

Министерство образования
Российской Федерации
Новосибирский Государственный Университет
Физический факультет
Кафедра химической и биологической физики

Квалификационная работа на соискание степени бакалавра

ИССЛЕДОВАНИЕ АГГЛЮТИНАЦИИ ЛАТЕКСНЫХ ЧАСТИЦ

Юркин Максим Александрович

Научный руководитель

Суровцев Иван Владимирович

Новосибирск – 2002

Содержание

1.	Введение	3
1.1.	Экскурс в иммунологию	3
1.2.	Обзор литературы	5
2.	Кинетическая модель агглютинации	10
2.1.	Взаимодействие антиген – антитело	10
2.2.	Взаимодействие антитело – латексная частица	11
2.3.	Взаимодействие латексных частиц	15
2.4.	Модель ранней стадии агглютинации в диффузионном пределе	18
3.	Методика эксперимента	21
3.1.	Описание установки	21
3.2.	Постановка эксперимента	23
4.	Результаты	27
5.	Анализ полученных результатов	32
6.	Заключение	34
7.	Приложение	35
8.	Литература	37

1. Введение

1.1. Экскурс в иммунологию

В окружающей нас среде присутствуют в огромном разнообразии патогенные микробы (вирусы, бактерии, грибы, простейшие) и многоклеточные паразиты. Они способны вызывать заболевания и, если размножаются при этом в тканях организма бесконтрольно, в конце концов, приводят к его гибели. Однако благодаря иммунной системе, которая защищает нас от патогенных микробов, большинство инфекций протекает кратковременно и практически без нарушающих здоровье последствий. [1]

Как правило, иммунный ответ заключается, во-первых, в распознавании возбудителя или иного чужеродного материала и, во-вторых, в развёртывании цепи реакций, направленных на их устранение. В широком смысле, все разнообразные формы иммунного ответа можно разделить на два типа – врождённые и приобретённые реакции. Две главные характеристики приобретённого иммунитета – специфичность в отношении конкретного возбудителя и иммунологическая память.

Ведущая роль во всех реакциях приобретённого иммунитета принадлежит специфическим клеткам крови – лимфоцитам, поскольку они специфично распознают конкретный возбудитель, где бы он ни находился: внутри или вне клеток, в тканевой жидкости или в крови. Существует две основные популяции лимфоцитов: Т-лимфоциты (или Т-клетки) и В-лимфоциты (или В-клетки). Последние противодействуют внеклеточным возбудителям и влиянию их продуктов, продуцируя антитела, молекулы которых способны специфически распознавать и связывать определённые молекулы-мишени – антигены.

Первоначально термин антиген (от англ. *antibody generator*) применяли для обозначения любой молекулы, индуцирующей образование В-клетками специфических антител. Однако теперь этот термин имеет более широкий смысл, означая любую молекулу, которую могут специфически распознавать элементы системы приобретённого иммунитета, т.е. В-клетки или Т-клетки, либо и те и другие. Антитела взаимодействуют с определённой областью молекулы антигена, названной эпитопом (антигенной детерминантой). Один антиген может иметь несколько различных или повторяющихся эпитопов. Если антиген имеет два (или больше) одинаковых эпитопа, то он называется мультивалентным. Антитела специфичны именно к эпитопам, а не ко всей молекуле антигена.

Антитела, называемые также иммуноглобулинами (Ig), представляют собой группу гликопротеинов, которые содержатся в плазме крови и в тканевой жидкости у

всех млекопитающих. У большинства высших млекопитающих обнаружено пять классов (изотипов) иммуноглобулинов – IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, которые различаются по размерам молекул, структуре и содержанию углеводов. Все антитела данного изотипа однотипны по строению молекулы, но различаются областью антигенсвязывающих участков. Как правило, каждое антитело может специфически связываться только с одним видом антигена.

Главным изотипом нормальной сыворотки человека является IgG; на его долю приходится 70–75% общего количества сывороточных иммуноглобулинов. Схематическое строение IgG приведено на рис. 1. Молекула IgG имеет два идентичных антигенсвязывающих участка, т.е. является бивалентной. Молекулярная масса IgG – 146кДа. [1] Расстояние между антигенсвязывающими участками [2]:

$$l_y = 12 \div 14 \text{ нм}. \quad (1)$$

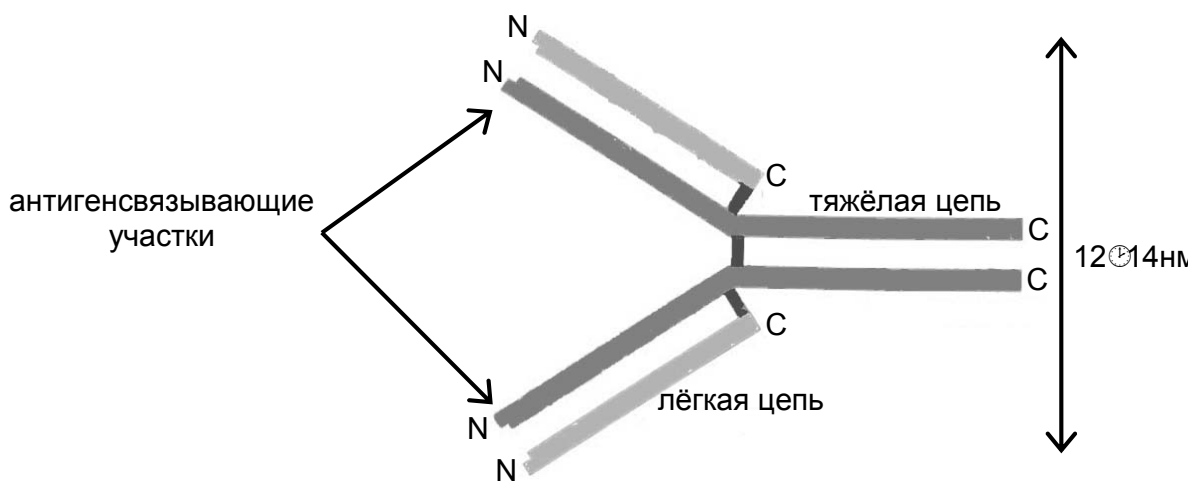


Рис. 1. Схематическое строение иммуноглобулина G (IgG)

Агглютинация является одним из старейших методов для демонстрации наличия иммунной реакции *in vitro*. Она наблюдается, если к относительно стабильной суспензии антигенных частиц добавить антитела, специфичные к их эпитопам. При этом происходит дестабилизация суспензии путём перекрёстного сшивания антигенных частиц антителами. Иными словами, происходит слипание антигенных частиц. Так как дестабилизация антигенных частиц может быть зафиксирована в достаточно малых объёмах суспензии (примерно 0,1мл), и лишь небольшое количество молекул антител требуется для достижения дестабилизации, агглютинация является чувствительным методом, который позволяет определять достаточно низкие концентрации антител (до нескольких нг/мл). Величины антигенных частиц, используемых в агглютинации, могут варьироваться от нескольких нм до примерно 10мкм в диаметре. [2]

Агглютинация широко используется в медицине. Например, она используется для диагностики брюшного тифа уже более 100 лет. Слайд-тесты, основанные на агглютинации, за последние 10 лет широко распространились в клинической диагностике. В настоящее время многие заболевания могут быть диагностированы с помощью имеющихся в продаже тест-систем, основанных на агглютинации. И число диагностируемых этим методом заболеваний постоянно увеличивается.

Данная работа посвящена построению теоретической модели и экспериментальному исследованию ранних стадий агглютинации.

1.2. Обзор литературы

Различают активную и пассивную агглютинацию (рис. 2). Агглютинацию называют активной, когда антигенными частицами являются клетки (бактерии, эритроциты или другие), имеющие свои собственные эпитопы. При пассивной агглютинации используются инертные частицы (клетки или синтетические носители), на которые антигенные молекулы адсорбированы или ковалентно к ним присоединены.

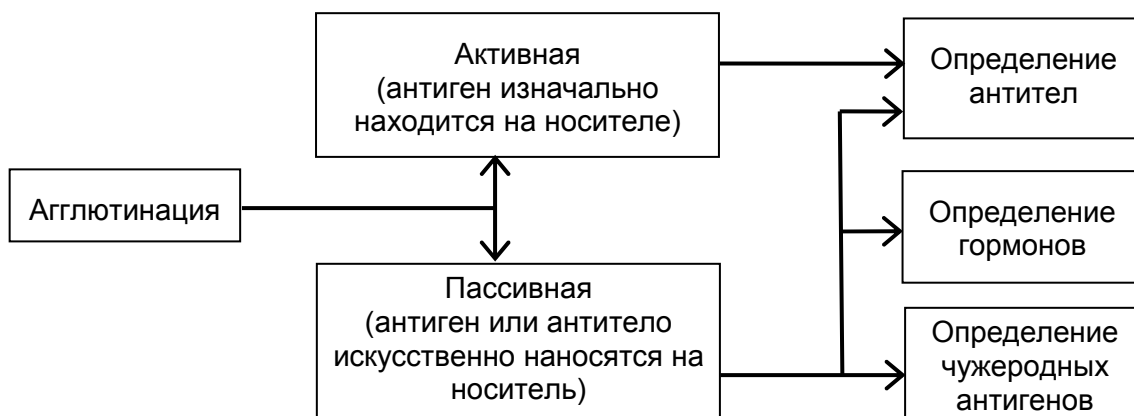


Рис. 2. Использование агглютинации в биологии и медицине

Пассивная агглютинация обладает более широким спектром применения, позволяя определять не только наличие определённых антител в исследуемой пробе, но и различных антигенов (для этого на носитель наносятся антитела к определяемому антигену). При этом антиген может быть либо чужеродным, либо аутоантигеном, т.е. являться макромолекулой самого организма (например, гормоны). При этом для реакции агглютинации необходимо, чтобы антиген был мультивалентным.

В настоящее время в исследованиях и клинических тестах широко используется пассивная агглютинация на основе полистирольных латексных сферических частиц в качестве инертных носителей. Молекулы антигена (или антитела) адсорбируются или ковалентно связываются с поверхностью латексных частиц. После этого их помещают

в исследуемую жидкую пробу, и их агглютинация демонстрирует наличие в пробе соответствующих антител (или антигена). [2]

Самый простой способ наблюдения агглютинации – визуальный, когда видимые хлопья появляются в объёме или оседают на поверхность. На втором способе основаны многочисленные слайд-тесты, когда агглютинированные комплексы оседают на поверхность, например, картонной карточки. При этом результат основан на контрасте рыхлой поверхности при осаждении агглютинированных комплексов и гладкой поверхности при осаждении монодисперсных носителей. Однако эти методы имеют ограниченную чувствительность и, как правило, являются качественными. Это связано, с тем, что метод контроля «на глаз» является субъективным. Для увеличения чувствительности и уменьшения субъективности анализа применяется центрифугирование, ультразвук, светорассеяние и микроскопия.

Использование центрифугирования основано на том, что с увеличением размеров частиц скорость их седиментации растёт квадратично. Поэтому при центрифугировании в первую очередь оседают агглютинированные комплексы, которые образуют на дне пробирки характерный рыхлый осадок.

Применение некавитирующей стоячей ультразвуковой волны позволяет увеличить чувствительность латексных агглютинационных методов в 10-500 раз по сравнению с коммерческими слайд-тестами в зависимости от вида определяемого антитела (или антигена) [3]. При этом также происходит увеличение скорости определения до нескольких минут. Это происходит за счёт звукового давления, которое стремится сблизить латексные частицы и тем самым увеличить их локальную концентрацию.

