

Міністерство освіти і науки України  
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

На правах рукопису

**БАРАННИК МАР'ЯНА ОЛЕКСАНДРІВНА**

УДК 577.352.5: 576.524

**ВПЛИВ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ЧИННИКІВ СЕРЕДОВИЩА НА  
МІЖКЛІТИННУ АДГЕЗІЮ ЛАКТОБАКТЕРІЙ *STREPTOCOCCUS*  
*THERMOPHILUS* ТА ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ**

03.00.02 – біофізика

**Дисертація на здобуття наукового ступеня**

кандидата фізико-математичних наук

**Науковий керівник:**

Гордієнко Євген Олександрович, докт. біол. наук, професор член-кор. НАН України
---

**Харків – 2016**

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	4
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. МЕХАНІЗМИ КЛІТИННОЇ АДГЕЗІЇ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	13
1.1. Фізичні механізми адгезії.	13
1.1.1. Ван-дер-ваальсові взаємодії	13
1.1.2. Електростатичні сили	19
1.1.3. ТЕОРІЯ ДЛФО: спільна дія сил Ван-дер-Ваальса та подвійного електричного шару	22
1.1.4. Структурні сили	23
1.2. Молекулярні механізми та молекули клітинної адгезії, види адгезії на молекулярному рівні.	28
1.3. Бактеріофіксуюча здатність еритроцитів.	36
1.4. Адгезивна спроможність мікроорганізмів бактеріальної природи ( <i>Streptococcus thermophilus</i> ).	38
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	42
2.1. Матеріали	42
2.2. Методи дослідження	43
2.2.1. Визначення впливу рН середовища на адгезію мікроорганізмів <i>Streptococcus thermophilus</i> на еритроцитах людини	43
2.2.2. Визначення впливу одно- та двовалентних катіонів на адгезію <i>Streptococcus thermophilus</i> на еритроцитах людини	45
2.2.3. Визначення поверхневого заряду еритроцитів та лактобактерій	46
2.2.4. Визначення впливу режимів кріоконсервування еритроцитів на адгезію до них лактобактерій	48
2.2.5. Теоретичні розрахунки та статистична обробка результатів	49
РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК СЕРЕДОВИЩА НА АДГЕЗІЮ <i>S.THERMOPHILUS</i> НА ЕРИТРОЦИТАХ	50

## ЛЮДИНИ

3.1. Вплив рН на адгезію мікроорганізмів *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини. 51

3.2. Вплив іонної сили середовища на адгезію *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини. 57

3.3. Вплив двовалентних катіонів  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Mg}^{2+}$  на адгезію *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини. 63

## РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК СЕРЕДОВИЩА НА ПОВЕРХНЕВИЙ ЗАРЯД ЕРИТРОЦИТІВ І ЛАКТОБАКТЕРІЙ *S.THERMOPHILUS* ТА ЇХ АДГЕЗІЙНУ ВЗАЄМОДІЮ

4.1. Вплив рН та іонної сили середовища на поверхневий заряд еритроцитів та лактобактерій *S.thermophilus* 68

4.2. Вплив двовалентних катіонів  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Mg}^{2+}$  на поверхневий заряд еритроцитів і лактобактерій *S.thermophilus* 70

4.3. Роль електростатичних взаємодій у адгезії *S.thermophilus* на еритроцитах людини в середовищах з різною концентрацією 1:1 і 2:1 електролітів 78

4.3.1. Роль електростатичних взаємодій у адгезії *S.thermophilus* на еритроцитах людини в середовищах з різною концентрацією 1:1 електроліту 78

4.3.2. Роль електростатичних взаємодій у адгезії *S.thermophilus* на еритроцитах людини в середовищах з різною концентрацією 2:1 електроліту 88

## РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ РЕЖИМІВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ЕРИТОЦИТІВ ЛЮДИНИ НА АДГЕЗІЮ НА НИХ ЛАКТОБАКТЕРІЙ *S.THERMOPHILUS*

ВИСНОВКИ 110

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 113

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

Позначення	Найменування величини
$R$	Відстань між атомами, м
$W$	Енергія ван-дер-ваальсових взаємодій, Дж/моль
$A$	Константа Гамакера, Дж
$D$	Відстань між поверхнями, м
$C$	Параметр дисперсійних сил Лондона, Дж·м <sup>6</sup>
$l/\kappa$	довжина Дебая, м
$A_{v=0}$	Статичний член константи Гамакера, Дж/К
$\gamma$	Поверхнева енергія, Дж/м <sup>2</sup>
$\delta$	Діаметр молекули, м
$\varepsilon$	Діелектрична проникність середовища
EDL	Подвійний електричний шар
$k$	Постійна Больцмана, Дж/К
$T$	Абсолютна температура, К
$\varphi_0$	Поверхневий електростатичний потенціал, мВ
$e$	Елементарний електричний заряд, Ф/м
$z$	Валентність атомів
AC	Барвник альціановий синій
ПЕО-1500	Поліетиленоксид 1500
$h$	Товщина прошарку, Å
$K$	Показник адгезії
$r$	Коефіцієнт кореляції

$I$	Іонна сила, Моль/л
$SLP$	Білок поверхневого шару
$E$	Напруга електричного поля, В/м
$\rho_i$	Концентрація протиіонів у будь-якій точці між поверхнями, М
$\rho_0$	Густина протиіонів на поверхні, М
$\rho_\infty$	Густина протиіонів в об'ємному розчині, М
$[Na^+]_\infty$ , $[Ca^{2+}]_\infty$ , $[Cl^-]_\infty$	Концентрація певного типу іонів $i$ в об'ємі розчину, М
$[Na^+]_0$ , $[Ca^{2+}]_0$ , $[Cl^-]_0$	Концентрація певного типу іонів на поверхні еритроцитів, М
$[Re^{2-}]_0$	Концентрація або поверхнева густина не зв'язаних з $Ca^{2+}$ рецепторів на поверхні, М
$\sigma$	Поверхнева густина заряду, Кл/м <sup>2</sup>
$D_{AB}$	Відстань зіткнення (відстань дальнього потенціального мінімуму) клітини, нм
$R_{1,2}$	Радіуси сфер(клітин), нм
$F$	Сила електростатичного відштовхування, Н
$P$	Імовірність встановлення адгезійного зв'язку, відносні одиниці
$b$	Частина рецепторів, що відповідають за адгезію з лактобактеріями, відносні одиниці
$N$	Вихідна поверхнева густина рецепторів
$\alpha$	Частина не зв'язаних з $Ca^{2+}$ рецепторів, відносні одиниці
$DMCO$	Диметилсульфоксид

## ВСТУП

### **Актуальність теми.**

Адгезія між клітинами різного походження відіграє важливу роль у нормальному функціонуванні організму та має велике значення під час розвитку онкологічних та інфекційних захворювань. Мікробна адгезія до поверхонь людських тканин - важливий крок у інфекційному патогенезі [1-3]. У зв'язку з ідентичністю глікофорина еритроцитів і глікокалікса епітеліоцитів еритроцити широко використовуються при дослідженні адгезивних властивостей бактерій [4-6]. Проте даних про роль бактеріофіксуючої активності еритроцитів, яка значною мірою визначає розвиток імунної відповіді та інфекційних процесів, наразі майже немає.

Процес бактеріальної адгезії зазвичай обговорюється в термінах моделі двоступеневої сорбції, у якій бактерії на першому кроці швидко прикріплюються до поверхні слабкими фізичними взаємодіями, здійснюючи в основному оборотне прикріплення, тоді як на другому кроці відбувається необоротний молекулярний та клітинний адгезійний процес, в результаті якого формуються стійкі агрегати [7,8]. Вважається, що перша стадія прикріплення є дуже важливою і впливає на кінцевий результат. Початкова, миттєва фаза мікробної адгезії опосередкована взаємодіями з характеристиками далекої дії. Перша стадія адгезії зазвичай розглядається в рамках розширеної теорії Дерягіна-Ландау-Фервея-Овербека (ДЛФО) [9-13]. Теорія ДЛФО розглядає взаємодію поверхонь, зокрема часток в суспензії, з урахуванням балансу діючих сил (Ван-дер-Ваальсових та електростатичних) між ними.

Великий вплив на адгезивні процеси має склад середовища та його фізичні характеристики. Оскільки клітини еритроцитів та лактобактерій несуть сумарний негативний електричний заряд, вони мають тенденцію відштовхуватись одна від одної електростатичними силами. В залежності від

концентрації електроліту і густини поверхневого заряду енергія взаємодії може мати різну залежність від відстані між поверхнями. Сили відштовхування подвійного електричного шару, на відміну від сил Ван-дер-Ваальса, є більш чутливими до типу і концентрації електроліту, рН і поверхневої густини заряду (або поверхневого потенціалу). Наявність двовалентних катіонів викликає кардинальні зміни поверхневого потенціалу і розподілу протіонів біля негативно зарядженої поверхні. При високих концентраціях двовалентні іони вступають у зв'язки з негативно зарядженими групами на поверхні мембрани, тим самим знижуючи густину поверхневого заряду клітини і зменшуючи поверхневий потенціал [14-16]. У зв'язку з цим особливої актуальності набуває проблема вивчення впливу чинників середовища на міжклітинну взаємодію.

В ситуації, яка склалася наразі, є актуальним накопичення кількісних даних щодо залежності адгезійної здатності клітин від фізико-хімічних властивостей поверхні клітинної мембрани, поверхні контактуючої з нею підкладки або іншої клітинної поверхні, а також фізико-хімічних параметрів позаклітинного середовища. Такі дані разом з теоретичним моделюванням процесу адгезії клітини сприятимуть з'ясуванню основних закономірностей і уточненню механізму цього явища, а також є корисними для практичного застосування в біофізиці, біоінженерії та медицині.

Механізми адгезії бактерій на поверхні еритроцитів мало вивчені, що викликає необхідність більш детального дослідження впливу параметрів оточуючого середовища на бактеріофіксуючу активність еритроцитів.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційну роботу виконано на кафедрі молекулярної та медичної біофізики Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна у відповідності з планом науково-дослідних робіт кафедри за темами: «Дослідження взаємодії наночастинок і біологічно активних речовин з біооб'єктами в умовах дії пошкоджуючих факторів», номер держреєстрації

0111U002464, 2011-2012 рр.; «Структурні перебудови біомакромолекул і клітин при взаємодії з наночастинками і біологічно активними речовинами», номер держреєстрації 0112U006963, 2013-2014 рр.

### **Мета і задачі дослідження.**

Мета дисертаційної роботи полягала в з'ясуванні залежності міжклітинної взаємодії еритроцитів та лактобактерій *S. thermophilus* від складу, фізико-хімічних характеристик середовища і поверхневого заряду клітин.

Для досягнення даної мети було поставлено та вирішено наступні задачі:

1. Експериментально дослідити вплив рН, іонної сили середовища та вмісту двовалентних катіонів ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ) на адгезію лактобактерій *S. thermophilus* на еритроцитах людини;
2. Експериментально дослідити залежність поверхневого заряду еритроцитів та лактобактерій *S. thermophilus* від рН та іонної сили середовища;
3. Експериментально дослідити вплив двовалентних катіонів на поверхневий заряд еритроцитів людини та лактобактерій *S. thermophilus*;
4. Теоретично розрахувати концентрації протиіонів біля поверхні еритроцитів, поверхневий потенціал еритроцитів у досліджуваних експериментальних розчинах та оцінити імовірність установадження адгезійного зв'язку між *S. thermophilus* та еритроцитами людини;
5. З'ясувати роль електростатичної складової у міжклітинній взаємодії на першому та другому етапах адгезії;
6. Дослідити вплив режимів кріоконсервування еритроцитів на їх поверхневий заряд та адгезію на них лактобактерій *S. thermophilus*.

Об'єкт дослідження – процес адгезійної взаємодії еритроцитів людини та лактобактерій *S. thermophilus*.

*Предмет дослідження* – вплив параметрів середовища та поверхневих властивостей клітин на міжклітинну адгезію лактобактерій *S.thermophilus* на еритроцитах людини.

*Методи дослідження* – світлова мікроскопія; спектрофотометрія. Теоретичні розрахунки поверхневого потенціалу еритроцитів та концентрацій катіонів біля клітинної поверхні проведені за рівнянням Пуасона-Больцмана та рівнянням Грема. Силу електростатичної взаємодії між клітинними поверхнями оцінювали у наближенні Дерягіна за малих потенціалів.

### **Наукова новизна отриманих результатів.**

1. На підставі запропонованої методики для вивчення міжклітинної адгезії вперше досліджено вплив чинників середовища (рН, іонна сила) на адгезію лактобактерій *S. thermophilus* на еритроцитах людини. Показано, що названі чинники впливають на фізичні взаємодії на першому, оборотному етапі адгезійного процесу, не змінюючи поверхневий заряд клітин.
2. Вперше показано, що незважаючи на схожий пригнічуючий вплив катіонів  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Mg}^{2+}$  на адгезію лактобактерій *S.thermophilus* на еритроцитах людини, причини такого впливу різняться: якщо катіони  $\text{Ca}^{2+}$  змінюють поверхневий заряд еритроцитів та не впливають на поверхневий заряд лактобактерій *S. thermophilus*, то іони  $\text{Mg}^{2+}$ , навпаки, змінюють поверхневий заряд лактобактерій та не змінюють його у еритроцитів.
3. На основі використаної математичної моделі вперше розраховано імовірність адгезії лактобактерій на еритроцитах людини в залежності від концентрації  $\text{CaCl}_2$  у середовищі.
4. Двовалентні катіони впливають на другий етап адгезійного процесу, що підтверджено отриманими експериментальними даними щодо впливу двовалентних катіонів на поверхневий заряд, міжклітинну

адгезію еритроцитів і *S. thermophilus* та результатами оцінки імовірності устанавлення адгезійного зв'язку за проведеними теоретичними розрахунками поверхневого потенціалу і дебаївського радіусу.

5. Вперше досліджено вплив різних методів заморожування на поверхневий заряд еритроцитів та пов'язану з ним здатність адгезувати бактеріальні клітини.

### **Практичне значення отриманих результатів.**

Результати роботи створюють підґрунтя для більш глибокого розуміння фізичних механізмів міжклітинної адгезійної взаємодії. Запропоновано доступну методику для вивчення міжклітинної адгезії та показано можливість її використання для вивчення адгезії бактерій на клітинах людини. Дана методика значно полегшує проведення досліджень закономірностей адгезійного процесу та впливу на нього фізичних чинників. За результатами досліджень запропоновано новий метод оцінки збереження поверхневих характеристик кріоконсервованих клітин за здатністю до адгезійної взаємодії. Запропонований в роботі алгоритм оцінки імовірності міжклітинної адгезійної взаємодії між еритроцитами та лактобактеріями *S. thermophilus* за розрахованими фізичними параметрами середовища та клітин (дебаївський радіус, поверхневий потенціал клітин, концентрації іонів біля клітинної поверхні) може бути застосований для дослідження адгезійних процесів між іншими видами клітин та між клітинами і поверхнями.

### **Особистий внесок здобувача.**

В опублікованих зі співавторами наукових працях особистий внесок здобувача полягає: у роботах [22,24,25,30] – участь в отриманні та інтерпретації експериментальних даних, обговорення результатів; [23,26,27] – проведення експериментів, інтерпретація експериментальних даних, написання статей; в роботах [28,29,33-40,44,45] – участь в отриманні та

інтерпретації даних, проведенні розрахунків, написанні статей та тез; у роботах [31,32,41-43] – отримання та інтерпретація експериментальних даних, написання тез.

### **Апробація результатів дисертації.**

Основні результати досліджень, що увійшли до дисертаційної роботи, були представлені та обговорені на 3rd Congress of Croatian Physiological Society and 1<sup>st</sup> Regional Congress of the Physiological Societies (Rijeka, 2013); 13th Kharkiv young scientists conference on radiophysics, electronics, photonics and biophysics (Kharkiv, 2013); VIII Міжнародній конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2013); IV International Scientific-Practical Conference «Scientific Youth: Priorities of the World Science» (Luhansk, 2014); III Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології» (Донецьк, 2014); Міжнародній конференції «Теоретические и практические аспекты современной криобиологии» (Сыктывкар, 2014); X Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ в біології» (Львів, 2014); науково-технічній конференції «Фізика, електроніка, електротехніка – 2014» (Суми, 2014); V International Conference for Young Scientists «Low Temperature Physics» (Kharkiv, 2014); Всеукраїнській науково-практичній конференції «Сучасні проблеми викладання та наукових досліджень біології у ВНЗ» (Дніпропетровськ, 2014); 14th Kharkiv young scientists conference on radiophysics, electronics, photonics and biophysics (Kharkiv, 2014); IX Міжнародній конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2014); XXII Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Актуальні питання створення нових лікарських засобів» (Харків, 2015); VI International Conference for Young Scientists «Low Temperature Physics» (Kharkiv, 2015), III Міжнародній

науково-практичній конференції «Актуальні питання сучасної науки» (Львів, 2015).

### **Публікації.**

За результатами дисертаційної роботи опубліковано 23 наукові праці, зокрема 7 статей у наукових фахових виданнях (з них 3 – в іноземних виданнях з імпакт-фактором) та 16 тез доповідей на національних і міжнародних наукових конференціях.

### **Структура та обсяг дисертації дисертації.**

Дисертація складається зі вступу, 5 розділів, висновків і списку використаної літератури. Повний обсяг роботи складає 136 сторінок. Дисертація містить 12 рисунків, 8 таблиць. Список використаної літератури (211 найменувань) займає 24 сторінки.

## РОЗДІЛ 1. МЕХАНІЗМИ КЛІТИННОЇ АДГЕЗІЇ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

### 1.1. Фізичні механізми адгезії

Перша стадія клітинної адгезії здійснюється за допомогою фізичних чинників, які утримують бактерії на поверхні клітини-господаря. У ній беруть участь сили Ван-дер-Ваальса, електростатичні, структурні, гідрофобні сили, а також водневі зв'язки [46-48]. Але найбільший внесок на першій стадії клітинної адгезії мають перші три з зазначених вище сил.

Часто міжвидове зв'язування клітин опосередковується взаємодією з лектином або лектиноподібним вуглеводом [49]. Фундаментальними силами у лектин-вуглеводних взаємодіях є сили Ван-дер-Ваальса, електростатичні взаємодії і водневі зв'язки [50].

#### 1.1.1. Ван-дер-ваальсові взаємодії

При взаємодії молекул одна з одною деякі явища свідчать про наявність далекодіючих сил притягіння, і агрегації частинок у швидко коагулюючих колоїдних розчинах вказують на те, що за деяких умов існують сили притягіння, що переважають для всіх частинок на відстанях від більш ніж 10 нм і аж до міжатомних (0,2 нм). У 1927 році Уонг вперше розглянув квантово-механічне притягіння, що виникає між двома атомами водню на великих відстанях, і показав, що воно пропорційно  $1/R^6$ , де  $R$  - відстань між атомами [51]. Сили, які здійснюють притягіння, отримали назву дисперсійних. Загальна теорія дисперсійних сил була побудована в 1930 р. в основоположних роботах Лондона [52,53]. Ця теорія вирішила проблему походження притягіння між атомами благородних газів [54]. У 1932 Лондон

надав квантово-механічне пояснення неполярних слабких сил, що діють між всіма молекулами і відповідають принаймні за відхилення від законів ідеального газу [51].

Робота Онзагера [55] дозволила зрозуміти механізм впливу полярного оточення на молекулу в розчині. Нарешті, у 1955 р., Ліфшицем [56] була створена загальна теорія сил притягіння між макроскопічними тілами. Описані сили притягіння, що діють між нейтральними атомами і молекулами на великих відстанях, стали називати надалі ван-дер-ваальсовими силами. Це пов'язано не з конкретними дослідженнями Ван-дер-Ваальса природи міжмолекулярних сил, а з його відомим рівнянням стану (1873), що враховує відхилення реального газу від ідеального [54]. Ці унікальні сили притягіння пояснюються згідно першого наближення теорії, як сили другого порядку між нейтральними атомами. Ці сили виникають внаслідок взаємної поляризації одного атома флуктуаціями розподілу заряду у іншому атомі. Теорія показує, що ці сили можуть бути прийняті в якості додаткового наближення, виключно адитивного, тобто кожен атом притягує до себе всі інші атоми, і також притягується ними. Отже передбачається, що ці сили діють незалежно від присутності інших атомів, і, виходячи з того, не залежать від середовища, через яке вони передаються. Завдяки цьому додатку характер цих сил тяжіння між двома колоїдними частинками, що містять мільйони атомів, може бути помітним, хоча сила тяжіння між двома атомами достатньо слабка.

Згідно теорії, сила взаємодії між двома атомами зменшується пропорційно сьомому ступеню відстані між ними, і тому має досить короткий діапазон. Внаслідок взаємодії всіх атомів однієї частинки, сила тяжіння між двома частками зменшується набагато повільніше з відстанню частинки. Сили тяжіння далекого діапазону, які при сприятливих умовах можуть перевищувати ефект відштовхуючих сил, можливо пояснити на основі сил Ван-дер-Ваальса – Лондона [9,51].

Сили Ван-дер-Ваальса включають в себе три сили різного походження [57], кожна з яких надає свій особистий внесок у взаємодію. Перший внесок роблять електростатичні взаємодії між зарядами (у молекулярних іонів), диполів (для полярних молекул), квадруполів (всі молекули з симетрією нижче кубічної), і постійні мультиполя. Вони також називаються сили Кеезома або орієнтаційні, названі на честь Віллема Хендріка Кеезома [58]. Часто ці сили виникають між двома молекулами з постійними диполями, тобто вони походять з притягіння між постійними диполями і залежать від температури. Такі молекули називають полярними, наприклад, вода, яка має дипольний момент 1,85 Дебая ( $1D = 3,336 \times 10^{-30}$  Кл/м). Ці постійні диполі виникають, коли два атоми в молекулі мають істотно різні електронегативності. Таким чином, сили Кеезома залежать від електронегативності атому [59].

Другий внесок робить індукція (також відома як поляризація) або сила Дебая [60], обумовлена взаємодіями між обертанням постійних диполів і поляризацією атомів і молекул (індукованих диполів). Ці індуковані диполі виникають, коли одна молекула з постійним диполем відштовхує електрони іншої молекули. Молекула з постійним диполем може індукувати диполь у аналогічній сусідній молекулі і викликати взаємне притягіння. Сили Дебая не можуть виникати між атомами. Сили, що діють між індукованими і постійними диполями, не так сильно залежать від температури, як взаємодії Кеезома, тому що індукований диполь може вільно переміщатися і обертатися навколо неполярної молекули. Індукційні ефекти Дебая і орієнтаційні ефекти Кеезома називають полярними взаємодіями.

Третій і основний внесок роблять дисперсійні сили, або сили Лондона (флуктуаційний диполь - індукований диполь) [61], завдяки ненульовим миттєвим дипольним моментам всіх атомів і молекул. Така поляризація може бути викликана або полярною молекулою або відштовхуванням негативно заряджених електронних хмар у неполярних молекулах. Таким чином, взаємодії Лондона викликаються випадковими флуктуаціями електронної

густини в електронній хмарі. Дисперсійна (лондонська) сила є найбільш важливим компонентом, оскільки всі матеріали мають здатність до поляризації, тоді як сили Кеезома та Дебая мають потребу у постійних диполях. Лондонська взаємодія є універсальною, і вона присутня в атом-атомних взаємодіях. З різних причин, лондонські взаємодії (дисперсійні) були розглянуті відносно до взаємодій між макроскопічними тілами в конденсованих системах [62].

Через кілька років після робіт Лондона, була сформована думка, що повну картину дії сил між колоїдними частками можливо отримати на підставі взаємодії подвійного шару, поєднаної зі взаємодією Ван-дер-Ваальса – Лондона. Ця проблема, і, зокрема, проблема взаємодії двох часток, були ретельно досліджені Гамакером [9]. Гамакер розробив теорію Ван-дер-Ваальса між макроскопічними тілами в 1937 році і показав, що адитивність цих взаємодій робить їх значно більш далекодіючими [62].

Гамакер показав, що криві повного потенціалу, отримані накладенням простого потенціалу притягіння і потенціалу відштовхування, пояснюють різні аспекти колоїдних хімічних явищ [9]. Він також надав кількісні розрахунки для взаємодії Ван-дер-Ваальса – Лондона між двома сферичними частками, між двома паралельними пластинками, тощо. Також він досліджував потенціал Ван-дер-Ваальса – Лондона двох таких частинок, занурених в середовище, і показав, що результатом є притягіння обох часток, що складаються з однакового матеріалу.

Незалежно від цих авторів, проблему колоїдних часток досліджували Бергманн, Зохер, Дерягін та ін. [51].

Для двох пласких поверхонь енергія ван-дер-ваальсових взаємодій дорівнює [63]:

$$W(D) = -A/12\pi D^2 \quad \text{на одиницю площі поверхні,} \quad (1.1)$$

де  $A$  - константа Гамакера (без урахування запізнювання, тобто дисперсійних взаємодій між сильно віддаленими молекулами),

$D$  – відстань між поверхнями.

У свою чергу, константа Гамакера дорівнює [64]:

$$A = \pi^2 C \rho_1 \rho_2, \quad (1.2)$$

де  $\rho_1, \rho_2$  - густини взаємодіючих речовин,

$C$  – параметр дисперсійних сил Лондона.

Ван-дер-ваальсові сили, що діють між амфіфільними структурами, найчастіше невеликі з наступних трьох причин. По-перше, константа Гамакера двох вуглеводневих фаз, взаємодіючих через прошарок води, відносно мала і знаходиться в інтервалі  $(4 \div 7) \times 10^{-21}$  Дж. Можна очікувати, що у біологічних мембран ця величина буде більшою за наявності в їх структурі білків, показник заломлення яких в середньому вище, ніж у вуглеводневого ядра -  $1,55 \div 1,60$  проти  $1,42 \div 1,48$ . По-друге, рівняння (1.1) можна застосувати до бішару або мембран, якщо тільки відстань між ними менша ніж 3 нм. Якщо вона більша, то константа Гамакера перестає бути постійною і неухильно зменшується зі збільшенням  $D$  внаслідок ефекту запізнювання, а також того, що товщина бішару є кінцевою; тому, якщо відстань між бішарами дорівнює 10 нм, то реальна сила взаємодії між ними в два рази менша, ніж розрахована за рівнянням (1.1) (в якому не враховується запізнювання). По-третє, якщо в розчині є електроліт, то константа  $A$  зменшується додатково внаслідок екранування зарядів, відповідно, падає внесок статичного члена  $A_{v=0}$  в константу Гамакера, що відповідає за індукційну і орієнтаційну взаємодії [65]:

$$A_{v=0}(D) = A_{v=0}(0) 2\kappa D e^{-2\kappa D}, \quad \text{при } \kappa D \geq 1 \quad (1.3)$$

де  $l/\kappa$  - це довжина Дебая, і де для вуглеводневих фаз, взаємодіючих через прошарок води,  $A_{v=0} = 3 \times 10^{-21}$  Дж. Рівняння (1.2) виконується з точністю до 15 % при  $\kappa D > 2$ . Так, наприклад, в розчині NaCl з концентрацією 0,15 М, де  $\kappa^{-1} = 0,8$  нм, внесок статичного члена, який обумовлює приблизно половину величини незапізнюючої взаємодії, практично зникає вже при  $D = 1,5$  нм.

