

УДК 577.27: 519.245

© А. А. Фёдоров

МОДЕЛИРОВАНИЕ РОСТА КОЛЬЦЕОБРАЗНОГО ПРЕЦИПИТАТА В МЕТОДЕ РАДИАЛЬНОЙ ИММУНОДИФфуЗИИ. РЕШЕТОЧНАЯ DLA-МОДЕЛЬ

В настоящей работе предлагается математическая модель образования кольцеобразного преципитата в методе радиальной иммунодиффузии. Модель представляет собой решеточную DLA-модель Виттена—Сандера. В дополнение к системе дифференциальных уравнений "реакция—диффузия" решеточная DLA-модель позволяет дать более наглядное и понятное физическое толкование процесса формирования иммунодиффузионного преципитата в гелевых средах.

ВВЕДЕНИЕ

В работе [1] предложена модель процесса радиальной иммунодиффузии (РИД), который лежит в основе одного из иммунологических методов определения концентрации иммуноактивных молекул — метода Манчини [2, 3]. Эта методика была разработана еще в 60-х гг. и благодаря низкой стоимости и удовлетворительности результатов в ряде анализов используется до сих пор.

Напомним, что в основе метода лежит явление иммунопреципитации — появление белого кольца вокруг источника иммуноактивных молекул сыворотки АТ в прозрачной гелевой среде, содержащей антисыворотку АГ (рис. 1). По диаметру этого кольца определяется концентрация иммуноактивных молекул в исследуемой сыворотке.

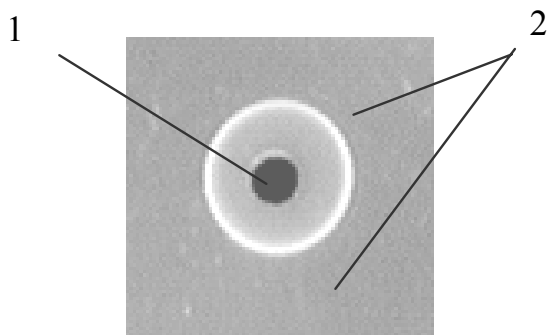


Рис. 1. Пример преципитационного кольца метода РИД при определении IgA в сыворотке. Фотография выполнена на черном фоне через сутки после постановки эксперимента.

1 — лунка в геле для исследуемой сыворотки; 2 — гель с антисывороткой

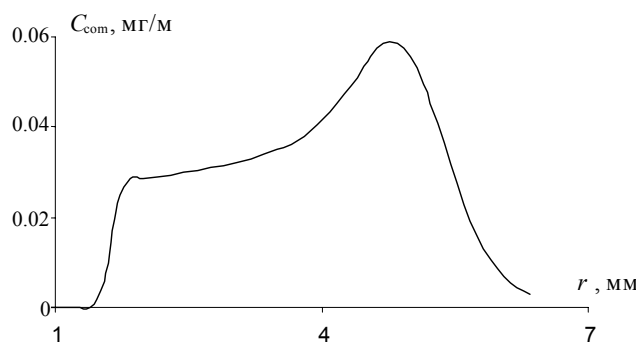


Рис. 2. Пространственная зависимость концентрации комплексов АГ-АТ через 24 часа, полученная в работе [1] решением системы уравнений "реакция—диффузия". r — расстояние от центра лунки; $C_{\text{ком}}$ — концентрация комплексов АГ-АТ

Система уравнений реакция—диффузия [1], рассматривавшая продукт иммунной реакции как комплекс двух молекул АГ-АТ, позволила объяснить наличие области повышенной концентрации таких комплексов (рис. 2). Однако эта модель является лишь грубым приближением, поскольку визуальная регистрация продукта реакции возможна лишь в том случае, если в прозрачной среде появляются частицы, размер которых сопоставим с длиной волн видимого света 500–700 нм. Поскольку диагностируемые молекулы имеют размеры порядка 10 нм, то очевидно, что комплексы из двух молекул не могут быть зарегистрированы визуально. В действительности иммуноактивные молекулы поливалентны, т. е. одна молекула АТ может

связать две или более молекул АГ, и наоборот. Таким образом, в ходе процесса иммунодиффузии взаимодействующие молекулы образуют кластеры, состоящие из большого числа молекул.