В работе [4] для определения агглютинации латексных частиц измерялось светорассеяние от исследуемой пробы (от всего ансамбля частиц) на различные углы (от 15 до 150°) для различных длин волн. При этом чувствительность при определении концентрации противостолбнячных антител была в 60 раз выше, чем у слайд-теста. В работе [5] авторы использовали сигнал светорассеяния от исследуемой пробы для описания кинетики процесса. При этом экспериментально определяемой величиной был наклон зависимости этого сигнала от времени в начальный момент.

В работе [6] для определения зависимости количества агглютинированных латексных частиц от времени наряду со светорассеянием была использована световая микроскопия.

Перейдём к рассмотрению существующих кинетических моделей процесса агглютинации. Кинетическая модель, представленная в работе [6], рассматривает агглютинацию как диффузионно-лимитированное слипание двух типов частиц и основана на кинетических уравнениях Смолуховского. Авторы предполагали, что антитела не связываются обоими антигенсвязывающими участками с антигенами на поверхности одной частицы, и константа скорости диффузии не зависит от размеров взаимодействующих комплексов. При этих предположениях авторами получено аналитическое решение для зависимости количества агглютинированных латексных частиц от времени. Это решение описывает стадии процесса, когда среднее количество латексных частиц в комплексе существенно больше единицы. Однако, физический смысл математических выкладок авторов не понятен.

В работе [5] предложена кинетическая модель ранних стадий агглютинации. В этой модели рассматривается образование только димеров и считается, что реакция лимитируется диффузией латексных частиц. Авторы также предполагают, что реакция антиген-антитело находится в равновесии. Модель содержит в себе несколько неизвестных параметров, в том числе и константу равновесия реакции антиген-антитело, которые определялись из экспериментальных данных. Эта модель, однако, не рассматривает детали взаимодействия антиген-антитело и границы применимости диффузионного предела.

Агглютинация находится на стыке физики и химии дисперсных систем и биологии и является частным случаем агрегации. Понятие агглютинации подразумевает наличие реакции антиген-антитело, в то время как, агрегация включает в себя более широкий класс физических явлений. Поэтому существует достаточно много физических методов описания и исследования агрегации.

Имеющиеся кинетические модели агрегации рассматривают функции распределения агрегатов по размерам на стадиях существенной агрегации, т.е. когда средний размер агрегатов значительно превышает размер начальных частиц, и не вникают в детали взаимодействия между агрегирующими частицами. Существуют модели, описывающие реакцию в кинетическом пределе [7], диффузионном пределе [8], и в смешанном случае [9].

В работе [8] кинетическая модель строилась в диффузионном пределе на основе уравнений Смолуховского. При предположении конкретного вида ядра уравнения Смолуховского, эта модель имеет аналитическое решение, что позволяет теоретически рассчитать распределение агрегатов по размерам в любой момент времени.

В работе [9] кинетические уравнения Смолуховского рассматриваются в промежуточной области между диффузионным и кинетическим пределами. Рассматриваемое ядро взаимодействия уравнений Смолуховского содержит в себе два параметра. Один параметр отвечает за реакционную способность больших кластеров, а другой – описывает, какое взаимодействие более предпочтительно: больших кластеров с большими или больших с маленькими. Авторами получено асимптотическое решение и найдена связь между параметрами ядра и параметрами фрактальной морфологии кластеров.

С точки зрения эксперимента агрегация принципиально не отличается от агглютинации. Поэтому для экспериментального исследования агрегации также применяется светорассеяние от всего ансамбля частиц [7, 9], однако используются и другие методы.

В работе [7] измерение размеров агрегатов проводилось путём измерения сопротивления солевого раствора между двумя электродами в капилляре, когда в нём движется комплекс, используя то, что увеличение сопротивления капилляра пропорционально объёму комплекса.

В работе [10] использовался проточный цитометр, где комплексы из нескольких латексных частиц пропускаются через капилляр, и измеряется сигнал светорассеяния от одиночных частиц на малые углы. Авторы показали, что величина этого сигнала пропорциональна квадрату искомого числа латексных частиц в комплексе.

Недавно был разработан сканирующий проточный цитометр [11], который нашёл широкое применение в биологических исследованиях. Он позволяет получать индикатрису светорассеяния и сигнал флуоресценции от одиночной частицы, причём делать это с большой скоростью. Эта методика применялась для исследования несферических клеток [12, 13], а также для исследования лиганд-рецепторного взаимодействия на поверхности клеток [14]. Представляется возможным применение сканирующего проточного цитометра для исследования агглютинации.

На основании вышеизложенного, можно сделать следующие выводы:

- Существующие работы по исследованию агглютинации (как и агрегации), в основном направлены на стадию существенной агглютинации, т.е. когда комплексы состоят из большого числа частиц.
- Существующие теоретические модели агглютинации основаны на упрощающих предположениях о взаимодействии латексных частиц и о влиянии диффузии, которые могут не осуществляться в экспериментах.

Целью работы является исследование ранних стадий агглютинации латексных частиц с помощью сканирующего проточного цитометра. Для достижения цели можно выделить следующие задачи:

1. Теоретическое описание агглютинации латексных частиц.
2. Разработка методики измерения кинетики агглютинации латексных частиц с помощью сканирующего проточного цитометра.
3. Экспериментальное исследование агглютинации на модельном объекте.

Данная работа была выполнена на базе Института Химической Кинетики и Горения СО РАН и Государственного Научного Центра Вирусологии и Биотехнологии (ГНЦ ВБ) «Вектор».

2. Кинетическая модель агглютинации

В этом разделе рассматривается кинетическая модель пассивной агглютинации, когда молекулы антигена находятся на поверхности латексных сферических частиц, а молекулы антитела находятся в растворе. При этом рассматриваем самые ранние стадии агглютинации, то есть рассматриваем только образование димеров. При агглютинации реакция взаимодействия антиген-антитело является гетерогенной, и диффузия играет в ней существенную роль. На диффузионные процессы существенное влияние может оказывать электростатическое взаимодействие, так как макромолекулы, которые находятся на поверхности латексных частиц, в растворе могут приобрести некоторый заряд. В этой работе мы для простоты не учитываем это взаимодействие.

Сначала рассмотрим гомогенную реакцию взаимодействия антиген-антитело в растворе, причём настолько медленную, что диффузия не оказывает лимитирующего действия.

2.1. Взаимодействие антиген – антитело

Взаимодействие одного антигенного эпитопа с одним антигенсвязывающим участком в растворе определяется суммой большого количества относительно слабых нековалентных взаимодействий, включая гидрофобные и водородные связи, вандерваальсовы силы и ионные взаимодействия. Эти слабые взаимодействия эффективны только в том случае, если молекулы антигена и антитела настолько комплементарны друг другу, что некоторые атомы входят в соответствующие углубления на поверхности антитела. Реакцию связывания можно представить в виде простой обратимой бимолекулярной реакции:



где A – молекула антигена, Y – молекула антитела, YA – комплекс антиген-антитело, k_{ass} , k_{diss} – константы скоростей реакций образования и диссоциации комплекса соответственно. Силу взаимодействия обычно выражают константой сродства (константой аффинности):

$$K_a = \frac{[YA]_e}{[A]_e [Y]_e}, \quad (3)$$

где $[A]_e$, $[Y]_e$, $[YA]_e$ – равновесные концентрации антигенов, антител и комплексов антиген-антитело соответственно. С точки зрения химической кинетики в равновесии

$$\frac{d[YA]}{dt} = k_{ass} [A]_e [Y]_e - k_{diss} [YA]_e = 0,$$

где $[YA]$ – концентрация комплексов антиген антитело; отсюда получаем:

$$K_a = \frac{k_{ass}}{k_{diss}}, \quad (4)$$

Константу скорости образования комплексов в жидкости можно выразить через вероятность образования комплекса при одном столкновении ϵ_0 :

$$k_{ass} = \overline{v_{omn}} \sigma \epsilon_0, \quad (5)$$

где $\overline{v_{omn}} = \sqrt{\frac{8kT}{\pi\mu}}$ – средняя скорость относительного движения антитела и антигена в

жидкости (k – константа Больцмана, T – температура, μ – приведённая масса молекул антигена и антитела); σ – сечение столкновения, равное:

$$\sigma = \pi(r_A + r_Y)^2, \quad (6)$$

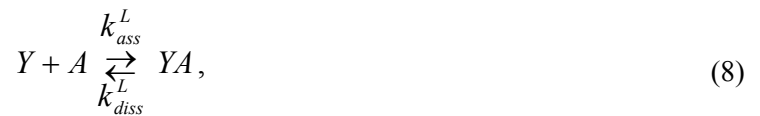
где r_A, r_Y – характерные радиусы антитела и антигена соответственно.

2.2. Взаимодействие антитело – латексная частица

Перейдём к рассмотрению первой стадии агглютинации – взаимодействия антитела с латексной частицей, на которую нанесены молекулы антигена. Эта реакция может быть представлена следующей схемой:



где L – латексная частица, YL – антитело, связанное с антигеном на поверхности латексной частицы. Эту же реакцию можно представить в аналогичном (2) виде, но с другими константами скоростей:



где YA – антитело, связанное с антигеном (по сути то же, что и YL).

Соотношения между константами скоростей реакций (7) и (8) можно получить из рассмотрения уравнения для изменения концентрации антител со временем для этих двух реакций:

$$\frac{d[Y]}{dt} = k_+[Y][L] - k_-[YL] = k_{ass}^L[Y][A] - k_{diss}^L[YA],$$

где $[A], [Y], [L]$ – концентрации антигенов, антител и латексных частиц соответственно. $[YA] = [YL]$ – концентрация комплексов антител с латексными частицами. При этом $[A] = N[L]$ (N – число молекул антигена на одной латексной частице):

$$k_+ = Nk_{ass}^L, k_- = k_{diss}^L. \quad (9)$$

Константа аффинности для реакции (8) определяется также как и (3), и она равняется:

$$K_a^L = \frac{k_{ass}^L}{k_{diss}^L}, \quad (10)$$

Если реакция медленная, то диффузию можно не учитывать, и константа скорости прямой реакции (7) пропорциональна числу столкновений антител с поверхностью латексной частицы в единицу времени. Так как радиус латексной частицы (для оценок берём $R = 1\mu\text{м}$) много больше характерного радиуса антитела (для оценок берём $r_Y = 4\text{нм}$), то поверхность можно считать локально плоской и учитывать тепловое движение только антитела, поэтому:

$$k_+ = \frac{1}{4} \bar{v}_Y S p \varepsilon_0, \quad (11)$$

где $\bar{v}_Y = \sqrt{\frac{8kT}{\pi m_Y}}$ – средняя скорость движения антитела в жидкости (m_Y – масса молекулы антитела), $S = 4\pi R^2$ – площадь поверхности латексной частицы (R – радиус латексной частицы), p – стерический фактор, характеризующий долю активной поверхности латексной частицы. В начальный момент времени, когда все молекулы антигена на поверхности латексной частицы свободны (не связаны с антителом), $p = \frac{N\sigma}{S}$. Можно оценить N сверху, считая, что антиген полностью покрывает поверхность частицы (для оценок возьмём $r_A = 3\text{нм}$):

$$N \leq \frac{4\pi R^2}{\pi r_A^2} = 5 \cdot 10^5. \quad (12)$$

Константа скорости прямой реакции (8) равняется:

$$k_{ass}^L = \frac{k_+}{N} = \frac{1}{4} \bar{v}_Y \sigma \varepsilon_0. \quad (13)$$

Сравнивая формулы (5) и (13), видим, что даже при пренебрежении диффузией, константа прямой реакции зависит от того, как антиген распределён в пространстве (равномерно, или на поверхности сферических частиц).

