

STUDIUL IMUNOLOGIC AL ȚESUTULUI NERVOS

dr. S. Szabó, Ana Iazigian, dr. Ecaterina Lukács, dr. Gabriella Muntyán

Diversitatea mare a factorilor cu caracter de anticorpi care apar în unele afecțiuni umane demielinizante și în encefalomielita alergică experimentală (EAE), ca: anticorpii mielintoxici și gliotoxici (1, 3), anticorpii fixatori de complement care prezintă variații în funcție de stadiul evolutiv al sclerozei în plăci (7, 11, 12, 14, 16), și pot avea o acțiune protectoare în EAE (4, 9), factorii imunologici cu rol în transferul EAE prin limfocite (8) impun studiul componentelor substanței cerebrale care joacă rolul de antigen în declanșarea fenomenelor imunobiologice respective. Majoritatea cercetărilor făcute în acest domeniu se referă la fracțiunile imunoelectroforetice ale extractelor cerebrale și la antigenicitatea extractelor apoase, alcoolice, a unor haptene lipidice etc., precum și la rezistența lor față de enzime, variații de temperatură etc. (Boroș 3, Feszt și Kerekes 5, Șerban 10).

Urmărind repartizarea antigenelor în diferitele fracțiuni proteice ale extractelor cerebrale obținute prin salifiere fracționată, într-o lucrare anterioară, am constatat că acestea dispun de capacități antigenice diferite (13, 15). În lucrarea de față am căutat să caracterizăm prin teste serologice antigenele fracțiilor de proteine cerebrale normale separate prin electroforeză preparativă în gel de agar și prin filtrare în gel de Sephadex. În acest scop, am hiperimunizat iepuri cu suspensii de măduva spinării de bou, urmărind dinamica imunogenezei, apoi am testat antiserurile obținute prin reacții de fixare a complementului (RFC) față de extractele totale de creier uman și de măduvă bovină, respectiv față de fracțiunile acestora din urmă.

Material și metodă

Un număr de 8 iepuri au fost imunizați cu triturat de măduva spinării de bou și adjuvant Freund. Amestecul antigenic a fost administrat intraplantar, la intervale de 5 zile, timp de 40 de zile. Pentru a urmări dinamica imunogenezei am prelevat sânge la 5, 10, 15, 25, 35 și 45 de zile de la începutul imunizării. În zilele 40-45 animalele au fost sacrificate prin exsanguinare.

În testele serologice s-au utilizat următoarele preparate antigenice:

Extract total de creier uman și măduva spinării de bou. Substanța nervoasă a fost omogenizată cu soluție salină tamponată cu fosfați la pH 7,4, în proporție de 1 parte creier la 3 părți soluție. Omogenizatul a fost centrifugat timp de o oră la 6000 ture/min. Supernatantul a servit ca antigen, respectiv a fost utilizat la separarea fracțiilor proteice.

Electroforeza preparativă a extractului de măduvă bovină s-a efectuat în bloc de agar (gel de agar 1%, tampon borat pH 8,6) durată 10 ore. Eluție prin congelare și decongelare, urmată de centrifugare. Dozarea proteinelor după Lowry și colab. (6).

Concentrația proteică a fracțiilor antigenice folosite în determinările comparative a fost adusă la același nivel prin diluare.

Filtrarea prin gel am efectuat-o în condițiile stabilite de Flodin și colab. pentru ser sanguin, cu o coloană de 4 cm diametru și 75 cm lungime, utilizând Sephadex G-200, cu tampon TRIS 0,1 M, pH 8,0, conținând NaCl 0,2 M. Fracțiunile ob-

ținute le-am concentrat cu gumă arabică prin celofan. Concentrația proteică a probelor colectate s-a determinat prin spectrofotometrie, la lungimea de undă de 280 mu.

