din acest proces va fi potențial capabilă să producă anticorpi, față de un singur determinant antigenic, clona derivată prin proliferarea acestei celule menținând indefinit această specificitate.

Totalitatea clonelor derivate prin acest proces de hipervariabilitate, pe care l-am denumit inițiere (commitment), va putea răspunde prin declanșarea unei reacții imune și împotriva antigenelelor proprii. Pentru a preveni aceasta, procesul de inițiere decurge *concomitent* cu un proces de *selecție* în cursul căruia clonele corespunzând unor determinanți antigenici proprii sînt „funcțional paralizate”, deci sînt împiedicate să prolifereze și să declanșeze răspunsul imun (Jerne, 1971).

Autoagresiunea reprezintă un proces biologic, care în esență se traduce prin elaborarea unui răspuns imun îndreptat împotriva anumitor componente autologe ce în mod normal nu posedă capacitate antigenică în raport cu organismul respectiv, fiind incluse în aria selfului sau separate prin bariere biologice de circuitul sanguin și deci de sistemul implicat în recunoașterea imunologică.

Ca urmare, autoagresiunea poate fi determinată prin două modalități :

a) Fie prin apariția sau prin alterarea unor macromolecule proprii care capătă un aspect deosebit de macromoleculele existente în momentul ontogenetic, când în organism sînt selectate și eliminate funcțional clonele interzise. Este cazul proceselor de autoagresiune ce apar prin alterarea unor compuși autologi, ca urmare a unor infecții bacteriene sau virale, cum ar fi anumite tipuri de glomerulonefrite.

Se consideră, de asemenea, că procesele de îmbătrînire sînt însoțite de un proces de autoagresiune apărut prin sinteza defectuoasă a unor proteine autologe.

Recent, Iverson și Lindenmann (1972) au arătat că dacă se imunizează șoarecii cu un extract de ficat alogenic (provenind deci de la o linie de șoareci genetic diferită), aceste animale vor produce anticorpi antificat care au un caracter de auto-anticorpi, deoarece precipită specific cu extracte apoase din propriul țesut hepatic.

Lucrările acestor autori demonstrează deci că un compus autolog poate deveni imunogen, dacă în momentul imunizării acesta este chimic legat la un alt compus alogenic, deci imunogen prin el însuși. Cu alte cuvinte, complexul macromolecular extras din ficat se comportă ca un complex haptene-purtător, în care fragmentul echivalent haptenei este reprezentat de macromoleculele specifice țesutului luat în considerare (ficat), în timp ce fragmentul echivalent purtătorului este reprezentat de antigenele de *transplantare* deosebite de la o linie de șoareci la alta.

Răspunsul imun elaborat în aceste condiții este un răspuns dependent de timus, în care stimularea celulelor T de către antigenele de transplantare induce prin cooperarea T—B sinteza de anticorpi antițesut propriu, ficat, la nivelul unor celule B care în condiții normale nu puteau fi stimulate.

b) Fie prin procesele care alterează sensibilitatea clonelor interzise la inhibiția indusă de compușii autologi. Ca urmare, aceste clone își vor redobîndi activitatea și vor reacționa prin producerea de anticorpi împotriva macromoleculelor propriului organism. Modificări de asemenea natură vor trebui să persiste însă timp îndelungat

la nivelul mai multor generații ale clonei interzise pentru a putea explica astfel durata lungă și stabilitatea proceselor de autoagresiune. Teoretic, deci, ele ar trebui asimilate cu evenimente de ordin mutațional (Gavrilescu și colab., 1969).

Există o serie de constatări experimentale care îndreptățesc afirmația că mutațiile ce stau la baza bolilor de autoagresiune pot să apară fie pe linie somatică, fie pe linie germinativă. Un exemplu tipic al unor asemenea modificări ale mecanismului de apărare imunologică, apărute ca urmare a unei mutații somatice spontane, sînt diversele manifestări autoimune prezente la linia de șoareci NZB (Burnet, 1964; Frion și Teague, 1964; de Wries și Hijmans, 1966; Hicks și Burnet, 1966). Modificările precoce care apar în timusul acestor animale argumentează că mutația somatică ce a declanșat redeșteptarea unor clone „interzise” a avut loc la acest nivel. Leziuni similare apar la nivelul timusului și la om în lupusul eritematos (L.E.) sau în miastenia gravă, boli cert autoimune (Mackay și colab., 1964; Burnet și Mackay, 1965).

Ca argumente suplimentare în favoarea faptului că procesele autoimune iau naștere prin mutații somatice care afectează stabilitatea clonelor interzise, cităm :

— asocierea frecventă a afecțiunilor limfo-proliferative cu manifestări autoimune (Peterson și Good, 1963; Dameshek, 1966; Holmes și Burnet, 1966);

— asocierea frecventă în același individ a mai multor boli cu caracter autoimun (Peterson și Good, 1963);

— asocierea frecventă a bolilor autoimune cu alte perturbări ale mecanismelor de apărare imunologică, cum ar fi modificări cantitative și calitative ale imunoglobulinelor (Wolf, 1963; Peterson și colab., 1965; Cruchaud și colab., 1966).

Burch (1963), (1964) și Burch și Rowell (1963), (1966), au constatat, pe baza unei analize statistice, mai multe caracteristici comune pentru o serie de afecțiuni cu componentă cert autoimună, cum ar fi lupusul eritematos, tiroidita Hashimoto sau poliartrita inflamatoare (P.C.E.).

Astfel, pentru o anumită boală, proporția de indivizi afectați dintr-o populație de o anumită vîrstă (incidența specifică de vîrstă) crește odată cu creșterea vîrstei. Analiza curbei de creștere arată că aceste reacții autoimune apar prin acumularea unor evenimente discrete, rare, a căror probabilitate medie de apariție constantă în timp pledează pentru identificarea lor cu mutații spontane somatice.



Panta curbei de creștere în acest caz ar indica numărul de mutații somatice, deci numărul de clone interzise redeșteptate, necesare pentru a determina apariția bolii autoimune.

Calculul raportului de sexe (sex-ratio) în aceste afecțiuni arată că raportul femeii/bărbați este egal cu 2.

Acest raport pledează pentru afirmația că mutațiile somatice spontane ce duc la redeșteptarea clonei interzise sînt situate pe cromozomul X și sînt dominante.

Dat fiind că femeile posedă acest cromozom în dublu exemplar, șansa apariției unei asemenea mutații este de două ori mai mare decît la bărbați, care au acest cromozom într-un singur exemplar. Mutația avînd un caracter dominant, se înțelege că afectarea măcar a unuia din cei doi cromozomi din genomul femeilor este suficientă pentru determinarea procesului de autoagresiune.

La bărbați, în schimb, neexistînd decît un singur cromozom X, rezultă că apărarea imunologică prin sinteză de anticorpi va fi mai redusă, dacă pe acest cromozom se găsesc situate locusuri care controlează sinteza anticorpilor. Acest lucru este confirmat prin constatarea că mortalitatea prin boli infecțioase este mai mare la bărbați decît la femei. Astfel, raportul mortalității bărbați/femei este întotdeauna supraunitar, în Anglia fiind de 2,13, în Danemarca de 1,20, în Japonia de 1,35 și populația albă din S.U.A. de 2,12.

Creșterea frecvenței dereglărilor autoimune în raport cu vîrsta, precum și o valoare similară a raportului de sexe au fost descrise și de alți autori la om (Peterson și Good, 1963; Leonhardt, 1964; Williams și colab., 1964), pentru poliartrita inflamatoare (P.C.E.), lupusul eritematos, anemia pernicioasă, și la animale (Frion și Teague 1964; Burnet 1965 a). Este însă foarte probabil că și anumiți factori autosomali controlează răspunsul imun prin sinteza de anticorpi. Mutațiile somatice incriminate în apariția bolilor de autoregresiune pot fi spontane sau induse de diverse agenți din mediul înconjurător.

Există astfel o serie de observații care arată că procesele de autoregresiune apar sau se intensifică în urma unor iradiieri intense (Editorial, 1966).

Majoritatea bolilor autoimune recunosc însă și o transmitere ereditară din generație în generație, fapt care îndreptățește afirmația că există și mutații apărute pe liniile germinative al căror efect

va fi dereglarea homeostaziei imunologice. Această concluzie este susținută de următoarele observații :

— Incidența reacțiilor autoimune este mult mai frecventă în cadrul anumitor familii umane, fapt semnalat pentru lupusul eritematos, poliartrita cronică evolutivă (Leonhardt, 1964; Vasey, 1965; Joseph și Zarafonietis, 1965), anemia hemolitică autoimună (Dreyfus, 1964), anemia pernicioasă (Peterson și Good, 1963; Veldek și colab., 1964), tiroidita Hashimoto (Hall și colab., 1964), sau în cadrul anumitor linii pure de animale, cum ar fi șoarecii liniei NZB (Holmes și Burnet, 1964; Burnet, 1965 a, b) și BSVS (Boehme, 1965) sau cobaii Hartley (MacMaster și colab., 1965).

— Studii pe gemeni arată o concordanță care variază în ordine descrescândă de la gemenii monozi-goți la cei dizigoți și în fratriile fără gemeni (Peterson și Good, 1963; Joseph și Zarafonietis, 1965; Osborne și Simeno, 1966).

— S-au descris frecvent boli autoimune asociate cu aberații cromozomiale, cum ar fi sindromul Turner (cariotip X0), sindromul Down (trisomie 21) (Fialkow, 1964) sau sindromul Klinefelter (cariotip XXV) (Burch, 1963).

Veldek și colab., (1964) au arătat că mutația germinativă care determină anemia pernicioasă are un caracter dominant și o penetranță incompletă. Este deci probabil că mutația somatică incriminată în reactivarea clonelor interzise apare în mod preferențial la indivizii cu o predispoziție constituțională, transmisibilă ereditar, predispoziție datorită unei mutații germinative.

Predispoziția genetică față de boli autoimune a fost demonstrată fără posibilitate de îndoială la anumite linii de animale. Astfel, numai anumite linii pure de șoareci fac anemii hemolitice autoimune sau glomerulonefrite. Argumentul cel mai puternic în favoarea acestei afirmații a fost furnizat de studiul liniei de șoareci NZB. Prin încrucișări repetate cu alte linii s-a constatat că în genomul liniei NZB există o alelă mutantă, codominantă cu alela normală, care determină un teren transmisibil ereditar, pe fondul căruia apar spontan cu frecvență mare, prin mutații somatice, alterări autoimune (Holmes și Burnet, 1964; 1966; Burnet, 1965 b).

Mai mult decât atât, se constată în acest caz un pronunțat efect de doză, afecțiunile homozigoților pentru această alelă fiind mult mai intense și precoce decât formele contractate de heterozigoți. Astfel, dacă se încrucișează linia de șoareci NZB, presupusă homozigotă pentru alela ce controlează procesul autoimun, cu linia NZW homozigotă pentru alela normală, hibridii  $F_1$  rezultați prezintă foarte

des sindromul autoimun, dar acesta apare mult mai târziu și sub o formă clinică mult mai blîndă decît în linia NZB.

În esență, particularitățile genetic controlate care ar putea explica predispoziția unui macroorganism la autoimunitate pot fi împărțite, după O.M.S. (1968), în :

- a) variații în producerea de autoanticorpi sau de celule imunologic competente reactive la antigenele proprii ;
- b) variații în reactivitatea țesuturilor țintă.

Determinismul genetic al primei particularități a fost pus în evidență prin inducerea la șobolan a nefropatiei autoimune după imunizarea cu proteine renale omologe. Watson și Dixon (1966) au arătat că la șobolanii liniilor Sprague-Dawley sau Lewis boala apare rapid, în timp ce șobolanii liniei Buffalo nu fac nefrită și nici nu se pot detecta în serul lor anticorpi antiproteinele renale injectate.

În ce privește inducerea encefalomielitei alergice experimentale, Paterson (1963) a constatat că șobolanii liniei Lewis sintetizează anticorpi fixatori de complement (avînd capacitatea protectoare) și nu fac boala după inocularea de țesut nervos, în timp ce alte linii de șobolani nu produc anticorpi protectori și contractează rapid encefalomielita.

În ce privește diferențele genetic controlate în reactivitatea țesuturilor țintă, acestea au fost investigate experimental prin inocularea la animale a unor cantități mari de anticorpi anti un țesut oarecare. Dacă se inoculează unui animal, de exemplu, anticorpi antirinichi, aceștia determină o nefrită. Cu toate acestea sensibilitatea diverselor specii la anticorpii anti-țesut propriu este foarte variabilă. Astfel, în timp ce oaia este foarte sensibilă, contractînd rapid nefrite, șobolanul are o sensibilitate intermediară și șoarecele este rezistent.

Sensibilitatea la nefrită variază însă în funcție de linia genetică a șoarecilor. Astfel, șoarecii BALB/c sînt extrem de sensibili, prezentînd o nefrită rapidă și foarte gravă, animalele liniei AKR au o reactivitate intermediară, pe cînd șoarecii liniei A/Jax nu fac boala deloc (Unanue și colab., 1967).

Nu se știe încă exact prin ce mecanism alela „autoimună” controlează declanșarea afecțiunii clinice. S-au dat pînă în prezent mai multe explicații (O.M.S., 1968 ; Fudenberg, 1971), printre care notăm :

- 1) Posibilitatea de a exista o sensibilitate genetică față de un agent infecțios oarecare, de exemplu, un virus care prin interacțiu-

nea cu țesuturile gazdei determină antigene noi ce vor declanșa boala autoimună (vezi în aceeași ordine de idei, nereactivitatea imunologică la anumite antigene, controlată genetic la anumite linii pure (Cap. IV).

Astfel, Baker și Hotchin (citați după O.M.S., 1968) au arătat că infecția persistentă cu virusul coriomeningitei limfocitare determină leziuni renale caracteristice unei boli autoimune. Incidența crescută a afecțiunilor autoimune la indivizi cu defecte genetice în sinteza imunoglobulinelor (hipogammaglobulinemii sau agammaglobulinemii) reprezintă un argument în plus în favoarea acestui punct de vedere; de asemenea, creșterea incidenței proceselor autoimune, la animale experimentale iradiate sau timectomizate, la care deci procesele de reactivitate imunologică sînt puternic lezate.

După acest punct de vedere, mutațiile survenite la nivelul liniei germinative ar reprezenta o condiție necesară, dar nu suficientă, pentru apariția bolii, aceasta fiind „declanșată” în final de un agent exogen (bacterie, virus, iradiere, medicamente). Acești factori exogeni pot acționa fie prin antigenitatea lor încrucișată cu un țesut oarecare al gazdei, fie prin alterarea țesuturilor acesteia.

2) Constituția genetică ar putea favoriza direct alterarea (modificarea) antigenelor gazdei. Această degradare progresivă ar fi de așteptat să inducă boala autoimună la vârste mai avansate, tîrziu, după ce paralizia funcțională a clonelor ce produc anticorpi împotriva constituentilor proprii a fost înfăptuită.

3) Factorii genetici ar mai putea afecta direct răspunsul imun, mutațiile somatice survenite la nivelul clonelor „interzise” reactivînd funcționalitatea acestora.

## BIBLIOGRAFIE

- BOEHME D., 1965, Proc. Soc. exp. Biol. Med., **118**, 374.  
 BURCH P.R.J., 1963, Lancet, *7293*, 1253.  
 BURCH P.R.J., 1964, Lancet, *7357*, 479.  
 BURCH P.R.J., Rowell M.R., 1963, Lancet, *7306*, 507.  
 BURCH P.R.J., Rowell M.R., 1966, Lancet, *7455*, 170.  
 BURNET F.M., 1964, J.Path. Bact., **88**, 229.  
 BURNET F.M., 1965 a, Brit. med. J., **1**, 338.  
 BURNET F.M., 1965 b, Nature, **207**, 368.  
 BURNET F.M., MACKAY I.R., 1965, J. Path. Bact., **89**, 263.

- CRUCHAUD A., LAPERROUZA C., DUMITTAN S.M., FERREIR P.F., 1966, Amer. J. Med., **40**, 127.
- DAMESHEK H., 1966, Ann. N.Y. Acad. Sci., **135**, 436.
- DREYFUS B., 1964, Nouv. Rev. Franç. Hemat., **4**, 669
- FIALKOW Ph.J., 1964, Lancet, *7331*, 474.
- FRION G.J., TEAGUE P.O., 1964, Science, **143**, 1333.
- FUDENBERG H.H., 1971, în *Immunobiology*, sub red. R.A. Good și D.W. Fisher, Sinauer Associates Inc. Publishers Stamford, Connecticut, vol. II, p. 175.
- GAVRILESCU N., GHYKA GR., SULICA A., BONA C., 1969 a, în *Cercetări de genetică*, Edit. didactică și pedagogică, București, p. 557.
- GAVRILESCU N., SULICA A., GHYKA GR., 1969 b, în *Cercetări de genetică*, Edit. didactică și pedagogică, București, p. 68.
- HALL R., OWEN S.G., SMORT G.A., 1964, Lancet, *7351*, 115.
- HICKS J.D., BURNET F.M., 1966, J. Path. Bact., **91**, 461.
- HOLMES M.C., BURNET F.M., 1964, Heredity, **19**, 419.
- HOLMES M.C., BURNET F.M., 1966, Austr. J. exp. Biol. med. Sci. **44**, 235.
- IVERSON G.M., LINDERMAN J., 1972, Eur. J. Immunol., **2**, 195.
- JERNE N.K., 1971, Eur. J. Immunol., **1**, 1.
- JOSEPH R.R., ZARAFONETIS J.D., 1965, Amer. J. med. Sci., **249**, 190.
- LEONHARDT T., 1964, Acta med scand., **176**, Suppl. 416, 5.
- MACKAY I. R., MASSEL M., BURNET F.M., 1964, Austr. Ann. Med., **13**, 5.
- MACMASTER P.R.B., LERNER E.M., MÜLLER P.S., 1965, Science, **147**, 157.
- OSBORNE D., SIMENO J., 1966, Brit. med. J., **1**, 1026.
- PATERSON P.Y., 1963, J. exp. Med., **117**, 755.
- PETERSON R.D.A., GOOD R.A., 1963, Annu. Rev. Med., **14**, 1.
- PETERSON R.D.A., COOPER M.D., GODEL R.A., 1965, Amer. J. Med., **38**, 579.
- UNANUE E.R., MARDINEY M.R., DIXON F.J., 1967, J. Immunol., **98**, 609.
- VASEY H., 1965, Path. Biol., **13**, 13.
- VELDEK K., ABELS J., ANDERS A.P.J.G., ARENDS A., HOEDEMACKER J. PH., NIVEWEG O.H., 1964, J. Lab. clin. Med., **64**, 177.
- WATSON J.J., DIXON F.J., 1966, Proc. Soc. exp. Biol., N.Y., **121**, 216.
- WILLIAMS E.D., ENGEL E., FORBES A.P., 1964, New Engl. J. Med., **270**, 805.
- WOLF J.K., 1963, J. Lab. clin. Med., **61**, 230.
- WRIES M.J. de, HIJMANS W., 1966, J. Path. Bact., **91**, 487.
- \* \* \* Editorial, 1966, Lancet, *7453*, 476.
- \* \* \* O.M.S., 1968, *Aspects génétiques de la réponse imunitaire*, Série de rapports techniques **402**, p. 40.