Данное рассмотрение является приближённым, поскольку вероятность образования комплекса при столкновении ε_0 в общем случае зависит от времени столкновения [15]. Это связано с тем, что молекулы антигена и антитела не являются сферически симметричными и могут взаимодействовать лишь своими сравнительно

небольшими участками. Если время столкновения велико по сравнению со временем тепловых поворотов молекулы, то за время столкновения взаимодействующие участки могут подойти друг к другу, даже если в начале столкновения они находились на некотором расстоянии и не могли связаться. Этот эффект увеличивает наблюдаемую вероятность и особенно существенен при взаимодействии двух латексных частиц, когда скорости сближения значительно меньше, чем скорость сближения антитела и латексной частицы.

Константа скорости диссоциации определяется взаимодействием комплементарных областей антитела и антигена и в первом приближении не зависит от того, где находится комплекс антиген-антитело: в растворе или на поверхности латексной частицы [15, 16].

Характерные значения кинетических констант для взаимодействия антитела с антигеном на поверхности сферических частиц [16]:

$$K_a^L = 10^{-13} \div 10^{-10} \text{ см}^3, \quad k_{ass}^L = 10^{-17} \div 10^{-15} \frac{\text{см}^3}{\text{с}}. \quad (14)$$

Используя эти значения, (6) и (13) можно получить характерные значения для ϵ_0 :

$$\epsilon_0 = \frac{4k_{ass}^L}{v_Y \sigma} = 10^{-7} \div 10^{-5}. \quad (15)$$

Если учесть диффузию, то скорость прямой реакции (7) будет равняться [17]:

$$k'_+ = \frac{k_+ k_D^{YL}}{k_+ + k_D^{YL}}, \quad (16)$$

где k_D^{YL} – константа скорости диффузии антител к латексной частице.

Константа скорости диффузии частиц 1 и 2 друг к другу в жидкости равняется:

$$k_D^{12} = 4\pi(D_1 + D_2)(R_1 + R_2), \quad (17)$$

где R_1, R_2 и D_1, D_2 – радиусы и коэффициенты диффузии частиц 1 и 2 соответственно. Учитывая, что $R \gg r_Y$ и $D_L \ll D_Y$, (17) упрощается в $k_D^{YL} = 4\pi D_Y R$. Коэффициент диффузии антитела в жидкости равняется:

$$D_Y = \frac{kT}{6\pi r_Y \eta}, \quad (18)$$

где η – вязкость жидкости. Все оценки далее будем проводить для воды ($\eta = 10^{-2}$ пуаз) при комнатной температуре ($T=300\text{K}$):

$$k_D^{YL} = 7 \cdot 10^{-10} \frac{\text{см}^3}{\text{с}}. \quad (19)$$

Теперь, используя (12), (14) и (19), оценим отношение кинетической и диффузионной констант скоростей:

$$\frac{k_+}{k_D^{YL}} = \frac{k_{ass}^L N}{k_D^{YL}} \leq 1 \div 10^{-2}. \quad (20)$$

Отсюда видно, что взаимодействие антитела с латексной частицей либо лимитируется реакцией, либо находится в промежуточном состоянии, где необходимо учитывать и диффузию, и реакцию. Так как мы оценивали сверху все величины в числителе этого отношения, то далее будем считать, что это взаимодействие лимитируется реакцией, и схема взаимодействия остаётся прежней (7).

В кинетическом пределе схема (8) более удобна чем схема (7), поскольку k_+ зависит от количества свободных мест связывания на поверхности латексной частицы, а k_{ass}^L остаётся постоянной в ходе реакции. При этом мы не учитываем возможный эффект заслонения связавшимся антителом соседних антигенов [18], считая, что размеры антитела и антигена не сильно различаются.

Выше мы рассматривали взаимодействие одного антигенсвязывающего участка антитела с одним эпитопом антигена. Однако, необходимо учитывать поливалентность антигена и антитела. Будем считать, что антиген – моновалентный, то есть каждое антитело может связаться лишь с одним его эпитопом. А также считаем, что при связывании с антигеном молекула антитела, имеющая больший размер, блокирует связывание других антител с этим антигеном (иначе при использовании поликлональных антител антиген проявлял бы себя поливалентным). Антитело, связавшись с антигеном на поверхности латексной частицы, может связаться свободным антигенсвязывающим участком с другим свободным антигеном. Будем называть антитела, которые связаны только с одним антигеном, активными, так как именно они участвуют в агглютинации. К схеме реакции (8) добавляется следующее уравнение:



Здесь мы считаем, что константа скоростей связывания первого и второго антигенсвязывающего участка антитела одинаковы. Константа скорости диссоциации этой реакции в 2 раза больше чем (8), потому что комплекс YA_2 может диссоциировать по любой из двух связей.

Считая, что равновесие в реакциях (8) и (21) установилось, выразим концентрации комплексов YA и свободных антигенов через начальную концентрацию антител $[Y]_0$ и антигенов $[A]_0$:

$$\begin{cases} [Y][A]K_a^L = [YA] \\ [YA][A]K_a^L = 2[YA_2] \\ [A] + [YA] + 2[YA_2] = [A]_0 \\ [Y] + [YA] + [YA_2] = [Y]_0 \end{cases} \quad (22)$$

Решим эту систему в двух предельных случаях:

1. $[Y]_0 \gg [A]_0$, тогда считаем, что $[Y] = [Y]_0$. Получаем следующее уравнение на $[A]$:

$$K_a^{L^2}[Y]_0[A]^2 + (1 + K_a^L[Y]_0)[A] - [A]_0 = 0.$$

Решая это уравнение, находим $[A]$ (пользуемся условием избытка антител), а потом из (22) находим $[YA]$ и $[A][YA]$:

$$[A] = \frac{\sqrt{(1 + K_a^L[Y]_0)^2 + 4K_a^{L^2}[Y]_0[A]_0} - (1 + K_a^L[Y]_0)}{2K_a^{L^2}[Y]_0} = \frac{[A]_0}{1 + K_a^L[Y]_0}, \quad (23)$$

$$[YA] = K_a^L[Y]_0[A] = \frac{[A]_0 K_a^L[Y]_0}{1 + K_a^L[Y]_0}, \quad (24)$$

$$[A][YA] = \frac{[A]_0^2 K_a^L[Y]_0}{(1 + K_a^L[Y]_0)^2}, \quad (25)$$

Легко показать, что решения получились такие же, как в случае моновалентных антител.

2. $[A]_0 \gg [Y]_0$, тогда считаем, что $[A] = [A]_0$. Получаем следующее уравнение на $[YA]$ и решаем его, затем находим $[A][YA]$:

$$[YA] \left(\frac{1}{K_a^L[A]_0} + 1 + \frac{K_a^L[A]_0}{2} \right) = [Y]_0,$$

$$[YA] = \frac{2[Y]_0 K_a^L[A]_0}{1 + (1 + K_a^L[A]_0)^2}, \quad (26)$$

$$[A][YA] = \frac{2[A]_0^2 K_a^L[Y]_0}{1 + (1 + K_a^L[A]_0)^2}. \quad (27)$$

2.3. Взаимодействие латексных частиц

Перейдём к рассмотрению второй стадии агглютинации – взаимодействию латексных частиц. Так как мы рассматриваем начальные стадии агглютинации, то будем считать реакцию необратимой. Это также оправдано тем, что после образования

одной связи антиген-антитело-антиген между двумя латексными частицами, между ними могут образовываться другие такие же связи. В результате, вероятность диссоциации комплекса из латексных частиц очень мала.



где k_{ag} – константа скорости агглютинации равная (аналогично (16)):

$$k_{ag} = \frac{k_r k_D^{LL}}{k_r + k_D^{LL}}, \quad (29)$$

где k_D^{LL} – константа скорости диффузии латексных частиц друг к другу, k_r – константа скорости реакции в пренебрежении диффузией. Коэффициент диффузии латексных частиц в жидкости определяется аналогично (18) с заменой r_γ на R , но в 2 раза меньше, так как мы дважды учитываем столкновение каждой пары латексных частиц. Из (17) следует:

$$k_D^{LL} = \frac{1}{2} 16\pi D_L R_L = \frac{4kT}{3\eta} = 5,5 \cdot 10^{-12} \frac{\text{см}^3}{\text{с}}. \quad (30)$$

Будем считать, что за время диффузии латексных частиц друг к другу, успеет установится равновесие между антителами и антигенами, в условиях которого получено выражение (27). Это оправдано, так как $\frac{k_D^{LL}}{k_+} = 10^{-2} \div 1$ (получено аналогично (20), используя (30)), следовательно за время диффузии выражение (27) станет близко к равновесному. Это ограничение совсем снимается, если агглютинация лимитируется реакцией связывания, потому что в этом случае её скорость существенно меньше.

Константа скорости реакции в пренебрежении диффузией определяется аналогично (5):

$$k_r = \bar{v}_L \sigma_L \varepsilon_L, \quad (31)$$

где $\bar{v}_L = \sqrt{\frac{16kT}{\pi m_L}}$ – средняя скорость относительного движения латексных частиц (m_L – масса латексной частицы), $\sigma_L \approx \pi(2R)^2$ – сечение столкновения, ε_L – вероятность связывания при одном столкновении. Плотность латексных частиц ($1,05 \frac{\text{г}}{\text{см}^3}$ для полистирола) близка к плотности воды. Поэтому $m_L \approx \frac{4}{3} \pi R^3 \rho$ (ρ – плотность воды).

Тогда:

$$\frac{k_r}{\varepsilon_L} = \bar{v}_L \sigma_L = 8 \sqrt{\frac{kTR}{3\rho}} = 9,4 \cdot 10^{-9} \frac{\text{см}^3}{\text{с}}. \quad (32)$$

Сравнивая (30) и (32), видим, что для того, чтобы реакция (28) лимитировалась диффузией, необходимо и достаточно, чтобы $\varepsilon_L \geq 10^{-3}$. Обозначим вероятность связывания одной пары антиген-антитело при столкновении латексных частиц ε_1 . Выше было обсуждено, что ε_1 больше чем ε_0 из-за относительно большого времени соударения двух латексных частиц. Считаем, что для связывания двух латексных частиц достаточно образования одной связи антиген-антитело. Тогда:

$$\varepsilon_L = 1 - (1 - \varepsilon_1)^M = 1 - e^{-\varepsilon_1 M}, \quad (33)$$

где M – число пар антиген-антитело, способных к связыванию, в области контакта. Здесь использовано равенство $\lim_{x \rightarrow 0} (1 - x)^{-1/x} = e$ и предположение, что $\varepsilon_1 \ll 1$. Считаем, что латексные частицы соприкасаются концами антигенов, а область контакта определяется условием, что расстояние между концами антигенов, которые находятся напротив друг друга на разных латексных частицах, не больше l_Y (1).

Оценим площадь области контакта S_c (φ – центральный угол между точкой касания и точкой на границе области контакта, $\varphi \ll 1$):

$$\frac{l_Y}{2} = R(1 - \cos \varphi) = R \frac{\varphi^2}{2} \Rightarrow \varphi = \sqrt{\frac{l_Y}{R}},$$

$$S_c = \pi(R\varphi)^2 = \pi R l_Y. \quad (34)$$

Считаем, что каждое антитело в области контакта на одной латексной частицей может связаться со свободным антигеном на другой латексной частице, если центр антигена попадает в площадь σ (6) вокруг центра антитела. Тогда число M равно:

$$M = 2S_c c_Y \sigma c_A = 2 \frac{S_c \sigma}{(4\pi R^2)^2} N_Y N_A, \quad (35)$$

где c_Y , c_A и N_Y , N_A – поверхностные концентрации и полное число на одной латексной частице активных антител и свободных антигенов соответственно.