RFC s-a executat cu microtitratorul Takátsy pe plăci cu godeuri, folosind diluții progresive de antigen, pentru caracterizarea capacității antigenice și diluții progresive de antiser, pentru determinarea nivelului de anticorpi. Serurile au fost titrate atât în stare nativă, pentru estimarea conținutului total în anticorpi, cât și după tratare cu 2-mercaptoetanol (ME) pentru decelarea anticorpilor ME-rezistenți care corespund 7S imunoglobulinelor (concentrație ME 0,1 M, timp de 2 ore la temperatura camerei, apoi dializă față de soluție salină tamponată, pH 7,4).

Rezultate

Fig. 1 reprezintă dinamica anticorpilor în singele iepurilor imunizați cu emulsie de măduvă bovină, antigenul utilizat în RFC fiind extractul total de măduvă bovină.

Anticorpii ME rezistenți corespunzători 7S imunoglobulinelor apar mai târziu decât cei inactivați de ME, fiind prezenți la toate animalele abia la 10 zile după prima imunizare. În faza a doua a perioadei experimentale titrul lor apropiindu-se de nivelul total de anticorpi

Executând RFC cu extract de țesut cerebral uman ca antigen, am obținut rezultate similare cu cele prezentate în primul grafic, cu deosebirea că, titrurile sînt mai scăzute. Diferența între nivelul imunoglobulinelor totale și ME sensibil se observă și aici (fig. 2). Efectuînd paralel titrarea bidimensională a antiserurilor native și tratate cu ME, față de extractul cerebral uman, s-a constatat de asemenea că anticorpii antțesut cerebral sînt repartizați atât în fracțiunea 7S, cât și în cea 19S a imunoglobulinelor (fig. 3).

Prin electroforeza în bloc de agar a extractului de măduva spinării s-au obținut 10 fracțiuni cu conținut variat în proteine (fig. 4). Cele mai mari procente de proteine le-am obținut în fracțiunea V corespunzătoare probabil unei beta-globuline și în fracțiunea VIII, corespunzătoare unei gama-globuline. Antigenicitatea cea mai exprimată au prezentat-o fracțiunile 8 și 9, în timp ce fracțiunile 2, 3 și 10 au fost lipsite de proprietăți antigenice decelabile prin metoda aplicată în aceste cercetări.

Cele 100 probe colectate în cursul filtrării prin gel de Sephadex au fost comasate în 5 fracțiuni (fig. 5). Titrînd antigenicitatea acestora prin RFC am constatat că fracțiunea I, corespunzătoare proteinelor cu constanta de sedimentare cea mai mare (19S) reprezintă antigenul cel mai puternic. Am obținut titruri mai mici de antigen cu fracțiunile II și III, care corespund proteinelor între 19S și 7S. Cea mai slabă participare în fixarea complementului au prezentat-o antigenele fracțiunilor IV și V corespunzătoare albuminei și diferitelor polipeptide.

Discuții

Apariția imunoglobulinelor cu diferite constante de sedimentare prezintă o dinamică caracteristică în cursul răspunsului imun primar: la început apar 19S globulinele, ca mai târziu acestea să fie înlocuite parțial sau total cu 7S imunoglobuline, avînd specificitatea serologică identică. Această comportare a anticorpilor e reglată de mecanisme feed-back. Admițînd că imunoglobulinele inactivate de ME corespund în general 19S globulinelor, iar cele ME-rezistente sînt 7S globuline, rezultatele obținute în experiențele noastre corespund cunoștințelor actuale privind secvența celor două clase de imunoglobuline și ele demonstrează că anticorpii anticerebrali organospecifici, decelabili prin titrare față de un extract cerebral heterolog, sînt repartizați în ambele fracțiuni de imunoglobuline, majoritatea lor aparți-

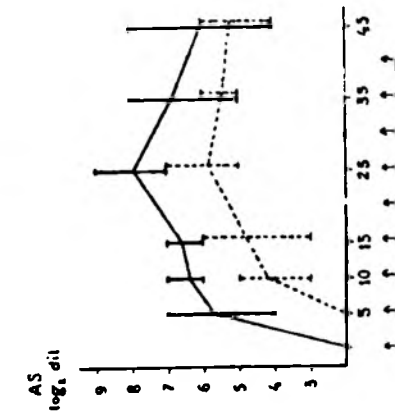


Fig. nr. 1: Dinamica anticorpozenei la iepuri imunizați cu suspensie de măduva spinării de bou. RFC, cu extract de măduvă ca antigen. Abscisa: timpul în zile. Ordinata: \log_2 diluții de antiser. — anticorpi totali, — anticorpi ME—rezistenți.