## VII

Deficiențe ereditare  
ale complementului

Sistemul complement (C) la om este format din 9 componente (C1—C9) (W.H.O., 1970). Componenta C1, la rîndul ei, este alcătuită din 3 subcomponente, C1q, C1r și C1s. Toate cele 9 componente există în serul normal sub formă inactivă, reprezentînd 10% din globulinele serice. Diversele componente ale complementului acționează secvențial în felul următor :

Complexul antigen (eritrocit) — anticorp (sau prescurtat EA) inițiază activarea complementului. Pentru aceasta este suficientă o singură moleculă de IgM sau două molecule de IgG.

Complexele antigen-anticorp activează cel mai eficient complementul atunci cînd sînt amestecate în proporție aproximativ echivalentă. În cazul în care în complexul EA apar imunoglobuline formate artificial din două lanțuri ușoare și două lanțuri grele, avînd un singur situs combinativ antieritrocit, nu se poate produce rețeaua antigen-anticorp-antigen... și nici activarea complementului (C).

Etapele de activare a complementului decurg secvențial după cum urmează (Müller-Eberhard, 1969 ; Humphrey și White, 1970 ; Herbert și Wilkinson, 1971) (fig. 13) :

— Formarea complexului EA—C1 activat (prescurtat EAC1a). În primul stadiu, C1q se leagă de porțiunea Fc a lanțului greu, fiind urmată de C1r și C1s. Legarea se produce în prezența ionului de calciu.

Subcomponenta C1s din plasmă este o proesterază inactivă.

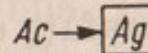
Combinarea C1 cu imunoglobulina inițiază un proces intramolecular care determină activarea enzimei C1s, esterază activă, responsabilă de inițierea reacțiilor următoare. Rolul exact al C1q și C1r în acest proces este neclar (Cooper, 1971).

Pe lîngă activitatea esterazică, subcomponenta C1s are și capacitatea de a reacționa specific cu C4 și C2.

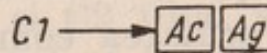
**ACTIVITĂȚI  
PROMOVATE**

**COMPONENTELE  
COMPLEMENTULUI**

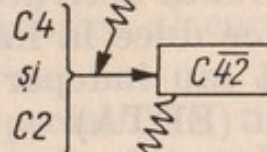
*Anticorpul se combină cu antigenul  
pe suprafața celulei*



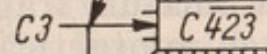
*Prima componentă a complemen-  
tului devine legată la acest complex  
antigen-anticorp și ca urmare se  
eliberează o estereză activă (C1)*



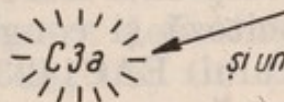
*Aceasta acționează asupra  
componentelor următoare  
care devin ele însele active  
și se leagă de suprafața celulei*



*Complexul produs (convertaza  
triptică) scindează acum C3,  
producând un fragment liber*



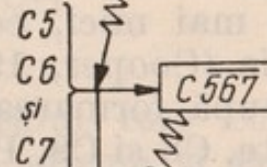
**C3a**  
Anafilatoxina  
Chimiotaxie



**C423**  
Imunoaderență  
Fagocitoză

*și un  
complex (C423) legat de celulă,  
ambele având activități importante*

*Complexul acționează asupra  
altor componente ale comple-  
mentului activându-le și pro-  
ducând un alt fragment activ*