Рассмотрим случай, когда концентрация антител много меньше концентрации антигена. Этот случай реализуется, когда агглютинация используется для определения малых концентраций антител в пробе. Используя (27), получаем:

$$N_A N_Y = \frac{[A][YA]}{[L]^2} = \frac{2N^2 K_a^L [Y]_0}{1 + (1 + K_a^L [A]_0)^2} = N^2 f, \quad (36)$$

где для удобства введён коэффициент f , равный:

$$f = \frac{2K_a^L[Y]_0}{1 + (1 + K_a^L[A]_0)^2}. \quad (37)$$

Подставляя это в (35) и используя (6), (34) и оценку для N (12), имеем:

$$M = \frac{2S_c\sigma}{(4\pi R^2)^2} N^2 f = \frac{2\pi R l_Y \pi (r_A + r_Y)^2}{(\pi r_A^2)^2} f = 1,5 \cdot 10^4 f. \quad (38)$$

В случае $\varepsilon_L \ll 1$ (именно он нас интересует, когда мы хотим найти границы диффузионного лимитирования агглютинации), а значит и $\varepsilon_1 M \ll 1$, (33) упрощается:

$$\varepsilon_L = \varepsilon_1 M = 1,5 \cdot 10^4 \varepsilon_1 f \geq 10^{-3}, \quad (39)$$

Ориентируясь на (15), будем считать $\varepsilon_1 \geq 10^{-5}$, тогда необходимым условием диффузионного предела реакции агглютинации будет:

$$f \geq 10^{-2} \Rightarrow K_a^L[Y]_0 \in (10^{-2}; 10^2), \quad (40)$$

Иными словами, в диапазоне концентраций антител от $\frac{10^{-2}}{K_a^L}$ до $\frac{10^2}{K_a^L}$ (при условии, что антигена много больше) реакция агглютинации будет диффузионно лимитирована, и её скорость не будет зависеть от концентрации антител $[Y]_0$.

Подставляя сюда характерные значения константы аффинности (14), получаем, что для диффузионного предела необходимо, чтобы $[Y]_0 \in (10^8; 10^{15}) \text{ см}^{-3}$, и достаточно, чтобы $[Y]_0 \in (10^{11}; 10^{12}) \text{ см}^{-3}$.

2.4. Модель ранней стадии агглютинации в диффузионном пределе.

Обозначим концентрацию комплексов из i латексных частиц как n_i . Полная концентрация комплексов латексных частиц в пробе $n = \sum_i n_i$ вообще говоря не совпадает с полной концентрацией латексных сферических частиц $[L] = \sum_i i n_i$.

Будем рассматривать комплексы из i латексных частиц, как шарики радиусом $\sqrt[3]{i}R$, тогда константу скорости диффузии комплексов из i и j латексных частиц друг к другу легко получить из (17) и (18):

$$k_D^{ij} = \frac{2kT}{3\eta} (\sqrt[3]{i} + \sqrt[3]{j}) \left(\frac{1}{\sqrt[3]{i}} + \frac{1}{\sqrt[3]{j}} \right) = \frac{8kT}{3\eta} \left(1 + \frac{(\xi - 1)^2}{4\xi} \right), \quad (41)$$

где введено обозначение $\xi = \sqrt[3]{\frac{i}{j}}$. Видно, что k_D^{ij} отличается от $2k_D^{LL}$ (30) в пределах 10%, если ξ лежит в пределах $(0,5; 2)$.

Будем рассматривать ранние стадии агглютинации, когда концентрация комплексов более чем из 8-ми латексных частиц пренебрежимо мала. В этом случае можно считать, что все k_D^{ij} равны $2k_D^{LL}$, если $i \neq j$, и k_D^{LL} , если $i = j$. Также считаем, что реакция слипания любых двух комплексов лимитируется диффузией. Схема реакции выглядит следующим образом:



где L_i – комплекс из i латексных частиц. Заметим, что один акт этой реакции приводит к уменьшению общего числа комплексов в пробе на 1, поэтому:

$$\frac{dn}{dt} = -\sum_{i \leq j} w_{ij} = -2k_D^{LL} \sum_{i < j} n_i n_j - k_D^{LL} \sum_i n_i^2 = -k_D^{LL} \sum_{i,j} n_i n_j = -k_D^{LL} n^2, \quad (43)$$

где $w_{ij} = k_D^{ij} n_i n_j$ – скорость реакции слипания L_i и L_j . Скорость изменения концентрации одиночных латексных частиц равняется:

$$\frac{dn_1}{dt} = -\sum_{i>1} w_{1i} - 2w_{11} = -2k_D^{LL} n_1 \left(\sum_{i>1} n_i + n_1 \right) = -2k_D^{LL} n_1 n. \quad (44)$$

Введём долю одиночных латексных частиц $q = \frac{n_1}{n}$ и найдём скорость её изменения, используя (43) и (44):

$$\frac{dq}{dt} = -k_D^{LL} n_1 = -k_D^{LL} nq. \quad (45)$$

Введём средний размер комплексов:

$$\langle j \rangle = \frac{\sum_i i n_i}{\sum_i n_i} = \frac{[L]}{n}. \quad (46)$$

Эта величина характеризует распределение комплексов латексных частиц по числу латексных частиц в комплексе. Выразим через него n в (45):

$$\frac{dq}{dt} = -\frac{k_D^{LL} [L]}{\langle j \rangle} q. \quad (47)$$

Чтобы найти эту скорость в начальный момент времени необходимо найти значение $\langle j \rangle$ в начальный момент времени ($\langle j \rangle_0$).

Если в начальный момент времени в исследуемой пробе присутствуют только одиночные и двойные латексные частицы, то $\langle j \rangle = 2 - q_0$ (q_0 – значение q в начальный момент времени), следовательно:

$$w_0 = -k_D^{LL} [L] \frac{q_0}{2 - q_0}. \quad (48)$$

где w_0 – скорость изменения доли одиночных латексных частиц в начальный момент времени. Однако если в начальный момент времени в исходной пробе присутствуют комплексы из большего числа частиц, то, при прочих равных условиях, $\langle j \rangle$ будет больше, а w_0 – меньше.

3. Методика эксперимента

3.1. Описание установки

Основная идея проточных цитометров заключается в измерении характеристик одиночных частиц. Для этого с помощью гидрофокусирующей головки (ГФГ) создается два ламинарных коаксиальных потока - внутренний (с диаметром порядка 10-30 мкм), представляющий собой пробу с измеряемыми объектами, и внешний, состоящий из дистиллированной и отфильтрованной воды. За счет малого сечения внутренней струи и ламинарности потока в рабочей зоне прибора создается возможность измерения характеристик одиночной частицы. При этом максимальная скорость измерений на проточных цитометрах достигает сотен тысяч частиц в минуту [19]. Такие измерения свойств одиночных частиц, не требующие каких либо предположений о характере распределения, позволяют легко отслеживать малые изменения во всей системе. С другой стороны, высокая скорость накопления данных позволяет измерять большое количество частиц, что дает высокую статистическую достоверность результатов.

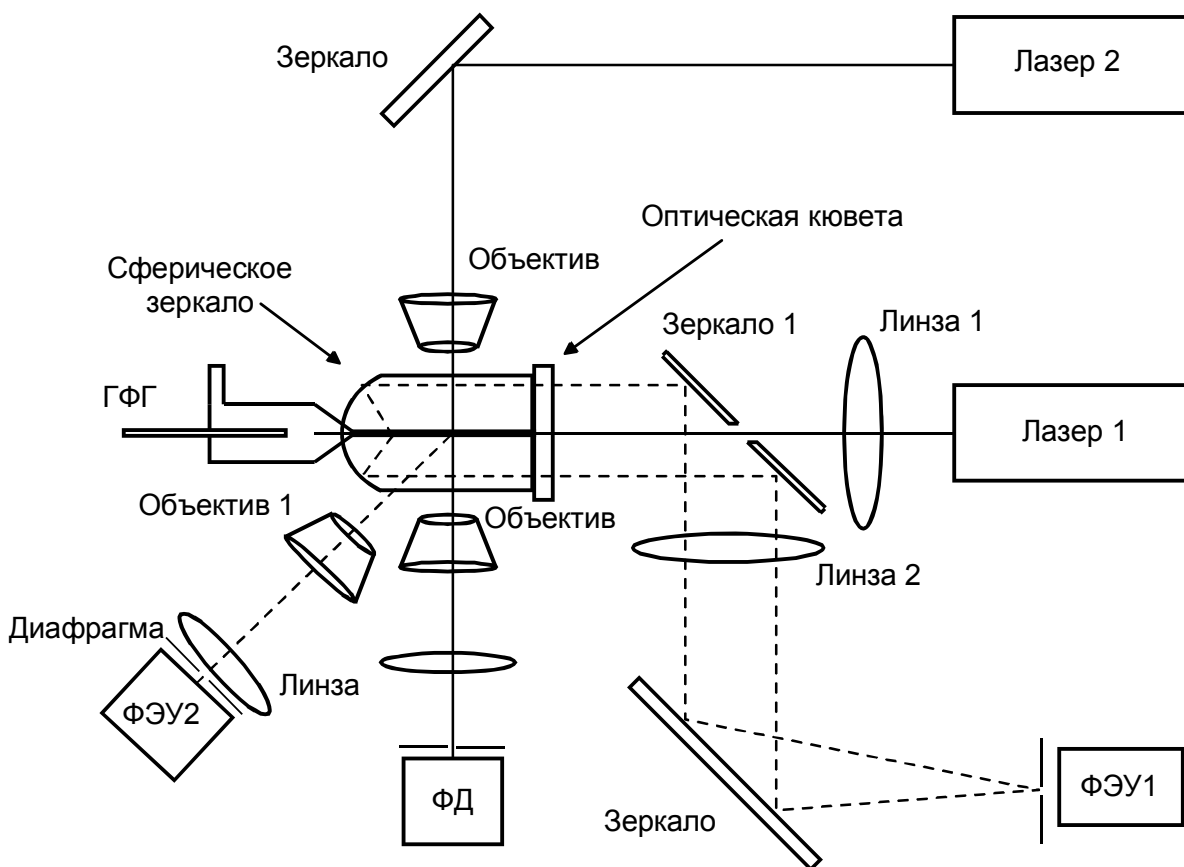


Рис. 3. Схема сканирующего проточного цитометра, модифицированного для флуоресцентных измерений

Основным отличием сканирующего проточного цитометра (СПЦ) [11] (рис. 3) от проточного цитометра стандартной конфигурации является наличие сканирующей оптической кюветы, в которой свет, рассеянный одиночной частицей, сканируется по апертуре фотоприемника во время ее движения в потоке по капилляру кюветы. Основное излучение (Ar лазер, 488нм, 6мВт, лазер 1 на рис. 3) распространяется вдоль оси канала, по которому движутся частицы, и фокусируется в кювету через оптическое окно в нижней части сканирующей оптической кюветы. Фокусировка луча (линза 1 на рис. 3, фокусное расстояние 45мм) обеспечивает постоянную освещенность движущейся частицы во время измерения.

Для любой точки на оси потока внутри рабочей зоны существует определенный угол рассеяния θ , для которого рассеянный частицей свет отразится сферическим зеркалом (радиус 4.5мм) параллельно оси потока. Далее этот световой цилиндр, покинув оптическую кювету, отражается от поверхности зеркала 1, и фокусируется линзой 2 (фокусное расстояние 300мм) на диафрагме (диаметр 500мкм), расположенной на входном окне фотоумножителя (ФЭУ 1, Hamamatsu R446). Перед ФЭУ 1 установлен интерференционный фильтр на 480–500нм.