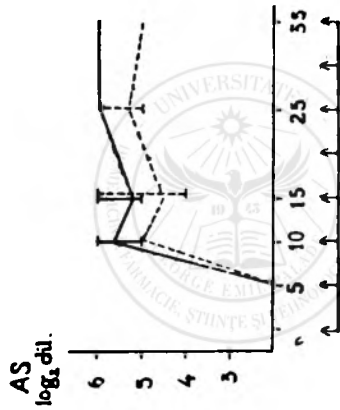


Fig. nr. 2: Dinamica imunogenzei la iepuri imunizați cu suspensie de măduva spinării de bou. RFC, cu extract de creier uman ca antigen. Vezi legenda fig. nr. 1.

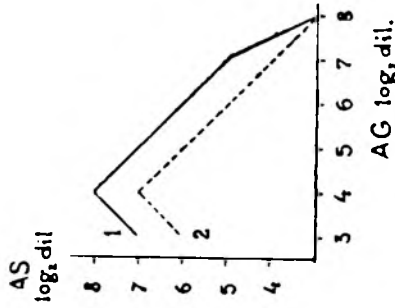


Fig. nr. 3: RFC bidimensională AC: diluții progresive de extract cerebral uman ca antigen. AS: diluții progresive de antiser (ser de iepure imunizat cu emulsie de măduva bovină). — anticorpi totali, — anticorpi ME—rezistenți.

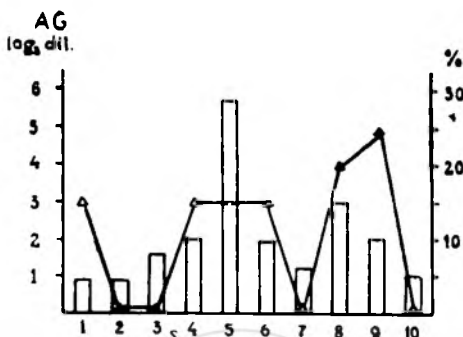


Fig. nr. 4: Antigenicitatea fracțiilor de măduva spinării de bou, separate prin electroforeză preparativă în gel de agar. Curba reprezintă titrurile de antigene din fracțiuni (log₂ dil.). Coloanele corespund cantităților de proteine din fracțiuni, exprimate în procentul cantității totale.

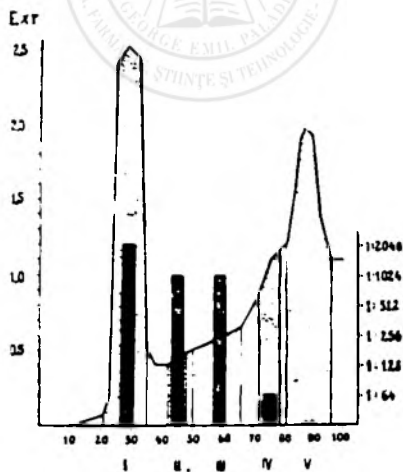


Fig. nr. 5: Antigenicitatea fracțiilor de extract de măduva spinării de bou, separate prin filtrare pe Sephadex G-200. Cifrele arabe pe abscisă corespund probelor colectate, cifrele romanice reprezintă fracțiunile. Coloanele: titruri de antigene (RFC); curba: extincțiile obținute la spectrofotometrie.

nînd totuși fracțiunii 7S. Aceeași concluzie se desprinde din rezultatele titrării bidi-mensionale: curbele obținute prin testarea serului nativ și a celui tratat cu ME sînt apropiate, fracțiunea 19S fiind foarte redusă.

