

Antigén-antitest reakciók modellezése és alkalmazás az ELISA immunkémiai vizsgálatban

Fedorszki Ádám
Témavezető: Pfeil Tamás

Az önálló projekt keretén belül a feladatom antigén-antitest reakciók modellezése és a megoldások numerikus vizsgálata, majd ezek alkalmazása az ELISA immunesszé különböző formáira.

A szervezet reagálása az idegen anyagok ellen az immunválasz, mely sejtes és kémiai részből áll, az utóbbiban vesznek részt az antitestek, melyek reverzibilis reakcióba lépnek az antigénnel, létrehozva az immunkomplexeket, más néven antigén-antitest komplexeket. Az immunkomplex koncentrációja asszociáció révén növekszik, disszociáció útján csökken, az előbbi másodrendű, az utóbbi elsőrendű kémiai reakció.

Az ELISA egy általánosan használt analitikai biokémiai vizsgálat. Különböző ELISA eljárásokat különböztetünk meg. A szilárd fázisúban egy antigént rögzítünk a reakciótartály aljára, utána az antigénre ráengednek egy oldatot, amely olyan antitesteket tartalmaz, amik megkötik a rögzített antigént. Az oldott fázisúnál a vizsgált oldathoz oldott antigént kevernek, majd megvárják az egyensúlyhoz közeli állapotot. A kompetitív ELISA két lépésből áll, az első az oldott fázis, a második a szilárd fázis az első fázis egyensúlyi oldatával, így az antigén nemcsak a felszínhez rögzítve, hanem korábban oldott állapotban is reagálhat az antitestekkel.

Az immunkomplex-képződés dinamikájának vizsgálata során feltételezzük, hogy egy antigén és egy antitest molekula alkot immunkomplexet (monovalens reagensek), a kinyomtatott antigénmolekulák egyrétegű felületet képeznek, az antigén molekulák irreverzibilis módon kötődnek a tartály falához, az oldatban szereplő, illetve a felszínhez kötött szabad antitestek, szabad antigének és immunkomplexek eloszlása minden időpillanatban homogén az oldatban, illetve az antigénfelszínen.

Ezen felvételek mellett a monoklonális (azonos kémiai szerkezetű antitesteket tartalmazó) oldat reakciója oldott antigénnel leírható differenciálegyenlettel:

$$\frac{d[AbAg]}{dt} = k_a[Ab][Ag] - k_d[AbAg],$$

ahol $[Ab]$ a szabad antitestek koncentrációja, $[Ag]$ a szabad antigének koncentrációja, $[AbAg]$ a komplexek koncentrációja az idő függvényében, k_a, k_d az $Ab + Ag \rightleftharpoons AbAg$ reakció asszociációs, illetve disszociációs reakciósebességi állandója, és érvényesek az anyagmegmaradási egyenletek: $[Ab]_T = [Ab] + [AbAg]$, $[Ag]_T = [Ag] + [AbAg]$.

Poliklonális esetben n fajta antitest molekulát vizsgálunk az oldatban, akkor a reakció során n fajta antigén-antitest komplex alakul ki. Így n egyenletből álló közönséges differenciálegyenlet-rendszerrel írjuk le a reakciót:

$$\left. \begin{aligned} \frac{d[Ab_1Ag]}{dt} &= k_{a_1}[Ab_1][Ag] - k_{d_1}[Ab_1Ag] \\ &\vdots \\ \frac{d[Ab_nAg]}{dt} &= k_{a_n}[Ab_n][Ag] - k_{d_n}[Ab_nAg] \end{aligned} \right\},$$

ahol $[Ab_i]$ az i . szabad antitest klónok koncentrációja, $[Ag]$ a szabad antigének koncentrációja, $[Ab_iAg]$ az i . típusú komplex koncentrációja az idő függvényében, k_{a_i} , k_{d_i} az $Ab_i + Ag \rightleftharpoons Ab_iAg$ reakció asszociációs, illetve disszociációs reakciósebességi állandója, az anyagmegmaradási egyenletek pedig: $[Ab_i]_T = [Ab_i] + [Ab_iAg]$, ahol $i = 1, \dots, n$ és $[Ag]_T = [Ag] + \sum_{i=1}^n [Ab_iAg]$.