Внесок сил Ван-дер-Ваальса в енергію границі розділу двох плоских поверхонь дорівнює

$$\gamma = \frac{\sqrt{3}A}{2\pi^2\delta^2} \approx \frac{A}{24\pi(\delta/2.5)^2} = \frac{0.1A}{\delta^2} \quad (1.4)$$

Марра [66], експериментально вивчив закон ван -дер - ваальсових сил між двома бішарами, що складаються з незарядженого гліколіпіда моногалактозил дігліцериду (полярна група - вуглеводний залишок). Показано, що в дистильованій воді на відстанях від  $D = 4$  нм до потенційної ями при  $D = 1$  нм між ними діє сила притягіння. Отримана залежність сили від відстані і енергія адгезії відповідали ван-дер-ваальсовому типу взаємодій з константою Гамакера (без урахування запізнювання)  $A = 7 \times 10^{-21}$  Дж. Проте в розчині NaCl з концентрацією 0,15 М (фізіологічні концентрації) в тому ж інтервалі відстаней константа Гамакера була в два рази меншою, як і можна було очікувати внаслідок екранування статичного внеску  $A_{v=0}$  [63].

Для непровідних (неметалевих) твердих тіл і рідких речовин, що взаємодіють у вакуумі або повітрі ( $\epsilon_3 = n_3 = 1$ ) константа Гамакера зазвичай знаходиться в діапазоні  $(5-10) \times 10^{-20}$  Дж, в той час як для взаємодії в рідкому середовищі, такому як вода, константа Гамакера, як правило, на один порядок менша, в діапазоні  $A = (0,5 \div 1,5) \times 10^{-20}$  Дж. Наприклад,  $\sim 0,8 \times 10^{-20}$  Дж використовується для ліпідних бішарів [64], і оцінюється як  $\sim (1,0 \div 1,5) \times 10^{-20}$  Дж для білків, взаємодіючих у воді або сольових розчинах, та є трохи нижчою у високих концентраціях солі [66].

З наведених даних можна відзначити, що ван-дер-ваальсови сили, що діють між бішарами і мембранами, доволі слабкі, особливо в присутності солі, а радіус їх дії не перевищує 15 нм, за межами якого ними взагалі можна знехтувати [63].

### **1.1.2. Електростатичні сили**

Лише після того, як була відкрита електронна структура атомів і молекул, а в 1920 - х рр. побудована квантова теорія, з'явилася можливість зрозуміти природу міжмолекулярних сил і вивести рівняння для потенціалів взаємодії. Виявилося, що всі міжмолекулярні сили, по суті, мають електростатичну природу. Це випливає з теореми Гельмана – Фейнмана, яка стверджує, що якщо просторовий розподіл електронної густини відомий (з рішення рівняння Шредінгера), то міжмолекулярні сили можна розрахувати, виходячи з тривіальної класичної електростатики. Дана теорема сильно спростила розуміння природи міжмолекулярних взаємодій [67].

Більшість поверхонь, занурених у розчин електроліту, мають поверхневий заряд внаслідок різноманітних механізмів. Заряджені поверхні призводять до появи градієнту концентрації в електроліті, що називається подвійним електричним шаром (EDL). Коли поверхні наближаються одна до одної, ця взаємодія з'являється завдяки перекриванню їх відповідних подвійних електричних шарів [63]. EDL взаємодія відіграє важливу роль у багатьох процесах колоїдних систем, наприклад у коагуляції [68]. Також, добре відомо, що EDL-заємодія відіграє важливу роль у багатьох біологічних процесах за рахунок її далекодіючого характеру, фізіологічного середовища, що містить невелику концентрацію іонів, а також сталого заряду молекул, таких як аміно- і нуклеїнові кислоти. Прикладами таких процесів є клітинна адгезія, стабільність структури білка і ДНК конденсації, а також білок-мембрана, білок-білок, і білок-ДНК взаємодії [69-75].

На поверхні, що знаходиться в рідині, електричний заряд може виникнути внаслідок двох причин. По-перше, заряд виникає шляхом іонізації або дисоціації поверхневих груп, наприклад дисоціації протонів в поверхневих карбоксильних групах (  $-COOH \rightarrow -COO^- + H^+$  ) з утворенням негативно заряджених поверхонь. По-друге, шляхом адсорбції (зв'язування) іонів з розчину на незарядженій поверхні, наприклад, зв'язування іонів  $Ca^{2+}$  з цвіттеріонними голівками (полярними групами) на поверхні ліпідних бішарів з утворенням позитивно заряджених поверхонь. Залежно від іонної атмосфери за таким механізмом можуть заряджатися навіть міжфазні границі вода – повітря і вода – вуглеводень. Природно, що адсорбція іонів з розчину може відбуватися тільки на протилежно заряджених поверхневих групах, наприклад, адсорбція катіонів  $Ca^{2+}$  на аніонних групах  $COO^-$ , що виникли при дисоціації іонів  $H^+$  або  $Na^+$ . Це явище називається іонним обміном. Незалежно від механізму виникнення заряду, поверхневий заряд, що утворився, завжди скомпенсований рівним за величиною зарядом протиіонів, одна частина яких пов'язана, як правило, зворотно з поверхнею і утворює шар Штерна або шар Гельмгольца, а інша знаходиться у швидкому тепловому русі поблизу поверхні і утворює дифузний подвійний електричний шар [9,63].

Сили відштовхування подвійного електричного шару, на відміну від ван-дер-ваальсового притягіння, є значно більш чутливими до типу і концентрації електроліту, рН та поверхневої густини заряду (або поверхневого потенціалу). Енергія взаємодії об'єктів, обумовленої наявністю у них подвійного електричного шару, приблизно виражається рівнянням [63]:

$$W = \frac{64kT\rho_{\infty}\gamma^2}{\kappa} e^{-\kappa D}, \quad (1.5)$$

$$\text{де } \gamma = th\left(\frac{ze\varphi_0}{4kT}\right), \quad (1.6)$$

$k$  - постійна Больцмана,  $T$  – температура,  $\rho_{\infty}$  – числова густина іонів у площині симетрії (посередині відстані між поверхнями),  $1/\kappa$ - довжина Дебая,  $D$  – відстань між поверхнями,  $\varphi_0$  – поверхневий електростатичний потенціал,  $e$  – елементарний електричний заряд.

Обидва типи взаємодій (сили ван-дер-ваальсового притягіння і сили відштовхування подвійного електричного шару), в яких беруть участь ліпідні бішари і заряджені ПАР, були вивчені в експериментах низкою дослідників [9,51,63,65,66]. Експерименти проводилися в середовищі водних розчинів 1:1 і 2:1 електролітів. Двовалентні катіони досить ефективно зменшують відштовхування подвійних електричних шарів, навіть при дуже низьких концентраціях; не менш ефективні вони і в якості адгезійних агентів і фюзогенів (речовин, що сприяють злиттю) бішарів і біогенних мембран. Дійсно, вимірювання показують, що в присутності двовалентних протиіонів короткодійчі сили притягіння значно сильніші, ніж можна було б припустити, виходячи тільки з ван-дер-ваальсових взаємодій [75,76]. Цей ефект приписують додатковому притягінню за рахунок іонних кореляцій, аналогічних силам Ван-дер-Ваальса, чинним між сильно поляризованими двовалентними іонами [77]. При підвищених концентраціях одновалентних електролітів відштовхування подвійних електричних шарів зменшується, але через відносно слабе ван-дер-ваальсове притягіння між ліпідними бішарами воно зазвичай залишається досить сильним, не дозволяючи поверхням контактувати – навіть якщо потенціали невеликі, а концентрація солі висока [63].

### **1.1.3. ТЕОРІЯ ДЛФО: спільна дія сил Ван-дер-Ваальса та подвійного електричного шару**

Повна сила взаємодії двох поверхонь завжди включає в себе ван-дер-ваальсове притягіння. У даному випадку, на відміну від сил подвійного

електричного шару, потенціал ван-дер-ваальсової взаємодії практично не залежить від змін концентрації електроліту і рН, і в першому наближенні може вважатися постійним. Більше того, на малих відстанях сили Ван-дер-Ваальса повинні завжди перевершувати відштовхування подвійного електричного шару, оскільки вони залежать від відстані за степеневим законом ( $W \propto -1/D^n$ ), в той час як енергія взаємодії подвійного електричного шару при  $D \rightarrow 0$  залишається кінцевою або повільно зростає [9]. Залежно від концентрації електроліту і густини поверхневого заряду можна виділити чотири різних ситуації [63]:

а) Між сильно зарядженими поверхнями в розбавленому електроліті (великий дебаєвський радіус) має місце сильне далекодіюче відштовхування, яке досягає максимуму (енергетичного бар'єру) на деякій відстані, як правило, між 1 і 4 нм.

б) У більш концентрованому розчині електроліту перед бар'єром має місце досить глибокий так званий дальній потенційний мінімум, як правило, далі 3 нм. У цьому випадку говорять, що колоїдний розчин кінетично стабільний (на відміну від термодинамічної стабільності).

в) Енергетичний бар'єр буде значно нижчим для поверхонь з низькою густиною заряду або потенціалом, що веде до повільної агрегації, відомої як коагуляція або флокуляція. При перевищенні певної концентрації електроліту, відомої як критична концентрація коагуляції (ККК), енергетичний бар'єр стає негативним і частинки швидко коагулюють. Такий колоїдний розчин є нестійким.

г) Із наближенням до нуля поверхневого заряду або потенціалу залежність енергії взаємодії від відстані наближається до ван-дер-ваальсового закону, і дві поверхні сильно притягуються на всіх відстанях.

Ця послідовність явищ може бути описана кількісно і являє собою основу відомої теорії стійкості колоїдів ДЛФО, названої так на честь Дерягіна, Ландау [78], Фервея і Овербека [51]. Дана теорія будується на

конкуренції між силами ван-дер-ваальсового притягіння і силами відштовхування подвійного електричного шару.

Основним чинником, що призводить до формування адгезійного контакту між поверхнями в ближньому потенційному мінімумі, є зниження їх поверхневого потенціалу або заряду, викликане посиленням зв'язуванням іонів і/або посиленням екранування відштовхування подвійного електричного шару при збільшенні концентрації солі. У той же час, якщо при зростанні концентрації солі поверхневий заряд залишається високим, дві поверхні можуть злипатися в дальньому мінімумі, де адгезія набагато слабше і легко оборотна [9,63].

В результаті великої кількості досліджень були сформовані уявлення про структурну складову взаємодії поверхонь, обумовлену особливими властивостями граничних шарів рідини на межі розділу тверде тіло – рідина. Встановлення в першому наближенні закону зміни структурного відштовхування з відстанню [9] дозволило ввести структурні сили в теорію ДЛФО, і оновлена теорія отримала назву розширена теорія ДЛФО.

#### **1.1.4. Структурні сили**

При застосуванні теорії ДЛФО та теорії гетерокоагуляції до аналізу стійкості різних колоїдних систем і тонких плівок рідин були виявлені в ряді випадків розбіжності між теорією та експериментами. Їх можна було імовірно пов'язати з сольватацією поверхні частинок: утворенням граничних шарів рідин з особливою структурою, відмінною від структури тієї ж рідини в об'ємі. Підставою для такого припущення було те, що розбіжності між теорією і експериментом були найбільш значні в разі ліофільних поверхонь і полярних рідин. Їх взаємодія не може бути зведена тільки до дисперсійних і електростатичних сил. Вперше на можливість існування сил «третього роду», пов'язаних зі зміною структури граничних шарів розчинника, було звернуто увагу в роботах Дерягіна Б.В. [9]. На малих відстанях (менше кількох

діаметрів молекули) характерні величини розчинника (показник заломлення, діелектрична проникність, густина) починають відрізнятися від своїх макроскопічних значень, а парний потенціал міжмолекулярної взаємодії на коротких відстанях перестає адекватно описуватися континуальними моделями. Зокрема, в літературі вказано, що в загальному випадку профілі густини рідини і потенціали взаємодії осцилюють з відстанню, причому період осциляції близький до розміру молекул, а радіус дії складає декілька діаметрів молекул. Ці короткодійчі взаємодії прийнято називати сольватаційними силами, структурними силами, або, якщо середовищем є вода, гідратаційними силами [63].

Короткодійчі осцилюючі сольватаційні сили виникають у всіх випадках, коли молекули рідини виявляються включеними в квазідискретні шари між поверхнями або в іншому сильно обмеженому просторі. Природа осцилюючих сил в основному геометрична. Для простих сферичних молекул між двома твердими гладкими поверхнями сольватаційна сила як функція відстані, зазвичай, має характер затухаючих коливань (осциляції). Для молекул несиметричної форми з анізотропним або не попарно адитивним потенціалом взаємодії сольватаційна сила може також включати монотонне притягіння або відштовхування. Крім того, взаємодії поверхні з розчинником можуть призводити до просторового або орієнтаційного упорядкування прилеглої рідини, приводячи до виникнення монотонних, а не осцилюючих, сольватаційних сил, які, як правило, експоненціально зменшуються з відстанню. Такі сили можуть бути притягуючими або відштовхуючими, а їх радіус дії значно більше, ніж у осцилюючих сил. Додаткові структурні сили можуть також виникати при руйнуванні мережі водневих зв'язків між двома поверхнями в результаті електростатичного зв'язування іонів і іонних кореляцій, а також утворення молекулярних «містків». Сольватаційні сили залежать не тільки від властивостей середовища, але й від хімічних і фізичних властивостей поверхонь, наприклад, їх гідрофобності або гідрофільності, аморфної або кристалічної

структури, гладкості або шорсткості, а також від того, чи є поверхні твердими або подібні до рідини. Сольватаційні сили можуть бути дуже великі на коротких відстанях, і саме тому вони вкрай важливі при визначенні сили адгезії між поверхнями або контактуючими частинками. Найбільш загальний тип сольватаційних сил - осцилюючі сили, що виникають через дискретну молекулярну структуру всіх конденсованих середовищ [9,63].

Сольватаційна сила виникає тільки при зміні густини рідини біля поверхонь по мірі їх зближення. Для виникнення осцилюючих взаємодій або сил не потрібно ніякого притягіння між молекулами рідини або рідиною і стінкою. Єдина вимога – це дві тверді стінки, що обмежують молекули, здатні до обміну з молекулами в основному об'ємі рідини. У відсутності яких би то не було сил притягіння між молекулами в об'ємі рідини густина може підтримуватися зовнішнім гідростатичним тиском. У реальних рідинах роль зовнішнього тиску грають міжмолекулярні сили притягіння, але природа осцилюючих сил залишається такою самою. Численні теоретичні дослідження і роботи з комп'ютерного моделювання різних рідин в обмеженому об'ємі, включаючи воду, із взаємодією у вигляді різних форм потенціалу Мі завжди призводять до висновку про існування осцилюючих сольватаційних сил на відстані між поверхнями менше декількох діаметрів молекул розчинника[63,79,80]. У першому наближенні осцилююча сила може бути описана експоненціально затухаючою гармонійною залежністю, при інтегруванні якої легко показати, що внесок сольватаційних сил в енергію границі розділу двох плоских поверхонь дорівнює

$$\gamma_i \approx \frac{\sqrt{2}kT}{8\pi^2\delta^2} \approx \frac{0.02kT}{\delta^2}, \quad (1.7)$$

Корисно порівняти формулу (1.7) з формулою (1.4), яка задає внесок енергії Ван-дер-Ваальса в енергію границі розділу. Так, при значеннях константи Гамакера менших, ніж  $A \approx 0.2kT$ , тобто  $A < 10^{-21}$  Дж, можна

очікувати, що при адгезії двох поверхонь в рідкому середовищі буде домінувати осцилююча сила [63].

Деякі глини, плівки ПАР на поверхнях, незаряджені ліпідні бішари та біологічні мембрани спонтанно набухають або відштовхуються в водних розчинах, а дисперсії кварцу та інших колоїдних частинок часто виявляються «стабільними» при високій концентрації солі. Можна було б очікувати, що в цих системах поверхні або частки знаходяться в сильному адгезійному контакті або коагулюють в ближньому потенційному мінімумі, якби взаємодії обмежувалися силами ДЛФО і осцилюючими сольватаційними силами.

Теорія ДЛФО непридатна і в багатьох інших водних системах, де присутня додаткова короткодійна взаємодія, причому не осцилююча, а монотонна. Ці сили призводять до експоненціального відштовхування гідрофобних поверхонь і називаються гідратаційними (структурними) силами. Природа і властивості цієї сили довгий час вважалися суперечливими, особливо в біологічній літературі і публікаціях про колоїди. Відштовхуючі гідратаційні сили виникають у всіх випадках, коли молекули води міцно пов'язані з поверхнями, що містять гідрофільні групи, тобто деякі іонні, цвіттер-іонні, або утворюючі водневі зв'язки групи, а їх величина залежить від енергії, необхідної для руйнування мережі водневих зв'язків та/або дегідратації поверхонь з їх наближенням [9,63].

Гідратаційні сили між двома твердими кристалічними поверхнями зазвичай мають осцилюючий характер. Період коливання величини сили дорівнює діаметру молекули води (0,25 нм) і відображає впорядкування молекул води в напівдискретні шари між рівними і твердими поверхнями. Однак між бішарами подібне впорядкування неможливо з двох причин: по-перше, в масштабах молекул води поверхня, встелена полярними групами, вже не гладка; по-друге, поверхні термічно рухливі, що призводить до стеричного відштовхування.

Отже, осцилюючі сили між бішарами повністю розмиваються, і залишається лише монотонна компонента гідратаційних сил [81]. Ймовірно, саме з цієї причини виміряти вдається лише монотонно спадаючі стерично-гідратаційні сили, що діють між амфіфільними структурами у воді та інших розчинниках. Радіус дії вивчених до теперішнього часу стерично-гідратаційних сил, що діють між різними бішарами ліпідів і ПАР, становить 1-3 нм. На менших відстанях вони різко зростають (за експонентою) зі значеннями характеристичних довжин від 0,08 до 0,64 нм [82,83]. Стерично-гідратаційні сили часто превалюють над силами ДЛФО на малих відстанях. Зокрема, ці сили відповідальні за відсутність сильної адгезії або агрегації бішарів і везикул, які складаються з електронеутральних ліпідів, таких, як лецитин, а також ліпідів, що несуть ПЕГ і вуглеводні полярні групи.

Вклад гідратаційних сил у взаємодію полярних груп можна розглядати або просто як збільшення ефективного розміру полярних груп (наприклад, це робиться у випадку розмірів гідратованих іонів) або ж як вплив особливих гідратаційних сил, що мають значно більшу вагу, на додаток до інших сил.

Деякі кінцеві групи ліпідів гідрофільні за своєю природою, наприклад ті, до складу яких входять  $-N(CH_3)_3^+$ , етиленоксидні або вуглеводні залишки, інші ж стають гідрофільними, коли пов'язують гідратовані іони, особливо  $Na^+$ ,  $Li^+$  або  $Mg^{2+}$ . Для ліпідів першого підкласу характерні істинні гідратаційні сили, для ліпідів другого - сили, які можна регулювати за допомогою іонного обміну. Так, негативно заряджені везикули фосфоліпідів агрегують, навіть зливаються в єдине ціле, як і передбачає теорія ДЛФО, в розведених розчинах  $CaCl_2$  (але не в концентрованих розчинах  $NaCl$ , де теорія ДЛФО, тим не менш, пророкує сильну необоротну адгезію, якщо реалізується контакт поверхонь на молекулярному рівні) [84]. Також і везикули фосфатидилсеріну злипаються в розбавлених (1 мМ) розчинах  $CaCl_2$ , чого не відбувається в розчинах  $MgCl_2$  [85] швидше за все через те, що більш гідратовані іони  $Mg^{2+}$  заважають поверхням наблизитися одна до одної настільки, щоб злитися в єдине ціле [86].

Іншим прикладом регульованих гідратаційних сил (але вже за допомогою катіонів) є взаємодії між краплями емульсії масла у воді, стабілізованої моношаром алкілсульфатів [63]. Виявлено, що адгезія між краплями емульсії в концентрованих розчинах солей зменшується зі збільшенням числа гідратації катіона, адсорбованого на поверхні, а саме, в ряду  $KCl > NaCl > LiCl$ . Інші приклади, де описується роль гідратації у взаємодії бішарів і мембран, наведені в роботах Маківера [86].

Для неіоногенних і цвіттер іонних бішарів зазвичай характерні істинні гідратаційні сили, на які майже не впливає склад розчину. Це відбувається через те, що іони слабо зв'язуються з такими поверхнями. Наприклад, відомо, що незаряджені бішари фосфатидилхоліну (ФХ) і фосфатидилетанола (ФЕ) адсорбують і іони  $Ca^{2+}$ , і іони  $Mg^{2+}$ . Це викликає відштовхування подвійних електричних шарів біля поверхонь, які через адсорбцію заряджені позитивно, проте на короткодійочі стерично-гідратаційні сили це не впливає, і вплив обох типів сил адитивний [87].

## **1.2. Молекулярні механізми та молекули клітинної адгезії, види адгезії на молекулярному рівні**

На другій стадії адгезії відбувається взаємодія на молекулярному рівні між адгезинами мікробних клітин і рецепторами клітин господаря. Під адгезинами на сьогоднішній день розуміють поверхневі структури бактерій і макромолекули, що входять до їх складу, переважно білкової, глікопротеїдної або гліколіпідної природи, за допомогою яких здійснюється прикріплення до клітин, що є мішенями. Під рецепторами розуміють структури, що відповідають адгезинам і знаходяться на поверхні еукаріотичної клітини [1,88,89]. Специфічна адгезія є одним з окремих випадків універсального біологічного механізму - ліганд-рецепторної взаємодії, основою якої є просторова комплементарність взаємодіючих

структур [90,91]. За допомогою адгезинів, що функціонують на першому етапі інфекційного процесу, здійснюється вибір тканини, чутливої до подальшого ураження токсинами та іншими чинниками патогенності бактерій [92].

Клітинна адгезія являє собою прикріплення клітини до клітини або клітини до субстрату, яке призводить до формування певних типів гістологічних структур, які є специфічними для даних типів клітин. Адгезивні властивості є критичними для початку і підтримання тривимірної структури і нормальної функції тканин. Клітинну адгезію реалізують спеціальні глікопротеїни – молекули (або рецептори) клітинної адгезії (МКА) [93]. МКА є переважно трансмембранними глікопротеїнами, що є посередниками зв'язування з молекулами позаклітинного матриксу або з рецепторами інших клітин способом, який визначає специфічність взаємодії клітина-клітина або клітина-позаклітинна матриця. За допомогою рецепторів МКА клітина отримує інформацію про своє просторове положення [94]. На думку більшості дослідників, виділяють 5 груп МКА:

1. Інтегрини – це велика група МКА, які беруть участь не тільки в міжклітинних взаємодіях, але і у взаємодіях з компонентами позаклітинного матриксу [94]. Вони експресуються в різних комбінаціях у всіх клітинах [95,96]. Інтегрини є трансмембранними глікопротеїнами, які формують гетеродимери, що складаються з однієї альфа ( $\alpha$ ) і однієї бета ( $\beta$ ) субодиниць [95,97,98]. Обидві субодиниці необхідні для взаємодії інтегринів з цитоскелетом і позаклітинним матриксом. Їх специфічність визначається комбінацією субодиниць та типом клітини [95,98]. Родина інтегрінових рецепторів відіграє важливу роль у складних клітинних подіях, таких як диференціювання, проліферація та міграція клітин, і бере участь у біологічних процесах, пов'язаних з онтогенезом, загоєнням ран, а також зміною адгезивних та інвазивних властивостей пухлинних клітин. Інтегрини передають сигнали у двох напрямках через плазматичні мембрани [99].

2. Кадгеріни –  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні МКА, об'єднують клітини в тканини і підтримують цілісність тканини [94]. Кадгеріни - основні молекули міжклітинної адгезії, що утримують клітини разом в ранніх ембріональних тканинах [99]. Вони мають позаклітинні домени для гемофільного зв'язування, домени для зв'язування кальцію, і цитоплазматичні домени для взаємодії з внутрішньоклітинними протеїнами [100-102]. Для кадгерінів характерні гомофільні взаємодії (коли рецептор і ліганд ідентичні), тобто позаклітинні домени кадгерінових молекул двох сусідніх клітин об'єднуються одна з одною [94]. Цитоплазматичний домен кадгерінів взаємодіє з катенінами, і кінцевий комплекс асоціює з кортикальними філаментами актину [100,103]. Взаємодія кадгерін-катенін необхідна для опосередкованої кадгеріном адгезії і асоціації комплексів з цитоскелетом [100,104]. Родина кадгерінів складається з 16 членів, з яких найважливішим є Е-кадгерін (епітеліальний кадгерін), який знаходиться в епітеліальних тканинах і бере участь у формуванні та підтримці клітинної гістоархітектури. Родина кадгерінів включає також інші важливі види, як то N-кадгерін (нейронний кадгерін), який знаходиться в нервових і м'язових тканинах, Р-кадгерін (плацентарний кадгерін), R-кадгерін (кадгерін сітківки), і VE-кадгерін (кадгерін ендотелію судин) [100,105]. Втрата функції або видалення Е-кадгерін-катенін комплексу, або будь-якого з його компонентів, усуває здатність клітини до адгезії, що призводить до втрати нормальної архітектури тканини [100].