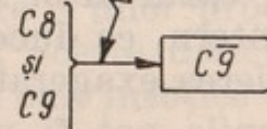


**C5a**  
Anafilatoxina  
Chimiotaxie



**C9**  
Liza celulară

*Ultimele două componente sînt  
acum activate și celula este lizată*



Suprafața celulei

~~~~> acțiune enzimatică

Cn componenta complement activată

Fig. 13. — Secvența reacțiilor diverselor componente ale complementului (după Herbert și Wilkinson, 1970).

— Formarea complexului EAC14: C1a sub forma unei esteraze active transformă C4 într-o formă activată, labilă, care se poate lega de suprafața eritrocitului sau de un alt complex antigen-anticorp. Componenta C4 activată se poate inactiva din nou dacă nu s-a legat imediat după activarea sa.

— Formarea complexului EAC142: componenta C2 activată prin interacțiunea cu C1a este fixată de C4 (Pooley și Müller-Eberhard, 1968). C2 este probabil o esterază care se inactivează rapid.

Legarea C4 și C2 la suprafața celulei-antigen necesită ioni de  $Mg^{2+}$ . Odată activate C4 și C2, acestea continuă singure secvența de reacții ce duce la liza celulei, C1a nemaifiind necesară. Ea poate fi pierdută sau îndepărtată artificial prin tratare cu etilendiamin-tetraacetat (EDTA).

— Formarea complexului EAC1423: componenta C3 este cea mai abundentă în plasma umană. Complexul enzimatic C42 desface C3 într-un fragment mai mic — anafilatoxina —, care are și acțiune chimiotactică, și un fragment mai mare care se leagă de membrană (Cooper, 1971). Complexul EAC1423 joacă un rol important în imunoaderență, fagocitoză și conglutinare.

— Formarea complexului EAC1423567: există puține date privind felul în care acționează componentele C5, C6 și C7, toate trei reprezentând o unitate funcțională. Complexul EAC1423 acționează asupra acestei unități funcționale, determinând trecerea ei într-o stare activă. Componenta activă C5a, prin clivarea în două fragmente mai mici, contribuie la producerea anafilatoxinei și la chimiotaxie (Cooper, 1971; Vogt și colab., 1971).

— După formarea EAC1423567, urmează activarea ultimelor componente, C8 și C9. Până în prezent există încă foarte puține date asupra rolului lor în complex. În cazul eritrocitului, fixarea ultimelor componente provoacă umflarea osmotică și spargerea acestuia, pe când în cazul altor celule-antigen se produce o dezorganizare a mediului intern, ce duce la ruperea lizozomilor și distrugerea celulei fără tumefierea exagerată.

Leziunile pot fi văzute la microscopul electronic sub forma unor găuri în membrana eritrocitului, a celulei tumorale sau a bacteriilor gramnegative.

Ele sînt puse în legătură cu ruperea stratului lipidic continuu de pe membrane, datorită anumitor alterări ale componentelor fosfolipidice, dar în general mecanismul acestor modificări este necunoscut.



În serul uman există inhibitori naturali ai complementului, dintre care cel mai bine caracterizat este inhibitorul C1-esterazei reprezentat de o  $\alpha_2$ -neuramin-glicoproteină termolabilă. Inhibitorul acționează asupra subcomponentei C1s și inhibă reacția complexului C1 activat cu C4 și C2.

Reacția complexului C1 activat cu C4 și C2 fiind mult mai rapidă comparativ cu reacția dintre C1-esterază și inhibitorul său, în mod normal nu are loc inhibarea și reacția componentei C1 cu C4 și C2 se poate produce.

S-au descris încă doi inhibitori naturali, unul termostabil, al componentei C3 și al doilea termolabil, inhibitor al componentei C6 (Humphrey și White, 1970).

În cercetările descrise în literatura de specialitate, toate componentele ce constituie sistemul complement sînt identificate fie prin funcția lor, în cazul de față activitatea hemolitică, fie prin imunoelectroforeză, punînd astfel în evidență structura și implicit antigenitatea specifică a proteinei ce alcătuiește fiecare componentă în parte (Ruddy și colab., 1970).

Se cunosc pînă în prezent deficiențe controlate ereditar pentru componentele C1, C2, C3, C4, C5, C6 și pentru inhibitorul C1-esterazei.

## DEFICIENȚE ALE SISTEMULUI COMPLEMENT LA OM

La omul sănătos, nivelul complementului este constant și caracteristic speciei. Același lucru se poate afirma și pentru alte specii de mamifere (iepuri, cobai, șoareci) (W.H.O., 1970).

Deficiențele complementului descrise la om pot fi determinate de factori genetici sau pot să apară ca urmare a unor procese patologice dobîndite în cursul existenței. Uneori, aceste deficiențe evoluează asimptomatic, în timp ce în alte cazuri sînt însoțite de perturbări clinice.

Cercetîndu-se serurile indivizilor ereditar deficitari în componenta C2, s-a constatat la persoanele homozigote lipsa totală sau activitatea foarte redusă (0,5—4% din activitatea normală) a acestei componente; în schimb, la persoanele heterozigote activitatea determinată a fost de 20—60% față de activitatea C2 din serul normal (Pooley, 1967; Cooper și colab. 1968; Klemperer, 1968).

Analiza imunochimică a acestei componente a confirmat reducerea sau lipsa proteinei C2 din serul acestor indivizi. Alte cercetări ce au urmărit activitatea de conversie a EAC14, precum și aspectul imunoelectroforetic au arătat că din căsătoria a doi heterozigoți au rezultat 9 copii, printre care s-au găsit: 2 indivizi homozigoți pentru C2 (normali), 3 indivizi heterozigoți și 3 copii homozigoți deficienți pentru C2 (un copil nu a fost investigat).

Aceste constatări permit concluzia că deficiența pentru C2 se transmite ereditar ca un caracter autosomal recesiv (Ruddy și colab., 1970).

Investigații făcute pe un ser provenind de la un individ nou-născut, homozigot pentru deficiența C2, și pe serul matern deficitar în formă heterozigotă au dus la constatarea că această componentă nu poate trece prin placentă.

Deficiența componentei C2 nu afectează nici una dintre celelalte componente sau subcomponente și nu este asociată cu vreun defect decelabil în ceea ce privește rezistența gazdei la infecții intercurrente (Ruddy și colab., 1970).

Se știe că imunoaderența, eritrofagocitoza și bacterioliza cer prezența primelor patru componente ale complementului, iar pentru elaborarea factorului chemotactic necesar leucocitelor polimorfonucleare se cere prezența și activitatea primelor șapte componente (Klemperer și colab., 1967).

Drept urmare, serurile deficitare pentru componenta C2 sînt deficitare și în ceea ce privește imunoaderența și bacterioliza.

Serul de la indivizii homozigoți pentru deficiența C2 are 10—15% din activitatea de imunoaderență a serului normal, iar serul de la indivizii heterozigoți prezintă aproximativ 50% din activitatea normală (Gewurz și colab., 1966; Klemperer și colab., 1967).

Defecțiunea componentei C2 a complementului apare ca rezultatul unei biosinteze proteice alterate și nu al producerii unui inhibitor seric sau al biosintezei unei forme de C2 active, dar instabile (Ruddy și colab., 1970).

În ceea ce privește componenta C3, capacitatea electroforezei în gel de amidon sau în agaroză de a separa amestecuri de proteine a dus la descoperirea în serul uman a unui polimorfism genetic determinat al acestei componente. S-a constatat astfel existența unor variate alotipuri ale componentei C3 care diferă în cursul electroforezei prin încărcătura electrică de suprafață, la pH 6,8, prezentînd viteze de migrare diferite.

În serurile a 113 caucazieni sănătoși s-au observat șase fenotipuri diferite ale fracțiunilor proteice corespunzătoare C3. Aceste fenotipuri pot fi explicate prin moștenirea codominantă autosomală a patru alele deosebite ale unui aceluiași locus, dintre care două alele (1 și 2) apar mai frecvent și două alele (3 și 4) apar relativ mai rar. S-a mai descris și o a cincea alelă rară, probabil prezentă în populația studiată și care migrează electroforetic mai rapid. Alelele locusului C3 au fost notate C3<sup>1</sup>, C3<sup>2</sup>, C3<sup>3</sup>, și C3<sup>4</sup> (Azen și Smithies, 1968).

Alți autori au identificat 7 alele codominante, corespunzând celor 7 alotipuri, determinate prin mobilitatea electroforetică (Alper și colab., 1968; Azen și Smithies, 1968).

Imunoelectroforeza executată cu serul de la heterozigoți prezintă un arc de precipitare specific în regiunile corespunzătoare componentei C3; în schimb, arcurile de precipitare lipsesc în serul deficitar pentru C3.

Într-o familie ai cărei membrii aveau componenta C3 la jumătate din cantitatea normală, moștenită ca un caracter autosomal codominant, prin determinarea alotipului fracțiunii C3 s-a putut constata că la indivizii heterozigoți afectați se exprimă o singură alelă. Fenotipurile nou-născuților au diferit în două cazuri de fenotipul mamei. Aceasta arată că proteina C3 din sângele nou-născuților a fost sintetizată de copil și nu obținută de la mamă pe cale transplacentară.

Diferitele alotipuri ale componentei C3 s-au dovedit a avea o acțiune hemolitică și de imunoaderență identică.

În ce privește componenta C4, Torisu și colab. (1970) au descris 37 de indivizi ce prezentau o activitate hemolitică scăzută, din 42 000 de donatori de sânge.

Aplicând în aceste cazuri metodele de imunodifuzie în gel și de imunoelectroforeză nu s-au constatat diferențe semnificative ale componentei C4 față de serurile normale.

Aceste observații sugerează că, spre deosebire de C2 și C3, proteina componentei C4 nu scade cu 50% în serurile deficitare; această proteină este însă alterată într-un mod care nu-i permite să-și exercite funcția hemolitică.

Drept urmare, în serul deficitar, C4 nu se poate lega la suprafața eritrocitului și nu determină activitate hemolitică. Activitatea serului deficitar a putut fi restabilită prin adaos de C4 normal purificat.

Nu se știe încă bine în ce măsură această deficiență a componentei C4 este determinată de factori genetici.

Recent, Miller și Nilsson (citați după Alper, 1971) au descris o familie ai cărei membri prezentau o susceptibilitate crescută la infecții stafilococice și cu germeni gramnegativi, determinată de o scădere a puterii fagocitare a leucocitelor. Această deficiență a fost corelată cu existența unei molecule C5 disfuncționale, care apărea ca un caracter familial.

Deficiențele de complement pot să apară însă asociate și cu alte boli umane, unele din aceste boli avînd un determinism genetic indiscutabil.

Astfel, Alper (1971) și Abramson și colab. (1971) au descris un bolnav cu *sindrom Klinefelter*, care prezenta o susceptibilitate crescută la infecții, datorată probabil faptului că  $1/2-3/4$  din componenta C3 se aflau în stare inactivă. Investigarea metabolismului C3 la bolnavul descris a arătat că, deși această componentă este sintetizată în ritm normal, totuși catabolizarea ei se face anormal de rapid.

În serul bolnavului menționat nu s-a putut pune în evidență inactivatorul C3.

*Edemul angioneurotic ereditar*. Pacienții suferind de această afecțiune sînt deficitari în inhibitorul C1-esterazei. Anumite cazuri de edem angioneurotic prezintă un conținut normal sau chiar crescut de proteină inhibitoare a C1-esterazei, dar această proteină este funcțional inactivă.

Serul persoanelor afectate posedă aproximativ 5—30% din activitatea inhibitorului din serul normal, restul proteinei fiind într-o stare inactivă (Donaldson și Evans, 1963; Davis și colab., 1968; Alper, 1971; Laurell și Mårtensson, 1971).

Bolnavii cu edem angioneurotic (Quinke) prezintă periodic acumulări de lichid de edem în diferite țesuturi și organe, boala fiind foarte periculoasă cînd este localizată la nivelul faringelui putînd provoca obstrucția traheei.

Afecțiunea se manifestă prin crize în cursul cărora în decurs de o oră sau chiar mai puțin apare un edem puternic al mîinii, al unui picior, al urechii sau al buzelor. Edemul poate dura de la o oră pînă la mai multe zile, apoi dispare.

În serul bolnavilor ereditar deficitari în inhibitorul C1-esterazei, în cursul crizelor, nivelul C1-esterazei urcă mult în ser, pro-

voând permeabilizarea capilarelor (Donaldson și Evans, 1963; Davis și colab., 1968).

Deficiența inhibitorului C1-esterazei este transmisibilă ereditar ca un caracter autosomal dominant și pare a fi foarte rar cîștigată *de novo*. Astfel, se citează cazul unei femei bolnave de edem angioneurotic ai cărei părinți nu prezentau tulburări clinice și aveau un nivel normal de inhibitor C1; în acest caz, deficiența a apărut probabil printr-o mutație spontană (Thorvaldsson și colab., 1969).

Persoanele afectate sînt heterozigote (Alper, 1971).

La bolnavii cu edem angioneurotic ereditar s-a observat și o activitate scăzută a componentelor C4 și C2 (Pooley, 1967). După unii autori, cauza scăderii activității C4 și C2 este activarea excesivă a C1-esterazei datorită lipsei inhibitorului său.

Drept urmare, serurile prezintă o activitate hemolitică și de imunoaderență foarte redusă (Donaldson și Evans, 1963).

Prin analiza imunoelectroforetică s-a putut dovedi că totuși serurile bolnavilor de edem angioneurotic prezintă arcurile de precipitare caracteristice componentei C4, întocmai ca și serurile normale. Această constatare sugerează că, cel puțin în anumite cazuri, există o diferență marcată între cantitatea de proteină C4, evidențiată prin antigenicitatea ei, și activitatea hemolitică a acestei proteine C4 funcțional inactive (Klemperer și colab., 1967; Torisu și colab., 1970).

*Lupusul eritematos*. În cursul acestei boli de sistem, condiționată de o predispoziție transmisibilă ereditar, nivelul complementului hemolitic este invariabil redus; în schimb apar la un nivel foarte înalt autoanticorpi antinucleoproteine și autoanticorpi ce determină leziuni renale.

În nefropatia lupică s-a constatat foarte frecvent scăderea activității complementului prin lipsa componentei C1.

De asemenea, titrul activității componentelor C2, C3 și C4 a fost găsit uneori sub nivelul serurilor normale de control (Townes și colab., 1965; Lagrue și colab., 1967; Pondman și colab., 1968).

La indivizii la care boala încă nu se manifestă, și deci imuno fluorescența nu pune în evidență anticorpii antinucleari, se constată totuși absența componentei C1.

În schimb s-a notat că inhibitorul C1-esterazei este în mod constant crescut.

După adăugarea componentei C1s la serul deficitar, activitatea hemolitică reapare, în timp ce adaosul de subcomponente C1q

sau/și C1r nu are nici un efect. Studii prin centrifugare în gradient de zaharoză a serurilor de bolnavi au confirmat prezența liberă în ser a C1q și C1r, în timp ce subcomponenta C1s nu a putut fi detectată (Pondman și colab., 1968).

În *ataxia telangiectazică*, la copii se constată un nivel semnificativ mai ridicat al complementului prin creșterea componentelor C1 și C4. Nu se cunoaște exact cauza acestor modificări. Se consideră că frecvența mare a infecțiilor pe care le prezintă acești bolnavi este datorată, în afară de creșterea anormală a nivelului componentelor C1 și C4, și unor tulburări imunologice intense ce afectează atât limfocitele timodependente, și deci răspunsul imun mediat de celule, cât și celulele producătoare de anticorpi (Nelson, 1969; Schöngut și colab., 1970).

Diferite modificări ale complementului pot apărea și în boli care nu sînt genetic controlate, cum ar fi: glomerulonefrita acută, în cursul căreia se observă valori scăzute ale componentelor C3 și C4, sau scleroza multiplă în plăci, unde mai ales în faza acută se constată o scădere a componentelor C1—C4 (Kuwert, 1968). În schimb, un nivel crescut al complementului poate apărea în faza acută a unor boli caracterizate prin modificări inflamatorii intense, cum ar fi reumatismul.

De asemenea s-a observat creșterea cantitativă a unor componente ale complementului în cursul infecțiilor cronice. Componenta C1 are un nivel înalt, mult crescut, în afecțiunile maligne sau în cursul numeroaselor infecții ce însoțesc imunopatiile (Schöngut și colab., 1970; Pozsgi, 1971).

## MODIFICĂRI GENETIC DETERMINATE ALE COMPLEMENTULUI LA ANIMALE

În serul diverselor specii de animale s-au constatat de asemenea deficiențe ale unor componente ale complementului.

La *șoareci* există un nivel caracteristic al activității hemolitice a complementului pentru fiecare linie consangvină.

Cercetări asupra urmașilor rezultați din încrucișări între diverse linii pure sugerează că nivelul complementului hemolitic este controlat prin mecanisme genetice.

Astfel, serul unor tulpini de șoareci consangvini este total lipsit sau prezintă diferențe marcate în conținutul  $\beta$ -globulinei notate de

unii autori HC (Erickson și colab., 1964), iar de alți autori MuB1 (Cinader și colab., 1964).

MuB1 este o euglobulină care reprezintă o componentă a sistemului complement al șoarecelui (Rosenberg și Tachibana, 1962, 1969; Unanue și Dixon, 1964; Unanue și Mardiney, 1967). Experiențele de dublă difuziune arată asemănarea imunologică dintre MuB1 și componenta C5 umană (Nilsson și Müller - Eberhard, 1967).

Absența proteinei respective este însoțită întotdeauna de o deficiență a activității hemolitice a complementului. Șoarecii deficițari în activitatea complementului pot răspunde imunologic prin sinteză de anticorpi față de această globulină care le lipsește, dacă sînt imunizați cu ser de șoarece care posedă MuB1. Proteina HC (MuB1) este cel mai puternic izoantigen cunoscut pînă acum la șoareci (Erickson și colab., 1964). Incapacitatea hemolizei constituie deci o eroare metabolică ereditară, care constă în deficiența sintezei acestei proteine.

Astfel, serurile unor tulpini consangvine de șoareci prezintă o activitate hemolitică a complementului redusă, sau nu prezintă deloc activitate hemolitică, cum ar fi, de exemplu, tulpinile DBA/JN, B<sub>10</sub>D<sub>2</sub>/Sn,,old'', sau A/Jax.

În schimb, serurile altor linii pure posedă activitate hemolitică normală, ca de exemplu, tulpinile B<sub>10</sub>D<sub>2</sub>/Sn,,new'', C<sub>57</sub>B<sub>4</sub>/10ScN sau B4/6. Prin încrucișări între tulpini de șoarece care posedă activitate hemolitică și tulpini ce nu posedă această activitate s-a dovedit că activitatea hemolitică se regăsește întotdeauna alături de antigenul MuB1.

În concluzie, ambii markeri sînt controlați de una și aceeași genă, deoarece dacă ar fi fost controlați de gene separate s-ar fi observat printre descendenți apariția de recombinanți care să aibă unul din caractere și nu pe al doilea (Rosenberg și Tachibana, 1962, 1969).

Antigenitatea MuB1, ca și activitatea complementară, reprezintă deci efectul unei singure proteine controlate de o singură genă notată HC, care apare în două forme alelomorfe ce determină fie prezența produsului (HC<sup>1</sup>), fie absența lui (HC<sup>0</sup>).

