

## КРИТИЧЕСКОЕ (ПЕРКОЛЯЦИОННОЕ) ПОВЕДЕНИЕ И ФРАКТАЛЬНАЯ РАЗМЕРНОСТЬ АГРЕГАТОВ В ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ \*

В. А. Маркель, М. И. Штокман

**Введение.** Иммунологические реакции широко используются в различных аналитических целях. Их особенности были предметом весьма большого числа работ, причем довольно хорошо изучены такие вопросы, как специфичность реакций, чувствительность тех или иных иммунохимических методов и т. д. Однако при этом остался существенный пробел в исследовании и теоретической интерпретации кинетики ряда иммунологических реакций, особенно в области разведений антисывороток, близких к титру. Так, в случае реакции агглютинации оставалось неизвестным распределение на ранней стадии агрегатов по размерам, зависимость среднего размера агрегата от времени. Представляет интерес также установление геометрических свойств агрегатов, в частности соотношения между размером агрегата и числом клеток в нем.

Выяснение указанных вопросов весьма важно для построения кинетической теории агглютинации, что может иметь значение для экспрессивной диагностики.

Настоящая работа посвящена теоретическому рассмотрению кинетических и равновесных особенностей реакции агглютинации. В ней интерпретируются и теоретически описываются экспериментальные данные недавней работы [1], в которой с использованием методов лазерной фотон-корреляционной спектроскопии изучена кинетика иммунологической агглютинации бактерий *Yersinia pestis* EV на ее ранней стадии.

На основе результатов настоящей работы предложена перколяционная модель квазиравновесной агглютинации. Модель объясняет наблюдающуюся [1] резкую зависимость скорости роста агрегатов от концентрации сыворотки: в ней данная зависимость является критической, подобной поведению при фазовых переходах второго рода.

**Перколяционная модель критического поведения агглютинации.** Кратко обсудим некоторые из экспериментальных результатов [1]. На рис. 1, воспроизведенном для этой цели из [1], показана зависимость среднего гидродинамического размера  $R$  агрегатов от времени  $t$  после добавления сыворотки. При разведении сыворотки 1:100, меньшем титра (1:1280), наблюдается непрерывный рост  $R$ , свидетельствующий об агглютинации бактерий. Зависимость  $R(t)$  с хорошей точностью является степенной:  $R = t^\rho$ , где  $\rho = 0,52 \pm 0,03$ . При разведении 1:1000, близком к титру, после короткого начального периода увеличения размеров наблюдается латентный период, в котором  $R = \text{const}$ , затем (при  $t > 1$  ч)  $R$  вновь начинает возрастать по степенному закону с показателем  $\rho = 0,58 \pm 0,11$ . При разведении 1:2000, несколько большем титра, после начального участка, совпадающего с предыдущим случаем, дальнейшего роста  $R$  не происходит. Таким образом, действительно наблюдается поведение, подобное фазовому переходу: когда концентрация сыворотки выше критической (соответствующей ее титру), происходит образование очень больших (в пределе — бесконечных) агрегатов бактерий. При концентрации сыворотки ниже критической реакция останавливается (выходит на стационарный режим) с образованием только конечных агрегатов.

Перейдем к формулировке модели, объясняющей указанное поведение. Рассмотрим сначала агглютинацию при концентрации сыворотки, близкой к критической. Тогда образование больших агрегатов происходит асимптотически (при  $t \rightarrow \infty$ ) бесконечно медленно, т. е. квази-

\* Представлена членом редколлегии В. И. Даниловым

равновесно. При соприкосновении двух клеток они связываются, если в области контакта находятся молекулы белка сыворотки (антитела). Разумно считать, что каждая связь образуется только минимально достаточным количеством молекул антител (обозначим его далее через  $K$ ).