3. Селектіни – група МКА, які зв'язуються з вуглеводними залишками в складі глікопротеїнів на поверхні сусідніх клітин [94]. Родина селектінових молекул адгезії, що складається з лейкоцитарного L-селектину, ендотеліального Е-селектину і тромбоцитарного Р-селектину, є кальцій-залежним типом трансмембранних глікопротеїнів з лектін-подібними позаклітинними доменами, які взаємодіють, наприклад, з сіалізованими вуглеводневими залишками і муцин-подібними глікопротеїнами [83]. Вони були вивчені переважно при дослідженні лейкоцитів що були виділені з

циркуляції [106,107]. Лігандами для селектинів є поверхневі клітинні глікани, специфічні сіалові структури також знайдені в антигенах груп крові. Р-селектин зв'язується з глікопротеїновим лігандом (PSGL-1), L-селектин взаємодіє з GlyCAM-1 і CD34, тоді як E-селектин можливо реагує з ESL-1 [95]. Селектини подібно до Ig CAMs, експресуються на поверхнях клітин на низькому рівні [107]. Р-селектин транспортується з депо до поверхні клітин після стимулюючої дії, E-селектин синтезується і транспортується до поверхні клітини при експозиції до збуджуючих медіаторів, L-селектин, присутній на поверхні лейкоцитів, від'єднується від поверхні і надходить у циркуляцію [107,108].

4. Імуноглобулінова суперродина – це група МКА, структура позаклітинної частини яких нагадує структуру молекул імуноглобулінів [94]. Всі МКА, що належать до цієї суперродини, поділяються на дві групи: такі, що створюють гомофільні або гетерофільні (наприклад, з інтегрінами) зв'язки. Вони є суперродиною молекул клітинної адгезії, які мають різні структури і функції, але в кожній з них міститься один або декілька загальних Ig-подібних повторів, які характеризуються двома цистеїнами, розділеними 55 та 75 амінокислотами. Ig-подібні домени експресуються на позаклітинному домені білка, і зазвичай ці молекули перетинають клітинні мембрани і містять тільки короткий цитоплазматичний хвіст [107,109]. Молекули відіграють важливу роль у розвитку нервової системи, ембріональному розвитку та імунних і запальних реакціях [99].

5. Муцини (протеоглікани) – це МКА, які мають низку глікозаміно-гліканових ділянок зв'язування [94]. Вони є клітинно-поверхневими трансмембранними глікопротеїнами і були знайдені на лімфоцитах і фібробластах. Ці МКА є головними поверхневими клітинними рецепторами гіалуронової кислоти, основного позаклітинного матричного компоненту. Вони пов'язують клітинно-матричні взаємодії за допомогою передачі сигналів із внутрішньоклітинного простору назовні. Муцини допомагають в взаємодіях клітина-клітина і клітина-матриця.

Комплекси, сформовані рецепторами клітинної адгезії є не статичними, а динамічними одиницями, здатними до сприйняття та включення сигналів позаклітинного оточення, і є дійсно основою двосторонньої сигналізації між клітиною та її оточуючим середовищем [110,111]. Ці родини молекул клітинної адгезії також залучаються до інформаційної взаємодії між внутрішнім і зовнішнім середовищем клітин, і отже є важливими для клітинного росту, проліферації, просторової організації, рухливості, міграції, сигналізації, диференціювання, апоптозу, а також транскрипції генів як в нормальному фізіологічному рості і розвитку, так і в патологічних умовах, як наприклад запалювання і заживання поранень [95,112].

Завдяки МКА клітина має здатність адгезувати до сусідньої клітини або матриксу. За цим принципом можна розглянути два види адгезії: клітина-матрикс (підкладка) і клітина-клітина.

#### – Адгезія клітин до матриксу

У взаємодіях клітини з матриксом беруть участь такі групи МКА: інтегрини, селектини, імуноглобулінова суперродина і протеоглікани. Взаємодії даного виду стали об'єктом дослідження багатьох вчених. У 1990 році було показано, що адгезійні взаємодії з участю гіалуронату і CD44 (молекули протеогліканової групи) можуть сприяти низці клітинних процесів розпізнавання, в тому числі необхідних для нормального кровотворення [113]. Механізми, що відповідають за адгезію різних типів кровотворних клітин є потенційно складними. У роботі [114] вивчали адгезію ВНК клітин (клітин нирки хом'яка) до полімерних поверхонь з різною густиною гідроксильних і карбоксильних груп. Для цього автори дослідили вплив ацетилювання, що блокує гідроксильні групи, і дізаметану, що впливає на густину карбоксильних груп, на клітинну адгезію. Було показано, що адгезія нелінійно залежить від густини гідроксильних груп: гідроксильні групи були необхідні для клітинної адгезії, але дуже висока їх поверхнева густина зменшувала клітинну адгезію. Адгезія є максимальною при поверхневій

густині гідроксильних груп близько  $0,5 \text{ нмоль/см}^2$  і мінімальною при поверхневій густині близько  $1 \text{ нмоль/см}^2$ . Карбоксильні групи пригнічують адгезію клітин, а блокування цих груп метилуванням підвищує прилипання [114].

В роботі [115] розглянуто розвиток самозібраних моношарів алканетіолів на золоті як моделі субстрату для вивчення клітинної адгезії. Була вивчена адгезія Swiss 3T3 клітин на моношарах, виготовлених із суміші алканетіолів та пептиду Gly-Arg-Gly-Asp-Ser з триетиленовою гліколевою групою. Для моношарів за концентрації пептиду від 0,01 до 1,0% (відносно загальної кількості алканетіола) клітини прикріплювалися і розпластувалися досить ефективно. Імунозabarвлення показало, що адгезовані клітини збирались в нормальні адгезійні комплекси - групи з інтегріновими рецепторами, які формують сильні з'єднання з основою і ініціюють адгезійні сигнали, що викликають напруження в актинових філаментах. Для моношарів з меншою густиною лігандів приєднання було менш ефективним і приєднані клітини розпластувалися в меншій мірі. У роботі показано, що навколишнє середовище, в якому присутній пептид, є важливим чинником для адгезії [115].

Була досліджена адгезія еритроцитів до очищеного позаклітинного білкового матриксу [116]. Відмиті еритроцити пацієнтів із серповидно-клітинною анемією (SS), здорових людей (AA) і пацієнтів з високою кількістю ретикулоцитів (від 25 до 80%) перфузували через проточні камери, заздалегідь покриті BSA (бичачим сироватковим альбуміном), TSP (тромбоспондином), або ламініном. Після промивання під мікроскопом підраховували кількість адгезованих еритроцитів на одиницю площі. Адгезія AA до іммобілізованого TSP і ламініну була трохи збільшена. Однак прилипання SS-еритроцитів до адгезивних лігандів TSP і ламініну було більш ніж в 15 разів вищим, ніж адгезія AA-еритроцитів. Також в цій роботі була досліджена роль потенційних адгезивних молекул еритроцитів. Потенційними TSP або ламініновими рецепторами, які були зареєстровані на

червоних кров'яних клітинах, є сульфатовані гліколіпіди і CD36 на ретикулоцитах. Щоб визначити, чи відповідають сульфатовані гліколіпіди за адгезію еритроцитів до TSP або ламініну, автори провели дослідження адгезії SS-еритроцитів з використанням низки аніонних полісахаридів як потенційних інгібіторів. Було показано [116], що сульфат хондроїтину або глікозаміноглікану перешкоджає більш ніж на 75% адгезії SS-еритроцитів до іммобілізованих TSP. Автори прийшли до висновку, що адгезія еритроцитів до очищеного іммобілізованого TSP і ламініну в умовах потоку стає інтенсивніше, і що кислотні ліпіди разом з сульфатованими гліколіпідами на поверхні еритроцитів, ймовірно, мають свій внесок у цю адгезію. Рівень адгезії на еритроцитах, отриманих від пацієнтів з серповидно-клітинною анемією, був більше, ніж від пацієнтів з високою кількістю ретикулоцитів [116].

В іншій роботі [117] були проведені експерименти для перевірки гіпотези, що відмінності між поверхнями еритроцитів нормальних і серповидних клітин відображаються в ступені приєднання до капілярного покрову. Було показано, що майже у всіх випадках ступінь зв'язування SS-еритроцитів з ендотеліальною культурою виявився вищим, ніж нормальних еритроцитів. Результати чітко показують, що SS-еритроцити (зворотні і незворотні) зв'язуються з ендотеліальними моношарами з набагато більшою частотою, ніж контрольні клітини. [117,118]

#### – Міжклітинна адгезія

У адгезії клітина-клітина також беруть участь рецептори більшості сімейств МКА. Поведінка клітини в багатоклітинних організмах в значній мірі залежить від контактів з іншими клітинами. Белл у своїй роботі [119] розробив теоретичне підґрунтя для аналізу адгезії клітина-клітина, опосередкованої зв'язками між специфічними молекулами. Основні ідеї цієї теорії дуже прості. По-перше, знаючи швидкість реакції реагентів у розчині разом з константами дифузії реагентів у розчині і на мембранах можна

оцінити швидкість реакції для реагентів, пов'язаних з мембраною. По-друге, сила дорівнює енергії, поділеній на відстань, це може бути використано для того, щоб з мікроскопічних властивостей зв'язування знайти макроскопічні сили, необхідні для поділу клітин. Автор теорії показав [119], що адгезія, опосередкована специфічними зв'язками, може бути сильнішою в порівнянні з очікуваними неспецифічними електричними силами між клітинами.

В роботі [120] було показано, що антигенний детермінант зв'язується з МКА нервових клітин (Н-МКА), і що між мембранами клітин спинного мозку і м'язовими клітинами відбувається швидка адгезія. Результати даного дослідження показали, що адгезія, опосередкована Н-МКА, має важливе значення для створення в лабораторних умовах фізичного зв'язку між нервом і м'язом. Автори зробили висновок, що зв'язуючі Н-МКА можуть бути важливими для першого кроку у синаптогенезі.

Дослідження кадгерінів показали, що вони беруть участь у міжклітинній адгезії, відіграють вирішальну роль у конструкції тканин і всього тваринного організму [121]. Описано два різних міжклітинних механізми адгезії ( $\text{Ca}^{2+}$ -залежний і  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежний), і схему зв'язування кадгеріном клітин. Дослідники Грангер і Кубес розглянули внесок різних МКА в адгезію лейкоцитів [122]. Розуміння того, що лейкоцити можуть впливати на патогенез багатьох захворювань, є результатом багатьох досліджень ефективності моноклональних антитіл, спрямованих проти лейкоцитарних і ендотеліальних МКА в різних експериментальних моделях. Дослідження показали, що запобігання або зменшення лейкоцитарно-ендотеліальної адгезії часто призводить до суттєвого послаблення мікросудинних і паренхіматозних клітинних дисфункцій, які спостерігаються в різних тваринних моделях людських хвороб [122].

### 1.3. Бактеріофіксуюча здатність еритроцитів

Мікроорганізми бактеріальної природи, які попадають у кровоносну систему, взаємодіють з різними компонентами плазми та клітинами крові. При цьому найбільш імовірним є контакти бактерій з еритроцитами. Наразі відомо, що еритроцити здатні до адсорбції на своїй поверхні живильних речовин, продуктів розпаду бактерій, екзотоксинів мікробів, антитіл, вірусів переносу їх по організму [123,1]. Еритроцити - зручне джерело клітин ссавців, які мають незлічену кількість експонованих складних вуглеводів, що представляють потенційно споріднені вуглеводні послідовності для бактерійних адгезинів [90].

Адгезія бактерій до будь-якої поверхні являє собою двосторонній процес між мікробною клітиною та субстратом, до якого вона прикріплюється [124,125].

Здатність еукаріотичних клітин фіксувати на своїй поверхні мікробні клітини позначається як бактеріофіксуюча активність, бактеріофіксуюча активність крові в основному визначається еритроцитами [126,88].

У крові людини еритроцити мають переважно форму двоввігнутого диску. Форма двоввігнутого диску, що характеризується великим поверхнево-об'ємним відношенням, забезпечує транспорт більшої кількості різних речовин через мембрану еритроцита. Крім того, така форма дозволяє еритроцитам закріплюватися в фібриновій мережі при утворенні тромбу. Але головна перевага полягає в тому, що форма двоввігнутого диска забезпечує проходження еритроцита через капіляри. Форма еритроцитів здорових людей вельми варіабельна - від двоввігнутої лінзи до тутової ягоди. Нормальний зрілий еритроцит людини не містить ядра та органел, які він втрачає в процесі розвитку.

Еритроцит оточений плазматичною мембраною, структура якої мало відрізняється від мембрани інших клітин. Мембрана містить набір ферментів гліколізу, пентозофосфатного циклу, системи глутатіону, фенілової системи

та інших реакцій обміну для реалізації анаеробного шляху засвоєння енергії та є важливим компонентом антиоксидантної системи організму [89,91].

У мембрані еритроциту виділяються три структурні елементи. Першим і основним елементом є подвійний шар ліпідів, що забезпечує бар'єр між навколишнім середовищем і цитоплазмою еритроцита, на його долю приходить 50-60 % маси мембрани еритроцита. Другий структурний елемент мембрани складають білки, що пронизують подвійний шар ліпідів і виконують різноманітні функції, третім є цитоскелет еритроциту, що забезпечує належну форму еритроциту [1].

На зовнішній поверхні мембрани еритроцита розташовані ліпіди, сіалові кислоти, антигенні олігосахариди, адсорбовані білки; внутрішня поверхня представлена гліколітичними ферментами, натрієм, кальцієм, АТФ-фазою, глікопротеїнами та гемоглобіном [92]. Білки мембрани умовно поділяються на інтегральні (вбудовані у ліпідний шар) і периферичні (цитоплазматичні). Інтегральні білки представлені в основному білками смуги 3, глікофоринами А, В, С. Периферичні білки представлені  $\alpha$ - і  $\beta$ -спектринами, анкірином, актином, тропоіозином та ін. [1]. Серед білків, що забезпечують іонний гомеостаз еритроцита, найбільш важливими є білки, що утворюють аніонний канал,  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -канал. Катіони через мембрану еритроцита практично не проходять, бо немає спеціальних транспортних систем, які б пропускали катіони по градієнту концентрації. Через аніонний канал, що являє собою інтегральний глікопротеїн, який містить не менш ніж дві субодиниці, в обидві сторони (по градієнту концентрації) проходять аніони ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{OH}^-$ ) та глюкоза. Відсутність  $\text{K}^+$ -каналів сприяє збереженню негативного заряду на зовнішній поверхні мембрани [127].

Від роботи  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-ази, що визначає концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{K}^+$  всередині клітини, залежить морфологія еритроцита. Збільшення концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  всередині клітини супроводжується перетворенням дискоцитів в ехіноцити.

Еритроцити мають негативний електричний заряд, що утворює  $\zeta$ -потенціал, тобто різницю потенціалів між плазмою і еритроцитом. Практично  $\zeta$ -потенціал оцінюють по електрофоретичній рухливості еритроцитів, тобто по встановленій швидкості руху еритроцитів у постійному електричному полі, віднесеної до напруги поля. У нормі  $\zeta$ -потенціал складає 15 мВ [128].

Проведено багато експериментів, які доводять здатність взаємодії бактерій та еритроцитів в умовах *in vitro* [129-132, 2].

У зв'язку з ідентичністю глікофорина еритроцитів і глікокалікса епітеліоцитів еритроцити широко використовуються при дослідженні адгезивних властивостей бактерій [2,133].

#### **1.4. Адгезивна спроможність мікроорганізмів бактеріальної природи (*Streptococcus thermophilus*)**

Лактобацили широко розповсюджені в природі і використовуються протягом тривалого часу в обробці та консервуванні їжі [134]. Крім того, деякі дослідження приписують пробіотичні властивості певним штамам *Lactobacillus*, які знайдені в шлунково-кишковій або жіночій сечостатевої системі як людей, так і тварин [135]. У всіх випадках згадувалося, що поведінка молочнокислих бактерій залежить від міжфазних процесів і, отже, від поверхневих фізико-хімічних властивостей клітини.

Адгезивні властивості лактобацил пов'язані з їх поверхневими властивостями, на які, в свою чергу, впливає склад, структура та організація клітинної стінки. Кількість адгезивних компонентів може бути визначена на клітинній стінці, що включає (ліпо)тейхоєві кислоти, полісахариди і білки, які вносять вклад у фізико-хімічні властивості поверхні бактерій, такі, як його гідрофобність і заряд [136,137].

Клітинна стінка грампозитивних бактерій, включаючи лактобацили, є жорсткою структурою зовні плазматичної мембрани, яка захищає їх від осмотичного лізису і токсичних речовин. Вона складається з пептидоглікану, який містить різні сполуки, в тому числі тейхоєві кислоти, білки і полісахариди [137]. Пептидоглікановий шар має товщину приблизно 20-80 нм і складається з лінійних полісахаридних ланцюгів змінного n-ацетилглюкозаміну і N-ацетил-мурамової кислоти, які з'єднані двома короткими пептидами [138].

Тейхоєві кислоти являють собою різнорідний клас сполук, за своєю основною структурою це лінійний полімер з поліюла (наприклад, гліцерина), який зв'язаний фосфодіефірними містками [138,139]. Вони ковалентно приєднані до пептидогліканового шару, в той час як ліпотейхоєві кислоти кріпляться до мембрани.

Полісахариди, пов'язані з бактеріальною клітинною стінкою, як правило, нейтральні, хоча деякі з них також можуть бути кислотними, так як вони можуть бути розгалуженими з аніонними субодиницями, зокрема гліцеринфосфатом. Вони можуть бути розділені на три класи: капсульні полісахариди, які утворюють товстий зовнішній шар навколо клітинної стінки; полісахариди клітинної стінки, які є ковалентно або слабо пов'язані з клітинною стінкою; і позаклітинні полісахариди, які виділяються в середовище [138].

Поверхнево-асоційовані білки можна розділити на ті, які пов'язані з мембраною/клітинною стінкою шляхом ковалентних або нековалентних взаємодій. До першої категорії належать білки, які відокремлюють цитоплазматичну мембрану гідрофобними трансмембранними доменами, ліпопротеїни яких пов'язані з цитоплазматичною мембраною і білками. До другої категорії відносяться білки, які прикріплені до поверхні клітини нековалентними зв'язками, які розпізнають деякі домени, що зв'язують клітинну стінку [140,141].

Основний білок, експонований на поверхні багатьох видів лактобацил, знаходиться в S- шарі. S- шар складається з одного виду (гліко)протеїну, S- білка, який зібраний в характерні двовимірні кристалічні шари на клітинній поверхні. Хоча ніякої загальної функції не відомо для бактеріальних S- шарів, їх присутність на зовнішній поверхні клітини передбачає важливу роль в адгезії. У S- шару білків лактобацил, як правило, значення рІ знаходиться в діапазоні від 9,35 до 10,4; їх молекулярні маси коливаються між 25 і 71 кДа, залежно від штаму [142].

Бактеріальна адгезія на поверхні визначається взаємовідношенням різних фізико-хімічних властивостей поверхні, але найбільше гідрофобністю і електричним зарядом поверхні бактеріальних клітин і субстрату. Як гідрофобність так і електричний заряд є наслідком хімічного складу поверхні. Відомо, що поверхневий шар білка (SLP) надає гідрофобність клітинній поверхні лактобацил [143]. Проте, адгезія молочнокислих бактерій на поверхні часто не відповідає очікуванням, заснованим на їх клітинній поверхневій гідрофобності і гідрофобні штами не завжди прилипають краще до гідрофобних субстратів [144], як передбачено поверхневою термодинамікою [145]. Це означає, що клітинна поверхня лактобацил може адаптувати свою гідрофобність у відповідь на зміни навколишнього середовища, такі як рН або іонна сила [146]. Взаємодія між бактеріями і твердими субстратами часто описується теорією колоїдної стабільності Дерягіна - Ландау - Фервея - Овербека (ДЛФО) [147,51], або так званим термодинамічним підходом [148]. Термодинамічний підхід заснований на вимірюванні контактних кутів на взаємодіючих поверхнях і подальшого порівняння міжфазних вільних енергій для бактерій в суспензії у порівнянні з адгезованим станом і розходженні Ліфшиц - Ван -дер-Ваальсового і кислотно-лужного компонента. Теорія ДЛФО використовується для розрахунку енергії взаємодії Гіббса між поверхнями в залежності від відстані, що їх розділяє. Повна енергія взаємодії Гіббса інтерпретується як сума притягуючих Ліфшиц-Ван-дер-Ваальсових взаємодій і

електростатичного внеску, за рахунок перекриття подвійного електричного шару, в той час як у розширеній теорії ДЛФО кислотно-основні взаємодії також враховуються. Загалом, як бактеріальна так і субстратна поверхні є негативно зарядженими і тому електростатичний внесок є негативним [149].

В літературі сумарний поверхневий заряд визначається шляхом вимірювання електрофоретичної рухливості або  $\zeta$ -потенціалу поверхні бактерій [150]. Він пов'язаний зі складовими клітинної стінки, наприклад, фосфатними і карбоксилатними групами, білками тощо. Експериментальний підхід заснований на тому, що при різних значеннях рН поверхневі хімічні групи, наприклад, карбоксильні, гідроксильні і фосфатні групи, мають різні ступені протонування, що впливають на заряд поверхні, який визначається через  $\zeta$ -потенціал [137]. Криві  $\zeta$ -потенціалу, що зображують  $\zeta$ -потенціал клітин в залежності від рН, таким чином, можуть бути використані для оцінки сполук, які домінують на бактеріальній поверхні [137,151,152]. Як і у випадку вимірювань гідрофобності, криві  $\zeta$ -потенціалу, представлені в літературі, залежать від видів і штамів. Проте, за загальним уявленням, у більшості штамів лактобацил ізоелектрична точка зазвичай знаходиться між 3 і 4,5 [137,152] і в деяких випадках навіть нижче 2 [151].

Існує декілька чинників, які можуть впливати на поверхневі властивості лактобацил. Вони включають ферментацію середовища та умови, час ферментації, постферментаційну обробку, наприклад, заготівлю, заморожування, сушіння виморожуванням, і зберігання, а також засоби доставки, наприклад, матрицю харчування і композиції. Обґрунтуванням цього твердження є те, що ферментація і наступні процеси, швидше за все, призводять до композиційних, організаційних і конформаційних змін на бактеріальній поверхні, які можуть вплинути на їх поверхневі властивості і адгезійну здатність [151].

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1. Матеріали

Дослідження проведено на еритроцитах донорської крові людини, яку отримували у Харківському обласному центрі служби крові. В якості консерванту в усіх випадках використовували консервуючий розчин “Глюгіцир”.

Після проведення моніторингу здатності низки лактобактерій адгезувати на еритроцитах людини для досліджень були вибрані бактеріальні клітини *Streptococcus thermophilus*, які отримували з бактеріальної закваски «Йогурт VIVO» (Київ, Україна).

При відмиванні еритроцитів були використані натрію хлорид (фізіологічний розчин), 0,1 М фосфатний буфер pH 7,4 (11,5 г/л  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 2,28 г/л  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 2,92 г/л  $\text{NaCl}$ ), та розчин глюкози 5%.

При дослідженні впливу pH середовища було використано сольові буферні розчини з pH 5,8, 6,6, 7,4 та 8,0, які були виготовлені на основі гідрофосфату натрію та дегідрофосфату натрію.

В експериментах щодо впливу іонної сили середовища на показник адгезії бактеріальних клітин на еритроцитах використовували розчини, які були виготовлені на основі сахарози, хлористого кальцію і магнію хлористого 6-водного. Всі хімічні речовини, використані у експериментах, були марки Sigma (USA).

У експерименті щодо впливу режимів кріоконсервування еритроцитів людини на адгезію до них лактобактерій *Streptococcus thermophilus* еритроцити заморожували під захистом 1,2-пропандіолу (кріопротекторний

розчин «Пропандіосахароль»), поліетиленоксид 1500 (ПЕО-1500), гліцерину (консервуючий розчин “ЦНИИГПК №114”).

Для визначення заряду еритроцитів використовували катіонний барвник альціановий синій (8 GX), фосфатний буфер та етанол.

## 2.2. Методи дослідження

### 2.2.1. Визначення впливу рН середовища на адгезію мікроорганізмів *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини

Адгезію бактеріальних клітин на еритроцитах людини спостерігали за допомогою мікроскопа Axio Observer Z1 (масляно-імерсійний об’єктив x63) (рис.2.1). Для підрахунку кількості адгезованих бактерій фіксували 5 різних полів зору до та після механічного струсу зразка. У кожному полі зору після



Рис. 2.1. Інвертований біологічний мікроскоп Axio Observer Z1.

механічного струсу зразка підраховували кількість адгезованих бактерій на кожному еритроциті (рис.2.2.) та розраховували середнє значення кількості адгезованих бактерій на еритроцит – показник адгезії (бакт/ер).

Для проведення експерименту еритроцити двічі відмивали фізіологічним розчином на 0,1М фосфатному буфері рН 7,4 та осаджували центрифугуванням 700 g впродовж 10 хвилин.