Există o relație între concentrația proteinei HC și numărul de forme alelice. Astfel, animalele homozigote (HC<sup>1</sup>/HC<sup>1</sup>) avînd două exemplare ale genei sintetizează de două ori mai multă proteină HC decît animalele heterozigote (HC<sup>1</sup>/HC<sup>0</sup>). Acest fenomen, denumit

efect genă/doză, se explică prin faptul că fiecare genă, în celulă, controlează sinteza unei cantități egale de proteină, așa încât două exemplare ale aceleiași gene vor determina o doză dublă a produsului sintetizat sub controlul lor (Dubiski și Cinader, 1966). Un fapt remarcabil este constatarea că două linii pure de șoareci, asemănătoare, DBA/2 și DBA/1, prezintă caractere cu totul diferite din punctul de vedere al activității hemolitice a complementului și al prezenței antigenului MuB1.

În timp ce prima tulpină nu are nici antigen, nici activitate hemolitică, cea de-a doua posedă ambele caractere. S-a constatat că la tulpina DBA, din care au derivat prin segregare tulpinile DBA/1 și DBA/2, 58% din indivizi posedau MuB1, iar 42% erau lipsiți de acest antigen (Cinader și colab., 1964). Pentru analiza naturii eredității, hibridii rezultați dintr-un părinte cu antigen MuB1 și un al doilea părinte fără acest antigen au fost încrucișați revers cu un animal lipsit de antigen. Părinții cu MuB1 au fost șoareci din tulpinile  $C_{57}B_4/6J$  sau  $C_{147}/J$ , iar părinții fără antigen MuB1 au fost șoarecii din tulpina A/J. Urmașii hibridi ai acestor împerecheri au fost încrucișați cu șoareci din tulpina A/J.

Încrucișările reverse au folosit un hibrid mascul și o femelă din tulpina A/J și respectiv un hibrid femelă încrucișată cu un animal mascul din tulpina A/J (Cinader și colab., 1964). Aceasta pentru că la tulpinile de șoareci consangvini, serul masculilor conține mai mult complement decât serul șoarecilor femele și deoarece conținutul MuB1 crește cu vârsta mai mult la masculi și mai puțin la femele (Cinader și colab., 1964; Nilsson și Müller-Eberhard, 1967).

Cercetându-se serurile acestor urmași rezultați din încrucișările reverse, prin metoda dublei difuzii în gel, s-a constatat prezența antigenului MuB1 într-o proporție de 50%; deficiența de antigen MuB1 se moștenește deci într-un mod unifactorial, printr-o singură genă autosomală dominantă.

O altă experiență constă din încrucișarea tulpinii  $B_{10}D_2$  „new” (linia nouă), ce are un nivel înalt de complement, cu linia  $C_3H/J$ , ce are un nivel foarte scăzut al activității hemolitice.

Șoarecii din generația  $F_1$  au o activitate hemolitică înaltă, caracteristică liniei  $B_{10}D_2$ , acest caracter fiind deci dominant față de caracterul complement scăzut. În generația  $F_2$ , valorile activității hemolitice segregă de la nivelul scăzut, caracteristic liniei  $C_3H/J$ , pînă la nivelul înalt, caracteristic liniei  $B_{10}D_2$  „new”, ceea ce confirmă



(transmiterea unifactorială, dominant autosomală, a acestui caracter (Rosenberg și Tachibana, 1962, 1969).

Animalele care posedă MuB1 nu sintetizează anticorpi specifici după imunizarea lor cu ser provenit de la alți șoareci purtători de MuB1. Spre deosebire de aceștia, animalele lipsite de acest antigen (avînd o activitate redusă a complementului) produc anticorpi anti-MuB1. Hibrizii obținuți din încrucișarea șoarecilor MuB1 pozitivi cu cei MuB1 negativi posedă MuB1 și sînt incapabili de a sintetiza anticorpi specifici împotriva acestei proteine. Dintre șoarecii rezultați din încrucișările reverse între acești hibridi și linia parentală MuB1, negativă, 50% posedă acest antigen și 50% nu posedă acest antigen. Este evident că moștenirea potențialului de a produce anticorpi anti-MuB1 nu este direct controlată genetic, ci este o consecință indirectă a sintezei genetice controlate de antigen MuB1.

Rezultă că moștenirea *aparent recesivă* a potențialului anti-MuB1 apare drept o consecință a transmiterii ereditare *dominante* unifactoriale a posibilității de sinteză a MuB1.

*Iepurele* prezintă un sistem complement analog omului. Și la această specie animală s-au constatat perturbări genetice determinate ale complementului. Astfel, în R.F. Germania, Mexic și Anglia s-au semnalat rase de iepuri deficitari în componenta C6 (Rother și Rother, 1965; Rother și colab., 1966). Serul deficitar prezintă în medie aproximativ 2% din activitatea litică a serului normal. Adăugarea componentei C6 purificate la serul deficitar determină restaurarea activității hemolitice (Rother și colab., 1966; Nelson și Biro, 1968).

S-a stabilit în mod experimental că, în absența C6, componenta C5 nu poate reacționa cu complexul EAC1423. Observațiile acestea sînt în acord cu constatarea că, în sistemul complement, C5, C6 și C7 sînt funcțional interdependente. Componenta C5 nu poate exercita un efect durabil asupra eritrocitelor în absența componentei C6.

Serul deficitar nu omoară bacteriile gramnegative. De asemenea este lipsit de capacitatea de a genera activitatea chemotactică leucocitară. Iepurii lipsiți de componenta C6 nu dau reacția Arthus, ceea ce demonstrează că reacția respectivă este dependentă de componentele C5, C6 și C7. S-a mai observat că aceste animale nu prezintă reacție la tuberculină și adesea nu resping homogrefele. Toate aceste observații sugerează că aceste componente ale complementului sînt importante și în reacțiile de hipersensibilitate de tip întîrziat (Nelson și Biro, 1968).

*La cobai* sistemul complement este de asemenea foarte asemănător cu complementul uman. Prin tehnica izoelectrofocusing s-au

pus în evidență două fracțiuni ale componentei C2, una cu un punct izoelectric de aproximativ 5,2 și a doua de aproximativ 5,6 (Izoelectrofocusing este o tehnică prin care moleculele încărcate electric diferit pot fi separate și concentrate într-un gradient de pH la punctul lor izoelectric. Metoda este capabilă de a separa proteine al căror punct izoelectric diferă prin 0,02 unități de pH).

Cele două fracțiuni ale componentei C2 obținute din serurile de cobai reprezintă două tipuri de molecule care nu pot fi diferențiate prin caracterele lor funcționale sau prin ultracentrifugare.

Diferențele de punct izoelectric reprezintă deci deosebiri relativ mici, situate într-o zonă a moleculei ce nu afectează funcția acesteia. Aceste date sînt compatibile cu ipoteza că componenta C2 la cobai există în cel puțin două forme alotipice diferite, controlate de două alele ale unui aceluiași locus (Colten și colab., 1970).

Root și colab., (1972) au descris recent la cobai deficiența C4 transmisă ca un caracter ereditar autosomal recesiv.

Animalele afectate nu prezintă o creștere evidentă a susceptibilității la infecții, deși în serul lor componenta C4 apare redusă la 50 % din nivelul normal. Această reducere a fost pusă în evidență atît prin imunelectroforeză, cît și prin lipsa totală a activității hemolitice a serului, de unde concluzia că animalele respective sintetizează componenta C4 la o rată scăzută.

## BIBLIOGRAFIE

- ABRAMSON M., ALPER CH. A., LACHMAN P.J., ROSEN F.S., JANDL J.H., 1971, *J. Immunol.*, **107**, 19.
- ALPER C.A., PROPP R.P., JOHNSTON R.B., ROSEN T.S.JR., 1968, *J. Immunol.*, **101**, 816.
- ALPER CH. A., 1971, în *Progress in Immunology*, sub red. B. AMOS, Acad. Press, New York, p. 609.
- AZEN E.A., SMITHIES O., 1968, *Science*, **162**, 905.
- CINADER C., DUBISKI S., WARDLAW A.C., 1964, *J. exp. Med.*, **120**, 897.
- CINADER C., DUBISKI S., 1964, *Nature*, **202**, 102.
- COLTEN H.R., BORSOS T., RAPP N.Y., 1970, *Immunology*, **18**, 467.
- COOPER N.R., BENSEL R., KOHLER P.K., 1968, *J. Immunology*, **101**, 1176.
- COOPER N.R., 1971, în *Progress in Immunology*, sub red. B. AMOS, Acad. Press, New York, p. 568.
- DAVIS B.D., DULBECCO R., EISEN H.N., GINSBERG H.S., WOOD B.W.JR., 1968, *Principles of Microbiology and Immunology*, Harper International Edition, partea a II-a, Cap. 16, p. 509.
- DONALDSON H.V., EVANS R.R., 1963, *Amer. J. Med.*, **35**, 37.

- DUBISKI S., CINADER B., 1966, Proc. Soc. exp. Biol., N.Y., **122**, 1775.
- ERICKSON R.P., TACHIBANA D.K., HERZENBERG L.A., ROSENBERG L.T., 1964, J. Immunol., **92**, 611.
- GEWURZ H., PICKERING R., MUSHEL L.A., MERGENHAGEN E.S., GOOD A.R., 1966, Lancet, **7459**, 356.
- HERBERT W.J., WILKINSON P.C., 1971, *A Dictionary of Immunology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford și Edinburg.
- HUMPHREY J. H., WHITE R.C., 1970, *Immunology for Students of Medicine*, Blackwell Scientific Publications, Oxford și Edinburg, p. 188.
- KLEMPERER M.R., AUSTEN F., ROSEN S.F., 1967, J. Immunol., **98**, 72.
- KLEMPERER M.R., 1968, J. Immunol., **101**, 812.
- KUWERT E., NOLL K., FIRNHABER W., 1968, Z. Immun. Forsch., **135**, 462.
- LAURELL A. B., MÄRTENSSON U., 1971 Eur. J. Immunol, **1**, 146.
- LAGRUE G., BARIETY J., HALPERN B., MILLIEZ P., 1967, Path. et Biol., **15**, 378
- MÜLLER-EBERHARD N.Y., 1969, Annu. Rev. Biochem., **38**, 389.
- NELSON R.A., BIRO C.R., 1968, Immunol., **14**, 527.
- NELSON W.E., 1969, *Textbook of Pediatrics*, Edit W.B. Saunders Co., Philadelphia—Londra — Toronto, p. 842 ; 1384.
- NILSSON U.R., MÜLLER-EBERHARD H.Y., 1967, J. exp., Med., **125**, 1.
- PONDMAN K.W., STROP. J.W., CORMANE R.H., HANNEMA A.Y., 1968, J. Immunol., **101**, 811.
- POOLEY M.Y., 1967, Science, **161**, 1149.
- POOLEY M.Y., MÜLLER-EBERHARD H.J., 1968, J. exp. Med., **128**, 533.
- POZSGI N., 1971, Microbiol., Parazitol., Epidemiol., **16**, 481.
- ROOT R.K., ELLMAN L., FRANK M.M., 1972, J. Immunol., **109**, 477.
- ROSENBERG L.T., TACHIBANA D.F., 1962, J. Immunol., **89**, 861.
- ROSENBERG L.T., TACHIBANA D.F., 1969, J. Immunol., **103**, 1143.
- ROTHER K., ROTHER U., 1965, Proc. Soc. exp. Biol., N.Y., **119**, 1055.
- ROTHER K., ROTHER U., MÜLLER-EBERHARD H.Y., NILSSON U.R., 1966, J. exp. Med., **124**, 773.
- RUDDY S., KLEMPERER M.R., ROSEN F.S., AUSTEN K.F., KUMATE J., 1970, Immunology, **18**, 943.
- SCHÖNGUT L. FAUST G., SURJAN M. 1970, Acta paeđiat. Acad. Sci. Hung. **11** 89.
- THORVALDSSON E.S., SEDLACK E.R., GLEICH J.G., RUDDY J.S., 1969, Ann. intern. Med. **71**, 353.
- TORISU M., SONOZAKI H., INAI S., AVATA M., 1970, J. Immunol., **104**, 728.
- TOWNES A.S., CLARENCE R.S., 1965, Bull. Johns Hopk. Hosp., **117**, 348.
- UNANUE E., DIXON F.Y., 1964, J. exp. Med., **119**, 965.
- UNANUE E., MARDINEY M.R., 1967, J. Immunol., **98**, 609.
- VOGT W., LUFFT E., SCHMIDT G., 1971, Eur. J. Immunol., **1**, 141.
- WEST C.D., DAVIS N.C., FORRISTAL J., SPITZER H.R., 1966, J. Immunol. **96**, 650.
- \* \* \* W.H.O., 1970, Int. Arch. Allergy, **37**, 660.

## VIII

## Imunitatea de transplantare

Problemele imunității de transplantare au derivat din necesitățile terapeutice legate de grefele de organe. În mod spontan, în natură nu întâlnim reacții imune declanșate de țesuturi grefate, singura situație analogă fiind reprezentată de starea de imunitate a mamei, indusă prin incompatibilitate cu țesuturile fătului.

Cercetări recente consideră de asemenea că reacții imune similare cu cele induse artificial de către grefe au un rol important în apărarea organismului față de celule aberante, cum ar fi celulele tumorale maligne sau benigne.

Răspunsul imun față de transplant reprezintă starea de sensibilizare a unui organism (receptor) care apare în urma grefării de celule, țesuturi sau organe provenite de la alt organism (donator) genetic diferit, fenomen care se exprimă prin rejecția grefei. Procesul de rejecție a grefei a fost încadrat printre reacțiile de hipersensibilitate întârziată datorită următoarelor trăsături comune :

- imunitatea antigrefă nu poate fi corelată cu titrul anticorpilor serici ;
- ea nu poate fi transmisă pasiv prin ser, ci doar prin limfocite ;
- poate fi indusă la bolnavii cu agammaglobulinemie.

Celulele efectoare ale rejecției de greță sînt anumiți limfoclaști derivați din seria limfocitară timo-dependentă, așa-numitele „killer cells” (Roitt și colab., 1969), deși rolul anticorpilor nu este de neglijat.

Încă de la primele studii de transplantare s-a constatat că acceptarea sau rejecția grefelor depinde de omologia sau respectiv de deosebiri existente între anumite regiuni genetice din genomul donatorului și ale receptorului de greță. Cu alte cuvinte, cu cît două organisme sînt mai îndepărtate unul de altul din punct de vedere taxonomic, cu atît mai probabilă și mai rapidă va fi rejecția grefei, sau, în sfîrșit, probabilitatea de acceptare a grefei este cu atît mai

mare, cu cât similaritatea anumitor regiuni din genomul donatorului și receptorului grefei este mai mare.

Terminologia folosită în transplantări poate fi rezumată, după Herbert și Wilkinson (1971), în tabelul nr. 11.

Tabelul nr. 11

Terminologia folosită în transplantări (Herbert și Wilkinson, 1971)

| Nomenclatura recentă        | Nomenclatura veche       | Relația dintre donatorul și primitorul grefei                                     |
|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Grefe singenice (izogenice) | { autogrefă<br>homogrefă | același individ<br>aceeași specie; genetic identici<br>(ex., gemeni univitellini) |
| Grefă alogenică             | homogrefă                | aceeași specie, dar genetic diferiți<br>(ex., indivizi din familii diferite)      |
| Grefă xenogenică            | heterogrefă              | specii diferite                                                                   |

Regiunile genetice ce controlează soarta unei grefe sînt denumite locusuri de histocompatibilitate.

Expresia fenotipică a locusurilor de histocompatibilitate este reprezentată prin sinteza anumitor compuși macromoleculari legați de celulele grefei denumite antigene T și deci specifice țesuturilor individului donator. Antigenele de histocompatibilitate sînt izoantigene. Ele sînt constituite din lipoproteine asociate cu structura membranoasă a celulei. Herberman și Stetson (1965) au arătat că antigenele de histocompatibilitate H—2 la șoarece se regăsesc și pe sistemul membranos intracelular care este strîns legat cu membrana suprafeței celulare. Ele au fost astfel detectate pe membranele reticulului endoplasmic, pe resturile membranoase din microzomi, sau pe membranele provenite din disruperea lizozomilor. Această observație a fost considerată drept un argument în plus că membranele reticulului endoplasmic fac parte dintr-un sistem continuu, în care sînt incluse și membrana de suprafață a celulei, membrana aparatului Golgi și cea nucleară. În schimb, membranele mitocondriale nu au deloc antigene H—2 în structura lor.

În toate țesuturile unui organism se găsesc exprimate toate antigenele de histocompatibilitate ce caracterizează acest organism, deși cantitativ aceste antigene diferă de la un țesut la altul. Astfel,

Herberman și Stetson (1965) au constatat că, la șoareci, oricare țesut conține toate antigenele H-2 genetic caracteristice liniei respective. Concentrația cea mai mare de antigene a fost găsită în splină. În ordine descrescândă urmează apoi ficatul, ganglionii limfatici, plămîinii și rinichii. În mușchii scheletici, creier și testicule nu s-au putut pune în evidență cantități detectabile din aceste antigene. Kano și colab. (1972) au studiat repartizarea antigenelor de histocompatibilitate pe celule hibride rezultate din fuziunea limfocitelor de om cu celule de șoarece, mediată de virusul Sendai. Se constată că pe aceste celule hibride coexistă atât antigenele specifice speciei umane (HL-A), cât și cele specifice șoarecelui. Acest lucru este demonstrat și de constatarea că șoarecii inoculați cu aceste celule hibride sintetizează anticorpi specifici anti-HL-A.

În momentul implantării grefei, organismul gazdă, intrînd în contact cu macromoleculele acestuia, le recunoaște drept compuși proprii (self), în cazul în care organismul donator are gene de histocompatibilitate identice cu cele din genomul gazdei, și ca urmare, grefa va fi acceptată. În cazul cînd antigenele de histocompatibilitate ale donatorului nu sînt identice cu cele ale gazdei, macromoleculele de pe celulele grefei vor fi recunoscute drept străine (nonself), ele stimulînd în organismul gazdei un răspuns imun ce duce la rejecția grefei. Reacția organismului gazdă la macromoleculele antigenice ale grefei capătă un aspect foarte complex, legat de un răspuns umoral prin sinteză de anticorpi și de un răspuns celular care joacă rolul principal (Mathé și Amiel, 1962).

Reacția imună determină o acțiune citotoxică asupra celulelor străine din greafă, acțiune exercitată atât de limfocitele sensibilizate la antigenele grefei ce invadează țesutul transplantat, cât și de anticorpi (Sulica, 1966).

Locusurile de histocompatibilitate se comportă ca determinanți genetici mendelieni, deci situați pe cromozomi. Această afirmație este pe deplin dovedită de legile descoperite de Snell în 1953. Legile lui Snell sînt respectate de toate țesuturile normale și de unele tumori. Anumite tumori fac însă excepție de la aceste legi, ceea ce a determinat pe unii autori să considere că anumite locusuri de histocompatibilitate ar putea fi controlate de factori extracromozomali. După alți autori însă, aceste cazuri pot fi explicate mai curînd prin pierderi sau prin modificări ale unor determinanți antigenici, ca urmare a alterărilor cromozomiale ce pot apărea în cursul carcinogenezei (Bach și Amos, 1967).

În esență, legile lui Snell arată (fig. 14) că :

1. Grefele izogenice prind întotdeauna.
2. Grefele alogene nu sînt acceptate sau sînt acceptate numai temporar după care regresează, fiind întotdeauna respinse.

*Linii parentale homozigote care se deosebesc printr-un singur locus de histocompatibilitate*

*Descendenți  $F_1$ : heterozigoți  
Acceptă toți grefe de la ambii părinți*

*Descendenți  $F_2$*

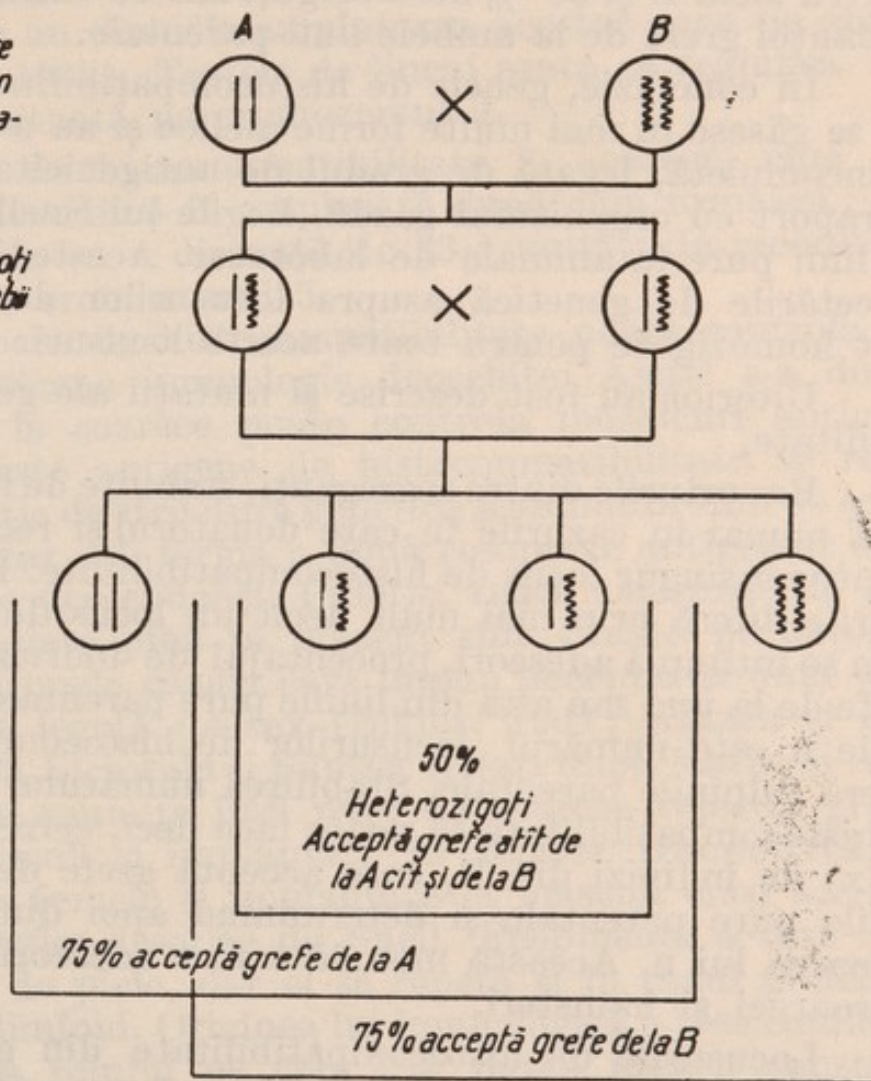


Fig. 14. — Reprezentarea schematică a legilor lui Snell.

3. Hibrizii primei generații  $F_1$ , produși prin încrucișarea a două linii pure (A și B) — deci implicit homozigote —, acceptă tumorile provenite de la oricare din cele două linii parentale ;

4. În generația  $F_2$ , obținută prin încrucișarea indivizilor  $F_1$  între ei, 75% din indivizi primesc grefele provenite de la o linie parentală și 75% din indivizi primesc grefele celeilalte linii parentale.