Aplicarea paralelă a celor două procedee de fracționare a proteinelor cerebrale a permis o caracterizare mai precisă a antigenelor tisulare. Dintre fracțiunile sepa-rate prin electroforeză preparativă, activitatea antigenică cea mai exprimată au prezentat-o unele proteine, avînd mobilitatea electroforetică a globulinelor. Potrivit rezultatelor fracționării prin filtrare în gel aceste proteine au o constantă de sedimentare corespunzătoare 19S globulinelor din ser.

Proteinele cerebrale cu rol de autoantigene, pentru a ajunge în contact cu ce-lulele imunocompetente ale organismului, trebuie să traverseze bariera hemoencefalică. Antigenele cele mai valide ale țesutului nervos normal fiind reprezen-tate de molecule mari, pentru o imunizare eficientă trebuie să admitem următoa-rele posibilități: permeabilitatea barierei hemoencefalice crește în așa măsură, încît permite trecerea acestor macromolecule în circulația sanguină, sau, substan-ța care joacă rolul de autoantigen este o componentă a țesutului cerebral deja le-zat, o substanță cu antigenicitate exprimată dar cu o greutate moleculară mai mică.

Concluzii

Antigenele tisulare cele mai active ale nevraxului sînt reprezentate de proteine, care la electroforeză migrează cu viteza globulinelor serice. Filtra-rea în gel de Sephadex arată că aceste proteine au o constantă de sedimentare de 19S.

Sosit la redacție: 28 octombrie 1969.

Bibliografie

1. APPEL S. H., BORNSTEIN M. B.: *J. exp. Med.* (1964), 303, 1964; 2. BORN-STEIN M. B., CRAIN S. M.: *Science* (1965), 148, 1242; 3. BORȘ I. N.: Contribuții la studiul encefalomielitelor alergice experimentale. Teză de doctorat, București, 1967; 4. CASPARY E. A., SINDEN R. F., FIELD E. J.: *Zschr. Imm. Forsch.* (1966), 130, 454; 5. FESZT T., KERÉKES M.: *St. Cerc. Neurol.* (1968), 13, 147; 6. LOWRY H. O., ROSEBROUGH N. Y., FARR L. A., RANDALL R. J.: *J. Biol. chem.* (1951), 193, 265; 7. MISKOLCZY D., SZABÓ S., BECUȘ T.: Simpozion de Neuropatologie Tg.-Mureș, 1967, 10; 8. PATERSON P. Y.: *Ann. New York Acad. Sci.* (1965), 124, 292; 9. PATERSON P. Y., HARWIN S. M.: *J. exp. Med.* (1963), 117, 755; 10. ȘERBAN M.: *St. Cerc. Biochim.* (1967), 10, 69; 11. SZABÓ S.: *Acta Neurol. Psychiatr. Belg.* (1968), 68, 682; 12. SZABO S., BECUȘ T., MISKOLCZY D.: *Cercetări Medicale Acad. R.S.R. Baza de cercetări Tîrgu-Mureș, Ed. Acad. R.S.R.* 1968, 89; 13. SZABÓ S., GYER-GYAY F., LUKÁCS E., IAZIGIAN A.: II. Simpozion Național de Neuropatologie, București, 1968, 82; 14. SZABO S., LUKÁCS E., LAPAHOȘ E., GY. MALATINSZKY E., CS. WAGNER R., BECUȘ T.: *St. Cerc. Neurol.* (1968), 13, 19; 15. SZABO S., LUKÁCS E., IAZIGIAN A., MUNTYÁN G.: Sesiunea anuală a Institutului de neu-rologie a Acad. R.S.R. București 1968; 16. SZABÓ S., CS. WAGNER R., GY. MA-LATINSZKY E., BECUȘ T., REICHEL C., FRÎNCU I.: *St. Cerc. Neurol.* (1967), 12, 457.