В данной работе предпринята попытка моделирования этого процесса с помощью классической DLA-модели Виттена—Сандера [4], широко используемой в физике фрактальных кластеров [5]. Поскольку в реальном масштабе решить эту задачу не представляется возможным, в представленной модельной задаче размер молекул выбирается равным минимально возможной точке отображения на экране — пикселю. В этом случае сам процесс, а также его результат, становятся наиболее наглядными.

1. DLA-МОДЕЛЬ МЕТОДА РИД

Двумерное пространство разбивается равномерной квадратной сеткой на элементарные ячейки. Рассматривается сетка 1000×1000 ячеек. Размер каждой ячейки, соответствующий размеру минимально возможной точки отображения на экране монитора — пикселю, предполагается равным размеру молекулы. Диффузионное движение молекул представляет собой перемещение молекулы в одну из соседних ячеек. Начальное распределение молекул-точек выбиралось исходя из физической картины задачи: высокая концентрация молекул АТ у края лунки-источника, получившаяся в результате впитывания гелем исследуемого раствора иммуноактивной сыворотки, и равномерная концентрация АГ в геле, создаваемая на этапе приготовления геля. Принимая во внимание поливалентность молекул АГ и АТ, которая играет ключевую роль в этом процессе, предполагается, что каждая молекула одного типа может присоединить к себе две молекулы другого типа. При этом образуется неподвижный комплекс из этих молекул, т. е. координаты молекул фиксируются. С целью уменьшения объема расчетов, а также для большей наглядности результатов, рассматривается только четверть лунки-источника и соответственно окружающего гелевого слоя (см. рис. 3).

Диффузия молекул-точек моделируется с помощью генератора случайных чисел. При этом новое положение молекулы может оказаться равновероятно в любой из соседних ячеек.

Взаимодействие молекул-точек (в действительности соответствующее белок-белковому взаимодействию АГ-АТ) представляется так: если какие-либо две молекулы АГ и АТ окажутся в соседних ячейках, то они могут образовать комплекс АГ-АТ,

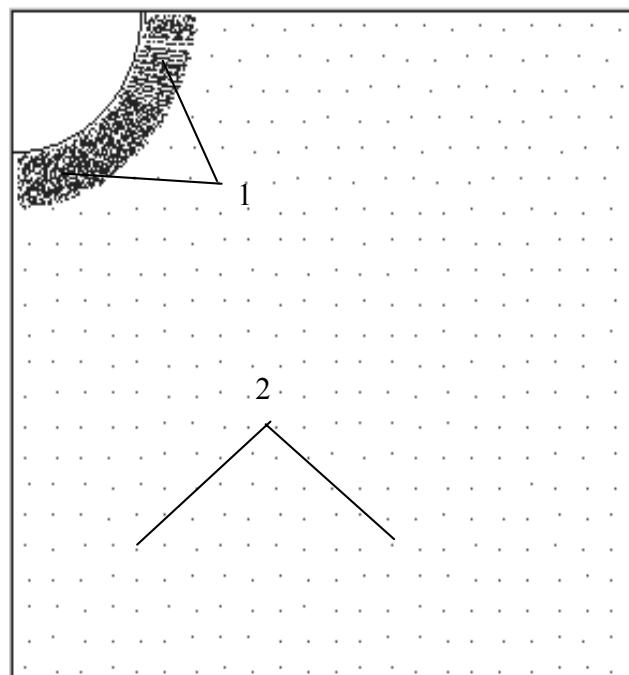


Рис. 3. Начальное распределение молекул АТ и АГ: 1 — молекулы АТ распределены вокруг источника; 2 — молекулы АГ распределены равномерно

при этом вероятность образования комплекса — $1/2$. Наряду с процессом ассоциации свободных молекул в комплексы возможен процесс увеличения этих комплексов за счет присоединения к ним свободно диффундирующих молекул. Это происходит в том случае, если диффундирующая молекула одного типа окажется рядом со свободным участком связывания одной из молекул другого типа, составляющей комплекс. Вероятность образования второй связи, очевидно, меньше, чем первой, и выбирается равной $1/3$.

Образовавшиеся комплексы и кластеры считаются неподвижными, поскольку диффузия больших объектов в геле невозможна.

Процесс моделирования разбивается на циклы, в каждом цикле рассчитываются новые положения для всех молекул, а также вероятности взаимодействия для молекул в соседних ячейках. Можно считать, что один цикл пересчета в реальности соответствует некоторому интервалу времени dt .