Se observă deci că, conform legii 3, cele două alele de histocompatibilitate sînt *codominante*, fiind exprimate în mod egal în organismul heterozigoților. De asemenea, legea 4 reprezintă segregarea alelelor de histocompatibilitate, între indivizii  $F_2$  realizîndu-se raporturile mendeliene de 25 % homozigoți pentru alela A, 25 % homozigoți pentru alela B și 50 % heterozigoți AB ce vor accepta conform codominanței grefe de la ambele linii parentale.

În concluzie, genele de histocompatibilitate sînt codominante; ele se găsesc în mai multe forme alelice și au o penetranță variabilă și incompletă, legată de gradul de antigenicitate a țesutului grefat în raport cu organismul gazdă. Legile lui Snell au permis obținerea de linii pure la animale de laborator. Aceste linii, foarte utilizate în cercetările de genetică asupra locusurilor de histocompatibilitate, sînt homozigote pentru toate aceste locusuri.

Ulterior au fost descrise și mutații ale genelor de histocompatibilitate.

Raporturile dintre segreganți, stabilite de legea 4, sînt respectate însă numai în cazurile în care donatorul și receptorul diferă numai printr-un singur locus de histocompatibilitate. În cazurile în care cuplurile diferă prin mai mult decît un locus de histocompatibilitate, cum se întîmplă adeseori, procentajul de indivizi din  $F_2$  ce va accepta grefe de la una sau alta din liniile pure parentale va fi egal cu  $(0,75)^n$ , unde  $n$  este numărul locusurilor de histocompatibilitate prin care diferă tulpinile parentale. Stabilirea numărului de locusuri implicate în histocompatibilitate se poate face deci, cercetînd procentul (notat cu  $x$ ) de indivizi din  $F_2$  care acceptă grefe de la una sau alta din liniile pure parentale și determinînd apoi din ecuația  $(0,75)^n = x$ , valoarea lui  $n$ . Această metodă a fost adeseori folosită în laborator la șoareci și hamsteri.

Locusurile de histocompatibilitate din genomul unui individ se subîmpart în majore și în minore. Locusurile majore controlează antigene de histocompatibilitate „tari”, care în cazul grefării la indivizi genetic deosebiți determină răspunsuri imune puternice și deci respingerea rapidă a grefei. Locusurile de histocompatibilitate majore au fost notate H—2 la șoarece, B la pui, AgB la șobolani și H—1 la iepure. În ultimii ani s-a investigat intens locusul major de histocompatibilitate la om, denumit HL—A sau după nomenclaturi mai vechi Hu—1 (Amos și Bach, 1968; Thorsby, 1971).

Spre deosebire de locusurile majore, locusurile minore de histocompatibilitate controlează antigene „slabe”, secundar implicate în



reacția de respingere a grefei, care induce răspunsuri imune mai slabe și mai tardive după grefarea lor.

La șoarece, locusurile de histocompatibilitate minore au fost notate  $H_1$ ,  $H_3$  și  $H_4$ .

O dovadă suplimentară a localizării cromozomiale a genelor de histocompatibilitate este adusă de numeroase studii de cartografiere genetică ce au dovedit amplasarea acestor gene pe anumiți cromozomi (Amos, 1962). Testele de lincaj arată că regiunea  $H-2$  de la șoarece este situată pe cromozomul 9.

Alte locusuri de histocompatibilitate la șoarece, cum ar fi  $H_1$ ,  $H_3$  și  $H_4$ , s-au dovedit a fi amplasate după cum urmează:  $H_1$  și  $H_4$  pe cromozomul 1, cu o distanță de 23,4 unități de recombinare între ele, iar  $H_3$  pe cromozomul 5.

Un anumit locus de histocompatibilitate poate controla unul sau mai multe antigene imunologic deosebite. Astfel s-a dovedit că regiunea  $H-2$  la șoarece poate controla mozaicuri antigenice foarte variate. Aceste antigene de histocompatibilitate se reasortează diferit în funcție de structura genetică a anumitor linii de șoareci și se transmit ereditar sub forma a două complexe antigenice alelice care segregă printre descendenți. Practic, toate locusurile de histocompatibilitate studiate pînă în prezent sînt situate pe autozomi.

Există însă și unele cazuri care impun acceptarea unui tip de histocompatibilitate legată de sex (Elkins, 1964; Katsch și colab. 1964). Astfel, în 1955 Eichwald și Silmsner (citați după Mathé și Amiel, 1962) au descris la anumite linii pure de șoarece rejecția grefelor prelevate de la masculi și implantate la femele. Dimpotrivă, grefele prelevate de la femele și implantate la masculi erau acceptate și se conformau legilor descrise de Snell. Fenomenul a fost inițial observat la grefele de piele, dar el se repetă și în cazul grefelor de timus sau de țesut limfoid. Originea lui imunologică a fost confirmată atît prin eliminarea rolului pe care l-ar putea juca o constelație endocrină diferită, cît mai ales prin teste de preimunizare. Adică, s-a constatat că femelele rejectează mai rapid grefa provenită de la mascul în cazul cînd au suferit în prealabil implantarea unei alte grefe identice. Gena de histocompatibilitate legată de sex se consideră a fi o genă slabă (minoră), ea determinînd o rejecție relativ lentă a grefei. În cazul grefelor de tumori, ea se exprimă inconstant. Marea majoritate a autorilor consideră că această genă de histocompatibilitate se exprimă numai la anumite linii de șoareci, fiind situată pe cromozomul Y și mai exact în porțiunea lui heterocromozomică.

După alți autori, diferența de comportare a țesuturilor masculine și feminine în calitatea lor de donatori de greafă ar fi datorată faptului că masculii au un singur cromozom X, în timp ce femelele au doi cromozomi X. Diferența ar fi deci determinată de un efect de doză.

În sfârșit, alți autori, în dezacord cu acest punct de vedere, consideră că factorul care variază de la o linie de șoareci la alta nu este stimulul antigenic al țesutului mascul, deci expresia fenotipică a unui locus legat de cromozomul Y, ci mai degrabă aptitudinea organismului primitor (femel) de a răspunde la acest stimul. Argumente puternice pledează totuși în favoarea ultimului punct de vedere care pare a fi cel mai aproape de realitate.

Cercetarea compatibilității tisulare la om s-a făcut avînd la bază o serie de tehnici imunologice, pe care le vom prezenta, pe scurt, după Amos și Bach (1968), în continuare.

*Tehnica culturii mixte de limfocite* (mixed lymphocyte culture; MLC): cele două populații de leucocite ce trebuie testate pentru compatibilitatea lor se amestecă în cultură. În cazul cînd între ele apar diferențe de histocompatibilitate, o populație de limfocite va recunoaște cealaltă populație drept străină și va reacționa față de ea prin dediferențiere blastică, sinteză de ADN și implicit încorporarea de timidină tritiată. Numărul de impulsuri per minut de timidină tritiată încorporată în celulele acestor culturi este deci proporțional cu incompatibilitatea dintre aceste două populații. În cazul cînd ambele populații au toate antigenele de histocompatibilitate identice, între cele două populații există compatibilitate perfectă și ambele coexistă în cultură. Încorporarea de timidină tritiată în celule va fi foarte redusă sau nulă.

*Testările serologice* se realizează cu antiseruri obținute de la femei multipare sau de la voluntari imunizați prin grefe de piele, sau prin inoculare subcutană de limfocite. Serurile ce conțin anticorpi cu specificități antigenice diferite sînt purificate prin adsorbție. Capacitatea lor antilimfocitară se determină prin efectul citotoxic (procentul de celule moarte care se colorează cu tripan albastru 0,1 %) asupra unor suspensii de limfocite, în prezența complementului.

Atît testările serologice, cît și cele prin MLC s-au dovedit a fi perfect concordante cu timpul de menținere a grefelor executate în diverse fratrii (între frații și surorile unei singure familii). Grefele de piele între frații și surorile cu grupe HL—A identice persistă între

14 și 42 de zile (cu o medie de 25 de zile), în timp ce grefele de piele între frați și surori cu diferențe de grup HL—A persistă numai 7—14 zile, cu o medie de 11—12 zile (Amos și Bach, 1968; Albertini și Bach, 1968).

Atît tehnica MLC, cît și determinările serologice arată că determinismul genetic al antigenelor leucocitare detectate de aceste reacții se supune unui control genetic mendelian, confirmînd întru totul legile lui Snell (Amos și Bach, 1968).

Testul MLC s-a dovedit a fi mai fin în discriminările realizate, permițînd ca din rezultatele obținute să se deducă prin studiul unei anumite fratii, cu multă exactitate, genotipul HL—A al ambilor părinți.

Pe baza acestor rezultate, o interpretare cantitativă mai fină a testului MLC a fost sugerată de către Albertini și Bach (1968). Acești autori pornesc de la premisa că dacă tatăl are genotipul *ab* și mama *cd*, atunci printre descendenți vom obține genotipurile *ac*, *ad*, *bc* și *bd*. Celulele copiilor dintr-un același grup, deci cu același genotip, nu vor induce stimulare în testul MLC pentru că au antigene leucocitare identice. Dacă se ia drept referință un grup oarecare, reprezentat printr-un individ „propositus”, care, de exemplu, are genotipul *ac*, vedem că două din aceste grupuri diferă printr-o singură alelă de genotipul *ac* (grupurile *ad* și *bc*), iar un singur grup diferă prin ambele alele (*bd*). Deci gradarea diferențelor ce apar între genotipurile HL—A va fi : 0 (același grup), 1 alelă și 2 alele.

Intensitatea reacției MLC va fi respectiv 0 (nestimulator), *x* și 2*x* celule induse în unitatea de timp la dediferențiere blastică.

Analiza a 15 familii a demonstrat o concordanță între intensitatea reacției și genotipul indivizilor unei fratii, fapt care confirmă încă o dată determinismul genetic mendelian al antigenelor de histocompatibilitate și posibilitatea practică de a face rapid o analiză genetică orientativă, utilă în problemele clinice de transplantare de țesuturi.

Intocmai ca și celelalte locusuri de histocompatibilitate, locusul HL—A reprezintă o regiune cromozomală relativ mică, în care sînt situate, foarte aproape una de alta, genele care determină antigenele de histocompatibilitate. Fiecare din aceste gene se poate găsi în mai multe forme alelomorfe; fiecare dintre aceste alele determină un anumit antigen HL—A. Locusul HL—A se subîmparte în două gene (în literatura de specialitate se numesc și locusuri sau

sublocusuri), una denumită LA și cealaltă FOUR. Gena din sublocusul LA poate să apară în cel puțin 8 forme alelice deosebite, iar gena din sublocusul FOUR în cel puțin 13 forme alelice (tabelul nr. 12).

Tabelul nr. 12

## Sistemul HL-A

| Locusul HL-A |                    |                    |
|--------------|--------------------|--------------------|
|              | sublocus LA        | sublocus FOUR      |
| Alele        | HL-A <sub>1</sub>  | HL-A <sub>5</sub>  |
|              | HL-A <sub>2</sub>  | HL-A <sub>7</sub>  |
|              | HL-A <sub>3</sub>  | HL-A <sub>8</sub>  |
|              | HL-A <sub>9</sub>  | HL-A <sub>12</sub> |
|              | HL-A <sub>10</sub> | HL-A <sub>13</sub> |
|              | HL-A <sub>11</sub> | 4C*                |
|              | Ba*                | BB                 |
|              | Li                 | FJH                |
|              |                    | LND                |
|              |                    | SL                 |
|              |                    | AA                 |
|              | MaKi               |                    |
|              | 407*               |                    |

Rissmeyer-Nielsen și Thorsby (citați după Thorsby, 1971) au calculat între cele două gene o frecvență de recombinare de 0,5—1,1%. Asocierea dintre o anumită alelă LA și anumită alelă FOUR pe un același cromozom constituie un *haplotip* HL-A. Se înțelege ușor că numărul mare de alele existente pentru fiecare genă determină un polimorfism și mai mare al haplotipurilor și implicit al fenotipurilor antigenelor majore de histocompatibilitate la om.

Astfel, Thorsby (1971) calculează că dacă pentru fiecare dintre cele două gene ar mai exista încă numai o singură alelă necunoscută, numărul acestor alele s-ar ridica la 9 și respectiv 14, formând deci 126 de haplotipuri HL-A diferite și 8 001 genotipuri (diploide) diferite.

Cercetări recente lasă să se întrevadă însă că polimorfismul este încă și mai mare, dat fiind că antigenele HL-A sînt foarte eterogene și par să includă două sau mai multe subunități antigenice diferite controlate de alele separate.

Apar astfel cazurile cunoscute în literatură sub numele de „grupuri incluse” (inclusion groups), care sînt puse în evidență

prin probe serologice. Astfel, Thorsby citează drept exemplu de grup inclus antigenul 4C, descris de Bodmer și Payne și considerat inițial a fi controlat de o alelă a genei FOUR. S-a văzut ulterior că un alt antigen HL-A<sub>5</sub> era complet inclus în specificitatea anticorpilor anti-4C; adică, toți indivizii HL-A<sub>5</sub> pozitivi erau și 4C pozitivi, dar unele persoane 4C pozitive erau totuși HL-A<sub>5</sub> negative. Rezultă că antigenul 4C pare a fi format din două antigene HL-A diferite: unul HL-A<sub>5</sub> și celălalt 4C\*, fiecare fiind controlat de alele diferite, deși anticorpii anti-4C nu pot fi separați prin absorbție cu cele două feluri de antigene cu specificități diferite (anti-HL-A<sub>5</sub> și anti-4C\*).

Ulterior s-a descris un alt antiser (serul SL-IH) care dădea reacții pozitive cu toate celulele HL-A<sub>5</sub> sau 4C\* pozitive, dar, în plus, reacționa cu unele celule HL-A<sub>5</sub> și 4C\* negative.

Rezultă că IH include și pe HL-A<sub>5</sub> și 4C\*, dar mai posedă un antigen suplimentar, care este determinat de o a treia alelă a genei FOUR și care a fost identificat prin studii de genetică formală și denumit SL (sau IH\*). Și în acest caz cele trei specificități antigenice diferite nu au putut fi separate prin absorbție din serul IH.

Se consideră că aceste date serologice pot fi explicate, acceptând că antigenele HL-A<sub>5</sub>, 4C\*, și IH\* reprezintă antigene separate controlate de alele diferite ale aceleiași gene FOUR. Anticorpii anti-4C reacționează însă încrucișat cu HL-A<sub>5</sub> și cu 4C\*, iar anticorpii anti-IH reacționează încrucișat cu HL-A<sub>5</sub>, cu 4C\* și cu IH\* (fig.15).

Am insistat mai mult asupra definirii și exemplificării grupurilor incluse, pentru a arăta că în aceste condiții analiza serologică se găsește într-un impas care poate fi depășit numai prin analizele de genetică formală.

Într-adevăr, segregarea acestor alele în cursul gametogenezei asigură haplotipuri noi printre descendenți la care diversele grupuri incluse capătă configurații noi în cadrul cărora anumite antigene incluse pot fi demascate.

Investigând populația germană din zona Ruhr, Bertrams și colab. (1971) au constatat că frecvențele genelor ce controlează genotipul HL-A se încadrează perfect în legea Hardy-Weinberg, conform căreia cele două sisteme de alele multiple controlate de locusurile LA și FOUR apar cu o frecvență egală în populație.

Sistemul H-2 reprezintă, după cum s-a mai spus, sistemul major de histocompatibilitate la șoarece—sistem foarte complex și

polimorf datorită multitudinii de antigene controlate de mai multe alele. Regiunea genetică H—2 este situată pe cromozomul 9 al șoarecilor și reprezintă o zonă cromozomială de întindere redusă în care se găsesc strâns lincate trei gene deosebite. Cele două gene care controlează cele mai multe antigene de histocompatibilitate cunoscute se

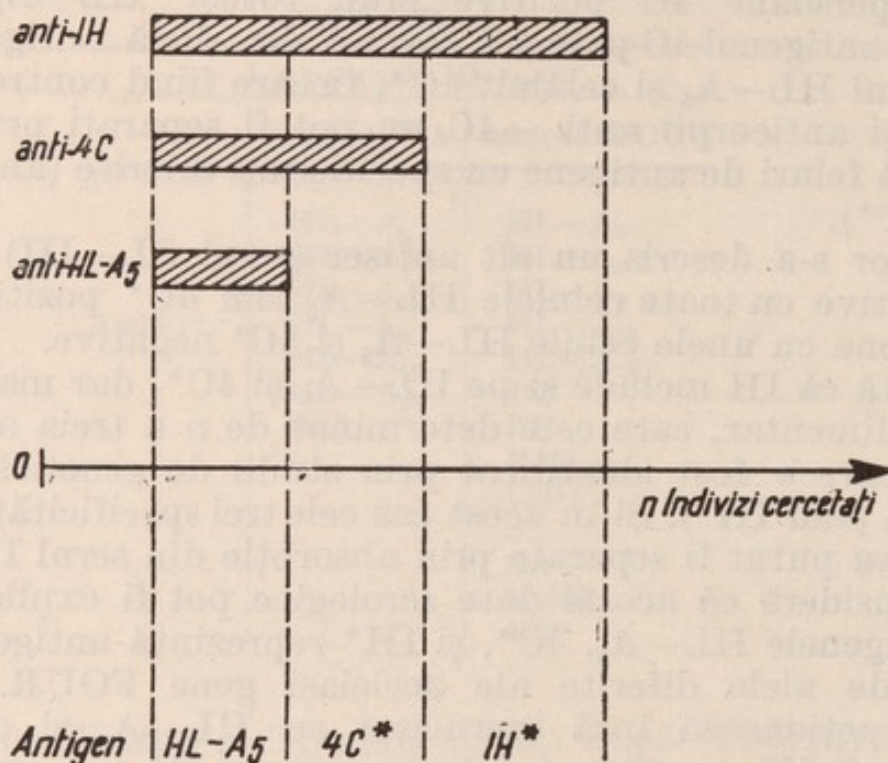


Fig. 15. — „Grupuri incluse” în cadrul antigenelor de histocompatibilitate la om (după Thorsby, 1971). S-au notat numai reacțiile pozitive.

găsesc amplasate la capătul acestei regiuni, fiind denumite gena „terminală D” („D end”) și gena „terminală K” („K end”). Între gena terminală D și cea terminală K se găsesc subdiviziunea Ss, care controlează genetic proteina serică Ss, precum și genele Ir, care, după cum am arătat în capitolul IV, controlează reactivitatea imunologică a șoarecilor față de diferite antigene. Schreffler și Klein (citați după Thorsby, 1971) au calculat între genele terminale D și K o frecvență de recombinare de aproximativ 0,4 %. Până în prezent s-au descris 17 haplotipuri alelice diferite, fiecare haplotip fiind exprimat prin 5 pînă la 15 din cele 30 de antigene H—2 diferite, cunoscute.

Recent, Thorsby a analizat grupurile incluse din această multitudine de antigene cunoscute și pe baza acestei analize a stabilit alelele existente pentru fiecare din genele D și K. Rezultă că cele 17

haplotipuri descrise (notate H-2<sup>a</sup>, H-2<sup>b</sup>, H-2<sup>d</sup>... H-2<sup>s</sup>) sînt formate prin asortarea variabilă a celor 7 alele existente în locusul D, cu cele 8 alele existente în locusul K (tabelul nr. 13).

Modelul organizării locusului H-2 propus de Thorsby este în mod izbitor asemănător cu organizarea locusului HL-A de la

Tabelul nr. 13

Cele două serii de alele D și K prin asocierea cărora apar cele 17 haplotipuri H-2 descrise la șoarece (după Thorsby, 1971)

| Haplotip                      | Locus D | Locus K |
|-------------------------------|---------|---------|
| H-2 <sup>a</sup>              | 4       | 23      |
| H-2 <sup>b</sup>              | 28      | 5       |
| H-2 <sup>d</sup>              | 4       | 8       |
| H-2 <sup>f</sup>              | 6       | 8       |
| H-2 <sup>g</sup>              | 6       | 8       |
| H-2 <sup>h</sup>              | 3       | 23      |
| H-2 <sup>i</sup>              | 4       | 1*      |
| H-2 <sup>j</sup>              | 28      | 22      |
| H-2 <sup>k</sup>              | 3**     | 23      |
| H-2 <sup>l</sup>              | 6       | 22      |
| H-2 <sup>m</sup>              | 13      | 23      |
| H-2 <sup>n</sup>              | 6       | 1       |
| H-2 <sup>o</sup>              | 3**     | 1       |
| H-2 <sup>p</sup>              | 3*      | 1       |
| H-2 <sup>q</sup>              | 13      | 25      |
| H-2 <sup>r</sup>              | 3*      | 11      |
| H-2 <sup>s</sup>              | 3       | 1*      |
| Total 17 haplotipuri descrise | 7 alele | 8 alele |

om și prezintă avantajul de a putea extrapola o serie de constatări genetice, observate la locusul H-2, asupra locusului HL-A, care poate fi mai greu investigat în populațiile umane.

În cursul reacțiilor de respingere a grefelor, timusul are un rol esențial pentru declanșarea reacțiilor imune de rejecție. Aceasta pentru că, după cum am arătat în capitolul III, rejecția de grefă reprezintă o reacție imună mediată prin celule în care rolul principal este jucat de limfocitele timodependente (T). Animalele cu timusul extirpat neonatal prezintă un sindrom de epuizare (wasting disease),