Таким образом, мы рассматриваем систему, в которой фактором, лимитирующим размер агрегата, является среднее число  $x$  связей дан-

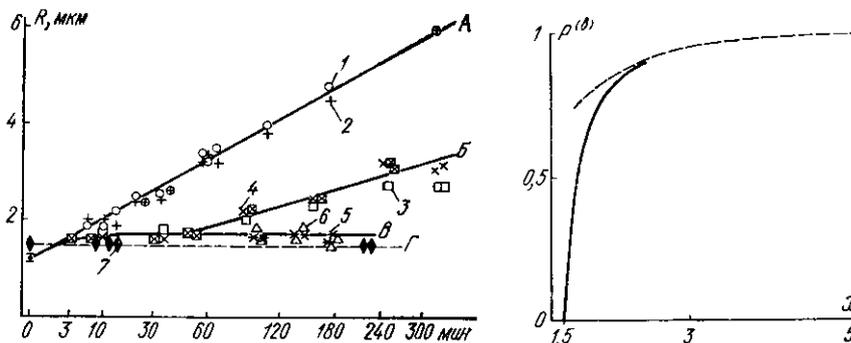


Рис. 1. Иммунологическая агглютинация бактерий *Jersinia pestis* EV: средний размер частиц (бактерий и их агрегатов)  $R$  как функция времени после добавления сыворотки. Шкала абсцисс линейна по переменной  $t^{1/2}$ . Высота символов передает статистическую ошибку на уровне одного стандартного отклонения. Через экспериментальные точки для целей наглядности проведены гладкие кривые: А — разведение сыворотки 1 : 100; В — 1 : 1000; С — 1 : 2000; Д — эксперимент с *E. coli* (контроль). Размеры найдены усреднением по методу гистограмм (символы 1, 3, 6) и независимо по методу кумулянтов (2, 4, 5). Для *E. coli* (7) размеры, найденные по указанным методам, практически совпадают. Начальные точки ( $t=0$ ) — до добавления сыворотки

Fig. 1. Immunological agglutination of the bacteria *Jersinia pestis* EV: average size of particles (bacteria and their aggregates)  $R$  as a function of time after addition of the serum. The horizontal scale is linear in the variable  $t^{1/2}$ . The height of symbols corresponds to the statistical error (one standard deviation). Smooth curves are drawn through the experimental points to guide eye: А — dilution of the serum is 1 : 100; В — 1 : 1000; С — 1 : 2000; Д — experiment with *E. coli* (control). The particle sizes were determined by the histogram method (symbols 1, 3, 6) and, independently, by the cumulant method (2, 4, 5). For *E. coli* (7) the sizes, which were determined by the above methods, are practically identical. The initial points ( $t=0$ ) were recorded before the serum addition

Рис. 2. Предсказываемая зависимость доли клеток, выпадающих в преципитат (плотности бесконечного кластера)  $P^{(in)}$ , от относительной концентрации сыворотки  $x$ . Штриховая кривая — асимптотика (формула (2))

Fig. 2. The predicted fraction of precipitated bacterial cells  $P^{(in)}$  (the density of infinite cluster) as a function of the relative serum concentration  $x$ . The dotted curve is plotted in accordance with the asymptotical formula (2)

ной клетки с другими. При указанных предположениях  $x=2s/K$ , где  $s$  — количество молекул антител на одну клетку.

Рассматриваемая система очень близка к описываемой в задаче связей перколяционной модели [2, 3]. В последней ближайшие центры, расположенные на некоторой решетке, считаются объединенными в кластер, если их соединяет связь. Появление или непоявление связи является случайным, задается только доля установленных связей  $p$ . В данной работе удобно воспользоваться другим определением параметра перехода — средним числом связей на центр  $x$ . При  $x$ , превышающем критическое значение  $x_c$ , появляется бесконечный кластер.