Таким образом, в каждый момент времени на ФЭУ попадает свет, рассеянный частицей под определенным углом θ . Сигнал с ФЭУ непрерывно поступает на вход АЦП (2,6мкс на точку), связанного с ЭВМ. Частица при выходе из рабочей зоны пересекает луч триггерного лазера (лазерная указка, 630-680нм, <5мВт, лазер 2 на рис. 3). Сигнал от рассеяния частицей света вперед, регистрирующийся с помощью фотодиода, позволяет определить положение частицы на оси канала в определенный момент времени. Для фокусировки триггерного луча и сбора рассеянного излучения используются два объектива (10х, числовая апертура 0,2).

Однозначная связь местоположения частицы и угла рассеяния света, для которого свет попадет на ФЭУ, позволяет восстановить зависимость интенсивности рассеянного света от угла рассеяния. Такая зависимость называется индикатрисой светорассеяния. Данная установка позволяет получать индикатрису светорассеяния в диапазоне азимутальных углов θ от 5° до 120° . Индикатриса светорассеяния определяется морфологическими свойствами частицы. Например, она сильно зависит от формы, размеров, показателя преломления. С помощью аппроксимационных уравнений (метод FLSI), полученных для однородной непоглощающей сферы [20], возможно получить параметры частиц (размер, показатель преломления) по измеренным индикатрисам.

Для несферических частиц индикатриса светорассеяния зависит от ориентации частицы в капилляре. Ранее было показано, что капилляр оптической кюветы обладает

ориентирующим действием в отношении вытянутых несферических частиц [21], которые, двигаясь по капилляру, ориентируются преимущественно вдоль потока. Таким образом, при измерении индикатрис светорассеяния от вытянутых несферических частиц, можно считать, что они все имеют одинаковую ориентацию. Это обстоятельство упрощает анализ индикатрис светорассеяния для таких частиц.

В данной работе использовался модифицированный сканирующий проточный цитометр [14]. Главное отличие от основного варианта состоит в добавлении объектива 1 (10х, числовая апертура 0,3) с фотоумножителем (ФЭУ 2, Hamamatsu R446). Данные изменения позволяют одновременно с индикатрисой светорассеяния от одиночной частицы измерять также сигнал флюоресценции от неё. Аргонный лазер возбуждает флюоресценцию в молекулах красителя, связанных с частицей, которая движется в потоке по капилляру оптической кюветы. Сигнал флюоресценции регистрируется ФЭУ 2 под углом в 90° к лучу индикатрисного лазера в тот момент, когда частица пролетает фокус объектива 1. Для того чтобы подавить упругое рассеяние от лазеров 1 и 2, а также засветку от внешних источников света, применяется комбинация из стеклянного фильтра ОЖ18 и интерференционного фильтра с полосой пропускания 530–550нм. Сигнал ФЭУ 1 складывается с усиленным сигналом ФД и коммутируется с сигналом ФЭУ 2, после чего подаётся на вход АЦП. Таким образом, результатом измерения одной частицы является сигнал светорассеяния и сигнал флюоресценции.

Использование индикатрисы светорассеяния для идентификации клеток позволяет преодолеть одну из главных проблем при изучении биологических систем. Эта проблема состоит в том, что в биологической взвеси всегда присутствуют нежелательные элементы – примеси, “биологический мусор” (разрушенные и мертвые клетки, их клеточные компоненты), ассоциаты используемых белков. Регистрация рассеяния под определенным углом, реализованная в стандартных цитометрах, не позволяет преодолеть эту трудность. В то время как использование для идентификации клеток индикатрисы светорассеяния, являющейся более информативной характеристикой частицы, позволяет успешно решить эту проблему.

3.2. Постановка эксперимента

В экспериментах использовались латексные частицы радиусом 0,9мкм (“Polysciences”, Cat.No. 18338). Внутри этих частиц распределены молекулы флюоресцеина, которые имеют максимум поглощения на длине волны 490нм (что соответствует длине волны возбуждающего лазера), а максимум флюоресценции на

длине волны 530нм [22]. Карбоксильные группы, находящиеся на поверхности этих частиц, позволяют ковалентно присоединять к ним различные белки.

В данной работе в качестве антигена использовался бычий сывороточный альбумин (БСА) – белок с молекулярной массой 66кДа (“Sigma”, Cat.No. A-7030). Ковалентно связывание его с поверхностью латексных частиц было проведено к.х.н. Сиволобовой Г.Ф. (ГНЦ ВБ «Вектор»). Методика этого связывания [23] позволяет считать, что практически вся поверхность латексных частиц покрыта антигеном.

В качестве антител использовалась цельная сыворотка, полученная при иммунизации лабораторных кроликов БСА. Сыворотка была любезно предоставлена к.м.н. Игнатъевым Г.М. (ГНЦ ВБ «Вектор»). Суммарная концентрация белков в сыворотке была определена по методу Лоури [24] и составила 10^{16} см^{-3} , при этом содержание IgG антител специфичных именно к БСА в сыворотке можно грубо оценить величиной 10%, т.е. содержание специфичных к БСА IgG в исходной сыворотке составляет $c_0^Y = 10^{15} \text{ см}^{-3}$.

Концентрация латексных частиц определялась с помощью камеры Горяева. Исходная проба с латексными частицами, покрытыми БСА, разбавлялась в 500 раз, и помещалась в микроячейку известного объёма. Число латексных частиц в ячейке определялось визуально с помощью микроскопа. В результате была получена следующая концентрация латексных частиц в исходной пробе $c_0^L = (3 \pm 0,4) \cdot 10^9 \text{ см}^{-3}$.

Для демонстрации возможностей сканирующего проточного цитометра по измерению агглютинации было проведено исследование взвеси латексных частиц с концентрацией примерно $5 \cdot 10^6 \text{ см}^{-3}$. Так как латексные частицы склонны к самопроизвольной агрегации, то в этой пробе изначально имелись агрегаты из двух и более латексных частиц. Для разрушения больших комплексов латексных частиц непосредственно перед экспериментом эта проба подвергалась мягкому пипетированию.

Схема эксперимента по агглютинации приведена на рис. 4. Разведённая сыворотка (50мкл) и взвесь латексных частиц (50мкл) смешивались, образуя реакционную пробу. После этого в различные моменты времени из реакционной пробы отбирался маленький объём (1-2мкл) и разводился в пробирках с буферным раствором в 25–100 раз в зависимости от концентрации латексных частиц в исследуемой пробе. Полученные таким образом пробы исследовались с помощью СПЦ для определения доли одиночных латексных частиц в них. При разбавлении скорость реакции замедлялась настолько, что за время измерений проб (~30мин) измеряемые

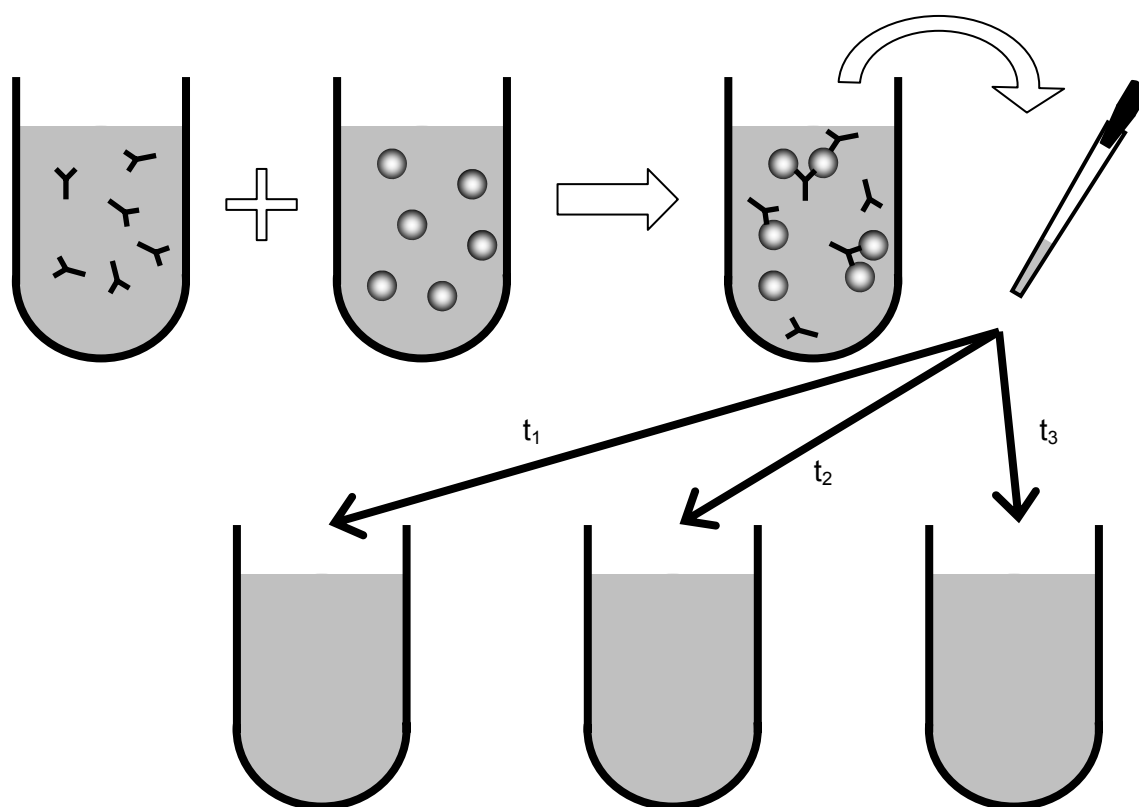


Рис. 4. Схема проведения эксперимента по агглютинации

характеристики пробы существенно не менялись (это было проверено экспериментально путём измерения пробы второй раз через 70мин после первого измерения). Концентрация антител в реакционной пробе бралась $[Y]_0 = 5 \cdot 10^{11} \div 5 \cdot 10^{12} \text{ см}^{-3}$, концентрация латексных частиц – $[L] = 7,5 \cdot 10^7 \div 3 \cdot 10^8 \text{ см}^{-3}$. При этом легко проверить, что удовлетворялось условие избытка антигена.

Так как латексные частицы склонны к самопроизвольной агрегации, особенно при высоких концентрациях, пробирка с взвесью латексных частиц обрабатывалась ультразвуком непосредственно перед смешиванием с антителами. В результате этого, почти все латексные частицы при смешивании с антителами находятся в монодисперсном состоянии.

В данной части работы использовался сигнал флуоресценции, а не светорассеяния, для идентификации одиночных и слипшихся латексных частиц, так как это предъявляет менее жёсткие требования к настройке прибора. Это связано с тем, что для того чтобы проявлялось ориентирующее действие СПЦ, необходимо, чтобы струя с измеряемой пробой находилась в центре капилляра. При этом не осуществляются оптимальные условия для измерения индикатрис светорассеяния, так как ось капилляра, вообще говоря, проходит на некотором расстоянии от центра сферического зеркала (дефект изготовления).

Однако следует заметить, что разработанный в данной работе метод измерения кинетики агглютинации путём анализа индикатрис светорассеяния применим к более широкому классу объектов, так как не требует наличия у них флюоресцентной метки. Во-первых, это упрощает подготовку проб и уменьшает затраты на реактивы. Во-вторых, в некоторых случаях присоединение флюоресцентной метки к объектам исследования может существенно изменить их свойства, и поэтому неприемлемо (например, при исследовании взаимодействия вируса с клеткой).