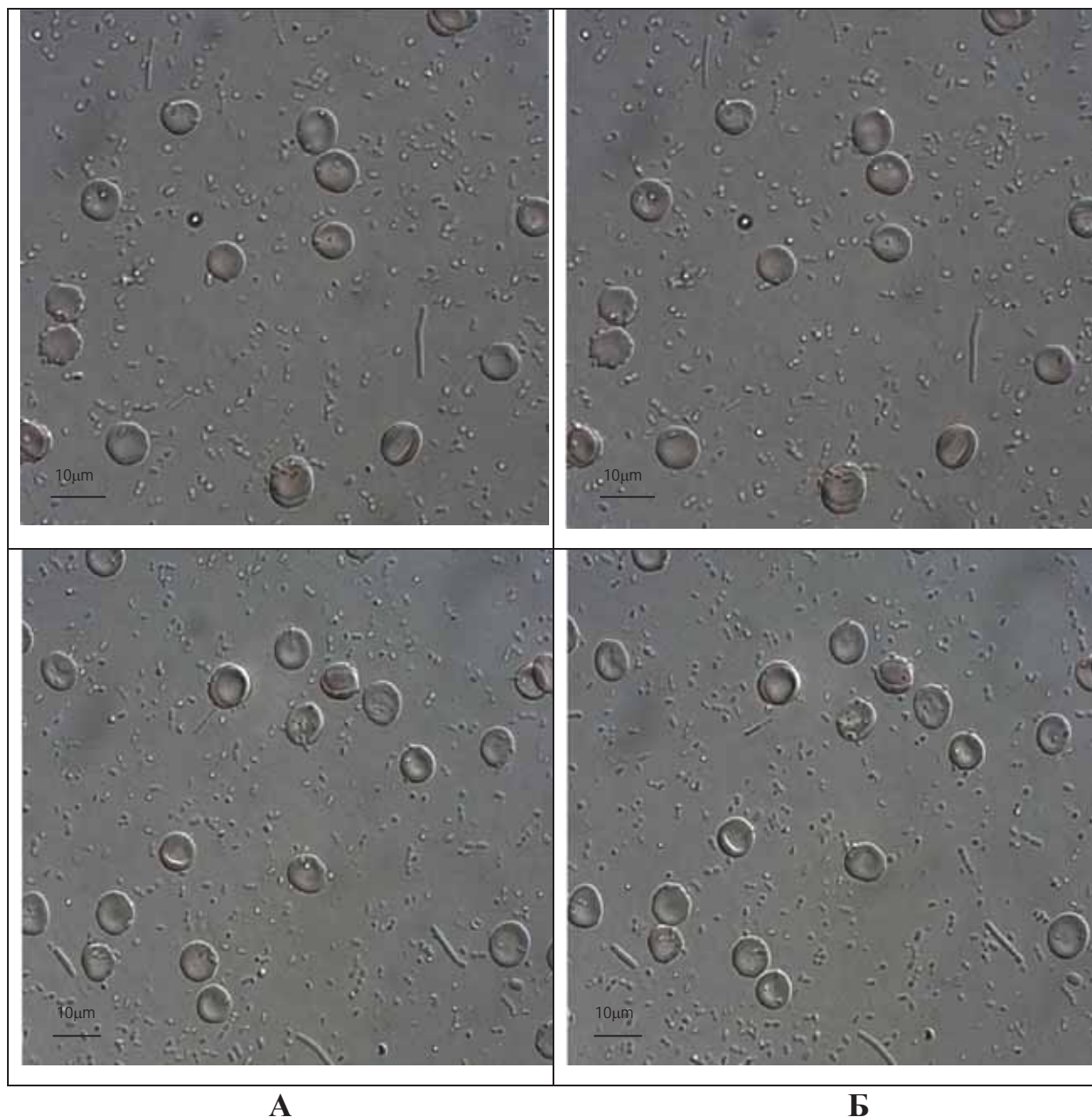


Рис. 2.2. Мікрофотографії суспензії еритроцитів після інкубації з бактеріями *Streptococcus thermophilus*: А – до струсу зразка; Б – після струсу зразка.

Висушені бактеріальні клітини суспендували у фізіологічному розчині з додаванням 5% глюкози та інкубували при 37°C впродовж 30 хвилин, відмивали у фізіологічному розчині і осаджували центрифугуванням 4000 g впродовж 10 хвилин. Осад обох видів клітин ресуспендували у відношенні 1:2 у буферному розчині з відповідними фізико-хімічними характеристиками.

Суспензії клітин змішували з експериментальним розчином у відношенні 1:1 та інкубували при температурі 37°C впродовж 30 хвилин, струшуючи суспензію кожні 5 хвилин.

При дослідженні впливу рН середовища осад обох видів клітин ресуспендували у відношенні 1:2 у сольовому буферному розчині з рН 5,8, 6,6, 7,4 та 8,0.

### **2.2.2. Визначення впливу одно- та двовалентних катіонів на адгезію *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини**

Для визначення впливу одно- та двовалентних катіонів на адгезію лактобактерій *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини еритроцити і бактеріальні клітини готували таким же чином, як і для попереднього експерименту.

В експериментах щодо впливу концентрації одновалентних катіонів, а отже іонної сили середовища, на показник адгезії бактеріальних клітин на еритроцитах осмотичність розчину підтримували на фізіологічному рівні, заміщуючи електроліти сахарозою. Розчини зі зниженою іонною силою отримували відповідним розведенням основного розчину (контроль) та додаванням до них сахарози.

В експерименті використовували розчини NaCl на фосфатному буфері з додаванням сахарози:

розчин №1 – 0,1 М сахароза + 0,1М солей (I=0,175);

розчин №2 – 0,2 М сахароза + 0,05 М солей (I=0,087);

розчин №3 – 0,25 М сахароза + 0,025 М солей (I=0,044);

контроль – фізіологічний буферний розчин pH 7,4 (0,1М фосфатний буфер  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 0,05 \text{ M NaCl}$ ) з іонною силою 0,312.

Усі розчини готували на 0,1М фосфатному буфері pH 7,4.

При дослідженні впливу двовалентних катіонів на адгезію бактеріальних клітин на еритроцитах людини в середовищі інкубації (фізіологічний буферний розчин) концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  або  $\text{Mg}^{2+}$  (0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%) варіювали додаванням  $\text{CaCl}_2$  і  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . При цьому фізіологічна концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  у плазмі крові становить 0,03%, ( $2,7 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ) а  $\text{Mg}^{2+}$  - 0,015% ( $1,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ). pH середовища становив 7,4. Контролем слугував показник адгезії у фізіологічному буферному розчині pH 7,4 у відсутності двовалентних катіонів.

Показник адгезії K визначали за допомогою мікроскопа Axio Observer Z1 (масляно-імерсійний об'єктив x63).

### **2.2.3. Визначення поверхневого заряду еритроцитів та лактобактерій**

Заряд на еритроцитах вимірювали за допомогою катіонного барвника альціанового синього (АС) (Alcian blue 8GX) (AB) [17, 18]. П'ятдесят міліграм АС повністю розчиняли в 1 мл 100% етанолу, згідно з рекомендаціями, опублікованими у роботі Winkel et al. [153]. Свіжий спиртовий розчин АС робили для кожного експерименту. Розчин барвника фільтрували через паперовий фільтр і розбавляли у 100 разів у фосфатному буферному розчині, або відповідному експериментальному розчині, отримуючи кінцеву концентрацію етанолу 1%. Щодо реальної концентрації АС у розчині після фільтрації, то було враховано його втрати на стінках бюксу, в якому розчиняли барвник, та втрати АС і розчинника (спирту) шляхом зважування бюксу та фільтру до приготування та фільтрації розчину та після фільтрації, а також фільтру після його висихання. Цю процедуру

було здійснено при кожному приготуванні розчину АС. Після врахування втрат АС та розчинника концентрація первинного розчину після фільтрації становила  $30 \pm 0,8$  мг/мл, або після розведення у фосфатному буфері приблизно 0,30 мг/мл. При розрахунках у кожному експерименті використовували величину концентрації АС для даного експерименту. Безпосередньо перед використанням розчину кожного разу його оптичну щільність вимірювали на спектрофотометрі (Unicam SP 8000) на 650 нм. Похибка видимої області спектрофотометру складає не більш 1%. Якщо величина  $E_{650}$  були за межами діапазону 0,830-1,130 (середня  $0,950 \pm 0,024$ ) розчин відкидався і готувався новий.

В експериментах по визначенню показника адгезії були використані наступні концентрації суспензій клітин:  $1,25 \times 10^9$  кл / мл еритроцитів і  $30 \times 10^9$  кл / мл бактерій.

В експериментах по оцінюванню поверхневого заряду еритроцитів використовували концентрацію клітин, як і в роботі [17] ( $1,25 \times 10^9$  кл / мл). В експериментах по оцінюванню поверхневого заряду лактобактерій *S.thermophilus* була підібрана оптимальна кількість клітин 10 мг/мл, що відповідало їх концентрації  $5 \cdot 10^9$  кл/мл. Концентрацію як еритроцитів, так і лактобактерій підраховували у камері Горяєва.

0,1 мл суспензії еритроцитів або бактеріальних клітин змішували з 2 мл кінцевого розчину АС. Суміш інкубували 30 хв. при 37°C. Після видалення клітин центрифугуванням залишок АС вимірювали на спектрофотометрі за оптичною щільністю при 650 нм. Кількість зв'язаного АС на клітину розраховували за різницею між оптичною щільністю початковою розчину АС і супернатанту. Вона виражалась в нанограмах на  $10^6$  клітин.

Експерименти були зроблені в у п'яти повторях у тому числі вимірювався і порожній розчин АС. Ніяких змін в оптичній щільності розчину АС до і після інкубації не спостерігалось.

#### **2.2.4. Визначення впливу режимів кріоконсервування еритроцитів на адгезію до них лактобактерій**

Еритроцити виділяли з донорської крові людини, яку отримували у Харківському обласному центрі служби крові. Еритроцити людини заморожували за трьома різними режимами:

Режим №1 – заморожування під захистом ПЕО-1500 за методом Бабійчук Л.О. [21]. В еритромасу, охолоджену до 0°C, по краплям додавали охолоджений 40% водний розчин ПЕО-1500 у кінцевому відношенні 1:1. Суспензію вміщували в контейнери по 2 мл та заморожували зануренням у рідкий азот. Відігрівали у водяній ванні за температури 37°C. Розморожену суспензію центрифугували 2000 об/хв. Осаджені еритроцити ресуспендували у фізіологічному розчині на 0,1М фосфатному буфері рН 7,4.

Режим №2 – заморожування під захистом гліцерину за методом, розробленим в Інституті гематології і переливання крові (Москва) [19]. До еритромаси повільно додавали консервуючий розчин “ЦНИИГПК №114”, що містить 30% гліцерину, у відношенні 1:1 та витримували 15-20 хв. Суспензію вміщували в контейнери по 2 мл та заморожували зануренням у рідкий азот. Відігрівали у водяній ванні за температури 37°C. Відмивання здійснювали в три етапи за протоколом з використанням 3-х розчинів для відмивання. Після третього відмивання еритроцити ресуспендували у фізіологічному розчині на 0,1М фосфатному буфері рН 7,4.

Режим №3 – заморожування під захистом 1,2-пропандіолу за методом Воротіліна [20]. Еритромасу змішували у відношенні 1:1 з кріопротекторним розчином “Пропандіосахароль“, що містив у 1000 мл розчину 370 г 1,2-пропандіолу, 32 г сахарози, 6 г хлориду натрію. Суспензію еритроцитів витримували протягом 5 хв., вміщували в контейнери по 2 мл та заморожували зі швидкістю 12-14 °C/хв. Відігрівали у водяній ванні за температури 37°C. Розморожену суспензію центрифугували 2000 об/хв.

Осаджені еритроцити ресуспендували у фізіологічному розчині на 0,1М фосфатному буфері рН 7,4.

Відсоток гемолізу було розраховано на основі спектрофотометричного вимірювання оптичної щільності гемоглобіну на 577 нм в супернатанті після заморожування-відтавання і після повного гемолізу в контрольній пробі.

### 2.2.5. Теоретичні розрахунки та статистична обробка результатів

Теоретичні розрахунки поверхневого потенціалу еритроцитів та концентрацій катіонів біля клітинної поверхні проведено за рівнянням Пуасона-Больцмана та рівнянням Грема за допомогою програми «Microsoft Excel 2010». Силу електростатичної взаємодії між клітинними поверхнями оцінювали у наближенні Дерягіна за малих потенціалів [63].

Статистичну обробку результатів досліджень здійснювали за допомогою програми «Microsoft Excel 2010». Дані подані у вигляді  $M \pm SE$ , вірогідність різниці оцінювали за критерієм Стьюдента.

Рівняння для визначення коефіцієнту кореляції має вигляд:

$$r(X, Y) = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}}, \quad (2.1)$$

де  $\bar{x}$  та  $\bar{y}$  - є середніми значеннями виборок.

Функція стандартне відхилення обчислюється за наступною формулою:

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n - 1)}}, \quad (2.2)$$

де  $\bar{x}$  - є середнім значенням виборки, а  $n$  - розмір виборки.

### РОЗДІЛ 3

#### **ВПЛИВ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК СЕРЕДОВИЩА НА АДГЕЗІЮ *S.THERMOPHILUS* НА ЕРИТРОЦИТАХ ЛЮДИНИ**

Хвороба, викликана бактеріальними патогенами, є результатом взаємодії хазяїн-патоген. Перший крок в інфекційній хворобі, чи тільки колонізації, чи проникнення в глибші тканини хазяїна, потребує спеціалізованих білкових чинників, синтезованих бактерією, які дозволяють їх зв'язування з клітинами хазяїна.

Такі чинники колонізації, або адгезини, не можуть викликати пошкодження тканин, але можуть визначити тяжкість захворювання і, отже, результат взаємодії хазяїн-патоген, специфічний орган-мішень, та види тварин, в яких бактерії можуть викликати захворювання. У бактеріальних інфекціях адгезини патогенних бактерій беруть участь в послідовному визначенні споріднених епітеліальних клітинних рецепторів. Адгезини часто виступають в якості біологічних ефекторів; вони можуть ініціювати бактеріальні внутрішньоклітинні вторгнення поодиночі або спільно з вторинними білками. Вони мають здатність ініціювати, підривати або кооптувати системи оборони господарів на користь збудника.

Рецептори адгезину - це зазвичай вуглеводневі частини поверхнево експонованих глікопротеїнів або гліколіпідів, часто ковалентно приєднаних до мембранних білків епітеліальних клітин, які знаходяться в цільовій тканині або органі. Ці ж самі вуглеводні частини рецепторів часто знаходяться в таких же глікосполуках, білках, або сіалоглікопротеїнах клітинних мембран в інших місцях окрім цільової тканини або органу. Наприклад, еритроцити демонструють величезну різноманітність складних глікопротеїнів, глікосфінголіпідів і гангліозидів, які ідентичні або близькі до рецепторів адгезину на епітеліальних клітинах. Отже, еритроцити є зручним джерелом клітин ссавців, які мають велику кількість експонованих складних

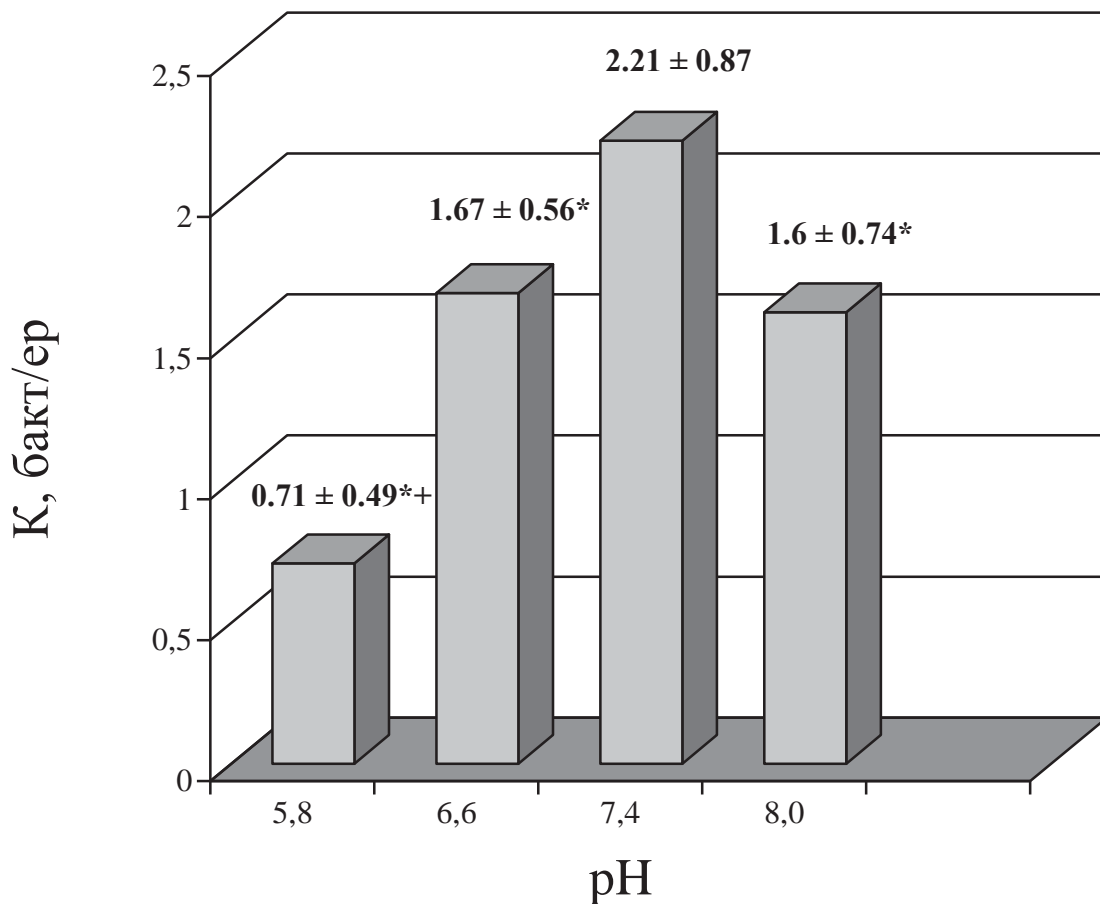
вуглеводів, що представляють потенційно споріднені вуглеводні послідовності для бактерійних адгезинів. Наприклад, адгезія гемагглютиніну *H.pilori* до еритроцитарної мембрани має характеристики, подібні до тих, що спостерігаються, коли бактерії прикріплюються до епітеліальних клітин [90]. З іншого боку, мікроорганізми бактеріальної природи, які попадають у кровоносну систему, взаємодіють з різними компонентами плазми та клітинами крові. Оскільки еритроцити - найчисленніші формені елементи крові, то найбільш імовірним є контакти бактерій саме з еритроцитами. Проте даних про роль адгезії мікроорганізмів на еритроцитах, яка у значній мірі визначає розвиток імунної відповіді та інфекційних процесів, наразі майже немає. Механізми адгезії бактерій на поверхні еритроцитів мало вивчені, що викликає необхідність більш детального дослідження впливу температури і параметрів оточуючого середовища на бактеріофіксуючу активність еритроцитів.

Фізико-хімічні властивості клітинних стінок *Lactobacillus* визначаються в значній мірі їх поведінкою і їх взаємодіями з навколишнім середовищем. Основні фізико-хімічні властивості клітинних поверхонь, які широко вивчені, включають в себе загальну гідрофобність і поверхневий заряд. Гідрофобність клітини *Lactobacillus* визначається різними методами, в тому числі аналізом межфазної адгезії, контактними кутовими методами, сольовими агрегаційними тестами, та гідрофобною хроматографією [46].

### **3.1. Вплив рН на адгезію мікроорганізмів *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини**

На першому етапі було вивчено вплив рН середовища на процес адгезії *Streptococcus thermophilus*.

На рисунку 3.1 подано результати визначення показника адгезії для різних рН.



Примітка: \* - дані вірогідно відрізняються від даних для рН7,4, + - дані вірогідно відрізняються від даних для рН 6,6 та 8,0;  $p < 0,001$

Рис. 3.1. Показник адгезії бактеріальних клітин *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини в залежності від рН середовища

Як видно з поданих даних, показник адгезії суттєво залежить від рН середовища та є максимальним за фізіологічного для еритроцитів значення. Показники адгезії для рН 5,8; 6,6 та 8,0 вірогідно відрізняються від таких для рН 7,4. З таким же ступенем достовірності відрізняються дані для рН 5,8 та інших досліджених рН. Немає вірогідної різниці лише між показниками адгезії за рН 6,6 та 8,0.

Згідно моделі Маршалла [7], через якийсь час адгезійний зв'язок між бактерією і поверхнею субстрату посилюється, переводячи процес у

безповоротний стан. Мікробна десорбція була вивчена *in situ* у пристрої з керованим потоком як функція часу утримування організмів на поверхні. Виявилося, що десорбція *S. thermophilus* сильно зменшується приблизно в межах 50 секунд після початкової адгезії через посилення зв'язків. Посилення зв'язування між клітинною поверхнею *S. thermophilus* і силіконовим нітридним наконечником атомного силового мікроскопа (АСМ) підтверджується мікроскопічно, що узгоджується з макроскопічними даними залежної від часу контакту десорбції мікроорганізмів під дією потоку. АСМ показала посилення зв'язку між наконечником і клітинною поверхнею в межах 100 секунд контакту, тобто того ж порядку величини, що і укріплення зв'язків в залежності від часу контакту при десорбції. Порівняння енергії взаємодії, отриманих методами АСМ і макроскопічної десорбції, вказують, на думку авторів, що сила зв'язків зростає в результаті мультиприкріплень позаклітинних полімерних субстанцій до поверхні основи [154]. Проте, посилення зв'язків з часом було показано і на дослідах з кварцовими нитками. Був знайдений ефект повільного руйнування граничних шарів, що втрачали свою сталість за взаємного перекриття. Внаслідок цього із збільшенням часу контакту збільшуються сили злипання [9].

В наших експериментах бактерії інкубували з еритроцитами впродовж 30 хвилин. Отже, отримані дані відображають результат кінцевої (необоротної) стадії. Тим не менше, вплив першої стадії прикріплення безумовно впливає на кінцевий результат.

З того часу, як Маршалл та ін. уперше запропонували пояснення початкової оборотної фази в термінах даної теорії, класична теорія ДЛФО використовувалась як модель якісного, а в деяких випадках кількісного шляху вичислення зміни вільної енергії для того, щоб пояснити мікробну адгезію.

Коротко кажучи, теорія ДЛФО використовується, щоб описати мережеву взаємодію між клітиною і плоскою твердою поверхнею, як баланс між взаємодіями притягування та відштовхування. Ця теорія розглядає

клітини з абсолютно сферичною гладкою поверхнею, яка, фактично, не існує. Такий підхід приводить до трактування мікроорганізмів як живих колоїдів, ігноруючи специфічну роль бактеріальних молекул та структур, як наприклад пілі, компоненти клітинних стінок, матеріал мембрани і ліпополісахариди (ЛПС), які вважаються такими, що мають специфічне значення на пізніших стадіях адгезії і особливо в утворенні біоплівки (цілісного адгезованого мікробного середовища). При теперішньому стані можливостей стає ясным, що критичний крок для утворення біоплівки - безповоротний крок прикріплення, тобто, другий крок в рамках моделі Маршала [7]. Цей крок, вочевидь, критично пов'язаний із специфічними зовнішніми макромолекулами, відповідальними за адгезійну активність мікроорганізмів, так званими адгезинами [8].

Розширена теорія ДЛФО, запропонована в роботах [9,12], використовує компоненти обох моделей і включає гідрофобні/гідратаційні ефекти, на додаток до класичних Ван-дер-ваальсових і електростатичних взаємодій. У деяких випадках розширена теорія ДЛФО якісно передбачає експериментальні адгезійні результати краще, ніж класична теорія ДЛФО і термодинамічний підхід окремо.

Отже, як і для еукаріотичних клітин, так і для мікроорганізмів адгезія – ускладнений процес, на який впливають багато чинників, у тому числі деякі властивості самих клітин (гідрофобність, поверхневий заряд, специфічні адгезини, чинники вірулентності, і т.п.), матеріал поверхні об'єкту (хімічний склад, нерівності, змочуваність і т.п.), і зовнішні чинники (температура, час експозиції, кількість клітин, присутність антибіотиків, хімічні речовини, і т.п.). Значення рН середовища може впливати на адгезію у декількох аспектах. Сумарний поверхневий заряд визначається складовими клітинної стінки. За різних значень рН поверхневі хімічні групи, наприклад, карбоксильні, гідроксильні і фосфатні групи, зазнають різного рівня протонування, що впливає на заряд поверхні [137,151]. Більшість ліній лактобактерій мають ізоелектричну точку зазвичай між 3 і 4,5 [137,152] і в

деяких випадках навіть нижче 2 [151,155], що є за межами дослідженого нами діапазону.

Гідрофобність поверхні бактерій є важливим фізичним чинником для адгезії, особливо коли субстрати поверхні є або гідрофільними, або гідрофобними. Гідрофобність бактерій можна отримати контактними кутовими вимірами, такими як метод краплі, яка покоїться; оцінка здатності бактерій прилипати до гексадекану, вуглеводню, або полістиролу; поділ бактерій у водній двофазній системі; сольовий агрегаційний тест; або гідрофобна хроматографія. Гідрофобність бактерії варіюється в залежності від виду бактерій і залежить від середовища росту, віку, і бактеріальної поверхневої структури. Як правило, бактерії з гідрофобними властивостями віддають перевагу гідрофобній поверхні матеріалів; а ті, які мають гідрофільні характеристики, віддають перевагу гідрофільній поверхні, також гідрофобні бактерії прикріплюються більшою мірою, ніж гідрофільні [13].

У нашому випадку двох різних клітинних поверхонь ситуація ще більше ускладнюється, оскільки зміни на обох поверхнях будуть впливати на результат адгезії. Було показано, що початкові коефіцієнти швидкості десорбції *S. thermophilus*, що прикріплювались до скляної поверхні, були вищі для експериментів, що здійснювались за рН 2, ніж для експериментів за рН 7, тобто прикріплення мікроорганізмів *S. thermophilus* на початковій стадії було міцнішим за рН 7, ніж у кислому середовищі (рН 2). Ці дані були підтверджені також методом атомної силової мікроскопії [154].

Автори показали вплив різних чинників, таких як рН, нагрівання, метаперіодату, ферментів і двовалентних іонів на адгезію п'яти штамів молочнокислих бактерій (GK20, GK74, GK81, MLK27, MLK67). Обробка бактерій в кислому, нейтральному і лужному рН не так істотно ( $p < 0,05$ ) впливає на адгезію *L. plantarum* GK81 і *L. brevis* MLK27 штамів, показуючи, що бактеріальні клітинні структури, необхідні для адгезії, не були безповоротно порушені при екстремальних значеннях рН. Тим не менш, адгезія *L. acidophilus* GK20, *L. paracasei* GK74, і *P. pentosaceus* MLK67 була

значно ( $p < 0,05$ ) знижена після контакту при рН 2,0, хоча їх адгезія не змінилася в нейтральному і лужному рН середовищі. Ці результати можуть вказувати, що стійкість до низьких рН важлива не тільки для виживання, але і для адгезії. Гранато та ін. [156] показали, що, хоча рН може відігравати важливу роль у підвищенні адгезії лактобактерій, але це не єдиний фактор, який впливає на адгезію.

В роботі [114] вивчали адгезію клітин ВНК до різних полімерних поверхонь, що мають виміряні густини гідроксильних та карбоксильних груп. Досліджували вплив на клітинну адгезію блокування гідроксильних груп ацетилюванням і карбоксильних груп діазометаном. Було показано, що гідроксильні групи необхідні для адгезії клітин, проте їх дуже висока поверхнева густина зменшує клітинну адгезію, тобто існує певна оптимальна поверхнева густина ОН-груп для адгезії клітин ВНК. Карбоксильні групи у деякій мірі пригнічували клітинну адгезію, про що свідчило збільшення адгезії при блокуванні цих груп метилюванням.