Ezek alapján a differenciálegyenlet-rendszer:

$$\left. \begin{aligned} \frac{d[Ab_1Ag]}{dt} &= k_{a_1}([Ab_1]_T - [Ab_1Ag]) \left([Ag]_T - \sum_{i=1}^n [Ab_iAg] \right) - k_{d_1}[Ab_1Ag] \\ &\vdots \\ \frac{d[Ab_nAg]}{dt} &= k_{a_n}([Ab_n]_T - [Ab_nAg]) \left([Ag]_T - \sum_{i=1}^n [Ab_iAg] \right) - k_{d_n}[Ab_nAg] \end{aligned} \right\}.$$

A szilárd fázisú ELISA reakcióban a reakciótartály aljának kis részére van kinyomtatva ismert koncentrációban az antigén (antigén spot) úgy, hogy az antigén molekulák száma jó pár nagyságrenddel kisebb legyen az oldatbeli bármely antitest klón molekula számánál, és a tartályt monoklonális/poliklonális antitesteket tartalmazó oldat tölti ki. Ebben az esetben reális egyszerűsítő feltevés az, hogy minden antitest klón koncentrációja az időben állandó. Ekkor a reakciót n antitest klón esetén n egyenletből álló lineáris differenciálegyenlet-rendszerrel tudjuk leírni.

Fő feladatomban az előző részben leírt reakciók vizsgálata és a megoldások szimulálása. A munka során eddig közönséges differenciálegyenletes és differenciálegyenlet-rendszeres modelleket és Matlab szimulációkat alkalmaztam. A témával először a BSc-s szakdolgozatom keretein belül foglalkoztam, ahol a monoklonális oldat antigén-antitest reakciója során megvizsgáltuk a komplexek képződésének dinamikáját. Meghatároztuk a kompetitív ELISA első és második fázisának egyensúlyi helyzetét. Poliklonális oldat esetén a komplexek képződésének dinamikáját írtuk le. A leírtakat Matlab szoftvert használva numerikus szimulációk segítségével illusztráltuk. A dolgozatban az oldott antigén esetét nemlineáris közönséges differenciálegyenlettel írtuk le. Az önálló projekt keretein belül ezen munka folytatásaként az egyensúlyi pontot és annak stabilitását vizsgáltuk. A témavezetőmmel közösen igazoltuk, hogy egyetlen immunológilag értelmes egyensúlyi pont van és ez aszimptotikusan stabil. Érdekes és részben bizonyításra váró hasonlóságokat tapasztaltunk a szilárd fázisú reakció lineáris rendszere és az oldott fázisú reakció nemlineáris rendszere között, az észrevétel az, hogy a nemlineáris esetben az egyensúlyi pontbeli deriváltmátrix olyan, mint a lineáris rendszer mátrixa, továbbá mindkét esetben a komplexek aránya állandó, ha a disszociációs reakciósebességi állandók egyenlők.

Ezen modellhez egy 10 klónból álló reális szimulációt készítettünk. A modellben szereplő reakció asszociációs, illetve disszociációs reakciósebességi állandóit egy kísérletes cikk alapján választottuk és lognormális eloszlásúnak találtuk. Ezt az eredményt vártuk, mivel a reakciósebességi állandókat és a disszociációs egyensúlyi állandót egy korábbi kísérletes cikkben lognormálisnak igazolták.

Tervek a folytatásra: célunk Pfeil Tamás vezetésével egy cikk publikálása az oldott antigén-reakció modelljéről, monoklonális kompetíciós méréseredmények illesztése a szakdolgozatomban kapott monoklonális egyensúlyi pont képletéhez. Távlatos terveim között szerepel a diffúzió figyelembe vétele kompartmentmodellel poliklonális esetben, valamint a reakciót parciális differenciálegyenlettel leírni és vizsgálni.