4. Результаты

Примеры сигналов, полученных в эксперименте с латексными частицами, не обработанными ультразвуком, приведены на рис. 5. Сигналы от разных частиц искусственно разнесены по вертикальной оси для удобства восприятия. Сначала идёт сигнал светорассеяния, который через аппаратную функцию цитометра может быть преобразован в индикатрису светорассеяния. Затем – триггерный сигнал, который служит для срабатывания системы. Завершает – сигнал флюоресценции. Видно, что в зависимости от количества частиц в комплексе различается и сигнал светорассеяния и сигнал флюоресценции.

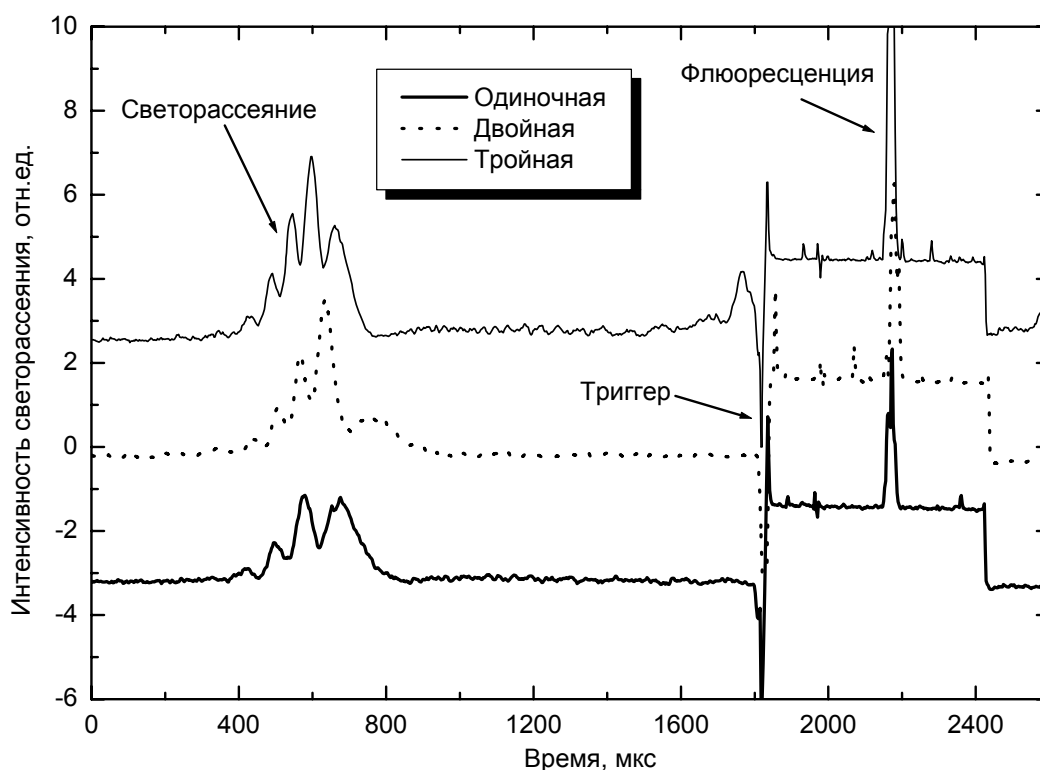


Рис. 5. Экспериментальные сигналы от одиночных и слипшихся латексных частиц

На рис. 6 представлена карта распределения латексных частиц по размеру и интенсивности флюоресценции. Каждая точка соответствует одной латексной частице. Интенсивность флюоресценция определялась путём интегрирования сигнала флюоресценции. Эффективный размер определялся с помощью анализа индикатрисы светорассеяния по приближённому методу FLSI [20], разработанному в нашей лаборатории. Этот метод основан на измерении расстояния между минимумами индикатрисы светорассеяния и даёт с точностью 50нм значения диаметра для

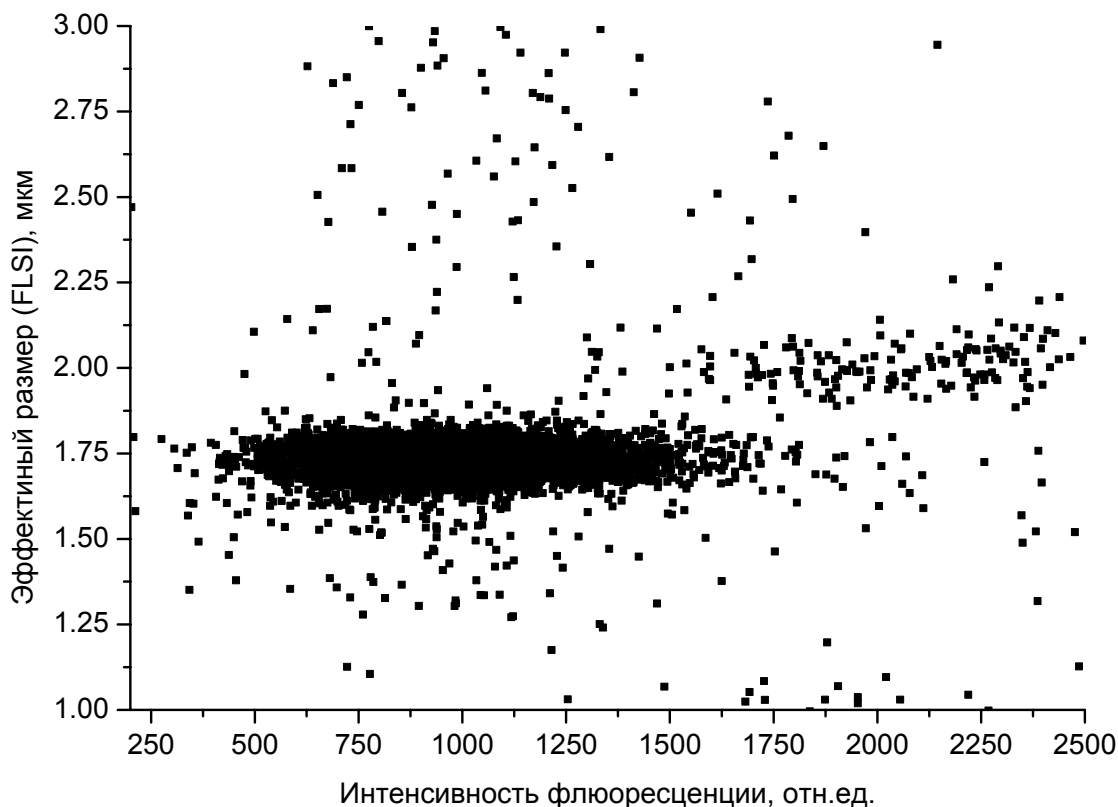


Рис. 6. Карта распределения флуоресцентных латексных частиц

однородных непоглощающих сферических частиц. Формально этот метод можно применить и для димеров латексных частиц. Полученные значения назовём эффективным размером.

Прямым результатом измерения одной пробы на СПЦ является выборка из примерно 1000 точек, каждая из которых – это интенсивность флуоресценции от одной латексной частицы или комплекса из нескольких латексных частиц. Для примера, на рис. 7 приведена эта выборка в виде гистограммы для одного разбавления одной измеренной пробы. Возникает вопрос, как по этой выборке получить долю одиночных латексных частиц в измеряемой пробе в момент разбавления (в показанном примере $t = 150$ с от смешивания антител и взвеси латексных частиц). Для этого был использован статистический анализ выборки, который описан в Приложении. Для автоматизации обработки была создана программа в среде LabView 6.0.

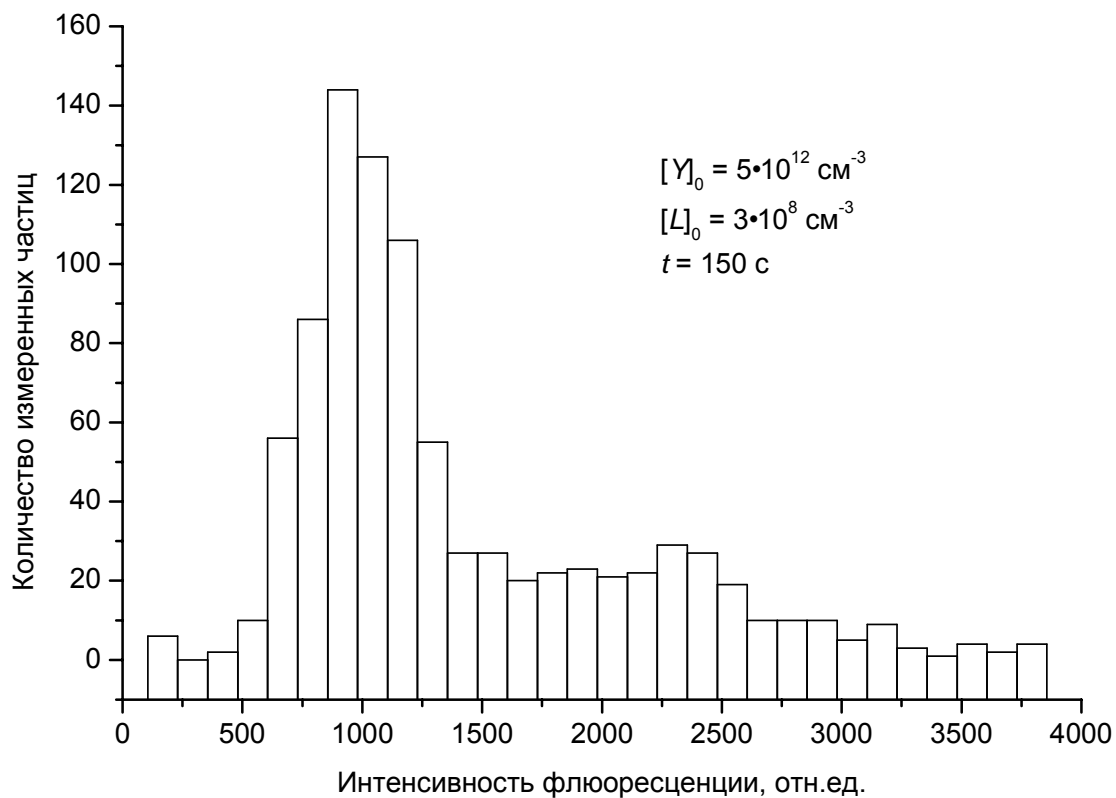


Рис. 7. Гистограмма распределения комплексов латексных частиц по интенсивности флуоресценции

На рис. 8 и рис. 9 приведены полученные зависимости доли одиночных частиц от времени для различных начальных концентраций латексных частиц и антител (указаны на графиках). Для определения начальной доли одиночных латексных частиц и начальной скорости её изменения была проведена линейная подгонка этих зависимостей. Результаты подгонки приведены на графиках. Приведённые ошибки результатов являются статистическими погрешностями обработки выборки (см. Приложение) и не включают в себя экспериментальные ошибки при измерении проб.

Были проведены эксперименты по неспецифической агрегации латексных частиц при разных их концентрациях. Иными словами, в этих экспериментах в исследуемую пробу антитела не добавлялись. Полученные результаты свидетельствуют о том, что скорость неспецифической агрегации существенно меньше скорости агглютинации.

Все доверительные интервалы в этой работе строятся по вероятности 95%, то есть величина ошибки составляет 2 стандартных отклонения.