З іншого боку рН середовища може впливати і на властивості адгезинів та рецепторів. Наприклад, в роботі [157] було показано, що очищений адгезин, виділений з *Bacteroides loeschei*, є основним протеїном з рІ між 7,4 і 8,0. Автори статті вважають, що адгезин впізнає ті ж сахари (N-ацетил-D-галактозамин, D-галактозамин, D галактоза,  $\beta$ -метил-D-галактозид, лактоза, D-фукоза) на прокаріотичних і еукаріотичних рецепторах, хоча природа цих рецепторів є, ймовірно, дуже різною. Бактеріальний рецептор, можливо, подібний до полісахариду клітинної стінки, тоді як рецептор еритроцита - ймовірно глікопротеїн або гліколіпід. Властивості виділеного адгезину залежали від рН середовища, і його здатність аглютинувати як еритроцити, так і стрептококи проявлялась лише у нейтральному середовищі з рН 6,8, і не проявлялась в кислому середовищі з рН 4,6.

У нашому випадку адгезія мікроорганізмів *S.thermophilus* на еритроцитах була також найбільшою за фізіологічних рН і зменшувалась при зміні рН як в кислий, так і в лужний бік.

Таким чином, проведені дослідження свідчать про те, що характер залежності адгезії мікроорганізмів *S.thermophilus* на еритроцитах людини від рН узгоджується з даними інших авторів і може бути наслідком впливу рН, як на першій, так і на другій стадії адгезійного процесу.

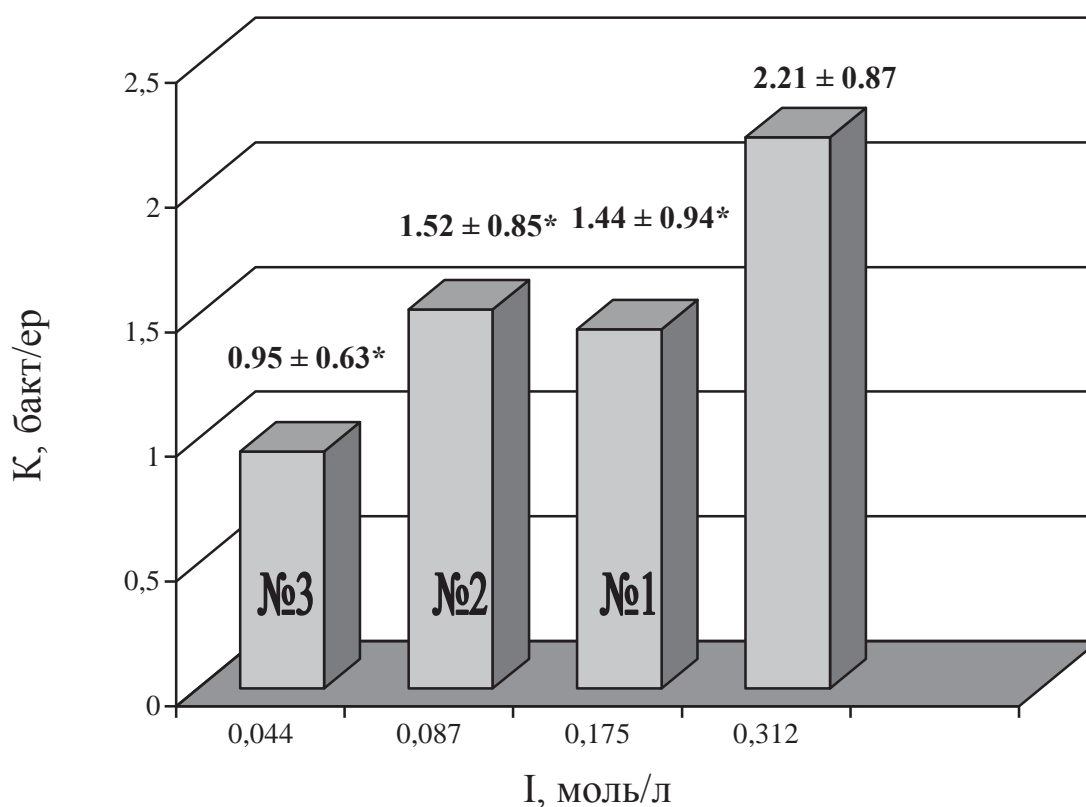
### **3.2. Вплив іонної сили середовища на адгезію *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини**

Мікробна адгезія до поверхонь людських тканин - важливий крок у інфекційному патогенезі. Клітини ссавців, покриті щільним глікокаліксом, що складається з гліколіпідів, глікопротеїнів і протеогліканів. Багато з цих глікосполук містять гліканові ланцюги, що закінчуються сіаловими кислотами. Внаслідок формування "покриття" з глікокаліксу, сіалові кислоти розпізнаються і використовуються як місця прикріплення великої кількості і широкої різноманітності мікробних патогенів і їх токсинів. Багато білків різних патогенів, що зв'язуються з сіаловими кислотами, були добре охарактеризовані і загалом показують високу специфічність для різних видів сіалових кислот і/або їх зв'язків до гліканових ланцюгів, що лежать в основі [6]. Отже, рецептори адгезинів - це зазвичай вуглеводневі частини поверхнево експонованих глікопротеїнів або гліколіпідів, часто ковалентно приєднаних до мембранних білків епітеліальних клітин, які знаходяться в цільовій тканині або органі. Ці ж самі вуглеводні частини рецепторів часто знаходяться в таких же глікосполуках, білках, або сіалоглікопротеїнах клітинних мембран в інших місцях, окрім цільової тканини або органу. Наприклад, еритроцити демонструють величезну різноманітність складних глікопротеїнів, глікосфінголіпідів і гангліозидів, які ідентичні або близькі до рецепторів адгезину на епітеліальних клітинах.

Важливим чинником, що впливає на адгезивні процеси, є фізико-хімічні характеристики середовища, зокрема присутність в ньому одно- та двохвалентних катіонів.

Метою даного етапу роботи було дослідження залежності адгезії мікроорганізмів *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини від іонної сили середовища.

На рис. 3.2 подано результати визначення показника адгезії в розчинах з різною іонною силою.



Примітка: \* - дані вірогідно відрізняються від даних для контролю,  $p < 0,001$

Рис. 3.2. Показник адгезії бактеріальних клітин *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини в залежності від іонної сили середовища. Склад середовищ наведений у розділі 2.2.2.

Як видно з представлених результатів показник адгезії найбільший у фізіологічному сольовому розчині. Зменшення іонної сили середовища призводить до вірогідного зменшення адгезії, показник адгезії при цьому є найменшим в середовищі з мінімальною дослідженою іонною силою (розчин №3). Значення показника адгезії у цьому середовищі вірогідно відрізняється від таких у всіх інших досліджених середовищах.

Прогностична цінність теорії ДЛФО була показана в низці лабораторних досліджень, де стискання подвійного шару шляхом збільшення концентрації електроліту в діапазоні від 0 до приблизно 0,1-0,2 М викликає збільшення бактеріальної адгезії [7,69]. При збільшенні цієї концентрації збільшення іонної сили або збільшує або знижує адгезію [69].

Тим не менш, є кілька досліджень, де зміна іонної сили не дає результатів, передбачених теорією ДЛФО. Вивчення деяких видів бактерій, прикріплених до гідрофобного і гідрофільного полістиролу не показали кореляцію зі зміною концентрації електролітів (0,01-0,1 М NaCl або  $MgCl_2$ ) [158]. В іншому дослідженні було показано, що навіть при тому, що кількість необоротно прикріплених *Escherichia coli* HCB1 клітин збільшується при високій іонній силі, в інтервалі 0,006-0,0202 М, час, проведений поблизу поверхні не був збільшений відповідно до розрахованої глибини вторинного мінімуму (від  $-3 \text{ } kT$  при 18,9 нм до  $-16 \text{ } kT$  при 2,7 нм на бактерію в двох концентраціях електроліту, відповідно) [69]. Фундаментальний сенс теплової енергії  $kT$  пов'язаний з розподілом молекул між різними енергетичними рівнями системи. Величина  $kT$  також часто використовується як приблизна оцінка сили взаємодії - мається на увазі, що якщо енергія взаємодії перевищує  $kT$ , то вона домінує над протидіючим дезорганізуючим ефектом теплового руху.

Повна енергія взаємодії Гіббса в теорії ДЛФО інтерпретується як сума притягання за рахунок сил Ліфшица-Ван дер Ваальса і електростатичного внеску через перекриття електричного подвійного шару. Підвищення

концентрації електроліту призводить або до зниження електростатичного потенціалу поверхні внаслідок адсорбції протиіонів, або до стискання дифузного іонного шару, або до того та іншого одночасно, що у будь-якому випадку супроводжується зниженням бар'єра відштовхування. При досягненні певної концентрації електроліту сили притягання стають домінуючими на всіх відстанях [9], що збільшує імовірність адгезії.

Розрахунки електростатичної взаємодії у суміші часток різної природи у розчинах електролітів пов'язані з більшими труднощами, ніж аналогічні розрахунки для однакових поверхонь розділу. Методом графічного дослідження електростатичної взаємодії неоднакових поверхонь [9] (метод ізодинамічних кривих) показано, що при взаємодії двох однойменно, але не однаково заряджених поверхонь їх відштовхування проходить через максимум (енергетичний бар'єр) при стоншенні прошарку і змінюється на притягання. Величина максимального відштовхування при цьому визначається значенням тільки меншого з потенціалів часток. Взагалі, бактеріальна поверхня і поверхня еритроцитів негативно заряджені, тому електростатичний внесок є відштовхувальний. В залежності від концентрації електроліту в оточуючому середовищі можна розрізнити три різні ситуації:

(i) за низьких концентраціях електроліту, коли подвійні шари розширені, необхідно подолати великий бар'єр енергії Гіббса, щоб досягти тісного контакту між двома поверхнями, отже, бактеріальна клітина фактично відштовхується від поверхні;

(ii) за проміжних концентрацій електроліту може формуватись (малий) вторинний потенціальний мінімум на деякій розділювальній відстані (зазвичай 5-20 нм), де мікроорганізм може захоплюватись оборотним чином;

(iii) за високих концентрацій електроліту електростатичний внесок значно зменшується, і результуюча електростатична взаємодія є притягальною на усіх розділювальних відстанях [9,157]. В роботі [50] експериментально показано, що  $\zeta$ -потенціал мікроорганізмів *S. oralis*

зменшувався за абсолютною величиною від -20 мВ у 2 мМ KCl до -10 мВ у 100 мМ KCl. При цьому основне зменшення  $\zeta$ -потенціалу відбувається до концентрації 60 мМ, при досягненні якої крива зміни  $\zeta$ -потенціалу виходить на плато. Кількість адгезованих мікроорганізмів *S. oralis* була більшою у 50 мМ KCl, ніж у 15 мМ KCl, та зменшувалась у 250 мМ KCl.

У розширеній теорії ДЛФО для описання початкової стадії адгезії крім електростатичних та дисперсійних взаємодій розглядають також так звані структурні сили (гідрофобні/гідратаційні ефекти). Було показано, що у розчинах з низькою іонною силою спостерігається задовільне узгодження з теоретичними оцінками за теорією ДЛФО. Проте у розчинах з концентрацією більше за 0,1 моль/л виявились додаткові сили, що не враховувались теорією. Ці сили не зникали ні в точці нульового заряду, ні при подальшому збільшенні концентрації електроліту. Структурні сили виявляються при товщині прошарку  $h \leq 70-80 \text{ \AA}$ , коли в силу їх більш різкого експоненціального росту при зменшенні прошарку вони починають давати все більший внесок. Сили структурного відштовхування в діапазоні малих відстаней зазнають різкого експоненціального росту з характерною довжиною порядку  $10 \text{ \AA}$ . При цьому для прошарків товщиною  $h < 50 \text{ \AA}$  підвищення концентрації 1-1 електроліту до 0,01 моль/л мало впливає на структурні сили, а за більшої концентрації граничні шари води починають інтенсивно руйнуватись. На відстані  $h > 50 \text{ \AA}$  також спостерігаються відмінності у спаді структурних сил, вони виявляються більш далекодіючими у розчинах з низькою іонною силою, тобто підвищення концентрації електроліту зменшує радіус дії відштовхуючих структурних сил і приводить до більш різкого їх спаду [9].

Присутність регулярно упорядкованої, плоскої матриці білкових субодиниць (S-шару) у віддалені від центру поверхні деяких ліній лактобактерій означає вірогідну роль S-шарів в адгезії. Показано, що S-шари *Lactobacillus subsp.*, наприклад, взаємодіють з рецепторами на епітеліальних клітинах хазяїна, блокуючи сайти рецепторів на слизових поверхнях для

адгезії патогенних різновидів [159]. Для деяких мікроорганізмів показано також вплив іонної сили суспензійного розчину на гідрофобність клітинної поверхні. У роботі [160] показано, що лінії з білком поверхневого шару (SLP) не обов'язково адгезують краще до гідрофобної підкладки, ніж лінії без SLP, і реверсія (повна зміна) гідрофобності клітинної поверхні була зареєстрована як для *L. acidophilus* ATCC4356, так і для *L. casei* ATCC393 при збільшенні іонної сили.

Автори роботи [154] показали, що лінії лактобактерій з SLP були гідрофобними в 10mM розчині KCl і ставали більш гідрофільними у 100 mM розчині, тоді як лінії без SLP були гідрофільними в 10mM і ставали гідрофобними в 100mM розчині KCl. Хоча не відомо, чи тільки варіації в іонній силі можуть викликати зміни гідрофобності клітинної поверхні чи, може, близькість гідрофільних або гідрофобних поверхонь може викликати такі зміни також. Очевидно, що така динамічна поведінка клітинної поверхні перешкоджає прямому застосуванню як теорії ДЛФО, так і термодинамічного підходу.

Проте, термодинамічна перевага ліній для адгезії до гідрофобних підкладок (субстратів) конкурує з вищою початковою швидкістю зміщення до гідрофобних підкладок. У недавній роботі [161] спостерігали, що культури лінії *L. casei* ATCC393, вирощені за гіперосмотичних умов, демонструють значно вищу гідрофобність, ніж контрольні культури, які були швидше гідрофільними. Було запропоновано, що H3DG і AcylH3DG гліколіпіди, які присутні в мембранній плівці, мають відношення до збільшення гідрофобності клітинної поверхні, викликаного зовнішньою іонною силою середовища. З цих досліджень було зроблено висновок, що клітинні поверхні лактобактерій можуть пристосовувати гідрофобність клітинної поверхні у відповідь на зміни оточуючого середовища з вірогідним потенційним впливом на їх адгезійні властивості.

Автори роботи [146] показують, що здатність *L. Acidophilus* ATCC4356 і *L. casei* ATCC393 з і без SLP відповідно, адгезувати до гідрофобних і

гідрофільних субстратів є подібною у середовищах з низькою і високою іонною силою. Так, при 10mM іонній силі обидві лінії показали нижчу початкову швидкість прикріплення до гідрофільних субстратів.

Таким чином, проведені дослідження показали, що характер залежності адгезії мікроорганізмів *S.thermophilus* на еритроцитах людини від іонної сили суспензійного розчину узгоджується з положеннями розширеної ДЛФО теорії. Такі результати свідчать про те, що перша стадія відіграє важливу роль у перебігу процесу адгезії і впливає на можливість здійснення другого етапу.

### **3.3. Вплив двовалентних катіонів $\text{Ca}^{2+}$ та $\text{Mg}^{2+}$ на адгезію *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини**

Дані по дослідженню впливу іонів  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Mg}^{2+}$  подані на рис. 3.3. Результати експериментів показали, що присутність двохвалентних катіонів ( $\text{Ca}^{2+}$  або  $\text{Mg}^{2+}$ ) вірогідно зменшує кількість адгезованих бактеріальних клітин *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини. В той же час при варіюванні концентрації цих катіонів у досліджених межах, близьких до фізіологічних, показник адгезії вірогідно не змінюється. Немає також вірогідної різниці між показниками адгезії при додаванні  $\text{Ca}^{2+}$  або  $\text{Mg}^{2+}$ .

Теорія ДЛФО не передбачає значних змін характеру розподілу електростатичного потенціалу поверхні навіть при повній заміні у розчинах електроліту одновалентних катіонів на двовалентні за однакової іонної сили, зменшується лише довжина дифузного шару протиіонів ( $1/\kappa$ , де  $\kappa$  - обернена дебаївська довжина).

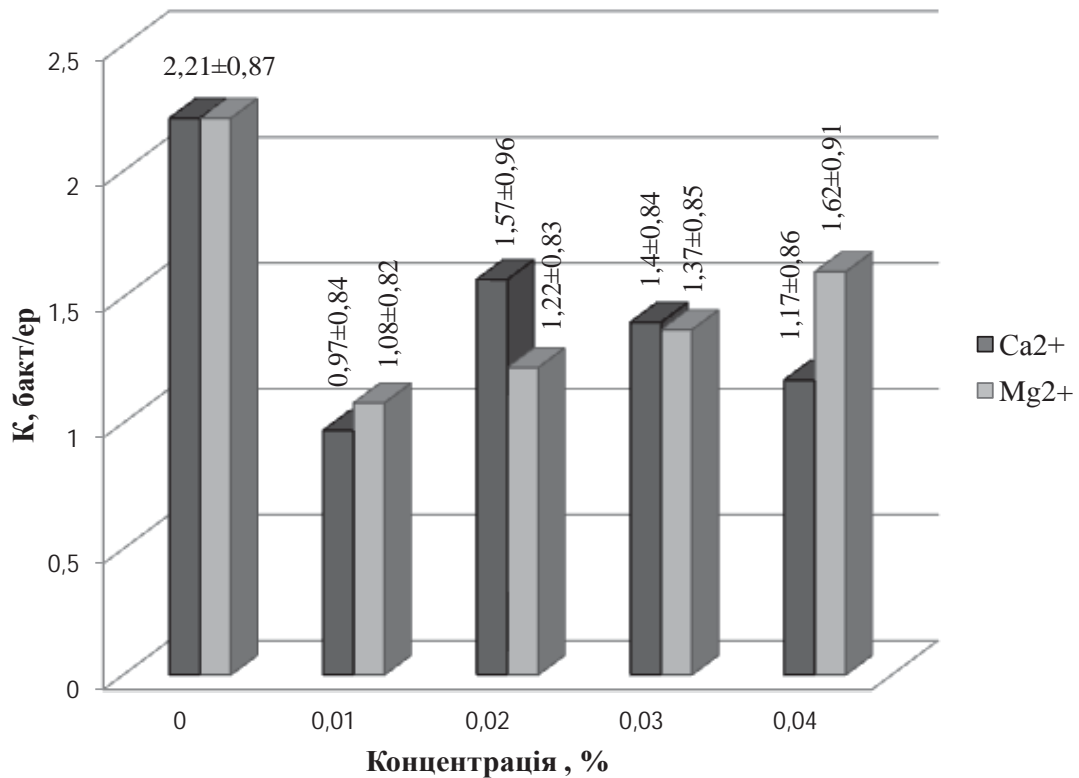


Рис. 3.3. Показник адгезії бактеріальних клітин *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини в залежності від концентрації іонів Ca<sup>2+</sup> та Mg<sup>2+</sup> в середовищі інкубації

У випадку 1-1 електроліта:

$$\kappa^2 = 8\pi e^2 n_1 / \epsilon kT, \quad (3.1)$$

у випадку 2-1 електроліта:

$$\kappa^2 = 24\pi e^2 n_2 / \epsilon kT \quad (3.2)$$

де  $\epsilon$  - діелектрична проникність середовища,  $e$  – елементарний заряд,  $n_1$  та  $n_2$  – концентрація іона [9], що повинно було б привести до полегшення адгезії. Враховуючи, що використані нами близькі до фізіологічних концентрації

двовалентних катіонів  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Mg}^{2+}$  були значно меншими за концентрацію  $\text{Na}^+$  і несуттєво впливали на іонну силу розчину та протяжність дифузного шару протиіонів, можна вважати, що електростатична складова взаємодії поверхонь при цьому суттєво не змінювалась. Що стосується структурної складової взаємодії поверхонь, то, як уже зазначено вище, збільшення концентрації електролітів зменшує радіус дії відштовхуючих структурних сил і приводить до більш різкого їх спаду, що також повинно полегшити адгезію.

Проте, отримані результати демонструють значний вплив двовалентних катіонів на показник адгезії у напрямку його зменшення. Такий результат можна пояснити впливом двовалентних катіонів на другому (необоротному) етапі адгезійного процесу. Двовалентні катіони можуть, зокрема, взаємодіяти з рецепторами, блокуючи їх доступність для взаємодії з лігандами. Електростатичні взаємодії важливі для молекулярних процесів розпізнавання, у тому числі  $\text{Ca}^{2+}$ - зв'язування і клітинної адгезії. Значна кількість великих білків, залучених у взаємодію клітина-поверхня і клітина-клітина містять кальцій-зв'язуючі домени [163-165].

$\text{Ca}^{2+}$ -залежні білки клітинної адгезії як, наприклад, кадгерини формують гомофільні димери від різних клітин, які є важливими для розвитку багатоклітинних організмів, і є передумовою для підтримки цілісності тканини, стабілізуючи міжклітинні контакти [166]. Існують і незалежні від  $\text{Ca}^{2+}$  білки клітинної адгезії, як, наприклад, CD2, експресовані у більшості Т-клітин людини. Вони ініціюють і підтримують контакти з антиген-несучими або цільовими клітинами і відіграють важливу роль в передачі сигналів [167-169]. Мембрано-периферичний імуноглобулін-подібний домен CD2 відповідальний за молекулярне розпізнавання і має топологію, подібну до  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної молекули клітинної адгезії кадгерину [170].

Фізіологічний партнер зв'язування для CD2 є CD48 у гризунів і CD58 у людей. Приблизно 35% і 70%, відповідно, із поверхневих залишків у

щурячих і людських CD2 ліганд-зв'язуючих сайтів заряджені, у порівнянні з 19% для середньої величини експонованих у розчин поверхневих білків [171]. Було показано, що мутації з реверсією поверхневих зарядів призводять до слабкого зв'язування або втрати зв'язування з CD48 [169]. Здатність до зв'язування ліганда відновлюється, якщо є комплементарна реверсія заряду на CD48 поверхні; це передбачає важливість електростатичної складової для їх взаємодії [172]. Електростатичні взаємодії також важливі для  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язування.  $\text{Ca}^{2+}$  в основному хелатується атомами кисню від бічних ланцюгів Asp, Glu, Asn, карбонілами головного ланцюга і розчинником [173]. Високий відсоток заряджених залишків ліганда спостерігається у природних  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючих сайтів [174]. Спостережувана сильна перевага Asp і Glu у природно створених  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючих білках узгоджується з електростатичною природою  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язування, оскільки майже усі зв'язуючі сайти досліджені до сьогодні мають щонайменше два негативно заряджених залишки ліганда. Велике число заряджених залишків на клітинній адгезійній поверхні, на додаток до компліментарності форми, є найголовнішим для цільової специфічності [172].

Показано, що кальцій може регулювати утворення біоплівки у протилежних напрямках у різних бактерій. Дослідження показали, що збільшення кількості кальцію блокує утворення біоплівки і міжклітинну адгезію *Staphylococcus aureus* для ліній, де присутній великий адгезин *Var* [164]. Цей білок містить чотири кальцій-зв'язуючих елемента, при їх мутації пригнічуючий ефект  $\text{Ca}^{2+}$  втрачається. Є дані, що вказують на негативний вплив кальцію на функції *LapA* - головного адгезину *Pseudomonas fluorescens*. Вплив кальцію в *Pseudomonas putida* на прикріплення опосередковане тим же великим адгезином *LapA* є також негативним [175]. З іншого боку, кальцій сприяє утворенню біоплівки у інших мікроорганізмів, як, наприклад, *Xylophilus fastidiosa* або *Vibrio vulnificus* [176,177]. Його потенційно пряме під'єднання до поверхні білка було досліджено на *Shewanella oneidensis*, де присутність

кальцію в межах певного концентраційного діапазону сприяє утворенню біоплівки, опосередкованому поверхневим білком *BfpA* [178].

Показано, що деякі інтегрини активуються приєднанням іншого двовалентного катіону -  $Mg^{2+}$ , який зв'язується на залежному від іона металу адгезійному сайті (MIDAS) в домені інтегрину A [179]. Ця взаємодія стабілізує домен у високо-спорідненому стані, який відрізняється від пасивного низько-спорідненого стану змінами третинної структури в домені, що завершується клітинною адгезією.

З двох двовалентних катіонів  $Mg^{2+}$  і  $Ca^{2+}$ , яких більш ніж достатньо у периферійній крові, восьмигранне оточення біля MIDAS ідеально задовольняє вимогам для закріплення  $Mg^{2+}$  [180]. Було показано, що пристосування більшого за розмірами іона  $Ca^{2+}$  (іонний радіус  $1.0\text{\AA}$ ) у порівнянні з  $Mg^{2+}$  (іонний радіус  $0.72\text{\AA}$ ) [181] у восьмигранному оточенні MIDAS є термодинамічно несприятливим і призводило би до істотної структурної перебудови оточення і в зменшенні спорідненості для природних лігандів [182].

Отримані нами результати впливу  $Ca^{2+}$  і  $Mg^{2+}$  на адгезію *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини вказують на те, що адгезивні молекули, що беруть участь в даному процесі, не є  $Ca^{2+}$ - або  $Mg^{2+}$ -залежними, тобто не активуються цими катіонами. Про це свідчить однаковий негативний вплив цих катіонів на адгезію. Отриманий результат є, видимо, наслідком нівелювання зарядів лігандів та/або рецепторів в результаті взаємодії з двовалентними катіонами. Отже, можна висловити припущення, що двовалентні катіони  $Mg^{2+}$  і  $Ca^{2+}$  у дослідженому фізіологічному діапазоні скоріше за все впливають на другу, необоротну стадію адгезивного процесу, впливаючи на заряд адгезивних молекул.