în cursul căruia se produc o slăbire intensă, o degradare fiziologică importantă cu perturbări ale răspunsului imun, printre care notăm atrofia țesutului limfoid, reducerea limfocitelor din sângele periferic și o imunitate de trasplantare extrem de deficientă, permițând greșirea unor țesuturi alogenice și chiar xenogenice (Junis și colab., 1965).

Transplantarea timusului sau a celulelor timice provenite de la un alt animal remediază această simptomatologie, restaurând și funcțiile imunologice pierdute. Această restaurare se poate realiza indiferent dacă celulele timice provin de la un animal adult sau de la nou-născut și indiferent dacă donatorul este singenic sau alogenic.

Anularea efectelor sindromului de epuizare apărut după timentomie poate fi determinată și prin inocularea intraperitoneală de celule de splină adultă (și nu splină de nou-născut) la animalul bolnav, însă numai în cazurile în care se efectuează grefe singenice sau dacă animalul donator diferă de cel primitor timentomizat, numai în locusurile de histocompatibilitate minore (non H-2).

Mitchison (1971) a investigat diferențele de expresie fenotipică a genelor ce controlează antigenele de histocompatibilitate printre celulele seriei B (derivate din măduva osoasă) și cele din seria T (derivate din timus). Celulele „ajutătoare” — H (din seria T) sînt mult mai puțin afectate după transferul lor la șoareci semialogenici (deci la animale care diferă de donatorul de celule imunologic competente printr-un singur haplotip). Spre deosebire de aceasta, celulele formatoare de anticorpi (din seria B) exprimă mult mai puternic pe suprafața lor antigenele de histocompatibilitate și de aceea declanșează la animalul primitor o reacție imună mult mai intensă, care afectează mult mai puternic funcția lor. Drept consecință, transplantarea acestor celule este mult mai puțin eficientă sub raportul capacității lor funcționale decît transplantarea celulelor T.

Interesantă este de asemenea observația că transplantarea dintre două linii pure ce diferă prin locusuri de histocompatibilitate H-2 nu are rezultate identice, indiferent de sensul în care se face. Astfel, șoarecii din linia A (H-2<sup>a</sup>) timentomiizați neonatal au fost vindecați de sindromul de epuizare după injectarea celulelor de timus adult sau de nou-născut prelevat de la linia C<sub>3</sub>H (H-2<sup>k</sup>), de unde concluzia că, în aceste condiții, celulele timice C<sub>3</sub>H au repopulat și au restaurat funcțiile imunologice ale primitorului A. În schimb, șoarecii C<sub>3</sub>H timentomiizați au fost foarte rar salvați prin greșirea de celule de timus din linia A (Junis și colab., 1965). În concluzie, chiar la naștere celulele de timus cu antigen de histocompatibilitate



H-2<sup>a</sup> sînt capabile de a declanșa un răspuns imun față de țesuturile C<sub>3</sub>H(H-2<sup>k</sup>), în timp ce celulele timice C<sub>3</sub>H au o capacitate relativ slabă de a reacționa împotriva țesuturilor din liniile A primitoare.

Soarta grefei de celule limfoide poate fi investigată printr-un test elaborat de Simmons (citată după Junis și colab., 1965) și care poartă numele de „testul pentru reacția grefei față de gazdă” (Graft versus host assay — testul GVH). Dacă celulele limfoide (timice sau splenice) grefate vor prolifera în organismul primitorului, atunci ele vor popula toate țesuturile limfoide și implicit splina, a cărei greutate relativă (greutatea splinei/greutatea corpului) va crește mult. Spre deosebire de aceasta, în cazurile în care celulele limfoide grefate sînt rejectate de organismul primitorului, aceste celule vor muri.

În consecință, greutatea relativă a splinei va rămîne mică în comparație cu greutatea relativă constatată la animalele care au primit grefa. Trebuie de asemenea notat că, în cazurile în care animalul primitor este timectomizat, neonatal, acesta nu poate practic răspunde imunologic, de aceea potențialul întregului său sistem imun este refăcut pe seama celulelor timice sau splenice grefate, ce vor repopula organele limfoide și implicit splina acestor animale. S-a dovedit că, în aceste condiții, celulele imunologic competente din organele limfoide ale primitorului mențin caracteristicile de histocompatibilitate ale donatorului. Apare astfel o stare deosebită, denumită „himeră”, în cursul căreia animale cu un anumit antigen de histocompatibilitate răspund imunologic prin intermediul unei sistem celular transplantat care are alte caracteristici de histocompatibilitate.

Această afirmație a fost verificată printr-un test deosebit de interesant, al cărui principiu îl vom menționa pe scurt în cele ce urmează.

Să luăm ca exemplu cazul în care șoareci din linia A, timectomizați la naștere, au fost grefați cu celulele timice ale unor șoareci din linia C<sub>3</sub>H. După 8 zile, timp în care soarta grefei a fost hotărîtă, animalele primitoare din linia A sînt sacrificate și splina lor este prelevată. Dacă grefa a fost primită și deci greutatea relativă a splinei a crescut, această populație limfoidă nou formată ar putea avea caracteristicile de histocompatibilitate ale donatorului C<sub>3</sub>H, adică H-2<sup>k</sup>, sau ale primitorului A, respectiv H-2<sup>a</sup>. Pentru a decide acest lucru, o suspensie de celule din splina prelevată se inoculează (se grefează din nou) unor șoareci hibridi F<sub>1</sub>, netimectomizați (normali,) care se vor deosebi de șoarecii grefați numai printr-o singură alelă de histocompatibilitate (hemialogeni).

Tabelul nr. 14

Determinarea caracteristicilor de histocompatibilitate ale unei „himere” (după Junis și colab., 1965; modificat)

| Linia de<br>șoareci<br>timectomizați<br>(primitori) | Linia de<br>șoareci<br>donatori<br>de timus | Compo-<br>nenta<br>testată                | Hibridii pentru<br>testare                               | Posibilitățile de răspuns ale hibridilor  |                                    |                                                                          | Rezultatul<br>experimental |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
|                                                     |                                             |                                           |                                                          | răspunsul<br>imun<br>(rejecția<br>grefei) | greutatea<br>relativă a<br>splinei | caracteristicile de<br>histocompatibilitate<br>ale animalelor<br>grefate |                            |
| A                                                   | C <sub>3</sub> H                            | donator                                   | F <sub>1</sub> (C <sub>3</sub> H × C <sub>57</sub> BL/1) | nu                                        | crește                             | de tip donator (C <sub>3</sub> H)                                        | da                         |
|                                                     |                                             |                                           |                                                          | da                                        | nu crește                          | de tip primitor (A)                                                      | nu                         |
|                                                     | gazdă                                       | F <sub>1</sub> (A × C <sub>57</sub> BL/1) | da                                                       | nu crește                                 | de tip donator (C <sub>3</sub> H)  | da                                                                       |                            |
|                                                     |                                             |                                           | nu                                                       | crește                                    | de tip primitor (A)                | nu                                                                       |                            |

În experiențele citate, tipul donator ( $C_3H$ ) se testează prin inoculare la hibridi  $F_1(C_3H \times C_{57}BL/1)$ , iar tipul primitor (A) se testează față de hibridi  $F_1(A \times C_{57}BL/1)$ . La ambele tipuri de hibridi apare diferită numai alela  $C_{57}BL/1$  care este  $H-2^b$ .

După cum se vede și din tabelul nr. 14 (după Junis și colab., 1965; modificat), dacă celulele inoculate vor fi considerate proprii de către hibridi, aceștia vor accepta grefa, nu vor răspunde imunologic față de ea și, în consecință, celulele grefate proliferază în organele limfoide, măbind și greutatea relativă a splinei. Și invers, dacă grefa va fi considerată nonsself, celulele declanșează reacția imună în organismul primitorului, această reacție distruge celulele grefate și splina nu își va mări dimensiunile. Rezultatele expuse în tabelul nr.14 reprezintă clar un răspuns de tip himeră, cu alte cuvinte arată că celulele imunologic competente ale animalului primitor (A) timectomizat nu recunosc drept proprii antigenele de histocompatibilitate  $H-2^a$  ale gazdei, deși aceste celule se multiplică în gazda A, în schimb recunosc drept self antigenele de histocompatibilitate  $H-2^k$ , caracteristice animalului din care provine transplantul.

## BIBLIOGRAFIE

- ALBERTINI R.J., BACH F.M., 1968, J. exp. Med, **128**, 639.
- AMOS B.D., 1962, Ann. N. Y. Acad. Sci, **97**, 69.
- AMOS B.D., BACH F.H., 1968, J. exp. Med., **128**, 623.
- BACH F.H., AMOS B.D., 1967, Science, **156**, 1506.
- BERTRAMS J., KUWIET E., BÖHME U., 1971, Eur. J. Immunol., **1**, 306.
- ELKINS W.L., 1964, J. Immunol., **92**, 275.
- HERBERMAN R., STEINSON CH. A., 1965, J. exp. Med., **121**, 533.
- HERBERT W.J., WILKINSON P.C., 1971, *A Dictionary of Immunology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford și Edinburg.
- JUNIS E. J., HILGARD H.R., MARTINEZ C., GOOD R., 1965, J. exp. Med., **121**, 607.
- KANO K., KNOWLES B.B., KOPROWSKI H., MILGFOM F., 1972, Eur. J. Immun. **2**, 198.
- KATSCH G.F., TALMAGE D.W., KATSCH S., 1964, Science, **143**, 41.
- MATHÉ G., AMIEL J.L., 1962, *La Greffe*, Masson et Cie, Paris, p. 8-22.
- MITCHISON N.A., 1971, Eur. J. Immunol. **1**, 18.
- ROITT I.M., TORRIGIANI G., GREAVES M.F., BROSTOFF J., PLAYFAIR J.H.L., 1969, Lancet, **7616**, 367.
- SULICA A., 1966, în *Genetica umană*, sub red. Șt. NILCU și C. MAXIMILIAN, Edit. științifică, București, p. 371.
- THORSBY E., 1971, Eur. J. Immunol., **1**, 57.

## IX

## Baza genetică a rezistenței naturale față de agenții infecțioși

Există date care demonstrează că rezistența sau, dimpotrivă, susceptibilitatea unui organism față de un germene microbial ori față de un virus sînt genetic controlate; cu alte cuvinte, rezistența față de un anumit agent patogen se transmite de la o generație la alta fără a reprezenta o însușire dobîndită în cursul ontogeniei fiecărui individ.

Alături de rezistența organismului față de agentul agresor nu trebuie omisă nici variația genetic determinată a caracterelor de patogenitate ale germenului infectant, așa încît evoluția unei infecții depinde de interacțiunea celor două elemente, macro- și microorganismul, care acționează reciproc unul asupra celuilalt.

Factorii care afectează sensibilitatea sau rezistența gazdei față de infecție sînt foarte numeroși.

La mamifere, pe lângă rezistența celulară neimunologică față de germenii patogeni, apar o serie de reacții de apărare imunologică care, la rîndul lor, amplifică posibilitatea organismului de a se opune invaziei microorganismului.

Întocmai ca și rezistența celulară neimunologică și reacțiile imunologice de apărare sînt controlate genetic. În acest ultim caz însă, de la o generație la alta se transmite doar capacitatea potențială de a distruge sau de a neutraliza prin reacții imunologice un agent agresor străin, răspunsul real al organismului față de acest agent străin (exemplu sinteza de anticorpi specifici) fiind o funcție dobîndită în cursul vieții fiecărui individ în parte, drept urmare a contactului dintre individ și agentul agresor.

Interacțiunea dintre rezistența neimunologică — clasic denumită „rezistența naturală” — și reacțiile imunologice de apărare reprezintă un fenomen frecvent întîlnit în natură.

Baza fenotipică pentru rezistența „naturală” neimunologică la boală poate fi interpretată ca fiind datorată unui număr de procese fiziologice variate, care, după cum se va arăta ulterior, fac pur și

simplu impropriu multiplicarea și invazia intra- sau extracelulară a agenților microbieni în țesuturile gazdei.

Cercetările făcute pe diferite linii de animale, precum și studiul diverselor colectivități umane au pus în evidență faptul că rezistența sau, dimpotrivă, susceptibilitatea față de un anumit agent patogen sînt transmise de la o generație la alta, urmînd o distribuție mendeliană.

La urmașii rezultați din încrucișarea de indivizi rezistenți cu indivizi sensibili, caracterele aflate sub controlul unei singure gene prezintă segregarea însușirii de rezistență sub forma unei curbe pluri-modale. În cazul cînd rezistența este controlată de numeroase gene nu se observă segregarea printre urmași și sensibilitatea sau rezistența prezintă o distribuție continuă (Allison și colab. 1967).

S-au făcut numeroase studii experimentale, pe specii animale diferite, cu scopul de a demonstra modul de transmitere ereditară a caracterelor de rezistență sau de susceptibilitate față de diferite virusuri, bacterii, protozoare și pentru a demonstra mecanismul care stă la baza lor.

#### **Diferențe ereditare neimunologice ale sensibilității la infecție.**

La puii Leghorn albi consangvini s-a cercetat modul de moștenire a rezistenței și a susceptibilității față de virusul sarcomului Rous (V.S.R.) (Payne și Biggs, 1964; Prince, 1958). Prin diverse încrucișări și prin selecție s-au obținut linii consangvine rezistente (linia 7), linii care au prezentat susceptibilitate la acest virus (6 și 10) și alte linii de pui consangvini (9 și 15) care au prezentat o mortalitate variabilă ca răspuns la inocularea cu VSR. În urma încrucișării indivizilor din linia 6 (susceptibilă) cu cei din linia 7 (rezistență), toți urmașii au fost susceptibili față de VSR. Prin încrucișarea indivizilor din linia 15, care prezentau o rezistență variabilă, cu indivizii liniei 10 (cu susceptibilitate 100 %) rezultă urmași cu susceptibilitate 100 % față de infecția cu VSR.

Aceste experiențe au arătat că susceptibilitatea genetică la VSR este un caracter dominant și că acesta este dependent de o singură genă autosomală (Waters și Burmeister, 1961).

Alte cercetări au adus date care susțin faptul că diferențele în susceptibilitatea față de infecția cu virusurile leucozei aviare VSR ( $RAV_1$ ) și VSR( $RAV_2$ ) —  $RAV_1$  și  $RAV_2$  reprezentînd virusurile ajutătoare (helper virus) — sînt determinate pentru fiecare tip de asociație virală de către o singură pereche de gene alelice autosomale. Alela pentru susceptibilitate fiind dominantă, caracterul de rezistență

apare numai la puii homozigoți pentru alela recesivă ce conferă rezistență. Se sugerează că alela dominantă controlează sinteza unui receptor celular specific, reprezentat de o componentă proteică a suprafeței celulare, care servește pentru fixarea virusului de celula-gazdă (Crittenden și colab., 1963; Rubin, 1960, 1965).

Sensibilitatea față de virusul leucozei aviare VSR (RAV<sub>1</sub>) sau pseudotipul VSR(RAV<sub>2</sub>) se manifestă fie prin formarea de tumori la puii de găină ieșiți din ou, fie prin lezarea culturilor celulare de embrion de pui. Datele prezentate arată că variabilitatea susceptibilității la VSR se manifestă la nivel celular; ea este deci independentă de imunitatea dobândită.

Un alt exemplu de rezistență genetic controlată este rezistența șoarecilor la virusul leucemiei. Probabil că cele mai multe leucemii la șoarece sînt induse de către virusuri. Primul virus a fost izolat de Gross, din țesuturile normale și leucemice ale șoarecilor C<sub>58</sub> și AKR (șoareci consangvini cu o foarte mare incidență a leucemiei spontane); filtratele acelulare ale acestor țesuturi au indus leucemia la șoarecii nou-născuți din tulpinile C<sub>57</sub>BR și C<sub>3</sub>Hf/B<sub>1</sub>.

Virusul Friend al leucemiei șoarecelui poate induce boala la un număr mare de tulpini de șoarece, ca, de exemplu, RF, Swiss, DBA<sub>2</sub>, DBA, AKR/LWN, C<sub>3</sub>H/P, C<sub>3</sub>H/Crgl, BALB/c, în timp ce, dimpotrivă, alte linii de șoareci, ca, de exemplu, PRI, C<sub>3</sub>H, C<sub>57</sub>BL/6, BALB, sînt rezistente la infecția virală (Odaka și Yamamoto, 1962).

În scopul lămuririi rolului configurației genetice a organismului în rezistența față de infecția virală, șoarecii din linia RF (susceptibili) au fost încrucișați cu șoareci din linia C<sub>57</sub>BL/6, rezistenți la virusul Friend al leucemiei șoarecelui. Drept urmare, toți urmașii (F<sub>1</sub>) au fost la fel de susceptibili, demonstrînd că acest caracter este dominant față de rezistență. Din încrucișarea reversă cu șoarecii liniei rezistente au rezultat șoareci cu un comportament diferit: 50% șoareci susceptibili și 50% șoareci rezistenți la virusul Friend al leucemiei. Încrucișarea reversă cu linia susceptibilă (RF) a dat 100% urmași susceptibili.

Dacă notăm gena dominantă pentru susceptibilitate cu litera S, iar gena alelică recesivă cu litera mică s, din experiențele citate rezultă că :

- genotipul liniei RF este SS (fenotipic 100% susceptibili);
- genotipul liniei C<sub>57</sub>BL/6 este ss (fenotipic 0% susceptibili);
- genotipul F<sub>1</sub> rezultat din încrucișarea celor două linii este Ss (fenotipic 100% susceptibili).

Din încrucișarea reversă a șoarecilor  $F_1$  cu linia RF vor rezulta genotipurile SS și Ss (fenotipic ambele sînt 100 % susceptibile). Încrucișarea reversă cu  $C_{57}$ BL/6 duce la apariția genotipurilor Ss și ss (fenotipic 50 % susceptibili și 50 % rezistenți).

Din încrucișarea șoarecilor  $F_1$  între ei, în generația  $F_2$  vor apărea genotipurile SS, Ss și ss, respectiv în proporțiile 1:2:1 (fenotipic 75 % susceptibili și 25 % rezistenți).