2. РЕЗУЛЬТАТЫ

Для реализации поставленной задачи была

написана программа на языке Visual C, которая рассчитывает новые координаты и состояния молекул АГ и АТ во времени в соответствии с изложенным алгоритмом исходя из начального распределения молекул, показанного на рис. 3. Для иллюстрации результатов рассмотрен пример со следующими данными: количество молекул АТ в пробе $N_{Ab} = 1500$, молекулы АГ изначально распределены по узлам сетки с шагом 13. Это значение является оптимальным для отображения результатов на мониторе компьютера. Начальное распределение молекул АТ и АГ соответствует рис. 3.

Результаты расчетов программы представлены на рис. 4 и 5. На этих рисунках приведены распределения крупных кластеров АГ-АТ спустя некоторые интервалы времени. Чтобы не перегружать рисунки, распределение отдельных молекул, а также небольших кластеров не приводится. На рис. 4 показано пространственное распределение кластеров, имеющих в своем составе четыре и более молекулы. На рис. 5 — распределение кластеров, состоящих из десяти и более молекул. На этих рисунках представлены распределения кластеров в начале (рис. 4, а и 5, а), в середине (рис. 4, б и 5, б) и в конце временного отрезка (рис. 4, в и 5, в), определяющего длительность процесса. Появление специфического кольцеобразного "узора" в конце процесса объясняется в п. 3.

Используя введенное понятие dt , можно оценить время окончания процесса примерно в $2 \cdot 10^5 dt$, т. е. 200 тыс. циклов пересчета, которое определяется отсутствием свободных АТ. Эта же оценка сохраняется и для других начальных значений N_{Ab} , которые варьировались в диапазоне 600–2500.

На рис. 6 представлены фотографии одной из лунок чашки Петри, сделанные спустя 1 час, 10 часов и 22 часа после заполнения лунки исследуемой сывороткой. Фотографии выполнены на черном фоне при рассеянном диффузном освещении.

Для определения концентрации АТ в методе РИД строят калибровочную кривую, которая в координатах (логарифм концентрации)—(радиус образовавшегося кольца) представляет собой практически линейную зависимость. Подобная зависимость выполняется и в представленной модельной задаче. Для возможного диапазона значений N_{Ab} зависимость $\ln(N_{Ab})$ —(радиус кольца) показана на рис. 7.

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как видно из рис. 4 и 5, спустя некоторое время после старта начинает образовываться некоторая область с большими комплексами, похожая на кольцо.

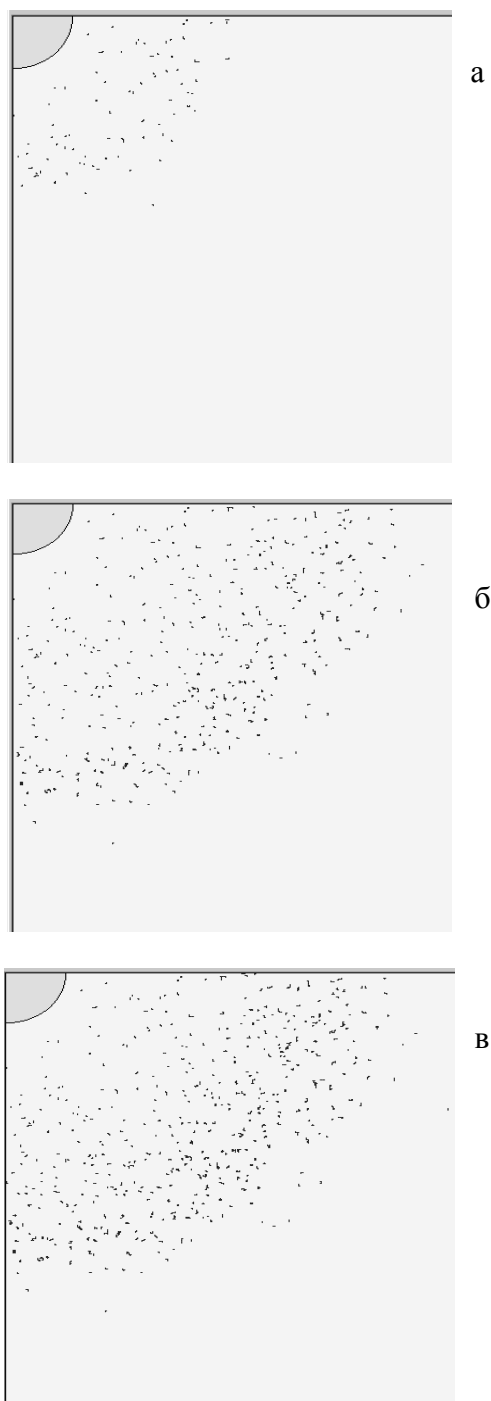


Рис. 4. Распределение кластеров, состоящих из четырех и более молекул, через 5000 dt (а), 75 000 dt (б) и 200 000 dt (в)

С течением времени кластеры, образующие этот кольцеобразный узор, увеличиваются за счет присоединения свободных молекул, кроме того, появляются новые кластеры, за счет чего эта кольцеобразная область становится более отчетливой.