## РОЗДІЛ 4

### ВПЛИВ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК СЕРЕДОВИЩА НА ПОВЕРХНЕВИЙ ЗАРЯД ЕРИТРОЦИТІВ І ЛАКТОБАКТЕРІЙ *S.THERMOPHILUS* ТА ЇХ АДГЕЗІЙНУ ВЗАЄМОДІЮ

#### 4.1. Вплив рН та іонної сили середовища на поверхневий заряд еритроцитів та лактобактерій *S.thermophilus*

За умов фізіологічних рН та іонної сили еритроцити багатьох тваринних різновидів виявляють негативну електрофоретичну рухливість [183], і отже мають негативний поверхневий заряд. Спроби описати цей поверхневий заряд на молекулярному рівні були зроблені з вивчень електрофоретичної рухливості при зміні умов рН та іонної сили [184,185]. Автори [186] знайшли, що ізоелектрична точка еритроцитів знаходиться біля рН 2.0, і приписали його негативний поверхневий характер до фосфорнокислих груп цефалінів. У роботі [187] було показано, що всі сіалові кислоти еритроцитів декількох тваринних різновидів знаходяться на мембранній поверхні, і від 95 до 100% цих кислот можуть бути видалені дією нейромінідази. Очевидно, що для еритроцитів більшості різновидів негативний поверхневий заряд передусім забезпечується карбоксильними групами сіалових кислот, а не фосфатними групами фосфоліпідів.

Зміни поверхневого заряду еритроцитів в залежності від фізико-хімічних чинників середовища мало вивчені, що викликає необхідність більш детального дослідження впливу параметрів оточуючого середовища на поверхневий заряд еритроцитів.

Метою даного етапу роботи було дослідження залежності поверхневого заряду еритроцитів людини та лактобактерій *S.thermophilus* від рН та іонної сили середовища.

Дані по дослідженню впливу рН та іонної сили подані в табл. 4.1,4.2.

Таблиця 4.1

Показник адгезії бактеріальних клітин *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини та зв'язування Alcian Blue клітинами в залежності від рН середовища

рН	К, бакт/ер	Кількість зв'язаного АС	
		еритроцитами, нг/10 <sup>6</sup> ер.	лактобактеріями, нг/10 <sup>6</sup> <i>S.thermophilus</i>
5,8	0,71±0,49*	218,0±7,5	444,3±11,7
6,6	1,67±0,56*	211,1±9,8	453,2±11,3
7,4(контроль)	2,21±0,87	220,8±4,0	444,1±8,7
8,0	1,60±0,74*	227,3±6,9	449,8±9,8

Примітка: \* - дані вірогідно відрізняються від даних для рН 7,4,  $p < 0,001$

Таблиця 4.2

Показник адгезії бактеріальних клітин *Streptococcus thermophilus* та зв'язування АС клітинами в залежності від іонної сили середовища

І, Моль/л	К, бакт/ер	Кількість зв'язаного АС	
		еритроцитами, нг/10 <sup>6</sup> ер.	лактобактеріями, нг/10 <sup>6</sup> <i>S.thermophilus</i>
0,312(контроль)	2,21±0,87	220,8±4,0	444,1±8,7
0,175	1,44±0,94*	228,2±7,7	438,4±9,6
0,087	1,52±0,85*	226,8±9,8	427,3±13,3
0,044	0,95±0,63*	226,8±9,3	438,4±8,8

Примітка: \* - дані вірогідно відрізняються від даних для контролю,  $p < 0,001$

Проведені дослідження показали, що зв'язування катіонного барвника АС з еритроцитами та лактобактеріями *S.thermophilus* вірогідно не змінювалось в дослідженому діапазоні змін рН розчину (5,8 – 8,0) та іонної сили (0,15 - 0,025 М NaCl ).

Для еритроцитів людини встановлено, що густина заряду мало варіює в широкому діапазоні іонної сили, а для даних рН і іонної сили рухливість інваріантна у багатьох видах буферів. З цих даних було зроблено висновок, що поверхневий заряд є наслідком головним чином фіксованих аніонних компонентів плазматичної мембрани, а не адсорбції аніонів.

#### **4.2. Вплив двовалентних катіонів $\text{Ca}^{2+}$ та $\text{Mg}^{2+}$ на поверхневий заряд еритроцитів і лактобактерій *S.thermophilus***

Електростатичні сили можуть впливати на початкову стадію бактеріальної адгезії, але вони також є важливими для молекулярних процесів розпізнавання, у тому числі  $\text{Ca}^{2+}$ - зв'язування і міжклітинної адгезії. Роль двовалентних катіонів, зокрема кальцію, у процесах життєдіяльності є дуже складною і не може бути зведена до примітивного односпрямованого впливу у тих чи інших процесах.  $\text{Ca}^{2+}$  регулює багато біологічних процесів через взаємодії з білками, що мають різні конформаційні, динамічні і метал-зв'язуючі властивості. Він, зокрема, впливає на багатоклітинну поведінку різних мікроорганізмів.

Значна кількість великих білків, залучених у взаємодію клітина - поверхня і клітина-клітина містять кальцій-зв'язуючі домени [163,164]. Кальцій пов'язаний з різноманітними біологічними процесами у бактеріях, але його роль, наприклад, у розвитку біоплівки є суперечливою. У роботі [163] показано, наприклад, що кальцій викликає прискорене утворення біоплівки *P.putida*, а також у інших мікроорганізмів, як наприклад *Xyella fastidiosa* [176] або *Vibrio vulnificus* [177]. У *Staphylococcus aureus*, навпаки,

$\text{Ca}^{2+}$  викликає пригнічення утворення біоплівки і міжклітинну адгезію для ліній, де присутній великий адгезин *Var*. Цей білок містить чотири кальцій-зв'язуючих елемента; при їх мутації пригнічуючий ефект  $\text{Ca}^{2+}$  втрачається [164]. Отже, кальцій, може регулювати утворення біоплівки у протилежних напрямках у різних бактерій, тобто як посилювати, так і послаблювати адгезійні процеси. Молекулярне підґрунтя його ролі залишається неясним.

Поверхневий заряд бактерій може бути ще одним важливим фізичним чинником для бактеріальної адгезії. Більшість часток здобувають електричний заряд в водній суспензії за рахунок іонізації їх поверхневих груп. Поверхневий заряд залучає іони протилежного заряду в середовищі і призводить до утворення подвійного електричного шару. Поверхневий заряд зазвичай характеризується ізоелектричною точкою, електрокінетичним потенціалом ( $\zeta$  потенціалом) або електрофоретичною рухливістю. Бактерії в водній суспензії завжди заряджені негативно. Високий поверхневий заряд супроводжується гідрофільним характером бактерій, але і гідрофобні бактерії можуть також мати достатньо високий поверхневий заряд. Поверхневий заряд бактерій варіюється в залежності від виду бактерій і залежить від середовища росту, віку, і бактеріальної поверхневої структури [13].

Автори роботи [188] вважають, що адгезія кисломолочних бактерій до кишкових поверхонь відбувається не в результаті специфічних механізмів зв'язків, як у випадку патогенних організмів, а в результаті механізмів слабких зв'язків, а в роботі [189] підкреслюється, що механізм, яким лактобактерії адгезують до кишкових клітин людини залишається невідомим. На їх думку дослідження механізму бактерійної адгезії дуже б полегшилось при використанні відповідної моделі клітинної культури. Ідеальним було би, якщо ізольовані ентероцити могли би бути використаними, але на жаль людська кишкова тканина не легкодоступна. Більше того, слабка життєздатність ізольованих ентероцитів людини і варіації між ентероцитами різних донорів дають підвищення варіабельності результатів при вивченні

бактерійної адгезії *in vitro*. Автори використовували кишкову клітинну лінію людини Caco-2, що є добре описаною клітинною моделлю, створеною від аденокарциноми товстої кишки людини.

Автори роботи [189] показали, що серед досліджених лактобактерій тільки *L. acidophilus* людини лінії LB, лінія ізолята курчати C2, лінії ізолята свині PA3 і PA19 і *L. casei* лінії GG мали високу кальцій-незалежну здатність до зв'язування з диференційованими клітинами Caco-2 в культурі. Здатність лактобацил приєднуватися до диференційованих клітин Caco-2 значно відрізняється у штамів *Lactobacillus*. Зокрема, результати показали, що серед двадцяти п'яти штамів *Lactobacillus* сім лактобактерій різного походження добре прикріплюються до клітин Caco-2. Те, що здатність лактобактерій адгезувати до диференційованих клітин Caco-2 значно варіює для різних ліній, показує, на думку авторів, що адгезійні властивості не є універсальною особливістю лактобактерій. Автори вважають, що адгезія лактобактерій до кишкових клітин, якій сприяють двовалентні катіони кальцію, відмінна від адгезії, що має місце у відсутності катіонів.

Ми запропонували просту і доступну модель адгезії лактобактерій на еритроцитах людини, яка ґрунтується на тому, що ті ж самі вуглеводні частини рецепторів, що і на цільових тканинах, які використовуються як місця прикріплення великої кількості і широкої різноманітності мікробних патогенів і їх токсинів, а також дружніх бактерій [6], часто знаходяться в таких же глікосполуках, білках, або сіалоглікопротеїнах клітинних мембран в інших місцях окрім цільової тканини або органу.

Спираючись на цю модель, ми дослідили вплив таких фізико-хімічних характеристик середовища, як рН та іонна сила, на адгезію лактобактерій *S. thermophilus* на еритроцитах людини [23]. Було показано, що вплив цих фізико-хімічних характеристик середовища на адгезію лактобактерій *S. thermophilus* на еритроцитах людини можна пояснити на підставі розширеної теорії Дерягіна-Ландау-Фервея-Овербека (ДЛФО) [63, 10-12]. Отримані результати свідчать про те, що перша стадія відіграє важливу роль

у перебігу процесу адгезії і впливає на можливість здійснення другого необоротного етапу.

В той же час результати досліджень щодо впливу двовалентних катіонів ( $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Mg}^{2+}$ ) на вказані процеси не могли бути пояснені в рамках цієї теорії. Для подальшого вивчення цього питання нами було проведено дослідження впливу двовалентних катіонів ( $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Mg}^{2+}$ ) на поверхневий заряд еритроцитів та лактобактерій *S. thermophilus* та їх адгезійну взаємодію.

На рисунках 4.1 і 4.2 подано результати зв'язування клітинами АС еритроцитів та лактобактерій *S.thermophilus* в залежності від концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  або  $\text{Mg}^{2+}$  в середовищі інкубації.

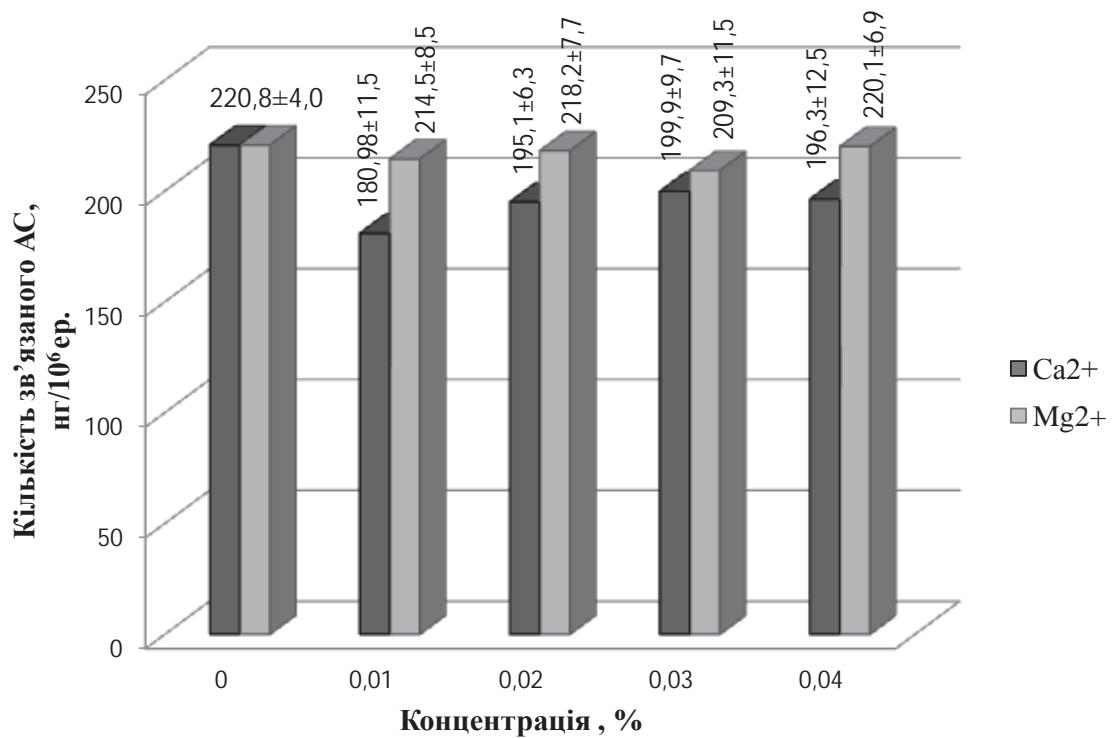


Рис. 4.1. Кількість зв'язаного АС з еритроцитами людини в залежності від концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  або  $\text{Mg}^{2+}$  в середовищі інкубації

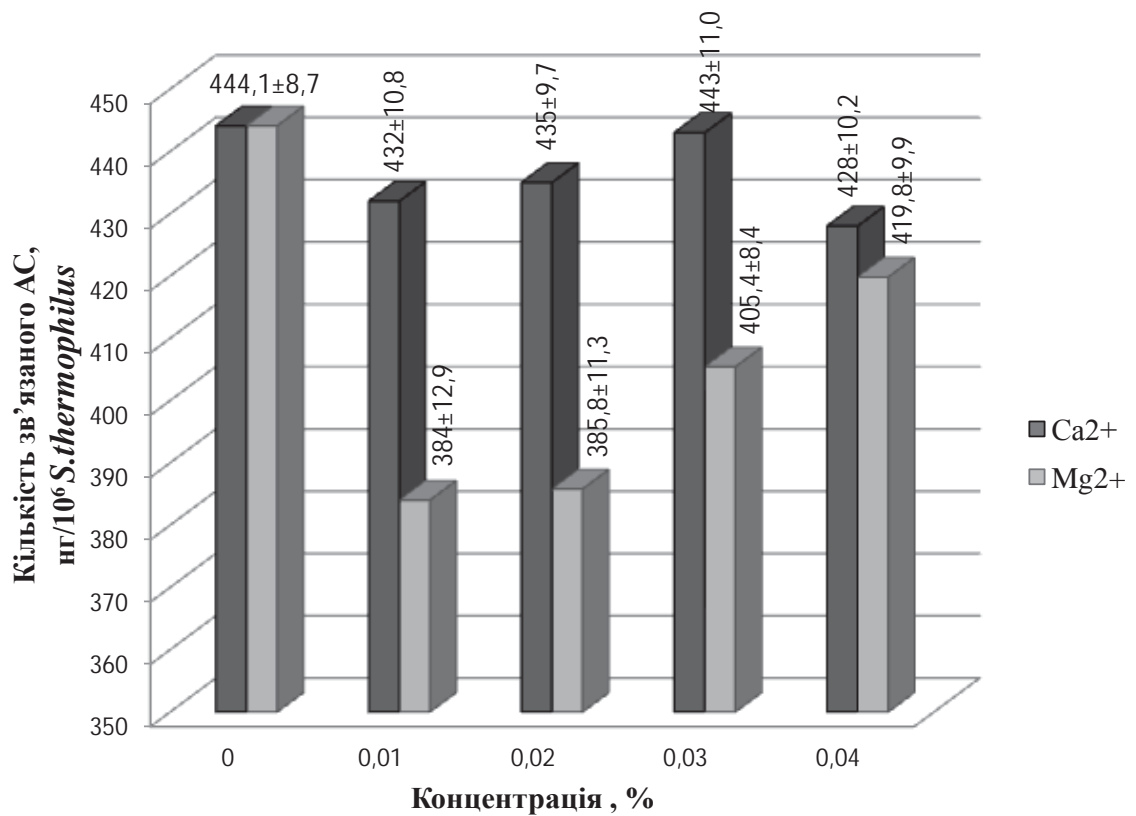


Рис. 4.2. Кількість зв'язаного АС з лактобактеріями *S. thermophilus* в залежності від концентрації іонів Ca<sup>2+</sup> або Mg<sup>2+</sup> в середовищі інкубації

В таблицях 4.3 і 4.4 подані результати показника адгезії бактеріальних клітин *S. thermophilus* на еритроцитах людини та зв'язування клітинами АС в залежності від концентрації певного типу іонів в середовищі інкубації.

Результати наших експериментів показали, що уведення в середовище фізіологічних концентрацій катіонів Ca<sup>2+</sup> призвело до вірогідного зменшення кількості АС, зв'язаного еритроцитами. При цьому зміни цієї характеристики корелюють зі змінами показника адгезії з коефіцієнтом кореляції  $r=0,935$  (Табл. 4.3., 2 та 3 стовпчики). В той же час, зв'язування АС з клітинами *S. thermophilus* вірогідно не змінювалось у дослідженому діапазоні концентрацій іонів Ca<sup>2+</sup> (Табл. 4.3., 4 стовпчик).

Дослідження впливу  $Mg^{2+}$  на зв'язування АС клітинами показало, що уведення в середовище цього іону вірогідно не змінювало кількість зв'язуваного барвника еритроцитами (Табл. 4.4., стовпчик 3), тоді як клітини *S.thermophilus* демонструють вірогідне зменшення кількості зв'язаного АС, що корелює зі змінами в адгезії з коефіцієнтом кореляції  $r=0,98$  (Табл. 4.4, 2 та 4 стовпчики).

Таблиця 4.3

Показник адгезії бактеріальних клітин *S. thermophilus* на еритроцитах людини та зв'язування клітинами АС в залежності від концентрації іонів  $Ca^{2+}$  в середовищі інкубації

[ $Ca^{2+}$ ], %	К, бакт/ер	кількість зв'язаного АС	
		еритроцитами, нг/10 <sup>6</sup> ер.	лактобактеріями, нг/10 <sup>6</sup> <i>S.thermophilus</i>
0,00 (контроль)	2,21±0,87	220,80±4,00	444,1±8,7
0,01	0,97±0,84*	180,98±11,50 <sup>+</sup>	432,0±10,8
0,02	1,57±0,96*	195,10±6,30 <sup>+</sup>	435,0±9,7
0,03	1,40±0,84*	199,90±9,70 <sup>+</sup>	443,0±11,0
0,04	1,17±0,86*	196,30±12,50 <sup>+</sup>	428,0±10,2

\* , <sup>+</sup> - дані вірогідно відрізняються від даних для контролю,  $p<0,01$

Отримані результати щодо впливу іонів  $Mg^{2+}$  узгоджуються з даними [17] про те, що  $MgCl_2$  не змінює прикріплення АС до еритроцитів.

Про різний вплив іонів кальцію та магнію на адгезію різних ліній лактобактерій повідомляється в роботі [190]. За даними цієї роботи

додавання  $\text{Ca}^{2+}$  призводило до істотного ( $p < 0,05$ ) підвищення адгезії ліній *L. acidophilus* GK20, *L. paracasei* GK74 і *P. pentosaceus* MLK67. Найбільший ефект спостерігався для *L. acidophilus* GK20 і *L. paracasei* GK74, для яких адгезія підвищувалась на 31,70% і 22,19% відповідно у порівнянні з контролем. Проте, адгезійна здатність *L. plantarum* GK81 і *L. brevis* MLK27 не відрізнялась від контролю при додаванні кальцію. Не спостерігалось істотної зміни в на адгезії усіх досліджених ліній при додаванні  $\text{Mg}^{2+}$  іонів.

Таблиця 4.4

Показник адгезії бактеріальних клітин *S. thermophilus* на еритроцитах людини та зв'язування клітинами АС в залежності від концентрації іонів  $\text{Mg}^{2+}$  в середовищі інкубації

[ $\text{Mg}^{2+}$ ], %	К, бакт/ер	кількість зв'язаного АС	
		еритроцитами, нг/10 <sup>6</sup> ер.	лактобактеріями нг/10 <sup>6</sup> <i>S.thermophilus</i>
0,00 (контроль)	2,21±0,87	220,8±4,0	444,1±8,7
0,01	1,08±0,82*	214,5±8,5	384,0±12,9 <sup>+</sup>
0,02	1,22±0,83*	218,2±7,7	385,8±11,3 <sup>+</sup>
0,03	1,37±0,85*	209,3±11,5	405,4±8,4 <sup>+</sup>
0,04	1,62±0,91*	220,1±6,9	419,8±9,9 <sup>+</sup>

\* , <sup>+</sup> - дані вірогідно відрізняються від даних для контролю ,  $p < 0,01$

Іони кальцію, як відомо, збільшують адгезію пробіотичних штамів до поверхні кишкових клітин і беруть участь в взаємодіях, таких як нейтралізація подвійного електричного шару між клітиною і поверхнею субстрату. Ці дані узгоджуються з даними Ларсен і співавт. [191], які показали, що додавання іонів кальцію значно збільшило адгезію тестованих

лактобацил до IPEC-J2 клітин; на відміну від іонів Mg, в присутності яких ніяких істотних змін в адгезії молочнокислих бактерій не спостерігалось [190].

Різний вплив  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Mg}^{2+}$  іонів на різні адгезійні молекули може бути пов'язаний з різним іонним радіусом цих молекул. Так, в роботі [179] було показано, що центральною особливістю взаємодії інтегрину CD11b/CD18 з фізіологічними лігандами є мономодальне зв'язування карбоксилата ліганду з  $\text{Mg}^{2+}$  іоном на залежному від іона металу адгезійному сайті (metal ion-dependent adhesion site – MIDAS) в А-домені інтегрину. Ця взаємодія стабілізує А-домен у високо-спорідненому стані, який відрізняється від пасивного низько-спорідненого стану змінами третинної структури в домені, що завершується клітинною адгезією.

Кальцій пов'язаний з різноманітними біологічними процесами у бактерій [163], але його роль в розвитку біоплівки є, певною мірою, спірною. Автори роботи [164] показали, що збільшення кількості кальцію блокує Вар-опосередковані утворення біоплівки і міжклітинну адгезію *Staphylococcus aureus*. Проте, у деяких джерелах літератури вказано, що кальцій сприяє утворенню біоплівки у інших мікроорганізмів, як наприклад у *Xylophilus fastidiosa* або *Vibrio vulnificus* [163,177]. Отже, кальцій, може регулювати утворення біоплівки у протилежних напрямках у різних бактерій. Його потенційно пряме під'єднання до поверхні білка було досліджено на *Shewanella oneidensis*, де присутність кальцію в межах певного концентраційного діапазону сприяє утворенню біоплівки, опосередкованому Вар-пов'язаним поверхневим білком VfrA [178]. На відміну від цього, недавні дані вказують на негативний вплив кальцію на функції LapA - головного адгезину *Pseudomonas fluorescens* [175]. Цей вплив був непрямим, через активність протеази LapG, яка регулюється кальцієм.

Отримані результати щодо впливу двовалентних катіонів на поверхневий заряд клітин свідчать про те, що, незважаючи на зовнішньо схожий односпрямований вплив катіонів  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Mg}^{2+}$  на адгезію лактобактерій

*S.thermophilus* на еритроцитах людини, причини такого впливу різняться. Якщо іони  $\text{Ca}^{2+}$  впливають на поверхневий заряд еритроцитів, не змінюючи його у *S.thermophilus*, то іони  $\text{Mg}^{2+}$ , навпаки впливають на поверхневий заряд лактобактерій та не змінюють його у еритроцитів. Цей результат підтверджує висловлену нами думку, що в даному випадку двовалентні катіони впливають на другу необоротну стадію адгезійного процесу, а не на фізичні взаємодії на першій оборотній стадії.

### **4.3. Роль електростатичних взаємодій у адгезії *S.thermophilus* на еритроцитах людини в середовищах з різною концентрацією 1:1 і 2:1 електролітів**

#### **4.3.1. Роль електростатичних взаємодій у адгезії *S.thermophilus* на еритроцитах людини в середовищах з різною концентрацією 1:1 електроліту**

Згідно теорії ДЛФО, в залежності від концентрації електроліту і густини поверхневого заряду енергія взаємодії може мати різну залежність від відстані між поверхнями. Не дивлячись на те, що термодинамічно рівноважним може бути знаходження часток в ближньому потенціальному мінімумі, енергетичний бар'єр може бути таким високим, що частки будуть не здатні подолати його за розумний час. В такому випадку частки (клітини) будуть або знаходитись в дальньому мінімумі, або роз'єднуються і залишаться диспергованими в розчині. Характерна відстань дальнього мінімуму у розчинах з концентраціями, близькими до фізіологічних, становить від 1 до 5 нм. Такі відстані цілком достатні для взаємодій між клітинами [63]. Таким чином, тривале знаходження взаємодіючих клітин в дальньому потенціальному мінімумі може привести до утворення зв'язку між адгезинами та лігандами.