Antigenele H-2 sînt larg răspîndite în țesuturi și reprezintă antigenele majore de histocompatibilitate ale șoarecelui. Lilly și colab. (1964) au constatat că mai multe linii de șoarece, cum ar fi  $C_{58}$ , AKR,  $C_{57}$ BR și  $C_3$ H, avînd același tip de antigen major de histocompatibilitate H-2<sup>k</sup>, sînt toate susceptibile la virusul Gross, de unde s-a tras concluzia că susceptibilitatea la acest virus este corelată cu tipul antigenelor H-2.

Această corelație a fost investigată prin testarea susceptibilității descendenților  $F_1$  rezultați din încrucișarea unei linii rezistente la virus ( $C_{57}$ BL/6), de tip H-2<sup>bb</sup>, cu o linie susceptibilă în proporție de 100 % ( $C_3$ Hf/B<sub>1</sub>), de tip H-2<sup>kk</sup>.

Șoarecii din generația  $F_1$ (H-2<sup>kb</sup>) au prezentat o rezistență foarte mare la leucemii. În urma încrucișării reverse cu linia rezistentă la virus, H-2<sup>bb</sup>, se obțin 50 % șoareci H-2<sup>bb</sup> și 50 % H-2<sup>kb</sup>. Atît animalele homozigote, cît și cele heterozigote pentru alela H-2<sup>b</sup> prezintă foarte rar leucemii. În cazul încrucișării reverse dintre  $F_1$  și linia susceptibilă H-2<sup>kk</sup> rezultă 50 % animale H-2<sup>kk</sup> și 50 % H-2<sup>kb</sup>. Atît în încrucișările reverse, cît și în generația  $F_2$ , șoarecii homozigoți pentru alela H-2<sup>k</sup> au prezentat o susceptibilitate foarte mare, cu o scurtă perioadă de latență la inducerea leucemiei, în timp ce șoarecii heterozigoți pentru H-2<sup>k</sup> ori fără alela H-2<sup>k</sup> prezintă o susceptibilitate mult mai redusă.

Cele două observații expuse diferă asupra unui anumit punct de vedere. În timp ce Odaka și Yamamoto (1962) susțin că susceptibilitatea este dominantă asupra rezistenței în cazul virusului Friend, Lilly și colab. (1964) constată că pentru virusul Gross, dimpotrivă, alela H-2<sup>b</sup> este corelată cu o formă de rezistență dominantă, heterozigoții H-2<sup>kb</sup> fiind rezistenți la infecția virală.

Ambele lucrări sînt însă de acord asupra faptului că susceptibilitatea șoarecilor la leucoză este controlată de un singur factor genetic autosomal, care, după Lilly și colab. (1964), este influențat sau chiar identic cu factorii genetici existenți în locusul H-2.

Este important de notat faptul că la șoareci genele Ir care controlează răspunsul imun prin sinteză de anticorpi față de o serie de antigene sînt situate de asemenea în interiorul regiunii H-2, fapt care ar explica și mai bine de ce susceptibilitatea genetic determinată a unor neoplazii sau a unor boli autoimune este legată de această regiune genetică (Benacerraf și McDevitt, 1972).

*Susceptibilitatea șoarecilor față de virusurile gripale.* S-a constatat că șoarecii tulpinii A<sub>2</sub>G sînt mult mai rezistenți decît alți șoareci de laborator față de virusul gripal de tip A cu afinitate neurotropă sau pneumotropă. Titrul viral atins în creier după inoculare de virus gripal neurotrop la tulpina A<sub>2</sub>G a fost de 100 ori mai mic decît la alte tulpini de șoareci.

Observația că șoarecii consangvini ai tulpinii A<sub>2</sub>G sînt foarte rezistenți la acțiunea letală a unor mixovirusuri a sugerat cercetarea mecanismului genetic al acestui fenomen.

Astfel s-au încrucișat șoarecii tulpinii A<sub>2</sub>G, rezistentă, cu șoarecii tulpinilor A ori C<sub>3</sub>H, susceptibile, obținîndu-se urmași F<sub>1</sub>. Testarea rezistenței la virusul gripal s-a făcut după 7 săptămîni de la naștere, pentru a evita protecția pasivă prin anticorpi antivirali materni.

Presupunînd că o alelă dominantă autosomală determină rezistența față de virusul A neurotrop (șoarecii A<sub>2</sub>G fiind homozigoți pentru această alelă), ar fi de așteptat ca printre descendenți să apară, în urma inoculării cu virus, următorul procentaj de indivizi susceptibili: 0% în generația F<sub>1</sub>, 25% în generația F<sub>2</sub> și 50% în urma încrucișării reverse dintre F<sub>1</sub> și linia susceptibilă C<sub>3</sub>H.

Procentele obținute experimental sînt apropiate de cele calculate prin această ipoteză. Rezultatele sugerează deci că o singură genă dominantă autosomală determină rezistența față de virusul neurotrop gripal A (Lindemann, 1962, 1964; Lindemann și colab., 1963).

*Susceptibilitatea omului față de paludism.* S-a dovedit că factorii genetici care influențează rezistența la boală sînt complecși și pot depinde de mai multe gene ce controlează fie sinteza anticorpilor sau a altor compuși (cum ar fi hemoglobina), fie alte procese metabolice.

În cazul malariei la om, o rezistență deosebită este conferită de două gene cu importanță majoră, gena celulei falciforme (sickle cell, Sk) și gena deficienței în enzima glucozo-6-fosfat dehidrogenază.



Gena celulei falciforme (Sk) este frecvent întâlnită în regiunile din Africa, Asia sau în sudul Europei, unde malarie cu *Plasmodium falciparum* este încă sau a fost hiperendemică pînă recent.

Are caracter codominant, autosomal și conferă rezistența față de malarie. Ea controlează formarea unei hemoglobine anormale (HbS), care diferă de hemoglobina normală A (HbA) prin existența unei substituții a unui aminoacid în lanțul  $\beta$ , unde, în poziția 6, acidul glutamic din HbA este înlocuit de valină în HbS (Baglioni, 1963). Rezistența la malarie este datorată faptului că parazitul ale cărui necesități metabolice sînt adaptate la hemoglobina normală A se dezvoltă mult mai puțin bine în hematiile cu hemoglobină S.

Cînd moleculele de HbS se găsesc în stare redusă, ele devin foarte puțin solubile în soluții saline și se agregă în mase rigide sub formă de bastonașe, care provoacă deformarea hematiei ce ia un aspect de seceră sau o formă filamentoasă.

La indivizii homozigoți, Sk/Sk, toată hemoglobina este anormală, iar fenomenul de deformare a hematiei se produce la presiunea parțială fiziologică a oxigenului; apare anemia severă, urmată de moarte. Această boală este frecventă în copilărie, cînd marea majoritate a indivizilor homozigoți mor în urma unei anemii hemolitice grave.

Hematiile indivizilor heterozigoți, Sk/A, sînt normale în condiții de oxigenare convenabilă, dar iau forma falciformă cînd presiunea parțială a oxigenului este mai scăzută.

Gena responsabilă de această anomalie are o acțiune nefastă, dar ea se menține în populație deoarece conferă indivizilor care o poartă în stare heterozigotă o rezistență crescută la malarie. Aceasta pentru că printre purtătorii genei Sk atît procentul indivizilor cu paraziți ai malariei, cît și numărul de paraziți ce populează fiecare individ în parte sînt mult scăzute. Indivizii heterozigoți, Sk/A, posedă atît HbS, cît și HbA, de unde concluzia că la nivelul macroorganismului cele două alele sînt codominante.

Deși un număr mare de gene este eliminat din populație prin moartea indivizilor homozigoți, gena Sk se întâlnește în formă heterozigotă la un procent mare, ce atinge pînă la 40 % din populațiile Africii, Indiei, Europei de sud, datorită avantajului selectiv al purtătorilor (Allison, 1960, 1964; Gilles și colab., 1967).

Gena deficienței în enzima glucozo-6-fosfat dehidrogenază determină o anomalie ereditară legată de sex, exprimată complet la masculi (hemizigoți) sau la femeile homozigote și cu o exprimare

particulară la femeile heterozigote, de unde concluzia că această genă este codominantă cu alela ei normală.

Incidența înaltă a deficienței în enzima glucozo-6-fosfat dshidrogenază (G-6-PD) este întâlnită în regiunile malarice. Deficiența enzimatică determină o degradare accentuată a hemoglobinei și prin aceasta limitează multiplicarea paraziților malariei, în hematii. Există numeroase date care vin în sprijinul faptului că deficiența în G-6-PD conferă un avantaj selectiv purtătorului față de infecția malarică, potențial letală (Allison 1960, 1964; Gilles și colab., 1967).

*Corelația dintre grupurile sangvine și susceptibilitatea omului față de gripă.* O serie de lucrări au atras atenția asupra sensibilității mai mari a indivizilor de grup sangvin 0, comparativ cu cei din grupa A, față de infecția cu virusul gripal A<sub>2</sub> (McDonald și Zuckerman, 1962).

*Corelația dintre grupurile sangvine și susceptibilitatea la variolă.* Diverse cercetări au arătat că indivizii cu grup sangvin B sau 0, ale căror seruri conțin aglutinine anti-A, prezintă rezistență față de variolă. După unii autori, această rezistență se datorește faptului că antigenul virusului vaccinal este înrudit cu antigenul de grup A (O. M. S., 1968).

**Anomalii ereditare ale funcției leucocitare asociate cu creșterea sensibilității la infecție.** *Boala nurcii aleutine* apare în mod spontan și este caracterizată prin hipergammaglobulinemie, creșterea proteinemiei totale, descreșterea albuminei serice, prezența de fibrinoid în pereții arteriali și în glomerulul renal. Este caracterizată de asemenea printr-o proliferare intensă a celulelor plasmocitare, fără formare de tumori. Se observă creșterea marcată a concentrației unui constituent special de gammaglobulină, amintind proteina de mielom monoclonal (Henson și colab., 1962; Porter și colab., 1965).

Nurcile homozigote pentru alela aleutin recesivă (aa) sînt cele mai frecvent afectate de boală; ocazional, boala apare și la heterozigoți. S-a observat că leucocitele nurcilor homozigote pentru alela recesivă (aa) diferă de leucocitele animalelor normale, pe de o parte, prin granulațiile lor și, pe de altă parte, prin faptul că prezintă anomalii ale funcției fagocitare. Aceste anomalii determină boala propriu-zisă, care se transmite ereditar și se manifestă prin creșterea sensibilității acestor animale față de diferite infecții.

*Sindromul Chediak-Higashi* (Windhorst și colab., 1966) caracterizează o boală a copilăriei la om, ce se manifestă printr-o hipopigmentare a pielii, părului și a ochilor, cu o marcată fotofobie; copiii

bolnavi sînt susceptibili la infecții frecvente și severe. Drept urmare, ei mor în prima copilărie. În sângele periferic se observă în leucocitele neutrofile și eozinofile granulații anormal de mari. Granulațiile anormale apar și în limfocite sau în monocite. De asemenea, granulele de melanină prezintă un aspect anormal.

Apariția de cazuri neobișnuit de frecvente, la diferite grupuri de frați-surori la care se constată un grad înalt de consangvinitate la părinți, a pus în evidență determinismul genetic al bolii; transmiterea ereditară se realizează ca un caracter unigenic autosomal, recesiv (Windhorst și colab., 1966).

*Granulomatoza cronică* apare în copilărie și este caracterizată printr-o creștere a sensibilității la infecția prin germeni mai puțin virulenți care la omul normal nu determină boala.

Are o transmitere recesivă, legată de sex. Boala este determinată de o anomalie a leucocitelor neutrofile care fagocitează normal bacteriile, virusurile și alte particule, dar nu pot distruge germenii intracelular. În aceste cazuri nu se observă o creștere a nivelului hexozo-monofosfatului din leucocite, ca în cazul fagocitozei normale (Baehner și Nathan, 1966, 1967; Vilde, 1971).

Femeile purtătoare, heterozigote, posedă două populații de leucocite — una normală și alta anormală. Capacitatea acestor celule de a distruge bacteriile înglobate este intermediară, între capacitatea leucocitelor de la indivizii normali și a celor de la indivizii homozigoți atinși de granulomatoza cronică (Windhorst și colab., 1967).

**Diferențe ereditare ale sensibilității la infecții exprimate la nivelul macrofagelor.** *Arbovirusurile de grup B la șoarece.* O remarcabilă diferență de sensibilitate față de virusul febrei galbene s-a manifestat între diverse linii de șoareci. Această diferență este determinată printr-o singură pereche de gene, alela care conferă rezistența fiind alela dominantă din genom (Sabin, 1952 a, b).

Astfel, prin încrucișări între liniile de șoareci PRI (rezistenți) cu șoarecii C<sub>3</sub>H/He (susceptibili) și prin încrucișările reverse s-a arătat că factorul care controlează rezistența liniei PRI se comportă ca o singură genă dominantă autosomală. Generațiile obținute prin încrucișări reverse între un heterozigot mascul și femela homozigot recesivă, susceptibilă, au prezentat o distribuție de 1 :1 a rezistenței și susceptibilității.

Același lucru se constată prin încrucișarea liniei BRVR (rezistentă) cu linia C<sub>3</sub>H/He (susceptibilă). Modul de transmitere eredi-

tară a genei ce controlează rezistența liniei BRVR față de arbovirusul B este similar cu cel al genei pentru rezistență din linia PRI.

Mecanismul celular prin care gena conferă rezistența la virus se exprimă în macrofagele sistemului reticulo-endotelial. În culturile de macrofage din splină sau din exsudate peritoneale obținute de la șoareci rezistenți nu se constată multiplicarea virusului, în schimb în culturile de macrofage de la tulpini de șoareci sensibili, virusul se poate multiplica. Spre deosebire de aceasta, culturile de celule din rinichi și pulmonii de la linii de șoareci rezistente sau susceptibile s-au comportat asemănător.

În concluzie, baza genetică a rezistenței tulpinilor PRI și BRVR la arbovirusuri, stabilită prin experiențe de reproducere încrucișată și încrucișări reverse, este determinată de prezența unei gene din genomul acestor șoareci, care este dominantă și autosomală. Expresia fenotipică a acestei rezistențe moștenite se realizează în macrofagele sistemului reticulo-endotelial (Goodman și Koprowski, 1962).

*Virusul hepatitei șoarecelui* (VHS). S-a observat că șoarecii liniei PRI sînt susceptibili la infecția cu virusul hepatitei șoarecelui, pe cînd șoarecii tulpinilor BSVS și C<sub>3</sub>H sînt rezistenți.

Încrucișări între diversele linii cu susceptibilitate diferită (de ex., tulpinile PRI și C<sub>3</sub>H), precum și încrucișările reverse au arătat că susceptibilitatea la boală a segregat ca și cum ar fi controlată de o singură genă dominantă.

Culturile de macrofage de la șoarecii susceptibili permit multiplicarea VHS, prezentînd efecte citopatogene, pe cînd în macrofagele de la șoarecii rezistenți, virusul nu se poate multiplica și nici nu determină efecte citopatogene. Drept urmare, culturile de macrofage preparate din tulpini susceptibile produc constant mai mult virus decît cele rezistente (Vainio, citat după O.M.S., 1968).

Deci macrofagul este celula responsabilă pentru susceptibilitatea genetică a șoarecilor PRI. Există o corelație clară între susceptibilitatea *in vivo*, testată direct pe animale, și susceptibilitatea *in vitro*, testată pe culturi de macrofage (Kantoch și colab., 1963).

S-a demonstrat experimental că șoarecii tulpinii BSVS, care sînt genetic rezistenți la VHS, după timectomie neonatală devin susceptibili la acest virus. De aici s-a tras concluzia că pentru ca animalele să reziste infecției virale este necesară și integritatea mecanismelor de apărare imună. Cu alte cuvinte, la animalul rezistent la

boală există și funcționează corect atît gena ce controlează rezistența macrofagelor față de infecția virală, cît și genele ce controlează reacțiile imunologice (Bang și Warwick, 1960).

**Diferențe ereditare, cu exprimare fenotipică complexă, ale rezistenței față de agenții infecțioși.** *Rezistența păsărilor față de salmoneloze.* S-au selecționat în mod progresiv păsări rezistente față de infecția cu *Salmonella gallinarum*. În urma încrucișării păsărilor rezistente față de infecție cu păsări susceptibile s-a obținut la descendenți o scădere a rezistenței, ceea ce pune în evidență dominanța susceptibilității asupra rezistenței.

Încrucișarea hibrizilor cu păsări ale liniei susceptibile duce la apariția unor descendenți la care se constată o scădere și mai accentuată a rezistenței, în timp ce încrucișarea hibrizilor cu păsări rezistente a mărit rezistența descendenților. Rezultatul încrucișărilor reverse reprezintă deci o medie între rezistență sau susceptibilitatea hibrizilor  $F_1$  și cea a tulpinilor parentale. Rezultă că numărul de perechi de gene implicate în determinarea rezistenței păsărilor la *Salmonella* este mai mare, aceasta deoarece rezultatele încrucișărilor se abat de la cele așteptate în cazul unui caracter genetic mendelian unifactorial (Gowen, 1960, a, b).

*Rezistența șoarecilor față de salmoneloze.* Încrucișarea realizată între tulpinile susceptibile și cele rezistente a arătat că urmașii acestor animale au fost aparent mai rezistenți. Concluzia acestor experiențe este că mai multe gene sînt implicate în controlul susceptibilității șoarecilor față de salmoneloze. Acest fapt rezultă și din constatarea că, din încrucișarea între diverse linii susceptibile, o parte dintre urmași au o rezistență crescută.

Observațiile asupra moștenirii rezistenței și susceptibilității față de infecția cu *S. typhi-murium* la șoarece sînt comparabile cu acelea descrise la păsările domestice — în cazul bolii tifoidice cu *S. gallinarum*.

Studiul diferitelor linii de șoarece a arătat o creștere a numărului total de leucocite în cazul animalelor cu rezistență crescută, infectate cu *S. typhi-murium*, în timp ce la tulpinile susceptibile s-a constatat un număr mult mai mic de leucocite. De asemenea, macrofagele din ficat prezentau diferențe în comportamentul lor. La tulpinile rezistente, bacteriile au fost rare ori găsite în macrofage, nu erau bine colorate, iar peretele bacterian arăta semne de degenerare. În schimb, în macrofagele tulpinilor susceptibile, bacteriile erau

bine colorate și prezentau un aspect de reproducere normală, deci nu erau distruse în urma fagocitozei.

*Rezistența șoarecilor la ectromelie.* Diferențele de sensibilitate sau de rezistență la ectromelie a multor linii de șoareci sînt probabil corelate cu diferențele de intensitate a răspunsului imun, după cum arată dozarea anticorpilor neutralizați.

Diferențele de susceptibilitate față de această boală sînt mai evidente la șoarecii în vîrstă de două luni.

Cercetîndu-se baza rezistenței tulpinii  $C_{57}B_1$  s-a constatat că aceste animale răspund mult mai repede și mai efectiv prin producerea de anticorpi antivirali neutralizanți și probabil fixatori de complement.

Comportamentul diferit al tulpinilor de șoareci este mai evident cînd virusul este inoculat în laba piciorului și este redus la maximum cînd virusul este injectat intracerebral, probabil pentru că în creier nu ajung anticorpi în cantitate suficientă. Diferențele duratei de supraviețuire reies limpede cînd șoarecii trăiesc mai mult de șase zile, probabil fiindcă după acest interval de timp răspunsul imun s-a dezvoltat suficient la șoarecii tulpinii  $C_{57}B_1$  pentru a influența cursul bolii (Schell, 1960).