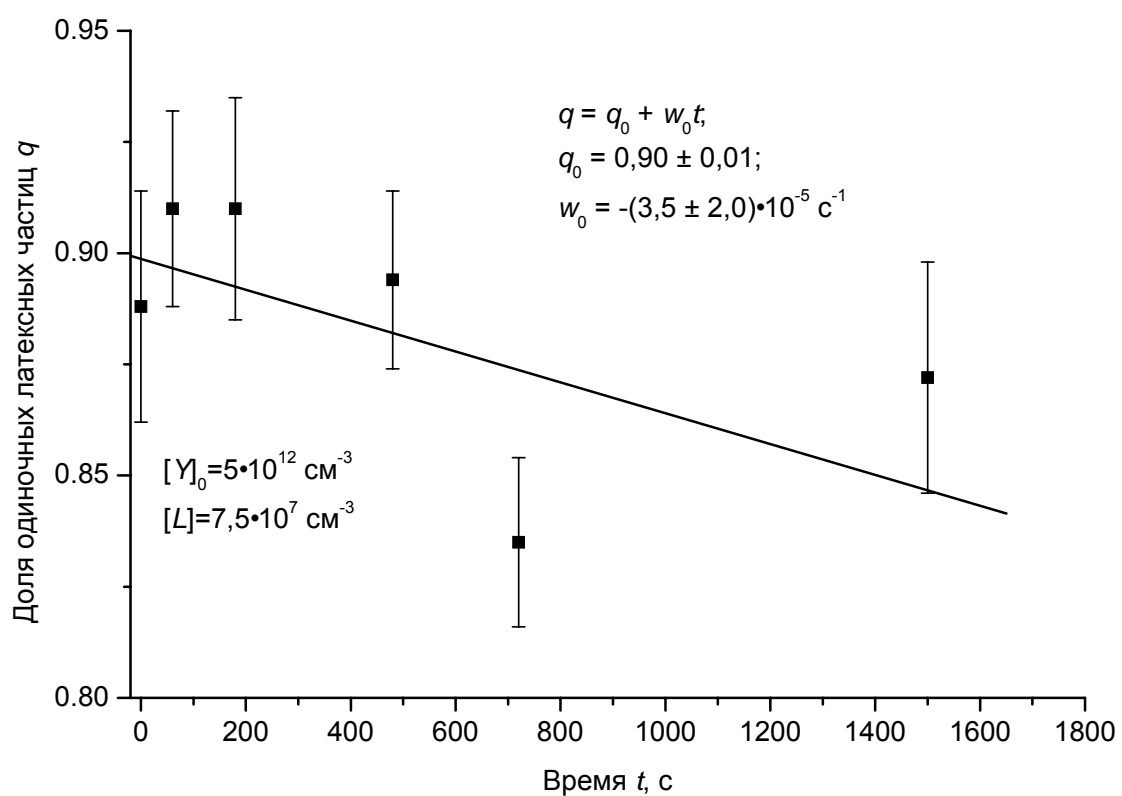
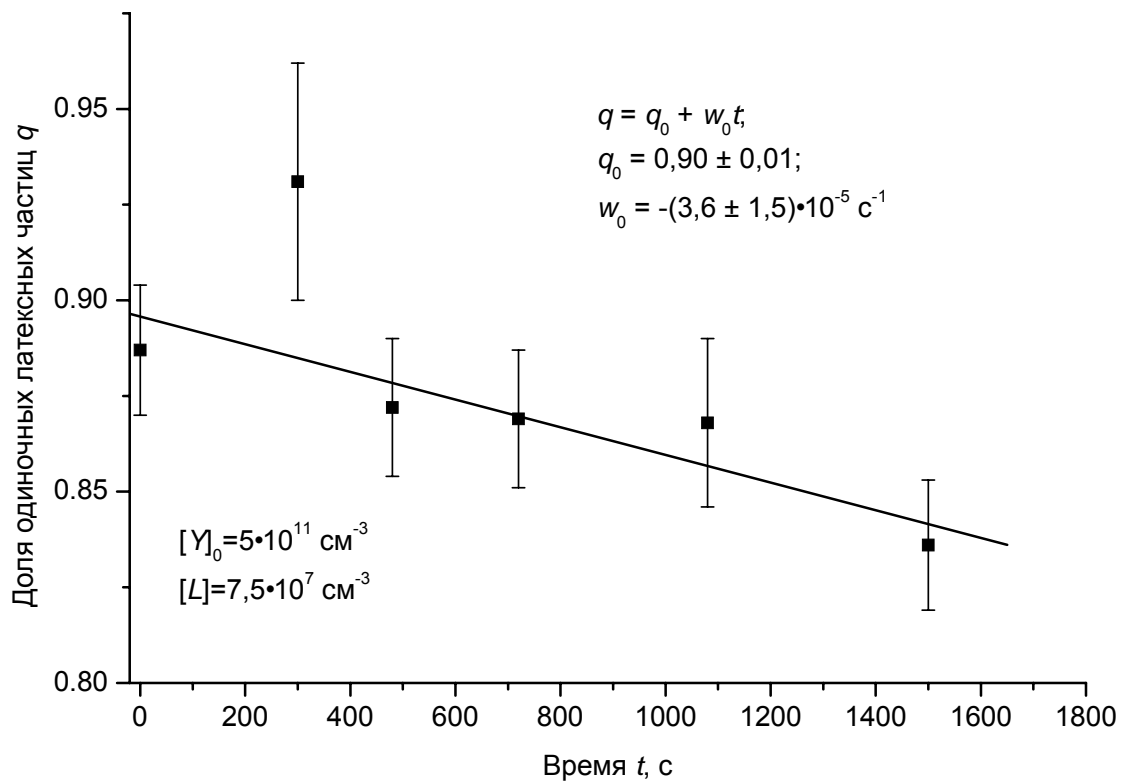


Рис. 8. Зависимости доли одиночных частиц от времени для различных начальных концентраций антител

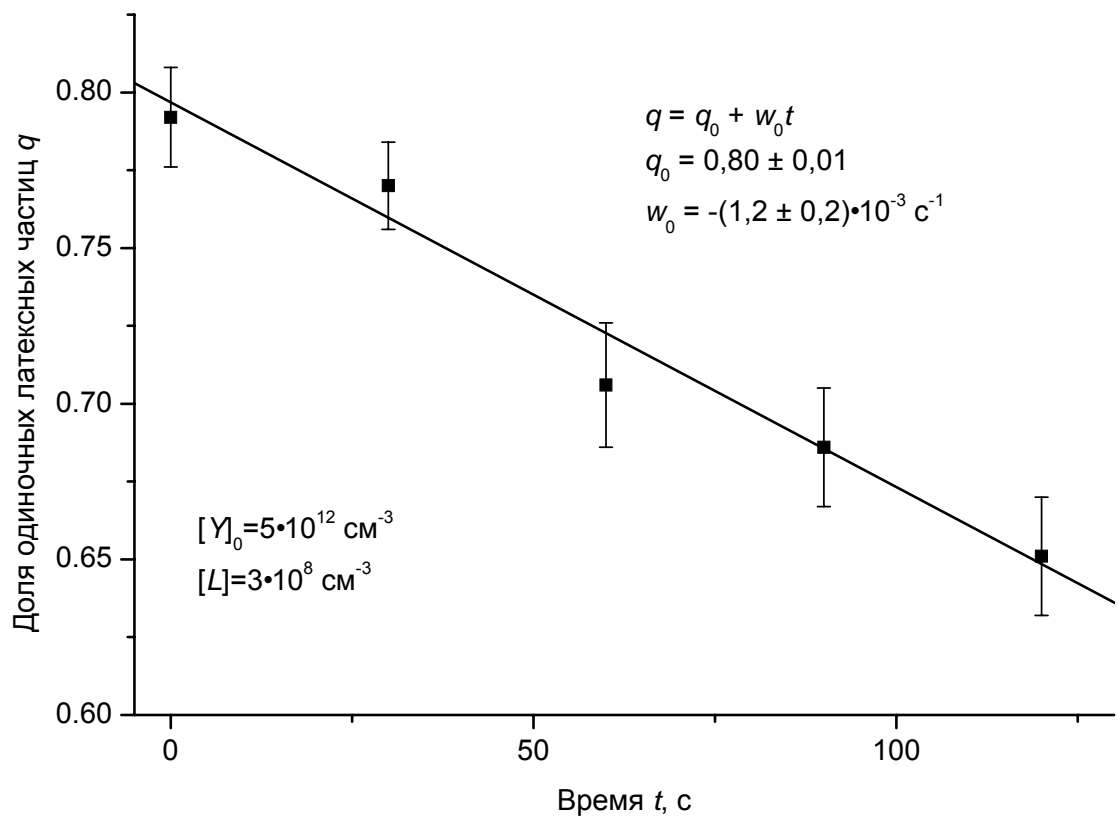


Рис. 9. Зависимость доли одиночных частиц от времени

5. Анализ полученных результатов

Карта, представленная на рис. 6, отчётливо свидетельствует о возможности измерения ранних стадий агглютинации с помощью СПЦ. При этом, измерения могут быть проведены как для флуоресцирующих частиц по интенсивности флуоресценции, так и для любых других частиц по индикатрисе светорассеяния. Заметим, что эффективный размер для димеров латексных частиц примерно в 1,2 раза больше диаметра латексных частиц. Это отношение близко к $\sqrt[3]{2}$, то есть эффективный размер димеров примерно равен диаметру шара с объёмом, равным суммарному объёму двух латексных частиц. Метод FLSI разработан для сферических частиц, поэтому эффективный размер димеров, вообще говоря, не должен совпадать с диаметром эквивалентного шара. Однако полученное соотношение всё же поясняет физический смысл введённого формальным образом эффективного размера. Необходимо заметить, что существенную роль в этом факте играет то, что частицы, двигаясь в капилляре СПЦ, ориентируются по направлению падающего излучения.

Концентрации антител, которые использовались в эксперименте, результаты которых приведены на рис. 8 и рис. 9, попадают в диапазон (40) практически для всего диапазона характерных констант аффинности (14), поэтому логично будет предположить, что в этом случае реакция агглютинации лимитирована диффузией. Приведённые на рис. 8 графики измерены при одинаковых концентрациях латексных частиц, но при разных концентрациях антител. Полученные значения скорости изменения доли одиночных латексных частиц ($w_0 = -(3,6 \pm 1,5) \cdot 10^{-5} \text{ c}^{-1}$ и $-(3,5 \pm 2,0) \cdot 10^{-5} \text{ c}^{-1}$) совпадают в пределах ошибок, что говорит в пользу того, что в данном диапазоне концентрации антител реакция агглютинации лимитируется диффузией (что и предсказывалось в теоретической части данной работы). Посчитаем теоретическое значение для скорости диффузионно лимитированной агглютинации (48), используя значения $[L]$ и q_0 , указанные на графиках, а также (30): $w_0^{теор} = -(3,4 \pm 0,4) \cdot 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ (одинаковая для обоих графиков). Видно, что полученная в эксперименте скорость существенно меньше теоретической. Можно предположить, что полученные результаты демонстрируют кинетику реакцию не на начальной стадии, и поэтому наши теоретические выкладки здесь неприменимы.

График, приведённый на рис. 9, был получен на меньших временах. Теоретическое значение скорости для диффузионно лимитированной агглютинации (считается аналогично тому, как для рис. 8) составляет $w_0^{теор} = -(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-3} \text{ c}^{-1}$, что

совпадает с экспериментальным значением (см. рис. 9) $w_0 = -(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ в пределах ошибки. Это позволяет утверждать, что при данной концентрации антител реализуется диффузионный предел агглютинации.

Дальнейшее изучение ранних стадий агглютинации должно быть направлено на экспериментальное исследование в случае малых концентраций антител. Это позволит разработать количественную методику определения концентрации антител (антигенов) в различных пробах.

Для количественного сравнения теории и эксперимента следует усовершенствовать методику эксперимента. Например, использовать очищенную сыворотку или моноклональные антитела для того, чтобы иметь возможность с большой точностью определять концентрацию специфичных антител.