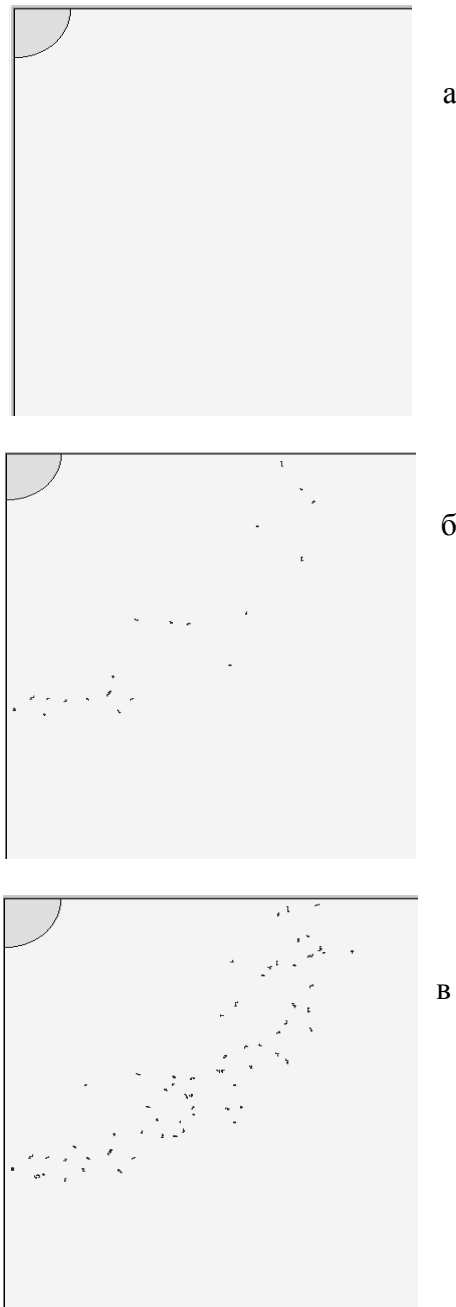


Рис. 5. Распределение кластеров, состоящих более чем из десяти молекул, через 5000 dt (а), 75 000 dt (б) и 200 000 dt (в)

Те же самые стадии проявления кольцеобразного узора наблюдаются и в реальности (рис. 6). Этот факт дает возможность предположить, что механизмы образования кольцеобразного узора в представленной модельной задаче и в реальности — одинаковые.

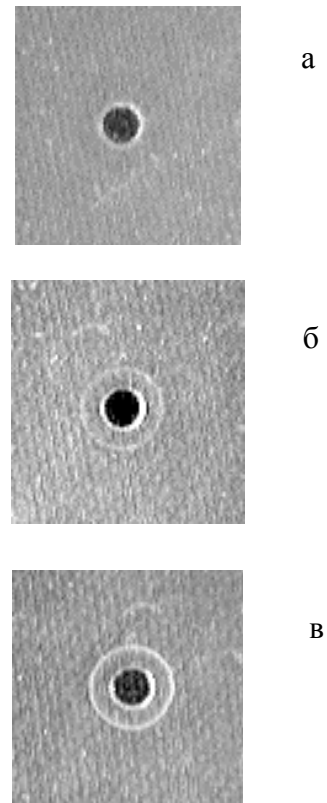


Рис. 6. Фотографии чашки Петри с сывороткой, выполненные через 1 час (а), 10 часов (б), 22 часа (в)

Остается выяснить, каким же образом формируется такая на первый взгляд довольно необычная картина распределения молекулярных кластеров.

На первом этапе молекулы АТ, обладая достаточно большим градиентом, начинают диффундировать в геле, причем поток этих молекул заметно превышает поток молекул АГ, градиент которых равен нулю. Распространяясь в пространстве, этот поток свободных АТ оставляет за собой как свободные АТ, так и комплексы вида АТ-АГ-АТ, т.е. практически все свободные АГ оказываются связанными. По мере распространения этот поток постепенно ослабевает, за счет уменьшения градиента концентрации свободных АТ.