Există cercetări care arată că virusul ectromeliei se dezvoltă la fel de bine pe culturi de macrofage provenind de la șoarecii tulpinii  $C_{57}B_1$  (rezistentă), ca și pe culturi de macrofage provenind de la șoarecii din tulpina Walter și Eliza Hall Institute (susceptibilă) (Roberts, 1963, 1964).

Încrușiînd tulpina  $C_{57}B_1$  (rezistentă) cu tulpina Walter și Eliza Hall Institute (susceptibilă), generația  $F_1$  a fost uniform rezistentă, arătînd că rezistența la boală este un caracter dominant. Încrușarea reversă între  $F_1$  și părinți rezistenți a dat urmași rezistenți, iar încrușarea reversă cu părinți susceptibili a determinat caracterul de susceptibilitate la 50 % din urmași.

Datele acestor experiențe arată că rezistența este moștenită ca un singur factor dominant autosomal și că șoarecii  $C_{57}B_1$  sînt homozigoți pentru acest caracter (Schell, 1960).

*Rezistența șoarecilor față de virusurile oncogene (tumorigene).* Diferențele determinate genetic ale sensibilității șoarecilor față de virusurile tumorigene par a fi strîns legate de eficacitatea mecanismelor imunitare cu suport celular. De exemplu, linia  $C_{57}B_1$  este rezistentă la tulpinile cele mai oncogene de virus polioma, dar o timectomie neonatală face să dispară această rezistență, care însă reappare

după inocularea de celule splenice singeneice (Law, 1966). La șoarecii  $C_3H$ , inocularea unei tulpini foarte oncogene a virusului poliomei provoacă apariția de numeroase tumori, în timp ce după inocularea tulpinii M, puțin oncogene, apar rareori tumori; după timentomie neonatală însă și tulpina M provoacă de asemenea apariția frecventă a tumorilor (Malmgren și colab., 1964).

Formarea de tumori prin adenovirus tip 12 devine posibilă la șoarecii  $C_3H$ , relativ rezistenți, și este facilitată la șoarecii CBA mai sensibili, prin timentomie neonatală sau prin administrare de ser antilinfocitar (Allison 1965; Allison și colab., 1967).

Deci inducerea de tumori prin virus depinde de interacțiunea a trei factori principali: de constituția genetică a virusului, de constituția genetică a gazdei și, corelat cu aceasta din urmă, de intensitatea reacției imune față de noul antigen tumoral.

**Hipersensibilitatea față de histamină, indusă la șoarecii albi prin *Bordetella pertussis*.** Parfentjev și Goodline (1948) au observat că, prin administrarea de *B. pertussis* la șoareci albi, rezistența cunoscută a acestora față de histamină scade foarte mult (100 de ori). Această sensibilizare față de histamină este determinată de factorul histamino-sensibilizant (FHS) din *B. pertussis*. S-a constatat că diverse linii de șoareci răspund diferit la administrarea acestui germen (Tokuda și colab., 1963; Bergman și Munoz, 1968).

Pentru a cerceta modul de transmitere ereditară a răspunsului față de FHS, s-au încrucișat diferite linii consangvine de șoareci sensibili și rezistenți, cum ar fi SWR/J (susceptibili) cu CBA/J (rezistenți). Hibrizii  $F_1$  obținuți prin încrucișarea acestor linii prezintă o mortalitate de 100%, dacă după vaccinarea cu *B. pertussis* li se administrează histamină, deci capacitatea de sensibilizare la histamină prin FHS, se comportă ca un caracter dominant. Moștenirea dominantă a fost de asemenea observată și la încrucișarea altor tulpini sensibile cu tulpini rezistente.

La șoarecii generației a doua ( $F_2$ ), ca urmare a moștenirii unifactoriale dominante a răspunsului la FHS, mortalitatea este de 75%. După încrucișări reverse între hibrizii  $F_1$  și CBA/J (părintele homozigot recesiv pentru rezistență la FHS), mortalitatea a fost de 50%. Prin încrucișarea reversă a hibrizilor  $F_1$  cu SWR/J (părinte homozigot dominant pentru susceptibilitate), urmașii au prezentat o mortalitate de aproape 100%, în urma vaccinării cu *B. pertussis* și a administrării de histamină. Încrucișarea reversă dintre toți

descendenții  $F_2$  și linia SWR/J (sensibilă) a determinat o mortalitate de 50%, ceea ce concordă cu o moștenire unifactorială.

În concluzie, sensibilitatea la FHS este controlată printr-o singură genă dominantă autosomală.

Există date experimentale care arată că gena care controlează sensibilitatea prin FHS controlează și alte reacții biologice.

De exemplu, șoarecii liniei BSVS sînt sensibili atît față de FHS, cît și față de producerea encefalomielitei alergice experimentale, pe cînd șoarecii liniei BRVR sînt rezistenți la ambele condiții patologice.

S-ar putea considera că factorii genetici care influențează răspunsul șoarecilor la FHS din *B. pertussis* își găsesc echivalentul lor și la om. Astfel, encefalopatiile care apar arareori după vaccinare antipertussis par să aibă un mecanism de producere asemănător aceluia de la șoarecii sensibilizați la histamină (Pozsgı, 1972).

## BIBLIOGRAFIE

- ALLISON A.C., 1960, Ann. N.Y. Acad. Sci., **91**, 710.  
 ALLISON A.C., 1964, Cold, Spr. Harb. Symp. quant. Biol., **29**, 137.  
 ALLISON A.C., 1965, Arch. ges. Virusforsch., **XVII**, 280.  
 ALLISON A.C., BERMAN L.D., LEVEY R.H., 1967, Nature, **215**, 185.  
 BAEHNER L., NATHAN D.G., 1966, Blood, **28**, 1010.  
 BAEHNER R.L., NATHAN D.G., 1967, Science, **155**, 835.  
 BAGLIONI C., 1963, *Molecular Genetics*, sub red. J.H. Taylor, Acad. Press, New York, partea I, p. 405.  
 BANG F.B., WARWICK A., 1960, Proc. nat. Acad. Sci., Wash., **46**, 1065.  
 BENACERRAF B., McDEVITT O.H., 1972, Science, **175**, 273.  
 BERGMAN R.K., MUNOZ J., 1968, Int. Arch. Allergy, **34**, 331.  
 CRITTENDEN L.B., OKAZAKI W., REAMER R., 1963, Virology, **20**, 541.  
 GILLES H. M., FLETCHER K.A., HENDRICKSE R.G., LINDNER R., REDDY S., ALLAN N. 1967, Lancet, **7482**, 138.  
 GOODMAN G., KOPROWSKI H., 1962, Proc. nat. Acad. Sci., Wash., **48**, 160.  
 GOWEN J.W., 1960 a, Ann. N.Y. Acad. Sci., **91**, 689.  
 GOWEN J.W., 1960, b, Bact. Rev., **24**, 192.  
 HARRIS R., 1963, Acta genet., Bassel, **13**, 44.  
 HENSON J. B., GORHAM J.R., LEADER R.W., WAGNER B.M., 1962, J. exp. Med., **116**, 357.  
 HOLMES B., 1967, J. clin. Invest., **47**, 1432.  
 KANTOCH N.A., WARWICK A., BANG F.B., 1963, J. exp. Med., **117**, 781.  
 LAW W., 1966, Cancer Res., **26**, 551.



- LILLY F., BOYSE A., E., OLD L.J., 1964, *Lancet*, **7371**, 1207.
- LINDEMANN J., 1962, *Virology*, **16**, 203.
- LINDEMANN J., LANE C.A., HOBSON D., 1963, *J. Immunol.*, **90**, 942.
- LINDEMANN J., 1964, *Proc. Soc. exp. Biol., N.Y.*, **116**, 506.
- MALMGREN R.A., ROBSON A.S., CARNEY P.G., 1964, *J. nat. Cancer. Inst.*, **33**, 101.
- MCDONALD J.C., ZUCKERMAN A.C., 1962, *Brit. med. J.*, **2**, 89.
- ODAKA T., YAMAMOTO T., 1962, *Jap. J. exp. Med.*, **32**, 405.
- PARFENTJEV I.A., GOODLINE M.A., 1948, *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **92**, 411.
- PAYNE L.N., BIGGS P.M., 1964, *Virology*, **24**, 610.
- PORTER D.D., DIXON F. J., LARSEN A.E., 1965, *Blood*, **25**, 736.
- POZSGI N., 1972, *Microbiol. Parazitol. Epidemiol.*, **XVII**, 369.
- PRINCE A.M., 1958, *J. nat. Cancer Inst.*, **20**, 843.
- ROBERTS I.A., 1963, *Brit. J. exp. Path.*, **44**, 465.
- ROBERTS I.A., 1964, *J. Immunol.*, **92**, 837.
- RUBIN H., 1960, *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.*, **46**, 1105.
- RUBIN H., 1965, *Virology*, **26**, 270.
- SABIN A.B., 1952 a, *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.*, **38**, 540.
- SABIN A.B., 1952 b, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **54**, 936.
- SCHELL K., 1960, *Austr. J. exp. Biol. med. Sci.*, **38**, 271.
- TOKUDA S., WEISER R.S., MUNOZ J., LARSON C., 1963, *J. infec. Dis.*, **112**, 77.
- VAINIO T., 1963, *Ann. Med. exp. Fenn.*, **41**, Suppl. 1, 3.
- VILDE J.L., 1971, *Ann. Inst. Pasteur*, **120**, 382.
- WARDLAW A.C., 1970, *Int. Arch. Allergy*, **38**, 573.
- WATERS N.F., BURMESTER B.R., 1961, *J. nat. Cancer Inst.*, **27**, 655.
- WINDHORST D.B., ZELICKSON S.A., GOOD A.R., 1966, *Science*, **151**, 81.
- WINDHORST D.B., HOLMES B., GOOD A.R., 1967, *Lancet*, **7493**, 737.
- \* \* \* O.M.S., 1968, *Aspects génétiques de la réponse immunitaire*, Série de rapports techniques, **402**.



# Immunogenetics

(SUMMARY)

The present work presents some immunological problems considered from the genetical point of view.

The first chapter deals with the immunological recognition of foreign cells and macromolecules in organisms and with the genetic laws which govern the inheritance of the macromolecular configuration in the self area of the offsprings.

It points out that cellular recognition of foreign macromolecules is a natural process appearing far in phylogeny, in the protozoan. By evolution, this more and more complex process is involved in the defence of the macroorganisms against heterologous macromolecules by immune, as well as nonimmune mechanisms.

The direct cellular recognition of nonself compounds, by membrane receptors, appears enhanced in the higher evolved species due to the interaction of foreign cells and macromolecules with specific antibodies.

The second chapter deals with the immunoglobulin structure and the genetic mechanism controlling the synthesis of these proteins. After a brief description of the immunoglobulin structure, the multiple variations appearing in these macromolecules are considered from the genetical point of view.

As concerning the constant (C) regions of the H chains, some differences in the primary structure of the polypeptide chains determine the group (isotype) and subgroup specificity, other differences determining the allotype specificity.

In all normal sera H chains of any groups and subgroups can be identified so that these polypeptide chains are genetic markers for different nonallelic genes, each gene controlling a single group and subgroup specificity.

By contrast the allotypic differences within each subgroup, account for the allelic forms of the same gene controlling a H chain of a given subgroup.

Variations of the constant regions of L chains are also discussed; there is shown that in the case of H chains, segregation or nonsegregation of a given marker between the offsprings may subdivide these differences of the L chains in some ones showing different genes controlling various L chains, as for instance K chains or the multiple types of the lambda chains ( $\text{Kern}^-\text{Oz}^-$ ;  $\text{Kern}^-\text{Oz}^+$  or  $\text{Kern}^+\text{Oz}^-$ ) and others—the allotypic differences—accounting for the various allelic forms of a single gene.

The variable regions of L and H chains are further discussed in another subsection of this chapter. The importance of these regions in the combining sites specificity and also the correlation between the configuration of the V regions and the idiotypic specificity of the antibodies are discussed too. Some recent works are presented which lend support for affirmation that the idiotypic specificity is genetically inheritable and consider hence that the idio type may be regarded as the genetic marker of the V regions of both L and H chains.

The next section of the same chapter deals with the phylogenetic evolution of the genes controlling the immunoglobulin synthesis. It describes the homologous regions of the immunoglobulin chains and hence, the possibility for both, the L and H chain, to have evolved from an unique primitive gene. Duplication of this primitive gene has led to the L chain gene, whereas duplication of parts or of the entire gene for the L chain has led to the H chain gene.

The chapter concerning the genetical determinism of the immunoglobulin structure includes also a section concerning the allotypes of human immunoglobulins. In this section the different genetic markers of human immunoglobulins as the Inv, Am, Gm, and the ISf systems, are presented.

The immunoglobulin biosynthesis is another subsection of the same chapter.

After some considerations on the allelic exclusion and subgroup exclusion phenomena occurring in each antibody producing cell experimental proofs are presented which show that the L and H chains are synthesized by different messenger RNA macromolecules forming polysomes with different sizes. The release of L and H chains from ribosomes and assembly of the complete immunoglobulin molecule is also discussed.

The different hypothesis explaining the way by which a great number of different V genes arise, coding for combining sites with

affinities for different antigenic determinants are also reviewed in another section. The translocation of the V cistron near the C cistron finally forming a complete VC gene coding for a complete L or H chain is presented as the most probable event occurring during the ontogenetic development of the antibody forming clones.

The germ line evolution hypothesis and the somatic hypothesis (somatic recombination or somatic hypermutability) are presented as possible mechanisms explaining the variability of the combining sites. Finally the mechanisms selecting the only clones which synthesize antibodies against non self antigenic determinants are commented.

In this context the recent Jerne theory, according to which histocompatibility antigens represent the barrier retaining in the thymus, and perhaps in the bone marrow, those clones producing antibodies against the self-macromolecules is presented.

The third chapter deals with the interactions between various cellular types during the immune response. The interaction between macrophages and immunocompetent cells as well as the interaction between T and B immunocompetent cells are briefly described.

Are the nucleic acids mediators involved in these interactions? The different opinions concerning their possible role *in vivo* are further discussed. Some experiments are presented suggesting that the nucleic acids can transference the antigenic information from macrophages to antibody synthesizing cells either encoded in the specific nucleotide sequence of their structure, or as "superantigens" i.e. complexes formed by interaction of the antigen with small molecular RNA. Other scientists consider that *in vivo* the nucleic acids stimulate unspecifically the antibody forming B cells (as many other polyanions). This opinion is also commented. Although the discussion is still open we consider that this latter point of view seems to be more adequate in explaining the adjuvant action of the nucleic acids. Numerous works have shown that immune responsiveness is genetically determined, some strains responding to an antigen, whereas other appear as unresponders.

Chapter V deals with the genetic control of the immune response to various antigens.

The Ir genes controlling the immune responses to different antigens, such as synthetic polypeptides, native proteins or polysaccharides, are first described. The correlation of the Ir genes with

the genes controlling the histocompatibility antigens, and also the phenotypic expression of the Ir genes, represent other problems reviewed in this chapter. These findings are of greater importance for biologists and physicians, since, as Benacerraf and McDevitt have pointed out "it is highly probable that such a genetic control may play an important role in the inherited susceptibility of some human families or animal lines to some infectious diseases".

Chapter VI deals with genetic disturbances in the immunoglobulin synthesis. Some of these diseases as sex-linked agammaglobulinemia are inherited during many generations showing genetic abnormalities of the germinative lines. Some others, as multiple myelomas,  $\mu$  or  $\gamma$  heavy chain diseases are also determined by genetic deficiencies but occurring in the somatic lines, involved in immunoglobulin synthesis. Recent works trying to correlate the different immunoglobulin deficiency diseases with genetic disturbances of the T or B immunocompetent cell lines are also discussed. Many studies have shown that at least some autoimmune diseases appear by genetic alterations too. Such alterations may occur either in the germinative lines, thus determining an inheritable predisposition to the autoimmune diseases, or in the somatic lines synthesizing autoantibodies, which are no longer sensitive to the functional inhibition, normally induced by the self compounds. These problems are briefly reviewed in the VIth chapter, which discusses the genetic determination of the autoimmune diseases.

Chapter VII presents some inheritable deficiency of different complement components, in humans or animals as mice, guinea-pig or rabbits.

The next section of the monograph deals with the immune reactions occurring during tissue transplantations. The major or minor genes controlling respectively strong and weak histocompatibility antigens and the genetic laws governing rejection or acceptance of a tissue transplanted from parental lines to offsprings are discussed.

After a brief presentation of the current techniques employed for testing the histocompatibility, as the mixed lymphocytes culture or serologic testing, the major histocompatibility locus in man (HL—A locus) and the H—2 locus of the mice are described. This section ends by some considerations on the thymus role in acceptance of the transplants and on the fate of the immunocompetent transplanted T and B cells demonstrated by the graft versus host reaction.

As many biologists have observed the natural resistance of some human or animal individuals to some infectious diseases is inherited during many generations. The last section described hence some cases of inheritable natural resistance.

The authors point out that this resistance may be determined by nonimmune mechanisms. Some examples of natural resistance to infectious agents are given, as the resistance of some chicken or mice strains to viral leukemias or other viruses, or the resistance of humans bearing the sickle cell anemia gene to malaria.

Redactorul: I. I. MIHAILOVICI  
Tipograful: "MOLDAVIA" BUCURESTI

But de tipar 10 x 15 cm. 1958. 11000 exemplare.  
Formata 18,5 x 24,5 cm. 50 g/m<sup>2</sup>. Cota de tipar 17,5.  
C. Z. pentru bibliotecile: 670.8.037:575.1  
C. Z. pentru bibliotecile: 670.8.037:575.1

Intreprinderea "Poligrafic" "Molдавия"  
str. Buzovana nr. 25-35, Bucuresti  
REPUBLICA SOCIALISTA ROMANIA

1958. P. 100 exemplare 804