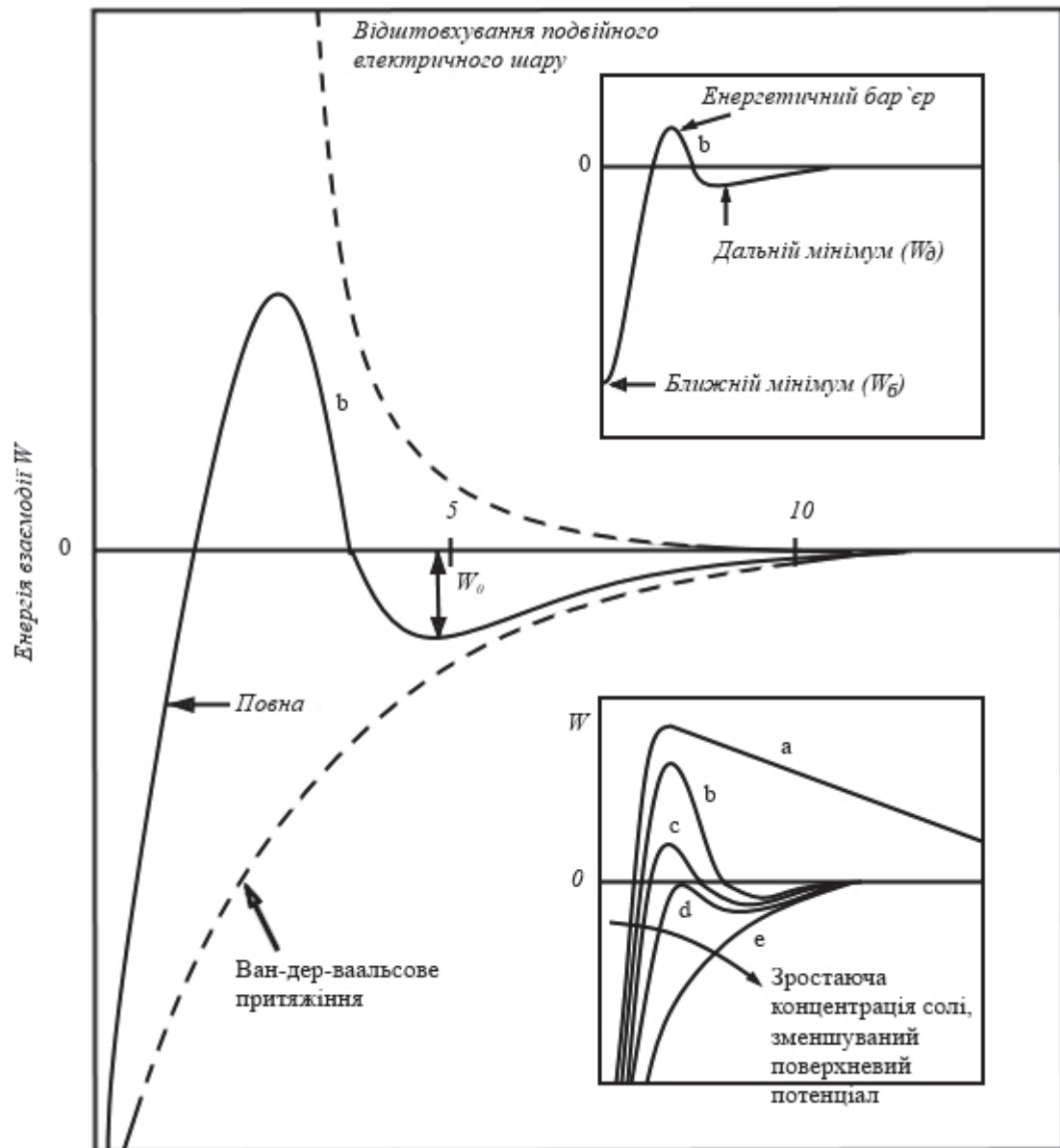


Рис. 4.3. Схематичні залежності енергії взаємодії ДЛФО від відстані [63].

(а) Поверхні сильно відштовхуються; малі колоїдні частки зберігають «стабільність». (b) Поверхні знаходяться у стійкій рівновазі в дальньому потенціальному мінімумі, якщо він достатньо глибокий; колоїди зберігають «кінетичну» стабільність. (c) Поверхні знаходяться в дальньому мінімумі; колоїди повільно коагулюють. (d) «Критична концентрація коагуляції». Поверхні залишаються в дальньому мінімумі або злипаються; колоїди швидко коагулюють; (e) Поверхні і колоїди швидко коалесцують.

Рівняння Пуассона-Больцмана визначає потенціал  $\varphi$ , електричне поле  $E = \frac{\partial \varphi}{\partial x}$  і концентрацію протиіонів  $\rho_i$  в будь-якій точці  $x$  між поверхнями [63]:

$$\frac{d^2 \varphi}{dx^2} = -\frac{ze\rho_i}{\varepsilon_0} = -\left(\frac{ze\rho_0}{\varepsilon_0}\right)e^{\frac{ze\varphi}{kT}} \quad (4.1)$$

де  $\varphi$  - електростатичний потенціал,  $\rho$  - числова густина іонів з валентністю  $z$  в точці  $x$  між поверхнями,  $\varepsilon_0$  - діелектрична проникність вакууму,  $\varepsilon$  - відносна діелектрична проникність середовища,  $k$  - стала Больцмана,  $T$  - абсолютна температура.

Густина протиіонів  $\rho_0$  на поверхні при цьому визначається за формулою [63]:

$$\rho_0 = \rho_\infty + \frac{\sigma^2}{2\varepsilon_0 kT} \quad (4.2)$$

де  $\rho_0$  - густина протиіонів на поверхні, а  $\rho_\infty$  - густина в об'ємному розчині.

За цією формулою концентрація протиіонів на поверхні залежить тільки від поверхневої густини заряду  $\sigma$  і концентрації протиіонів в об'ємному розчині. Отже, навіть для ізолюваної поверхні (тобто двох поверхонь, що знаходяться далеко одна від одної  $\rho_\infty \rightarrow 0$ ) величина  $\rho_0$  ніколи не може бути меншою за  $\frac{\sigma^2}{2\varepsilon_0 kT}$ .

Розглянемо розподіл іонів поблизу ізолюваної поверхні в контакті з розчином електроліту. Якщо записати повну густину заряду в будь-якій точці  $x$  як  $\sum_i z_i e \rho_{xi}$  а повну концентрацію іонів (числову густину) як  $\sum_i \rho_{xi}$ , то, розподіл Больцмана (1) для іонів  $i$  в точці  $x$  має вигляд

$$\rho_{xi} = \rho_{\infty i} e^{\frac{z_i e \varphi_x}{kT}}, \quad (4.3)$$

а на поверхні, при  $x=0$ , значення густини  $\rho_0$  і потенціалу  $\varphi_0$  зв'язані відношенням

$$\rho_{0i} = \rho_{\infty i} e^{\frac{z_i e \varphi_0}{kT}}, \quad (4.4)$$

де  $\rho_{\infty i}$  - концентрація  $i$ -тих іонів в об'ємі розчину (при  $x = \infty$ ), де  $\varphi_{\infty} = 0$ .

Наприклад, для розчину  $\text{Na}^+\text{Cl}^-$ , можна записати

$$\begin{aligned} [\text{Na}^+]_x &= [\text{Na}^+]_{\infty} e^{-\frac{e\varphi_x}{kT}} & [\text{Na}^+]_0 &= [\text{Na}^+]_{\infty} e^{-\frac{e\varphi_0}{kT}} \\ [\text{Cl}^-]_x &= [\text{Cl}^-]_{\infty} e^{+\frac{e\varphi_x}{kT}} & [\text{Cl}^-]_0 &= [\text{Cl}^-]_{\infty} e^{+\frac{e\varphi_0}{kT}} \end{aligned} \quad (4.5)$$

де величини у квадратних дужках, наприклад  $[\text{Na}^+]$ , виражені в деяких зручних одиницях концентрації, наприклад в М ( $1\text{М} = 1\text{моль/літр}$  і відповідає концентрації  $\rho = 6,022 \times 10^{26} \text{ м}^{-3}$ ).

Повна концентрація іонів біля ізолюваної поверхні з густиною заряду  $\sigma$  за формулою (4.2) становить:

$$\sum_i \rho_{0i} = \sum_i \rho_{\infty i} + \frac{\sigma^2}{2\epsilon_0 kT} \quad (4.6)$$

Звідки можна отримати наступне співвідношення:

$$\sigma^2 = 2\epsilon_0 kT \left( \sum_i \rho_{0i} - \sum_i \rho_{\infty i} \right) \quad (4.7)$$

Для еритроцитів густина поверхневого заряду  $\sigma = -1.31 \cdot 10^{-2} \text{ Кл/м}^2$  [192]. Або  $1.31 \cdot 10^{-2} \text{ Кл} \cdot \text{м}^{-2} / 1,602 \cdot 10^{-19} \text{ Кл} = 0,82 \cdot 10^{17} \text{ зар/м}^2 = 0,082 \text{ зар/нм}^2$ , тобто 1

елементарний заряд на  $12,2 \text{ нм}^2$ . Враховуючи, що площа поверхні еритроцита становить  $\sim 140 \cdot 10^{-12} \text{ м}^2$  (або  $14 \cdot 10^7 \text{ нм}^2$ ) маємо  $\sim 10^7$  зарядів на поверхні еритроцитів.

Для такої поверхневої густини заряду при  $37^\circ\text{C}$ , знаходимо

$$\frac{\sigma^2}{2\varepsilon_0 kT} = \frac{1716 \times 10^{-7}}{60647.775 \times 10^{-34}} = 0.0283 \times 10^{27} \text{ м}^{-3} = 0,047 \text{ М}.$$

Для 1,1-валентного електроліту, такого, як хлорид натрію, концентрація іонів на поверхні еритроцитів є

$$[Na^+]_0 + [Cl^-]_0 = 0.047 + [Na^+]_\infty + [Cl^-]_\infty = 0.047 + 2[Na^+]_\infty = 0.047 + 2[NaCl] \quad (4.8)$$

де  $[NaCl]$  – об’ємна молярна концентрація солі. На поверхні в основному знаходяться протиіони (тобто  $Na^+$ , якщо поверхня заряджена негативно) і їх надмірна концентрація на поверхні у порівнянні з розчином.

Співвідношення між густиною поверхневого заряду  $\sigma$  і поверхневим потенціалом  $\varphi_0$  для розчину  $NaCl$  отримуємо підставляючи рівняння (4.4) в (4.6):

$$\begin{aligned} \sigma^2 &= 2\varepsilon_0 kT \left( \sum_i \rho_{0i} - \sum_i \rho_{\infty i} \right) = 2\varepsilon_0 kT \left\{ [Na^+]_\infty e^{-\frac{e\varphi_0}{kT}} + [Cl^-]_\infty e^{+\frac{e\varphi_0}{kT}} - [Na^+]_\infty - [Cl^-]_\infty \right\} = \\ &= 2\varepsilon_0 kT \left\{ [Na^+]_\infty \left( e^{-\frac{e\varphi_0}{kT}} + e^{+\frac{e\varphi_0}{kT}} - 2 \right) \right\} = 2\varepsilon_0 kT \left\{ [NaCl] \times \left( e^{-\frac{e\varphi_0}{kT}} + e^{+\frac{e\varphi_0}{kT}} \right) - 2[NaCl] \right\} \end{aligned} \quad (4.9)$$

Підставляючи значення густини поверхневого заряду для еритроцитів людини  $\sigma = -1,31 \cdot 10^{-2}$  [192] маємо:

$$\sigma^2 = 2\varepsilon_0 kT [Na^+]_\infty \left( e^{-\frac{e\varphi_0}{kT}} + e^{+\frac{e\varphi_0}{kT}} - 2 \right) = (1.31 \times 10^{-2})^2$$

$$\begin{aligned}
\sigma^2 &= 1,7161 \times 10^{-4} = (60647.775 \times 10^{-34} \times 6.022 \times 10^{26}) [NaCl] \times \left( e^{-\frac{\varphi_0}{26.7}} + e^{+\frac{\varphi_0}{26.7}} - 2 \right) = \\
&= 3650220.9 \times 10^{-8} [NaCl] \left( e^{-\frac{\varphi_0}{26.7}} + e^{+\frac{\varphi_0}{26.7}} - 2 \right) = \\
&= 36.52 \times 10^{-4} [NaCl] \left( e^{-\frac{\varphi_0}{26.7}} + e^{+\frac{\varphi_0}{26.7}} \right) - 73.04 \times 10^{-4} \times [NaCl] \\
1,7161 \times 10^{-4} + 73,04 \times 10^{-4} \times [NaCl] &= 36.52 \times 10^{-4} \times 2 [NaCl] \times \frac{e^{-\frac{\varphi_0}{26.7}} + e^{+\frac{\varphi_0}{26.7}}}{2} = \\
&= 73.04 \times 10^{-4} \times [NaCl] \times \cosh \frac{\varphi_0}{26.7}
\end{aligned}$$

$$\cosh \frac{\varphi_0}{26.7} = \frac{1.7161 + 73.04 \times [NaCl]}{73.04 \times [NaCl]} \quad (4.10)$$

Концентрації NaCl в наших експериментах щодо впливу іонної сили на показник адгезії становили: 0,15 М, 0,1М, 0,05М, 0,025М. Для цих концентрацій маємо:

- для 0,15 М NaCl:

$$\cosh \frac{\varphi_0}{26.7} = \frac{1.7161 + 73.04 \times [0.15]}{73.04 \times [0.15]} = 1.16$$

$$\frac{\varphi_0}{26.7} = -0.55$$

$$\boxed{\varphi_0 = -14.7}$$

- для 0,1 М NaCl:

$$\cosh \frac{\varphi_0}{26.7} = \frac{1.7161 + 73.04 \times [0.1]}{73.04 \times [0.1]} = 1.235$$

$$\frac{\varphi_0}{26.7} = -0.69$$

$$\boxed{\varphi_0 = -18.4}$$

- для 0,05 М NaCl:

$$\cosh \frac{\varphi_0}{26.7} = \frac{1.7161 + 73.04 \times [0.05]}{73.04 \times [0.05]} = 1.47$$

$$\frac{\varphi_0}{26.7} = -0.95$$

$$\boxed{\varphi_0 = -25.4}$$

- для 0,025 М NaCl:

$$\cosh \frac{\varphi_0}{26.7} = \frac{1.7161 + 73.04 \times [0.025]}{73.04 \times [0.025]} = 1.94$$

$$\frac{\varphi_0}{26.7} = -1.29$$

$$\boxed{\varphi_0 = -34.4}$$

Поверхневий потенціал був розрахований за припущення, що густина поверхневих зарядів у розчинах NaCl з іонною силою, що знижувалась, залишається незмінною. Це припущення підтверджується нашими даними щодо зв'язування альціанового синього еритроцитами, яке вірогідно не відрізнялось у досліджених розчинах [26].

Концентрації  $\rho_{oi}$  індивідуальних іонів на поверхні можна обчислити за формулою (4.4), підставляючи розраховані значення поверхневого потенціалу для наших розчинів. Отже для нашого випадку:

$$[Na^+]_0 = [Na^+]_{\infty} e^{-\frac{e\varphi_0}{kT}} \quad [Cl^-]_0 = [Cl^-]_{\infty} e^{+\frac{e\varphi_0}{kT}}$$

де  $[Na^+]_0$ ,  $[Cl^-]_0$  – концентрація іонів натрію/хлору на поверхні еритроцитів,  $[Na^+]_{\infty}$ ,  $[Cl^-]_{\infty}$  - концентрація іонів в об'ємному розчині.

Тоді для 0,15 М NaCl при температурі 37°C маємо:

$$[Na^+]_0 = 0.15 \times e^{\frac{\varphi_0}{kT}} = 0.15 \times e^{\frac{14.7}{26.7}} = 0.26(M)$$

$$[Cl^-]_0 = 0.15 \times e^{\frac{-14.7}{26.7}} = 0.086(M)$$

Для 0,1М NaCl:

$$[Na^+]_0 = 0.1 \times e^{\frac{\varphi_0}{kT}} = 0.1 \times e^{\frac{18.4}{26.7}} = 0.199(M)$$

$$[Cl^-]_0 = 0.1 \times e^{\frac{-18.4}{26.7}} = 0.05(M)$$

Для 0,05 М NaCl:

$$[Na^+]_0 = 0.05 \times e^{\frac{\varphi_0}{kT}} = 0.05 \times e^{\frac{25.4}{26.7}} = 0.129(M)$$

$$[Cl^-]_0 = 0.05 \times e^{\frac{-25.4}{26.7}} = 0.019(M)$$

Для 0,025 М NaCl:

$$[Na^+]_0 = 0.025 \times e^{\frac{\varphi_0}{kT}} = 0.025 \times e^{\frac{34.4}{26.7}} = 0.09(M)$$

$$[Cl^-]_0 = 0.025 \times e^{\frac{-34.4}{26.7}} = 0.00687(M)$$

Як і очікувалось, повна концентрація всіх іонів у поверхні в точності збігається зі значеннями, отриманими за формулами (4.6,4.8).

Для малих величин потенціалу, менше 25 мВ, що справедливо у випадку еритроцитів, рівняння Грема (4.7) спрощується до вигляду

$$\sigma = \varepsilon_0 \kappa \varphi_0 \quad (4.11)$$

де обернена довжина Дебая:

$$\kappa = \left( \frac{\sum \rho_{oi} e^2 z_i^2}{\varepsilon_0 kT} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (4.12)$$

Отже, потенціал стає пропорційним густині поверхневого заряду.

Це співвідношення привело до виникнення поняття дифузного подвійного електричного шару, що описує іонну атмосферу поблизу зарядженої поверхні з характерним масштабом або «товщиною»  $1/\kappa$ , яка називається дебаївським радіусом екранування. Величина дебаївського радіуса залежить тільки від властивостей рідини і не залежить від властивостей поверхні, таких, як її заряд або потенціал.

Величина дебаївського радіусу у водних розчинах NaCl становить:

$$\frac{1}{\kappa} = \frac{(\varepsilon_0 kT)^{\frac{1}{2}}}{\left\{ (\rho_{Na} e^2 z_{Na}^2 + \rho_{Cl} e^2 z_{Cl}^2) \times N_A \times 10^3 \right\}^{\frac{1}{2}}} \quad (4.13)$$

де  $\rho_i$  – густина іонів шт/м<sup>3</sup>;  $z_i$  – заряд  $i$ -ого іону (для NaCl  $z_i = \pm 1$ );  $e$  – елементарний заряд;  $N_A$  – число Авогадро. Множення на  $N_A \cdot 10^3$  для переходу у вираженні концентрації від шт/м<sup>3</sup> до Моль/л.

Тоді в 1:1 електроліті, наприклад NaCl:

$$\frac{1}{\kappa} = \frac{\{80 \times 8.854 \times 10^{-12} \times 1.381 \times 10^{-23} \times 298(310)\}^{\frac{1}{2}}}{1.602 \times 10^{-19} \times (2\rho_{Na})^{\frac{1}{2}} \times 6.022 \times 10^{23} \times 10^3}$$

$$\text{Для температури } t=37^\circ\text{C (310 K): } \frac{1}{\kappa} = \frac{0.313}{([NaCl])^{\frac{1}{2}}} \quad (4.14)$$

Розраховані за формулою (4.14) значення дебаївського радіусу ( $1/\kappa$ ), а також за формулою (4.10) поверхневі потенціали еритроцитів ( $\varphi_0$ ) в розчинах з різною концентрацією хлориду натрію подані в таблиці 4.5.

Таблиця 4.5

Поверхневі потенціали еритроцитів та дебаївські радіуси в розчинах з різною концентрацією NaCl

[NaCl], М	К, бакт/ер	Кількість зв'язаного АС еритроцитами, нг/10 <sup>6</sup> ер.	$\phi_0$ , мВ	1/к, нм
0,15	2,21 ± 0,87	220,8 ± 4,0	-14,7	0,81
0,10	1,44 ± 0,94	228,2 ± 7,7	-18,4	0,99
0,05	1,52 ± 0,85	226,8 ± 9,8	-25,4	1,40
0,025	0,95 ± 0,63	226,8 ± 9,3	-34,4	1,98

Коефіцієнт кореляції між значеннями індексу адгезії та дебаївським радіусом становить  $r=0,864$ .

Коефіцієнт кореляції між значеннями індексу адгезії та поверхневим потенціалом становить  $r=-0,87$ .

Порівняння експериментальних даних щодо адгезії лактобактерій *S. thermophilus* на еритроцитах людини та теоретично визначених дебаївського радіусу і поверхневого потенціалу еритроцитів у досліджених розчинах показало, що зміна показника адгезії в наших експериментах при зменшенні іонної сили розчину повністю узгоджується з передбаченнями теорії ДЛФО. Отже, в даному випадку, визначальним чинником, що впливав на зміну адгезії лактобактерій *S. thermophilus* на еритроцитах людини в розчинах з різними концентраціями хлориду натрію, були електростатичні взаємодії на першому, оборотному етапі адгезії.

**4.3.2. Роль електростатичних взаємодій у адгезії *S.thermophilus* на еритроцитах людини в середовищах з різною концентрацією 2:1 електроліту**

Розглянемо розподіл іонів поблизу ізолюваної поверхні в контакті з розчином електроліту. Якщо записати повну густину заряду в будь-якій точці  $x$  як  $\sum_i z_i e \rho_{xi}$ , а повну концентрацію іонів (числову густину) як  $\sum_i \rho_{xi}$ , то розподіл Больцмана для іонів  $i$  в точці  $x$  має вигляд

$$\rho_{xi} = \rho_{\infty i} e^{\frac{z_i e \varphi_x}{kT}} \quad (4.15)$$

а на поверхні, при  $x = 0$ , значення густини  $\rho_0$  і потенціалу  $\varphi_0$  зв'язані відношенням

$$\rho_{0i} = \rho_{\infty i} e^{\frac{z_i e \varphi_0}{kT}}, \quad (4.16)$$

де  $\rho_{\infty i}$  - концентрація іонів  $i$  в об'ємі розчину (при  $x = \infty$ ), де  $\varphi_{\infty} = 0$ .

Наприклад, для розчину, що містить  $\text{Na}^+\text{Cl}^- + \text{Ca}^{2+}\text{Cl}_2^-$ , можна записати

$$\begin{aligned} [\text{Na}^+]_x &= [\text{Na}^+]_{\infty} e^{-\frac{e\varphi_x}{kT}}, & [\text{Na}^+]_0 &= [\text{Na}^+]_{\infty} e^{-\frac{e\varphi_0}{kT}}, \\ [\text{Ca}^{2+}]_x &= [\text{Ca}^{2+}]_{\infty} e^{-2\frac{e\varphi_x}{kT}}, & [\text{Ca}^{2+}]_0 &= [\text{Ca}^{2+}]_{\infty} e^{-2\frac{e\varphi_0}{kT}}, \\ [\text{Cl}^-]_x &= [\text{Cl}^-]_{\infty} e^{+\frac{e\varphi_x}{kT}}, & [\text{Cl}^-]_0 &= [\text{Cl}^-]_{\infty} e^{+\frac{e\varphi_0}{kT}} \end{aligned} \quad (4.17)$$

де величини у квадратних дужках, наприклад  $[\text{Na}^+]$ , виражені в деяких зручних одиницях концентрації, наприклад в М (1М = 1моль/літр відповідає концентрації  $\rho = 6,022 \times 10^{26} \text{ м}^{-3}$ ).

Повна концентрація іонів біля ізолюваної поверхні з густиною заряду  $\sigma$  становить [63]:

$$\sum_i \rho_{0i} = \sum_i \rho_{\infty i} + \frac{\sigma^2}{2\epsilon_0 kT} \quad (4.18)$$

де  $\varepsilon_0$  – діелектрична проникність вакууму ( $\text{Кл}^2\text{Дж}^{-1}\text{м}^{-1}$ ),  $\varepsilon$  – відносна діелектрична проникність середовища,  $k$  – стала Больцмана ( $\text{ДжК}^{-1}$ );  $T$  – абсолютна температура (К);  $\rho_{i\infty}$  – густина іонів в об'ємному розчині ( $\text{м}^{-3}$ ).

Співвідношення між густиною поверхневого заряду  $\sigma$  і поверхневим потенціалом  $\varphi_0$  для суміші електролітів  $\text{NaCl} + \text{CaCl}_2$  отримуємо з формули (4.18):

$$\begin{aligned}\sigma^2 &= 2\varepsilon_0 kT \left( \sum_i \rho_{0i} - \sum_i \rho_{\infty i} \right) = \\ &= 2\varepsilon_0 kT \left\{ [Na^+]_{\infty} e^{-\frac{e\varphi_0}{kT}} + [Ca^{2+}]_{\infty} e^{-\frac{2e\varphi_0}{kT}} + [Cl^-]_{\infty} e^{+\frac{e\varphi_0}{kT}} - [Na^+]_{\infty} - [Ca^{2+}]_{\infty} - [Cl^-]_{\infty} \right\}\end{aligned}\quad (4.19)$$

Оскільки  $[Cl^-]_{\infty} = [Na^+]_{\infty} + 2[Ca^{2+}]_{\infty}$ , цей вираз можна записати у вигляді:

$$\sigma^2 = 2\varepsilon_0 kT \left\{ [Na^+]_{\infty} \left( e^{-\frac{e\varphi_0}{kT}} + e^{+\frac{e\varphi_0}{kT}} - 2 \right) + [Ca^{2+}]_{\infty} \left( e^{-\frac{2e\varphi_0}{kT}} + 2e^{+\frac{e\varphi_0}{kT}} - 3 \right) \right\}, \quad (4.20)$$

Звідси:

$$\begin{aligned}\sigma^2 &= 2\varepsilon_0 kT \left\{ [Na^+]_{\infty} e^{-\frac{e\psi_0}{kT}} + [Na^+]_{\infty} e^{+\frac{e\psi_0}{kT}} - 2[Na^+]_{\infty} + [Ca^{2+}]_{\infty} \times \right. \\ &\quad \left. \times \left( 2e^{\frac{e\psi_0}{kT}} + 2e^{-\frac{e\psi_0}{kT}} - 4 + 1 + e^{\frac{2e\psi_0}{kT}} - 2e^{-\frac{e\psi_0}{kT}} \right) \right\} = \\ &= 2\varepsilon_0 kT \left\{ [Na^+]_{\infty} \left( e^{-\frac{e\psi_0}{kT}} + e^{+\frac{e\psi_0}{kT}} \right) - 2[Na^+]_{\infty} + [Ca^{2+}]_{\infty} \times 2 \times \right. \\ &\quad \left. \times \left( e^{\frac{e\psi_0}{kT}} + e^{-\frac{e\psi_0}{kT}} - 2 + \frac{1 + e^{\frac{2e\psi_0}{kT}}}{2} \right) - e^{-\frac{e\psi_0}{kT}} \right\} =\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
&= 2\varepsilon_0 kT \left\{ \left( [Na^+]_{\infty} \times \frac{2 \left( e^{-\frac{e\psi_0}{kT}} + e^{+\frac{e\psi_0}{kT}} \right)}{2} - 2 \right) + [Ca^{2+}]_{\infty} \times 2 \times \right. \\
&\quad \left. \times \left\{ e^{+\frac{e\psi_0}{kT}} + e^{-\frac{e\psi_0}{kT}} - 2 + \frac{e^{-\frac{e\psi_0}{kT}} \left( e^{\frac{e\psi_0}{kT}} + e^{-\frac{e\psi_0}{kT}} \right)}{2} \right\} - e^{-\frac{e\psi_0}{kT}} \right\} = \\
&= 2\varepsilon_0 kT \left\{ 2[Na^+]_{\infty} (2 \cosh(2x) - 1) + [Ca^{2+}]_{\infty} \times 2 \left( 2 + e^{-\frac{e\psi_0}{kT}} \right) \left( \frac{e^{+\frac{e\psi_0}{kT}} + e^{-\frac{e\psi_0}{kT}}}{2} - 1 \right) \right\} = \\
&= 2\varepsilon_0 kT \left\{ 4[Na^+]_{\infty} \sinh^2(x) + [Ca^{2+}]_{\infty} \times 4 \left( 2 + e^{-\frac{e\psi_0}{kT}} \right) \left( \frac{\cosh(2x) - 1}{2} \right) \right\} = \\
&= 2\varepsilon_0 kT \left\{ 4[Na^+]_{\infty} \sinh^2(x) + [Ca^{2+}]_{\infty} \left( 2 + e^{-\frac{e\psi_0}{kT}} \right) \times 4 \sinh^2(x) \right\} = \\
&= 4 \times 2\varepsilon_0 kT \sinh^2(x) \left\{ [Na^+]_{\infty} + [Ca^{2+}]_{\infty} \left( 2 + e^{-\frac{e\psi_0}{kT}} \right) \right\} = \\
&= 8\varepsilon_0 kT \sinh^2(x) \left\{ [Na^+]_{\infty} + [Ca^{2+}]_{\infty} \left( 2 + e^{-\frac{e\psi_0}{kT}} \right) \right\}
\end{aligned}$$

Тоді кінцевий результат запишеться у вигляді:

$$\sigma = (8\varepsilon_0 kT)^{\frac{1}{2}} \sinh\left(\frac{e\varphi_0}{2kT}\right) \left\{ [Na^+]_{\infty} + [Ca^{2+}]_{\infty} \left( 2 + e^{-\frac{e\varphi_0}{kT}} \right) \right\}^{\frac{1}{2}} \quad (4.21)$$

або при 37°C, де концентрації  $[NaCl] = [Na^+]_{\infty}$ , и  $[CaCl_2] = [Ca^{2+}]_{\infty}$ , виражені в одиницях М, густина заряду  $\sigma$  в Кл/м<sup>2</sup> і потенціал  $\varphi_0$  в мВ:

$$\sigma = 0.119 \sinh\left(\frac{\varphi_0}{53.4}\right) \left\{ [NaCl] + [CaCl_2] \left( 2 + e^{-\frac{\varphi_0}{26.7}} \right) \right\}^{\frac{1}{2}} \quad (4.22)$$

Рівняння (4.21) дозволяє обчислити значення поверхневого потенціалу  $\varphi_0$ , якщо відома величина густини поверхневого заряду  $\sigma$ , після чого концентрації  $\rho_0$  індивідуальних іонів на поверхні можна розрахувати за формулами (4.16) або (4.17).