Отличие настоящей модели агглютинации от задачи на решетке заключается в том, что связи случайно ориентированы по отношению друг к другу, а не направлены к узлам решетки. Однако данное отличие представляется несущественным по следующим соображениям. Критические индексы вообще зависят только от размерности пространства, но не от типа модели. Критическое значение (связей на центр)  $x_c$ , как известно, практически не зависит от типа решетки [4]. Для трехмерного пространства, по данным [2],  $x_c=1,49\pm 0,051$ . Такое же значение

ождается для рассматриваемой нерешеточной задачи. Дело в том, что в критической точке заполнение первой координационной сферы центра невелико:  $x_c \approx 1,5$  существенно меньше координационного числа  $C=12$  при плотной упаковке сфер. Поэтому маловероятно возникновение пространственных препятствий к образованию связей из-за их разупорядоченности по углам. Наиболее близка к данной модели задача перколяции на гранецентрированной кубической (ГЦК) решетке, имеющей также  $C=12$ .

Наконец отметим, что если бы помимо молекул белка образование больших агрегатов лимитировалось также количеством клеток, то пришлось бы рассматривать перколяционную задачу узлов-связей [5].

Рассмотрим следствия перколяционной модели равновесной агглютинации, в частности статический скейлинг. Последний выражается в степенных соотношениях между равновесными значениями величин, которые справедливы в некоторой, достаточно малой, окрестности  $x_c$ .

При концентрации сыворотки больше критической ( $x > x_c$ ) существуют агрегаты бесконечного размера (т. е. образуется преципитат). Средняя доля клеток, объединенных в такие агрегаты  $P^{(b)}$  (плотность бесконечного кластера по терминологии перколяционной модели), степенным образом зависит от превышения над порогом перколяции:

$$P^{(b)} \propto (x - x_c)^\beta, \quad x \geq x_c, \quad (1)$$

где критический индекс  $\beta = 0,41 \pm 0,02$  [2, 3]. Величина  $P^{(b)}$  играет роль параметра порядка фазового перехода. Для рассматриваемой реакции  $P^{(b)}$  является долей клеток, выпадающих в осадок-преципитат. Зависимость  $P^{(b)}(x)$  при немалых отклонениях от  $x_c$  может быть оценена по соответствующей функции [6], вычисленной для ГЦК решетки (рис. 2). При  $x > x_c$   $P^{(b)}$  изменяется сначала по закону (1), затем с ростом  $x$  быстро увеличивается, переходя на асимптотику:

$$P^{(b)} \approx 1 - (1 - x/C)^C. \quad (2)$$

Конечные агрегаты существуют при произвольных концентрациях сыворотки. Среднее число клеток в конечном агрегате  $\bar{N}$  и его средний размер  $R$  вблизи порога перколяции подчиняются соотношениям:

$$N \propto |x - x_c|^{-\nu}; \quad R \propto |x - x_c|^{-\nu}; \quad N \propto R^D, \quad (3)$$

где критические индексы  $\nu = 1,70 \pm 0,02$ ,  $\nu = 0,85 \pm 0,02$ . Важный критический индекс  $D = \nu/\nu$ , характеризующий геометрию агрегата, называется его фрактальной (хаусдорфовой) размерностью; ее величина в перколяционной теории  $D = 2,013 \pm 0,04$  (вычислено из данных моделирования по методу Монте-Карло [2, 3]).

Поведение функции корреляции флуктуаций плотности конечных агрегатов  $S(\vec{R})$  и ее фурье-образа  $S(\vec{Q})$  (статического форм-фактора) вблизи порога перколяции также задается фрактальной размерностью [7]:

$$S(\vec{R}) \propto |\vec{R}|^{D-3}; \quad S(\vec{Q}) \propto |\vec{Q}|^{-D}. \quad (4)$$

Форм-фактор  $S(\vec{Q})$  является важной характеристикой, поскольку определяет угловое распределение интенсивности света, рассеянного на суспензии агрегатов: интенсивность  $I(\vec{Q}) \propto S(\vec{Q})$ , где  $\vec{Q}$  — волновой вектор рассеяния [7].

**Динамический скейлинг.** Рассмотрим временную кинетику реакции агглютинации вдали от стационарного распределения агрегатов по размерам (например, на начальной стадии реакции). Для фрактальных агрегатов она имеет вид динамического скейлинга. Последний, в частности, выражается в степенных зависимостях средних величин от времени, причем показатели степени (индексы динамического скейлинга) не зависят от способа определения средних.