Важно отметить, что метод, предложенный в данной работе, применим для исследования агглютинации латексных частиц, покрытых антителами к некоторому антигену (например, вирусу), при добавлении к ним этого антигена. Этот процесс с физической точки зрения принципиально не отличается от исследованного в данной работе, но открывает новые горизонты для применения в биологии и медицине.

6. Заключение

В данной работе:

1. Проведено теоретическое моделирование ранних стадий агглютинации латексных частиц. Получена оценка для диапазона концентраций антител, в котором реакция агглютинации лимитируется диффузией. Рассчитано теоретическое значение скорости изменения доли одиночных латексных частиц на ранних стадиях агглютинации.
2. Показана возможность измерения кинетики агглютинации (дифференцировки одиночных латексных частиц и димеров) с помощью сканирующего проточного цитометра как по интенсивности флюоресценции, так и по анализу индикатрисы светорассеяния по методу FLSI. Разработан метод анализа экспериментальных данных и написана программа для определения доли одиночных частиц в исследуемой пробе.
3. Проведены первые эксперименты на латексных частицах, покрытых бычьим сывороточным альбумином. Полученные результаты говорят о том, что для использованных концентраций антител и латексных частиц реализуется диффузионный предел агглютинации, как и предсказывается в теоретической части данной работы.

В завершение, хотелось бы выразить благодарности:

- к.м.н. Игнатьеву Г.М. за предоставленную анти-БСА сыворотку.
- к.х.н. Сиволобовой Г.Ф. за работу по связыванию БСА с поверхностью латексных частиц.
- к.ф.-м.н. Швалову А.Н. за помощь в проведении экспериментов.
- моему научному руководителю Суровцеву И.В. за помощь в проведении экспериментов и обсуждении теоретической модели и результатов.

7. Приложение

В этом разделе представлен метод обработки экспериментальных данных, который использовался в данной работе. Исходными данными является набор из измеренных интенсивностей флюоресценции от отдельных частиц. Результатом обработки является доля одиночных латексных частиц в пробе.

Из полученной в эксперименте выборки (рис. 7), содержащей N_0 значений, выделим значения лежащие в пределах $(X_0 - \Delta_2; X_0 - \Delta_1)$, где X_0 – средняя интенсивность флюоресценции одиночных латексных частиц. Δ_1 выбирается так, чтобы можно было пренебречь попаданиям в этот промежуток значений флюоресценции комплексов из двух и более латексных частиц. Δ_2 выбирается так, чтобы захватить основную массу значений (см. рис. 10). Обозначим выборку, лежащую в описанном интервале Z . Введём обозначение $\alpha = \frac{\Delta_2}{\Delta_1}$ и сделаем линейное преобразование над выборкой Z :

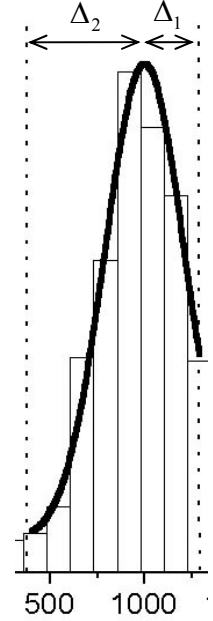


Рис. 10.

$$Y = \frac{Z - X_0}{\Delta_1 / \sqrt{2}}.$$

Выборка Y лежит в промежутке $(-\alpha\sqrt{2}; \sqrt{2})$ и содержит N_Y значений. Считаем, что она принадлежит нормальному распределению с центром в 0. Плотность этого распределения задаётся следующим образом:

$$f(y) = \frac{1}{C} e^{-\frac{y^2}{2\sigma_0^2}}, \quad (\text{П.1})$$

где σ_0 – подлежащая дальнейшему определению ширина распределения, а C – нормировочная константа, определяемая соотношением:

$$C = \int_{-\alpha\sqrt{2}}^{\sqrt{2}} e^{-\frac{y^2}{2\sigma_0^2}} dy = \sigma_0 \sqrt{\frac{\pi}{2}} \left(\operatorname{erf}\left(\frac{1}{\sigma_0}\right) + \operatorname{erf}\left(\frac{\alpha}{\sigma_0}\right) \right), \quad (\text{П.2})$$

где $\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-t^2} dt$ – функция ошибок. Второй момент этого распределения равен:

$$M(Y^2) = \int_{-\alpha\sqrt{2}}^{\sqrt{2}} y^2 f(y) dy = \sigma_0^2 \left[1 - \frac{2}{\sigma_0 \sqrt{\pi}} \frac{e^{-\frac{1}{\sigma_0^2}} + \alpha e^{-\frac{\alpha^2}{\sigma_0^2}}}{\operatorname{erf}\left(\frac{1}{\sigma_0}\right) + \operatorname{erf}\left(\frac{\alpha}{\sigma_0}\right)} \right]. \quad (\text{П.3})$$

С другой стороны эту же величину можно оценить по выборке Y :

$$M(Y^2) = \text{mean}(Y^2) \pm \frac{2}{\sqrt{N_Y}} \text{std}(Y^2), \quad (\text{П.4})$$

где $\text{mean}(X) = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m x_i$ – среднее по выборке (m – число элементов x_i в произвольной

выборке X), $\text{std}(X) = \sqrt{\frac{1}{m-1} \sum_{i=1}^m x_i^2}$ – стандартное отклонение по выборке.

Доверительный интервал берётся по вероятности 95%. Численно разрешаем уравнение (П.3) относительно σ_0 , подставляя вместо $M(Y^2)$ границы его доверительного интервала из (П.4). В результате получаем доверительный интервал для σ_0 . На рис. 10 приведена плотность распределения, нормированная на число значений в интервале, полученная по вычисленному σ_0 .

Количество значений, соответствующих одиночным латексным частицам, в выборке Z равно:

$$N_1 = N_Y \int_{-\infty}^{\infty} f(y) dy = N_Y \frac{2}{\text{erf}\left(\frac{1}{\sigma_0}\right) + \text{erf}\left(\frac{\alpha}{\sigma_0}\right)}. \quad (\text{П.5})$$

Здесь использовано то, что $f(y)$ – быстро убывающая функция, и поэтому можно с большой точностью взять $\pm \infty$ вместо границ области значений выборки Z .

Таким образом для доли одиночных латексных частиц имеем:

$$q = \frac{N_1}{N_0} = \frac{N_Y}{N_0} \frac{2}{\text{erf}\left(\frac{1}{\sigma_0}\right) + \text{erf}\left(\frac{\alpha}{\sigma_0}\right)}. \quad (\text{П.6})$$

Подставляя сюда границы доверительного интервала для σ_0 , получаем доверительный интервал для q .

8. Литература

1. *Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д.* Иммунология. Пер. с англ. М: Мир, 2000, 592с.
2. *Van Oss C.J.* Precipitation and agglutination. *J. Immunoassay*, 2000, vol.21, No.2&3, p.143-164.
3. *Ellis R.W., Sobanski M.A.* Diagnostic particle agglutination using ultrasound: a new technology to rejuvenate old microbiological methods. *J. Med. Microbiol.*, 2000, vol.49, p.853-859.
4. *Кардаш Г.И., Ахметьева Е.И., Изюмников А.Л., Грицкова И.А., Гусев С.А., Дорохова Е.А.* Исследование реакции латексной агглютинации методом светорассеяния. *Лаб. дело*, 1990, №5, с.55-58.
5. *Quesada M., Puig J., Delgado J.M., Peula J.M., Molina J.A., Higaldo-Alvarez R.* A simple kinetic model of antigen-antibody reactions in particle-enhanced light scattering immunoassays. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1997, vol.8, p.303-309.
6. *Dolgosheina E.B., Karulin A.Yu., Bobylev A.V.* A kinetic model of the agglutination process. *Mathematical Biosciences*, 1992, vol. 109, p.1-10.
7. *Lin M.Y., Lindsay H.M., Weitz D.A., Ball R.C., Klein R., Meakin P.* Universal reaction-limited colloid aggregation. *Phys. Rev. A*, 1990, vol.41, No.4., p.2005-2020.
8. *Peffercorn E., Varoqui R.* Dynamics of latex aggregation. Modes of cluster growth. *J. Chem. Phys.*, 1989, vol. 91, No.9, p.5679-5686.
9. *Asnaghi D., Carpineti M., Giglio M., Sozzi M.* Coagulation kinetics and aggregate morphology in the intermediate regimes between diffusion-limited and reaction-limited cluster aggregation. *Phys. Rev. A*, 1992, vol.45, No.2, p.1018-1023.
10. *Bowen M.S., Broide M.L., Cohen R.J.* Determination of cluster size distributions using an optical pulse particle sorter. *J. Colloid and Interface Science*, 1985, vol.105, No.2, p.605-616.
11. *Soini J.T., Chernyshev A.V., Hanninen P.E., Soini E., Maltsev V.P.* A new design of the flow cuvette and optical set-up for the scanning flow cytometry. *Cytometry*, 1998, vol. 31, No. 2, p.78-84.
12. *Shvalov A.N., Soini J.T., Chernyshev A.V., Tarasov P.A., Soini E., Maltsev V.P.* Light-scattering properties of individual erythrocytes. *Applied Optics*, 1999, vol.38, No.1, p.230-235.
13. *Shvalov A.N., Soini J.T., Surovtsev I.V., Kochneva G. V., Sivolobova G.F., Petrov A.K., Maltsev V.P.* Individual *Escherichia coli* cells studied from light scattering with the scanning flow cytometer. *Cytometry*, 2000, vol.41, p.41–45.

14. *Surovtsev I.V., Razumov I.A., Nekrasov V.M., Shvalov A.N., Soini J.T., Maltsev V.P., Petrov A.K., Loktev V.B., Chernyshev A.V.* Mathematical modeling of cell distribution in the process of ligand-receptor binding. *J. Theor. Biol.*, 2000, vol.206, p.407-417.
15. *Bongrand P.* Ligand-receptor interactions. *Rep. Prog. Phys.*, 1999, vol.62, p.921-968.
16. *Olson W.C., Spitznagel T.M., Yarmush M.L.* Dissociation kinetics of antigen-antibody interactions: studies on a panel of anti-albumin monoclonal antibodies. *Molecular Immunology*, 1989, vol.26, No.2, p.129-136.
17. *Туницкий Н.Н.* Диффузия и случайные процессы. «Наука», 1970, 116с.
18. *Hlavacek W.S., Posner R.G., Perelson A.S.* Steric effects on multivalent ligand-receptor binding: exclusion of ligand sites by bound cell surface receptors. *Biophysical J.*, 1999, vol.76, p.3031–3043.
19. *Стейнкамп Дж.А.* Цитометрия в потоке. Приборы для научных исследований, 1984, №9, с.3-35.
20. *Maltsev V.P., Lopatin V.N.* Parametric solution of the inverse light-scattering problem for individual spherical particles. *Applied Optics*, 1997, vol.36, No.24, p.6102-6108.
21. *Швалов А.Н.* Исследование светорассеивающих свойств несферических биологических частиц с использованием сканирующей проточной цитометрии. Диссертация на соискание учёной степени к.ф.-м.н., Новосибирск, 2000, 98с.
22. *Waggoner A.S.* Fluorescent probes for cytometry. in *Flow cytometry and sorting*, second edition. Editors: Melamed M.R., Lindmo T., Mendelsohn M.L. Wiley-Liss, 1990, p.209-225.
23. Working with FluoSpheres® fluorescent microspheres. Properties and modifications. <http://www.probes.com/media/pis/mp05001.pdf>, 2001, 5p.
24. *Скоунс Р.К.* Методы очистки белков. М.:Мир, 1985, с.341-342.