

SUBFRAȚIUNILE SISTEMULUI GAMA ȘI ROLUL LOR ÎN IMUNITATE

A. Cojocaru

Una din modalitățile de adaptare a organismului la pătrunderea antigenilor în mediul intern constă în elaborarea anticorpilor, substanțe speciale de apărare, capabile să reacționeze specific cu antigenul care le-a generat.

Importanța fundamentală a anticorpilor în reacția de apărare antimicrobiană rezidă în faptul că ei creează posibilități pentru aparatul nespecific de apărare al organismului (alexina, fagocitele) de a acționa asupra germenilor patogeni, propria lor activitate bactericidă fiind insignifiantă

Studii experimentale laborioase au fost consacrate naturii anticorpilor. Într-o primă etapă cercetările s-au axat pe studii diferențelor dintre fracțiunile proteice ale serurilor normale și imune, în etapa actuală obiectivul fundamental constând în obținerea anticorpilor puri.

Stabilirea prin cercetări electroforetice a scăderii conținutului în globuline al serurilor imune după absorbția anticorpilor cu antigeni specifici, a constituit cea dintâi dovadă directă a naturii globulinice a anticorpilor, iar certitudinea acestui fapt a contribuit la perfecționarea procedeelelor de separare a globulinelor de restul fracțiilor serice și la intensificarea cercetărilor imunologice în direcția studiului comparativ al fracțiilor globulinice din serurile normale și imune.

Obținerea globulinelor serice pe cale analitică sau preparativă se realizează astăzi prin salifiere, precipitare la rece cu alcool, electroforeză pe hîrtie, în gel, de convecție sau preparativă, ultracentrifugare, cromatografie pe coloană cu schimbători de ioni celulozici și filtrare prin gel cu utilizarea sitelor moleculare organice. Precipitarea salină, dependentă de ionii soluției saline, pH, temperatură și concentrație proteică, permite o anumită delimitare a fracțiilor proteice prin studiul inflexiunilor curbei de precipitare salină a proteinelor plasmatiche. Utilizarea solvenților organici (etanol, metanol etc.), la temperaturi joase, reduce constanta dielectrică a mediului, permițînd precipitarea diferențiată a proteinelor fără denaturarea inevitabilă a acestora la temperatura obișnuită. Prin procedee electroforetice și de imunelectroforeză s-au individualizat la om peste 18 fracțiuni proteice plasmatiche, numărul lor fiind în continuă creștere.

S-a stabilit neîndoiește că anticorpii se distribuie în toate fracțiunile electroforetice ale globulinelor, predominînd în fracțiunile gama-globulinice. Recent, *Strejan și Flechner* au adus dovezi directe pentru existența anticorpilor în fracțiunea α_1 -globulinică, imunizînd iepurii cu celulele obținute prin dezintegrarea ultrasonică a insectelor din specia *Strigomonas fasciculata*.

Fracțiunile constitutive ale gama-globulinelor au caracteristici fizico-chimice și imunologice comune, precum și proprietăți specifice, alcătuiind un adevărat sistem gama-globulinic. Acestui sistem îi aparțin 3 familii distincte de proteine gama, denumite după terminologia recent adoptată γ A-, γ M- și γ G-globuline.

γ A-globulinele au greutatea moleculară aproximativ de 160 000, respectiv constanta de sedimentare 7 S (numai 5% din γ A-globuline, rezultate probabil printr-un proces de dimerizare, au constante de sedimentare 13 S) și sînt prezente în plasma umană în concentrația de 112—200 mg%. La imunelectroforeză se separă sub forma unui arc alungit de precipitare. 7 S-gama-globulinele au fost preparate în stare pură de *Kapusta și Halberstam*, *Glicoproteinele*, solubile în apă distilată (pseudoglobuline), dispun de grupări determinante antigenice comune întregului sistem gamaglobulinic, precum și de grupări determinante specifice: γ A-globulinelor. De natură γ A-globulinică sînt anticorpii antitetanici, antidifterici, antitifici 0 etc.