Предположим, что агрегация носит квазиравновесный характер и лимитируется диффузией. Тогда из комбинаторных соотношений и уравнения Смолуховского следует, что распределение  $W$  агрегатов по числу  $N$  входящих в них клеток и средний размер агрегата  $R$  зависят от времени  $t$  после начала реакции согласно [8]:

$$W(N, t) = N^{-2} g(Nt^{-z}); \quad R \propto t^{z/D}. \quad (5)$$

Здесь  $g$  — некоторая функция, индекс  $z = 1/(1 - 2\omega)$ , где  $\omega$  — степень однородности ядра Смолуховского. Для реалистического ядра [9]  $\omega = 0$ , и, следовательно,  $z = 1$ . Моделирование по методу Монте-Карло в рамках модели кластерной агрегации [10] дает близкое значение  $z = 1,1$ . Коэффициент диффузии  $D$  и  $R$  определяются одним и тем же критическим индексом [10]:  $D \propto R^{-1,0}$ , что обычно и предполагается при обработке эксперимента [9].

Теория предсказывает (формула (5)) распределение по размерам  $W(R^D, t)$ , ширина которого порядка среднего значения размера агрегата  $R$ . Данный вывод находится в качественном согласии с экспериментально измеренными [1] распределениями.

В теории диффузионно-контролируемой агрегации [8, 9] фрактальная размерность агрегатов  $D$  является свободным параметром. Вблизи порога агрегации  $D \approx 2,0$  определяется критическими индексами перколяционной модели (см. формулу (3)). Такая ситуация в работе [1] (см. рис. 1) имела место при концентрации сыворотки вблизи титра (разведение сыворотки 1 : 1000). Принимая  $z = 1,0$ , из формулы (5) и соответствующего значения  $\rho = 0,58 \pm 0,11$  получим  $D = z/\rho = 1,72 \pm 0,33$ . Данная величина в пределах точности не противоречит предсказываемому значению 2,0.

Наконец, рассмотрим агрегацию вдали от порога перколяции. В этом случае статический скейлинг перколяционной модели (формулы (1), (3), (4)), разумеется, неприменим. Критические индексы динамического скейлинга, в частности  $D$ , самосогласованно определяются процессом агрегации. В модели необратимой кластерной агрегации [10]  $D = 1,84 \pm 0,05$ ; учет возможности разрывов связей не изменяет  $D$  существенно [11].

Альтернативный [10] статистический подход [12], который является обобщением теории среднего поля Флори, учитывающий в свободной энергии энтропийный вклад и взаимное отталкивание частиц, дает выражение для фрактальной размерности (квази)равновесных агрегатов:

$$D = \frac{5}{2} \frac{D_0}{1 + D_0}, \quad (6)$$

где  $D_0$  — фрактальная размерность, которую имели бы агрегаты в отсутствие отталкивания, зависящая от их геометрии. Поскольку число точек связывания (антигенных детерминант) на поверхности клетки велико, то агрегаты должны иметь геометрию ветвящихся деревьев, для которой  $D_0$  лежит в интервале от 4 до  $\infty$  [12] ( $D_0 = 4$  для случая однократных ветвлений); соответствующие значения  $D$  (формула (6)) — от 2,0 до 2,5.

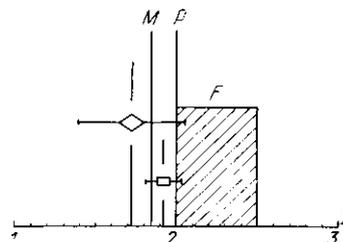
В случае относительно высокой концентрации сыворотки (разведение 1 : 100) экспериментальное значение  $\rho = 0,52 \pm 0,03$  приводит к величине  $D = 1,92 \pm 0,11$ . На рис. 3 показано данное значение  $D$  в сравнении с предсказаниями теоретических моделей. Видно, что оно не противоречит моделям кластерной агрегации, перколяции, а также теории Флори (для  $D_0 = 4$ , что соответствует геометрии однократно ветвящихся деревьев).