Наконец, на некотором расстоянии от источника этот поток ослабевает настолько, что скорость распространения фронта свободных АТ становится сравнимой со скоростью диффузии несвязанных АГ. Таким образом, в этой области создаются условия для накопления свободных молекул АТ и АГ, тем самым способствуя появлению крупных кластеров в этой узкой зоне (рис. 5, в).

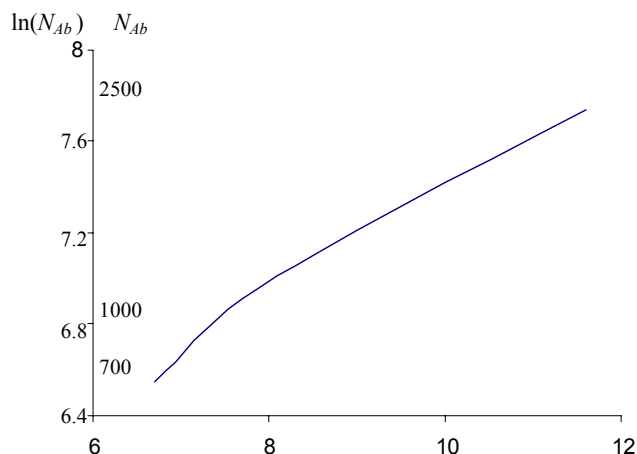


Рис. 7. Зависимость логарифма количества молекул (концентрации молекул) от радиуса образовавшегося кольца

Во всех остальных областях наблюдается либо дефицит свободных АТ (вдали от источника), либо дефицит свободных АГ (в той области, через которую прошел фронт свободных АТ), вследствие чего рост комплексов в этих областях сильно затруднен.

ВЫВОДЫ

Представленные на рис. 4, в и 5, в результаты показывают, что в рассматриваемой модельной задаче распределение крупных молекулярных кластеров обладает кольцеобразной формой. Кроме того, характер этого распределения не зависит от количества молекул в пробе. Изменяется только размер области занятой кластерами — радиус кольцеобразной зоны; при этом зависимость (логарифм концентрации частиц)—(радиус кольцеобразной зоны) имеет практически линейный харак-

тер в достаточно широком диапазоне (рис. 7), что выполняется в действительности [3]. Те же самые закономерности наблюдались и при моделировании процесса дифференциальными уравнениями химической кинетики [1], однако линейность сохранялась там в гораздо более узких диапазонах относительных изменений концентраций. Кроме того, рассмотрение продукта иммунной реакции как комплекса АГ-АТ в [1] не позволило объяснить наличие видимого глазом преципитационного кольца.

В отличие от модели [1] представленная здесь модель позволяет дать адекватное физическое описание результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фёдоров А.А., Курочкин В.Е., Мартынов А.И., Андреев И.В. Моделирование роста кольцеобразного преципитата в методе радиальной иммунодиффузии // Аллергия, астма и клиническая иммунология (в печати).
2. Mancini G., Carbonara A.O., Heremans J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion // *Immunochemistry*. 1965. V. 2, N 3. P. 235–254.
3. Mancini G., Nash D.R., Heremans J.F. Further studies on single radial immunodiffusion III // *Immunochemistry*. 1970. V. 7, N 3. P. 261–264.
4. Witten T.A., Sander L.M. Diffusion-limited aggregation, a kinetic critical phenomenon // *Phys. Rev. Lett.* 1981. V. 47, N 19. P. 1400–1403.
5. Смирнов Б.М. Физика фрактальных кластеров. М.: Наука, 1991. 136 с.

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург

Материал поступил в редакцию 15.10.2003.

SIMULATION OF RING-SHAPED PRECIPITATE GROWTH IN THE SINGLE RADIAL IMMUNODIFFUSION TECHNIQUE. GRID DLA MODEL

A. A. Fedorov

Institute for Analytical Instrumentation RAS. Saint-Petersburg

The paper offers a mathematical model of ring-shaped precipitate growth in the radial immunodiffusion technique. The model is based on the Witten—Sander grid DLA model. In addition to a set of differential equations "reaction—diffusion", the grid DLA model provides a more vivid and clear physical interpretation of the immunodiffusion precipitate formation process in gel media.