γ M-globulinele sînt macroglobuline cu greutatea moleculară de 990 000 și constanta de sedimentare 19 S. *Walton și colab.* disting în această grupă 3 subfracțiuni. Sînt eterogene, atît sub raportul vitezei de migrare electroforetică, mai redusă decît a γ A-globulinelor, cît și sub aceea a greutatei moleculare și constantei de sedimentare care variază între 18—39 S (macroglobulinemia Waldenström), după unii autori între 30—150 S. Avînd structură polimerică, γ M-globulinele se scindează prin tratarea serului macroglobulinic cu compuși sulfhidrilici (mercaptoetanol, glutation, bisulfid) în subunități structurale formate din 1—3 lanțuri polipeptidice. La imunelectroforeză, γ M-globulinele cu constanta de sedimentare 19 S corespund porțiunii liniare a liniei de precipitare, iar 30—150 S-macroglobulinele, arcului din apropierea rezervorului de antigen. Anticorpii macroglobulinici apar în urma stimulării organismului prin antigeni celulari (bacterii, elemente figurate ale singelui) sau proteine denaturate prin procese patologice (anticorpi heterofili, factorul LE, aglutininele la rece) Sînt de natură macroglobulinică factorul reumatoid, aglutininele antitifice O, anticorpii *Forsmann*, izo-hemaglutini-

nele anti-A și anti-B (la 1/3 din populație), anticorpii anti-tiroidieni, autoanticorpii antinucleici. Subunitățile 6,5 S, care provin din disocierea γ M-globulinelor în prezența mercaptanilor, pierd funcția de anticorp, dar reagregarea moleculelor duce la reconfigurarea proprietăților imunologice pierdute. Acest fapt demonstrează rolul esențial al configurației tridimensionale macromoleculare și al legăturilor -S-S- în specificitatea anticorpilor.

γ G-globulinele, cu greutatea moleculară similară γ A-globulinelor (160.000), au constanta de sedimentare 6—7 S. Molecula simetrică, avind o lungime de 240 Å și o grosime de 40 Å, conține 2 perechi de lanțuri polipeptidice denumite A (H) și B (L). Prezente în fracțiunea II-3 după *Cohn*, γ G-globulinele pot fi obținute cu rivanol într-un grad avansat de puritate (98%). În comparație cu γ A- și γ M-globulinele, au un conținut redus în glucide și cea mai scăzută mobilitate electroforetică. La imunelectroforeză se separă sub forma unei linii de precipitare foarte alungită, care se extinde până în zona α_2 -globulinelor. *Kornfeld* consideră că γ G-globulinele umane constau dintr-un amestec din cel puțin 3 proteine cu structură antigenică asemănătoare; la fel *Dray* distinge în 7 S-gamaglobuline umane 3 componenți antigenici notați cu gama-A, gama-B, și gama-C, care pot fi identificați prin imunprecipitare cu antiserul de maimuță. După date recente sînt incriminate în structura γ G-globulinelor 4—7 grupări determinante sub raport imunologic, numărul lor ridicindu-se după unii autori la 10 sau 15, aceste date necesitînd confirmări ulterioare. 90% din cantitatea totală a anticorpilor din serul uman aparține γ G-globulinelor, restul de 10% fracțiunilor γ A- și γ M-globulinice. Dintre anticorpii mai bine studiați ai fracțiunii γ G-globulinice menționăm anticorpii antifetici H, anti-Rh incompleți, antidifterici, anti-Haemophilus pertussis etc.

Greutatea moleculară și constanta de sedimentare diferite, conținutul în hexoze, fucoză, hexozamină și acid neuraminic variat, cit și mobilitatea electroforetică diversă demonstrează eterogenitatea globulinelor sistemului gama. În ceea ce privește diferențele lor antigenice, ele sînt condiționate genetic, alotipurile utilizate ca markeri în experiențele de transplantare fiind sub controlul direct a două locusuri genetice distincte; în mecanismul lor ereditar sînt incriminate două perechi de gene autozomale care segregă independent.

Cercetările recente, efectuate cu procedeul modern al cromatografiei pe coloană cu schimbători de ioni celulozici și geluri filtrante, au adus noi dovezi în sprijinul existenței unei mari diversități a globulinelor gama, considerate altădată o fracțiune omogenă a proteinelor plasmatic.

În 1958 *Willkens*, *Dreschler* și *Larson* au individualizat prin cromatografiere pe CMC 2 fracțiuni cromatografice ale gama-globulinelor. În anul următor *Fahey* și *Horbett* separă 5 fracțiuni cromatografice pe DEAE celuloză, iar în 1961 *Bac:u* și colab. obțin prin cromatografiere pe CMC cu gradient de pH fără interferență în eluție a NaCl 7 fracțiuni cromatografice principale, fracțiunea A, opta, eluată cu tamponul de fixare, avind un caracter eterogen. *Willkens* distinge 7 componenți antigenici, din care 3—5 componenți în fracțiunea A, pe cînd *Fahey* și *Horbett* numai 2 componenți antigenici ai gama-globulinelor cu constanta de sedimentare de 6,6 S și 18 S. Obținerea unui număr de fracțiuni cromatografice, superior numărului fracțiunilor antigenice ale globulinelor gama, creează premise pentru un studiu aprofundat al relației dintre structura proteinelor sistemului gama și funcția lor imunitară.