**Обсуждение.** В настоящей работе равновесные и кинетические свойства реакции агрегации рассмотрены с позиций физической теории фазовых переходов и масштабной инвариантности (статического и динамического скейлинга).

Кратко резюмируем и обсудим основные результаты. Предложена перколяционная модель (квази)равновесной агглютинации, предсказывающая критическое поведение реакции по концентрации сыворотки. Критическое значение последней соответствует разведению сыворотки, равному ее титру. При такой концентрации сыворотки количество молекул антител на клетку  $s_c = K(0,75 \pm 0,026)$ , где  $K$  — минимальное число молекул антител, формирующее устойчивую связь между клетками. Параметром порядка фазового перехода является плотность бесконечного кластера  $P^{(b)}$  — доля клеток, выпадающих в виде преципитата. При концентрации ниже критической  $P^{(b)} = 0$  и в суспензии присутствуют только агрегаты конечного размера. Критические индексы

Рис. 3. Экспериментальные значения  $D$  (квадрат — для разведения сыворотки 1:100, ромб — 1:1000); предсказанные значения  $D$ :  $M$  — модель кластерной агрегации;  $P$  — перколяционная модель;  $F$  — обобщенная теория Флори (формула (6)) для ветвящихся деревьев

Fig. 3. The experimental values of  $D$  (for the serum dilution 1:100 — square, 1:1000 — rhombus), and the predicted theoretical values of  $D$ :  $M$  — the model of cluster aggregation;  $P$  — the percolation model;  $F$  — the generalized Flory theory (6) for branching trees



перколяционной теории определяют поведение  $P^{(b)}$ , а также среднего размера конечного агрегата  $R$  и среднего числа клеток в нем  $\bar{N}$  как функций концентрации сыворотки.

Зависимость доли клеток, выпадающих в преципитат, а также среднего размера агрегата от концентрации сыворотки, предсказанные выше (см. формулы (1) — (3) и рис. 2), могут быть непосредственно проверены в эксперименте. Также непосредственной проверке поддается предсказанное угловое распределение рассеянного света (см. формулу (4)) при установленном значении  $D \approx 2,0$ .

Экспериментально наблюдаемое [1] степенное поведение среднего размера агрегата (за порогом перколяции в асимптотике больших времен) согласуется с динамическим скейлингом (см. формулу (5)). С ним же согласуется большая дисперсность (отсутствие характерного размера) экспериментально измеренных [1] распределений агрегатов по размерам. Найденная из индекса  $\rho$  динамического скейлинга фрактальная размерность агрегатов в пределах экспериментальной точности не отличается от значения  $D = 2,0$  (соответствующего прямым линиям в корневом масштабе рис. 1), но значительно отличается от размерности пространства 3. Таким образом, агрегаты, образующиеся при иммунологической агглютинации, оказываются фрактальными, т. е. с нетривиальной ( $D < 3$ ) хаусдорфовой размерностью, кластерами.

Таким образом, в данной работе установлена связь между теорией иммунологических реакций и областью критических явлений в физике.

Авторы благодарны А. И. Бурштейну и С. Г. Раутиану за полезные замечания.

#### CRITICAL (PERCOLATION) BEHAVIOUR AND FRACTAL DIMENSION OF AGGREGATES IN IMMUNOLOGICAL AGGLOUTINATION REACTION

V. A. Markel, M. I. Stokman

Institute of Automatics and Electrometry, Siberian Branch, Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk State University, Novosibirsk

#### Summary

Equilibrium and kinetic properties of the immunological agglutination reaction are theoretically considered. A percolation model of agglutination is suggested which predicts critical behaviour of the reaction in a serum concentration. The appearance of an infinite cluster of agglutinated particles (bacteria) is shown to be similar to the phase second-

order transition. The fraction of particles which are bound to the infinite cluster (precipitate) plays the role of the order parameter. The kinetics of an early stage of the agglutination reaction, previously studied, is in agreement with predictions of the dynamic scaling. It permits finding the fractal dimension of the bacterial clusters which has proved to be nontrivial, i. e. distinct from the dimension of the space. Magnitudes of the fractal dimension are compared to predictions of theoretical models.

1. *Кинетика иммунологической реакции агглютинации и экспрессное определение бактерий с помощью автоматизированного лазерного фотон-корреляционного спектрометра* / И. Г. Ерш, Л. С. Муратов, С. Ю. Новожилов и др. // Докл. АН СССР.— 1986.— 287, № 5.— С. 1239—1244.
2. *Шкловский Б. И., Эфрос А. Л.* Электронные свойства легированных полупроводников.— М.: Наука, 1979.— 416 с.
3. *Stanley H. A.* Cluster shapes at the percolation threshold: an effective cluster dimensionality and its connection with critical-point exponent // J. Phys. A: Math. and Gen.— 1977.— 10, N 11.— P. L211—L220.
4. *Эфрос А. Л.* Физика и геометрия беспорядка.— М.: Наука, 1982.— 176 с.
5. *Coniglio A., Stanley H. E., Klein W.* Solvent effects on polymer gels: a statistical-mechanical model // Phys. Rev. B— Solid State.— 1982.— 25, N 11.— P. 6805—6821.
6. *Frish H. L., Hamerley J. M., Welsh D. J. A.* Monte-Carlo estimates of percolation probabilities for various lattices // Phys. Rev.— 1962.— 126, N 3.— P. 949—951.
7. *Fractal geometry of colloidal aggregates* / D. W. Schaefer, J. E. Martin, P. Wiltzius, D. S. Cannel // Phys. Rev. Lett.— 1984.— 52, N 26.— P. 2371—2375.
8. *Botet R., Jullien R.* Size distribution of clusters in irreversible kinetic aggregation // J. Phys. A: Math. and Gen.— 1984.— 17, N 12.— P. 2517—2530.
9. *Feder J., Joessang T., Rosenqvist E.* Scaling behaviour and cluster fractal dimension determined by light scattering from aggregating proteins // Phys. Rev. Lett.— 1984.— 53, N 15.— P. 1403—1405.
10. *Meakin P., Chen Z.-Y., Deutch J. M.* The translational friction coefficient and time dependent cluster size distribution of three dimensional cluster-cluster aggregation // J. Chem. Phys.— 1985.— 82, N 8.— P. 3786—3789.
11. *Meakin P.* The effects of random bond breakings on diffusion limited cluster-cluster aggregation // Ibid.— 83, N 7.— P. 3645—3649.
12. *Isaacson J., Lubensky T. S.* Flory exponents for generalised polymer problems // J. Phys. Paris Lett.— 1980.— 41, N 3.— P. L469—L472.

Ин-т автоматизации и электротехники  
Сиб. отделения АН СССР, Новосибирск  
Новосиб. гос. ун-т

Получено 26.06.86

УДК 577.112

## ТРИПТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ КАТАЛАЗЫ ГРИБА *PENICILLIUM VITALE*. 2. РАЗДЕЛЕНИЕ И АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ НЕРАСТВОРИМЫХ ПЕПТИДОВ

**М. Т. Киряченко, Т. Л. Левитина,  
Л. В. Гудкова, Р. Г. Дегтярь, Э. А. Козлов**

В предыдущем сообщении описано выделение и приведены аминокислотные составы растворимых триптических пептидов каталазы *P. vitale* [1]. Из растворимой фракции триптического гидролизата каталазы было получено 54 пептида, насчитывающих 487 остатков аминокислот. Катализа *P. vitale* содержит около 650 аминокислотных остатков [2]. Нерастворимая фракция составила 60 % всего триптического гидролизата [1]. Можно было ожидать, что в ней содержатся, кроме недостающих пептидов с уникальной аминокислотной последовательностью, крупные фрагменты с перекрывающимися последовательностями.

Настоящее сообщение посвящено выделению пептидов из нерастворимой фракции триптического гидролизата каталазы *P. vitale*.