Cercetările de imunochimie, printre obiectivele cărora figurează diferențierea chimică a globulinelor imune de cele normale, sînt abia la început, cunoștințele noastre actuale asupra structurii terțiare a proteinelor-anticorpi fiind cu totul lacunare. Încercările de a caracteriza proteina-anticorp prin dimensiunea macromoleculii nu au dat rezultate. Gama-globulinele normale și imune pot avea aceeași constantă de sedimentare. Pe de altă parte, anticorpii față de același antigen, pot avea la diversele specii greutăți moleculare diferite — anticorpi: față de polizaharidul pneumococic din serul uman au greutatea moleculară de 160.000, pe cînd

anticorpii față de același antigen din serul de cal au greutatea moleculară de 990.000. Porter a studiat comparativ la iepure gama-globulinele nespecifice și cele specifice, obținute prin imunizarea animalelor cu ovalbumină și precipitarea anticorpului cu antigenul specific. Ambele tipuri de gama-globuline normale și imune aveau secvența identică a acizilor aminați în porțiunile terminale ale lanțurilor peptidice, același număr de grupări reactive ale lizinei și gruparea α -aminică a alaninei liberă. Singura diferență constatată de autor rezidă în faptul că raportul histidinei nereactive față de histidina totală era mai mare în gama-globulinele imune decît în cele normale.

Specificitatea reacțiilor imunochimice rezidă în capacitatea de combinare a structurilor spațiale ale antigenului cu cele ale anticorpului corespunzător. Ambele structuri se leagă între ele, cînd distanța intermoleculară se apropie de 1 Å, prin forțe van der Waals și punți de hidrogen. Grupările funcționale ale anticorpului, care reacționează cu grupările determinante ale antigenului, ocupă 1—3% din suprafața moleculei de anticorp. Zona activă a anticorpilor anti-proteină corespunde la aproximativ 10 resturi de acizi aminați, respectiv la 5—6 unități de glucoză în cazul anticorpilor elaborați față de antigeni cu structură glucidică. Suprafața moleculei de anticorp care rămîne în afara grupărilor reactive specifice, reprezintă din punct de vedere al reacției antigen-anticorp un material quasi-inert. În cazul anticorpilor bivalenți, există 2 grupe reactive pentru același antigen, deși există și molecule de anticorp bivalente cu specificitate diferită.

Structura chimică a grupelor reactive ale anticorpilor e departe de a fi cunoscută. S-a emis părerea că grupările acide ale structurilor antigenice reacționează cu resturile bazine din molecula anticorpilor. Resturile histidinei, lizinei și tirozinei par a avea un rol important în structura specifică a grupărilor funcționale ale anticorpilor. Inactivarea anticorpilor prin iodare indică importanța resturilor aromatice. Se discută dacă funcția de anticorp se datorește unei secvențe specifice a acizilor aminați sau dacă zonă activă a anticorpului este dată de o anumită plisare a catenelor polipeptidice, majoritatea autorilor corelînd funcția de anticorp cu o anumită configurație spațială a macromoleculei proteice, complementară structurilor antigenice.

Studiul subfracțiunilor sistemului gama prezintă interes nu numai pentru abordarea unor aspecte majore ale imunității, ci și pentru patologia sistemului globulinic. În ultimii ani au fost identificate paraproteine cu viteza de migrare electroforetică a globulinelor gama, a căror prezență însoțește ca un fenomen secundar unele procese patologice tumorale (macroglulinemia Waldenström, hemopatii maligne, mielom multiplu) inflamatorii acute sau bazate pe mecanisme autoimune (colagenoze). Astfel s-a stabilit că paraproteinele din mielomul multiplu sînt γ -A- și γ -G-globuline, iar paraproteinele din macroglulinemia Waldenström γ -M-globuline. Se pare că există și un tip intermediar de paraproteine căruia i-ar aparține proteinele de tip Bence-Jones. Paraproteinele au relații strînse cu proteinele normale ale sistemului gama, deși păstrează o specificitate imunologică individuală.

Procedeele moderne de fracționare și studiu a proteinelor plasmaticе, inclusiv ultracentrifugarea și cromatografia pe coloană cu schimbători de ioni celulozici (CMC, DEAE, TEAE, P-, ECTEOLA- α -celuloză) și geluri filtrante (dextranul, poliacrilamida, polivinilcarbitolul, polivinilpirolidona) deschid perspective fructuoase în studiul constituenților macromoleculari biologic activi ai plamei în general, al subfracțiunilor gama-globulinice în special, oferînd căi noi de elucidare a numeroaselor controverse care domină actualmente patologia sistemului globulinic.

Sosit la redacție: 24 februarie 1967.

Bibliografia la autor.