Для еритроцитів густина поверхневого заряду  $\sigma = -1,31 \cdot 10^{-2}$  Кл/м<sup>2</sup> [192]. Або  $1,31 \cdot 10^{-2}$  Кл·м<sup>-2</sup> /  $1,602 \cdot 10^{-19}$  Кл =  $0,82 \cdot 10^{17}$  зар/м<sup>2</sup> =  $0,082$  зар/нм<sup>2</sup>, тобто 1 елементарний заряд на 12,2 нм<sup>2</sup>.

В наших роботах [25,26], було показано що уведення в середовище навіть невеликих концентрацій кальцію приводить до зменшення поверхневого заряду еритроцитів. Для концентрації CaCl<sub>2</sub>  $0,9 \cdot 10^{-3}$  М (0,01%) зменшення поверхневого заряду становило ~18%, для концентрацій  $1,8 \cdot 10^{-3}$  М,  $2,7 \cdot 10^{-3}$  М,  $3,6 \cdot 10^{-3}$  М ~11%. Отже будемо вважати, що в першому розчині  $\sigma \approx 1,074 \cdot 10^{-2}$  Кл/м<sup>2</sup>, в інших –  $\sigma \approx 1,166 \cdot 10^{-2}$  Кл/м<sup>2</sup>.

Комп'ютерне обчислення поверхневого потенціалу еритроцитів в ізотонічному розчині NaCl з додаванням указаних концентрацій CaCl<sub>2</sub> (близьких до концентрацій в плазмі крові) за формулою (4.22) дають наступні величини:

$$0,15 \text{ М NaCl} + 0,9 \cdot 10^{-3} \text{ М CaCl}_2 \quad \varphi_0 = -12,2 \text{ мВ}$$

$$0,15 \text{ М NaCl} + 1,8 \cdot 10^{-3} \text{ М CaCl}_2 \quad \varphi_0 = -13,17 \text{ мВ}$$

$$0,15 \text{ М NaCl} + 2,7 \cdot 10^{-3} \text{ М CaCl}_2 \quad \varphi_0 = -13,07 \text{ мВ}$$

$$0,15 \text{ М NaCl} + 3,6 \cdot 10^{-3} \text{ М CaCl}_2 \quad \varphi_0 = -12,97 \text{ мВ}$$

для 0,15 М NaCl розрахований поверхневий потенціал становив  $\varphi_0 = -14,7$  мВ.

Отримавши значення поверхневого потенціалу, за рівняннями (4.17) можна розрахувати концентрацію іонів на поверхні еритроцитів.

Тоді для 0,15 М NaCl при температурі 37°C маємо:

$$[Na^+]_0 = 0.15 \times e^{-\frac{\varphi_0}{kT}} = 0.15 \times e^{\frac{14.7}{26.7}} = 0.26(M)$$

$$[Cl^-]_0 = 0.15 \times e^{\frac{-14.7}{26.7}} = 0.086(M)$$

Для розчину 0,15 М NaCl+0,9·10<sup>-3</sup> М CaCl<sub>2</sub>:

$$[Na^+]_0 = 0.15 \times e^{-\frac{\varphi_0}{kT}} = 0.15 \times e^{\frac{12.2}{26.7}} = 0.237(M)$$

$$[Ca^{2+}]_0 = 0.9 \times 10^{-3} \times e^{\frac{12.2}{26.7}} = 1.42 \times 10^{-3}(M)$$

$$[Cl^-]_0 = (0.15 + 0.0018) \times e^{\frac{-12.2}{26.7}} = 0.096(M)$$

Для розчину 0,15 М NaCl+1,8·10<sup>-3</sup> М CaCl<sub>2</sub>:

$$[Na^+]_0 = 0.15 \times e^{-\frac{\varphi_0}{kT}} = 0.15 \times e^{\frac{13.17}{26.7}} = 0.246(M)$$

$$[Ca^{2+}]_0 = 1.8 \times 10^{-3} \times e^{\frac{13.17}{26.7}} = 2.95 \times 10^{-3}(M)$$

$$[Cl^-]_0 = (0.15 + 0.0036) \times e^{\frac{-13.17}{26.7}} = 0.094(M)$$

Для розчину 0,15 М NaCl+2,7·10<sup>-3</sup> М CaCl<sub>2</sub>:

$$[Na^+]_0 = 0.15 \times e^{-\frac{\varphi_0}{kT}} = 0.15 \times e^{\frac{13.07}{26.7}} = 0.245(M)$$

$$[Ca^{2+}]_0 = 2.7 \times 10^{-3} \times e^{\frac{13.07}{26.7}} = 4.4 \times 10^{-3}(M)$$

$$[Cl^-]_0 = (0.15 + 0.0054) \times e^{\frac{-13.07}{26.7}} = 0.095(M)$$

Для розчину 0,15 М NaCl+3,6·10<sup>-3</sup> М CaCl<sub>2</sub>:

$$[Na^+]_0 = 0.15 \times e^{-\frac{\varphi_0}{kT}} = 0.15 \times e^{\frac{12.97}{26.7}} = 0.244(M)$$

$$[Ca^{2+}]_0 = 3.6 \times 10^{-3} \times e^{\frac{12.97}{26.7}} = 5.85 \times 10^{-3} (M)$$

$$[Cl^-]_0 = (0.15 + 0.0072) \times e^{\frac{-12.97}{26.7}} = 0.097 (M)$$

Дебаївський радіус можна визначити з формули (4.16)

$$\frac{1}{\kappa} = \left( \frac{\varepsilon_0 kT}{\sum \rho_{\infty i} e^2 z_i^2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (4.23)$$

Бачимо, що величина дебаївського радіусу залежить тільки від властивостей розчину і не залежить від властивостей поверхні, таких, як її заряд або потенціал.

Для наших концентрацій  $CaCl_2$  від 0,9 мМ до 3,6 мМ в 0,15 М NaCl дебаївський радіус становитиме

$$\begin{aligned} \frac{1}{\kappa} &= \frac{(\varepsilon_0 kT)^{\frac{1}{2}}}{\left( \rho_{Na} e^2 z_{Na}^2 + \rho_{Cl} e^2 z_{Cl}^2 + \rho_{Ca} e^2 z_{Ca}^2 + 2\rho_{Cl} e^2 z_{Cl}^2 \right)^{\frac{1}{2}}} = \\ &= \frac{(\varepsilon_0 kT)^{\frac{1}{2}}}{e \{2[Na] + 6[Ca]\}^{\frac{1}{2}} \times (N_A \times 10^3)^{\frac{1}{2}}} = \frac{0.443}{\{0.3 + 6[Ca]\}^{\frac{1}{2}}} \end{aligned}$$

при $[Ca] = 0,9 \cdot 10^{-3} \text{ М}$	$\rightarrow$	$1/\kappa = 0,80 \text{ нм}$
при $[Ca] = 1,8 \cdot 10^{-3} \text{ М}$	$\rightarrow$	$1/\kappa = 0,79 \text{ нм}$
при $[Ca] = 2,7 \cdot 10^{-3} \text{ М}$	$\rightarrow$	$1/\kappa = 0,79 \text{ нм}$
при $[Ca] = 3,6 \cdot 10^{-3} \text{ М}$	$\rightarrow$	$1/\kappa = 0,78 \text{ нм}$
при $[Ca] = 0$ в 0,15М NaCl	$\rightarrow$	$1/\kappa = 0,81 \text{ нм}$

Результати розрахунків поверхневих потенціалів еритроцитів, концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  на їх поверхні та радіуса Дебая в залежності від концентрації  $\text{CaCl}_2$  в середовищі подано в таблиці 4.6.

Таблиця 4.6

Вплив концентрації  $\text{CaCl}_2$  в середовищі на поверхневий потенціал еритроцитів, концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  на їх поверхні та радіус Дебая

$[\text{Ca}^{2+}]$ , мМ	K, бакт/ер	Кількість зв'язаного АС еритроцита- ми, нг/10 <sup>6</sup> ер.	$\phi_0$ , мВ	1/к, нм	$[\text{Ca}^{2+}]_0$ , мМ
0,0	$2,21 \pm 0,87$	$220,80 \pm 4,00$	-14,70	0,81	0,00
0,9	$0,97 \pm 0,84$	$180,98 \pm 11,50$	-12,20	0,80	1,42
1,8	$1,57 \pm 0,96$	$195,10 \pm 6,30$	-13,17	0,79	2,95
2,7	$1,40 \pm 0,84$	$199,90 \pm 9,70$	-13,07	0,79	4,40
3,6	$1,17 \pm 0,86$	$196,30 \pm 12,50$	-12,97	0,78	5,85

Коефіцієнт кореляції між значеннями індексу адгезії та поверхневим потенціалом становить  $r=-0,97$ .

Бачимо, що дебаївський радіус змінюється в наших розчинах з додаванням  $\text{CaCl}_2$  не дуже суттєво. Концентрація іонів кальцію на поверхні еритроцитів при порівняно невеликому потенціалі перевищує його концентрацію в об'ємному розчині  $\sim 1,6$  разів. В той же час концентрації іонів натрію та хлору на поверхні еритроцитів несуттєво відрізняються від таких для 0,15 М розчину  $\text{NaCl}$ . Отже, з розрахованих величин найбільше змінюється поверхневий потенціал клітин та концентрація кальцію біля поверхні еритроцитів.

При оцінці імовірності адгезії лактобактерій *S. thermophilus* на еритроцитах людини в залежності від концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  візьмемо до уваги вплив іонів  $\text{Ca}^{2+}$  на силу електростатичного відштовхування клітин та на імовірність встановлення адгезійного зв'язку внаслідок зв'язування цих іонів з рецепторами, що викликає їх інактивацію. Тобто, слідом за [119] будемо вважати, що утворення адгезійного зв'язку між двома клітинами, здійснюється у два етапи. Щоб оцінити ступінь імовірності використовується поняття комплексу зіткнення. У цьому підході реакція концептуально розділяється на два кроки. На першому етапі реагенти просто зустрічаються (стикаються) один з одним, тобто вони дифундують на достатньо близьку відстань, щоб дозволити другий етап реакції. В нашому випадку першим (оборотним) етапом реакції будемо вважати наближення клітин до відстані дальнього потенціального мінімуму.

Таким чином реакція може бути написана як



Вважатимемо, що клітини формують комплекс зіткнення кожного разу, коли вони відокремлені відстанню зіткнення  $D_{AB}$ , тобто відстанню дальнього потенціального мінімуму.

У наближенні Дерягіна [63] сила взаємодії між двома сферами може бути виражена через енергію взаємодії на одиницю площі двох плоских поверхонь на відстані  $D$ .

$$F(D) \approx 2\pi \left( \frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2} \right) W(D) \quad (4.25)$$

де  $W$  – вільна енергія взаємодії.

Ця формула застосовна до будь-якого типу закону сили, режиму притягання, відштовхування або перемінної взаємодії, якщо радіус взаємодії

та відстань  $D$  набагато менше, ніж радіуси сфер. У випадку взаємодії клітин на відстані  $\sim$  дальнього мінімуму (3-4 нм) ця вимога виконується. Якщо одна сфера є дуже великою, так що  $R_2 \gg R_1$ , отримуємо  $F(D) = 2\pi R_1 W(D)$ , що відповідає граничному випадку сфери біля плоскої поверхні. Діаметр лактобактерій *S. thermophilus* становить  $\sim 1$  мкм, тоді як діаметр еритроцита становить  $\sim 7-8$  мкм. Крім того, ми можемо прийняти указане наближення, оскільки, хоча форма еритроцита є достатньо складною, більшу частину його поверхні можна вважати плоскою по відношенню до майже сферичних клітин *S. thermophilus* (тобто радіус кривизни поверхні еритроцита  $\ll$  радіусу кривизни лактобактерій) (Див. мікрофотографії на рис. 2.2).

За малих потенціалів поверхні, менше ніж приблизно 25 мВ, що цілком відповідає нашому випадку, формули для енергії та сили взаємодії спрощуються. Для сфери біля плоскої поверхні сила електростатичного відштовхування

$$F \approx 2\pi R \varepsilon_0 \kappa \varphi_0^2 e^{-\kappa D} = \frac{2\pi R \sigma^2 e^{-\kappa D}}{\kappa \varepsilon_0} \quad (4.26)$$

В цих рівняннях  $\varphi_0$  і  $\sigma$  пов'язані виразом  $\sigma = \varepsilon_0 \kappa \varphi_0$ , яке справедливо за малих потенціалів.

Вирази (4.25, 4.26) для сили взаємодії двох подвійних електричних шарів є точними тільки на відстанях між поверхнями, більших приблизно одного дебаївського радіуса, що як показано нашими розрахунками (Табл. 4.6) справедливо для взаємодії клітин на відстані дальнього мінімуму і більше. Ми бачимо, що взаємодія подвійного електричного шару між сферичною частинкою та поверхнею експоненціально зменшується з відстанню, причому характерним масштабом затухання є дебаївський радіус екранування.

Отже, імовірність наближення клітин *S. thermophilus* до еритроцитів на відстань дальнього мінімуму є обернено пропорційною силі електростатичного відштовхування:

$$P_1 \sim \frac{1}{F} = \frac{1}{(2\pi R \varepsilon_0 \kappa \varphi_0^2 e^{-\kappa D})} = \frac{A}{\kappa \varphi_0^2 e^{-\kappa D}} \quad (4.27)$$

де  $A = \frac{1}{2\pi R \varepsilon_0}$ . Приймаємо  $D \approx 4$  нм [63],  $R \approx 0,5$  мкм  $= 0,5 \cdot 10^{-6}$  м (радіус клітин *S. thermophilus*).

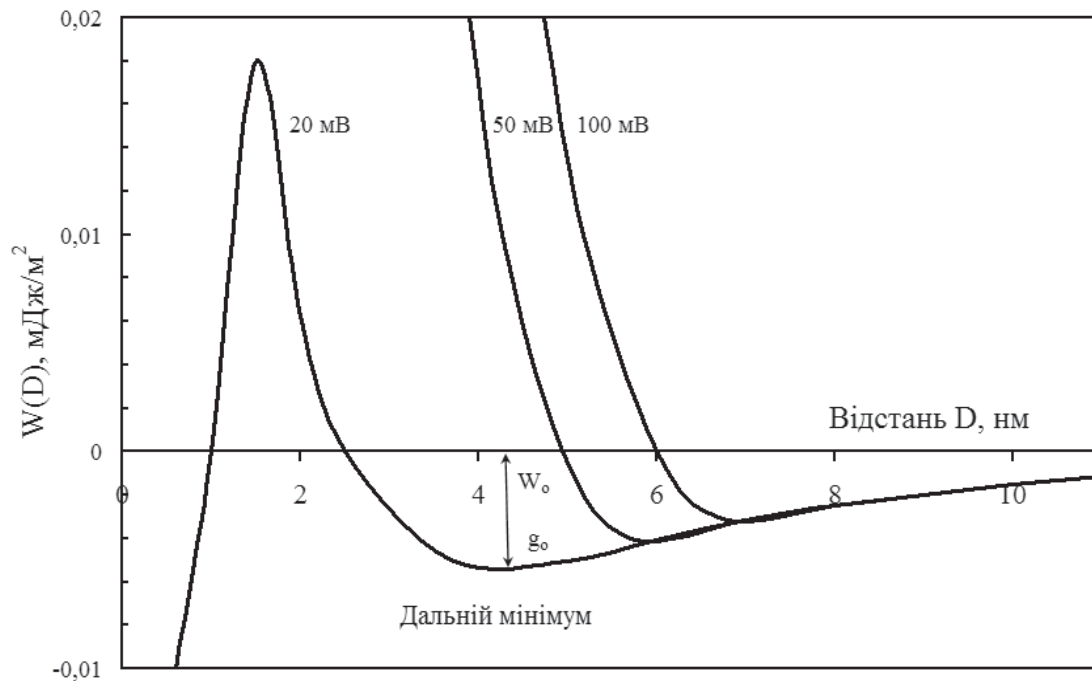


Рис. 4.4. Енергія взаємодії двох амфіфільних поверхонь в 0,15 М розчині NaCl, розрахована у наближенні теорії ДЛФО [63]. Константа Гамакера (без урахування запізнення) прийнята рівною  $A=6 \cdot 10^{-21}$  Дж; також припускається, що поверхні взаємодіють при постійному потенціалі  $\varphi_0$ . Три криві при  $\varphi_0 = 100, 50$  и  $20$  мВ відповідають густині поверхневого заряду  $1e$  на  $1, 3$  і  $8,5$  нм<sup>2</sup>.

Концентрацію кальцію на поверхні позначаємо як і раніше  $[Ca^{2+}]_0$ , концентрацію або поверхневу густину не зв'язаних з  $Ca^{2+}$  рецепторів на

поверхні як  $[Re^{2-}]_0$  і густину зв'язаних з  $Ca^{2+}$  рецепторів як  $[ReCa]_0$ . Величина  $[Re^{2-}]_0$  пов'язана з  $\sigma$  співвідношенням  $\sigma = -b[Re^{2-}]_0$ , де  $b$  - частина рецепторів, що відповідають за адгезію з лактобактеріями, відносно всіх негативно заряджених груп на поверхні еритроцитів.  $b\sigma_0 = N$  – вихідна поверхнева густина рецепторів, а  $\alpha$  - частина не зв'язаних з  $Ca^{2+}$  рецепторів. Величину  $\alpha$  беремо з наших експериментальних даних щодо зміни поверхневого заряду в розчинах з додаванням 2:1 електроліту  $CaCl_2$  за зв'язуванням катіонного фарбника (табл.4.6).

Тоді імовірність встановлення адгезійного зв'язку з бактеріальною клітиною, що знаходиться на відстані дальнього потенціального мінімуму буде пропорційна кількості не зв'язаних с кальцієм рецепторів

$$P_2 \sim \alpha b \sigma_0 = \alpha N \quad (4.29)$$

Отже імовірність встановлення адгезійного зв'язку з урахуванням імовірності наближення клітин до відстані дальнього потенціального мінімуму становитиме

$$P = P_1 \times P_2 \sim \frac{\alpha NA}{\kappa \phi_0^2 e^{-\kappa D}} \sim \frac{\alpha NA}{\kappa \phi_0^2 e^{-4\kappa}} \quad (4.30)$$

В таблиці 4.7 зведені експериментальні та розраховані нами теоретично дані, прийняті для обчислення імовірності установаження адгезійного зв'язку між *S. thermophilus* та еритроцитами людини.

Таблиця 4.7

Вплив концентрації  $\text{CaCl}_2$  в середовищі на поверхневі характеристики еритроцитів та імовірність утворення адгезійного зв'язку

$[\text{Ca}^{2+}]$ , мМ	$\alpha$	$\kappa$ , $\text{нм}^{-1}$	$\phi_0$ , мВ	P
0,0	1	1,23	-14,7	1
0,9	0,82	1,25	-12,2	0,51
1,8	0,89	1,26	-13,2	0,62
2,7	0,89	1,27	-13,1	0,58
3,6	0,89	1,28	-13,0	0,54

Результати оцінки імовірності (у відносних одиницях) установаження адгезійного зв'язку показані на рис. 4.5.

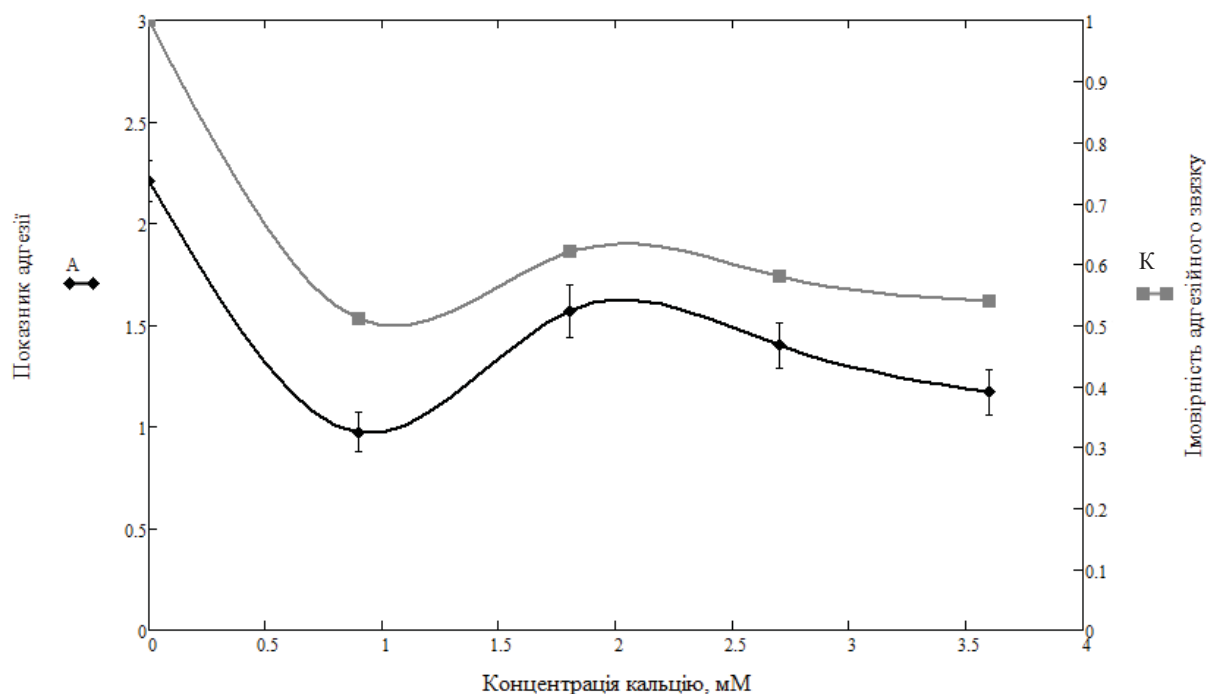


Рис. 4.5. Показник адгезії (♦) та імовірність утворення зв'язку (■) між лактобактеріями *S. thermophilus* та еритроцитами людини в залежності від концентрації  $\text{CaCl}_2$ .

З поданих на рисунку даних видно, що отримані величини показника адгезії лактобактерій *S. thermophilus* на еритроцитах людини адекватно пояснюються запропонованою моделлю.

Як ми і припускали в попередніх розділах [25,26], отримані залежності показника адгезії від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в середовищі можна пояснити блокуванням рецепторів зв'язування двовалентними катіонами. В той же час визначальну роль в можливості установаження міжклітинного зв'язку відіграють електростатичні взаємодії. Отримані експериментальні результати та теоретичні розрахунки параметрів електростатичної взаємодії підтверджують прийнятність моделі двоступеневої сорбції та теорії ДЛФО для описання міжклітинної адгезії.

## РОЗДІЛ 5

### ВПЛИВ РЕЖИМІВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ НА АДГЕЗІЮ НА НИХ ЛАКТОБАКТЕРІЙ *S.THERMOPHILUS*

До цього часу основними показниками успішності кріоконсервування клітин, зокрема еритроцитів, були дані про відсоток збережених клітин, проникність мембран клітин, що залишились, до непроникаючих в нормі барвників та деякі біохімічні показники життєдіяльності клітин. Мало уваги було приділено збереженню поверхневих клітинних структур, як наприклад глікокаліксу. Глікокалікс, який щільно покриває клітини ссавців, складається з гліколіпідів, глікопротеїнів і протеогліканів. Багато з цих глікосполук містять гліканові ланцюги, що закінчуються сіаловими кислотами. Сіалові кислоти упізнаються і використовуються як місця прикріплення великої кількості і широкої різноманітності бактеріальних клітин. Багато білків різних патогенів, що зв'язуються з сіаловими кислотами, були добре охарактеризовані і загалом показують високу специфічність для різних видів сіалових кислот і/або їх зв'язків до гліканових ланцюгів, що лежать в основі [6]. Рецептори адгезинів - вуглеводневі частини поверхнево експонованих глікопротеїнів або гліколіпідів, приєднаних до мембранних білків епітеліальних клітин, які знаходяться в цільовій тканині або органі. Ці ж самі вуглеводневі частини рецепторів знаходяться в таких же глікосполуках, білках, або сіалоглікопротеїнах клітинних мембран в інших місцях окрім цільової тканини або органу.

У роботі [187] було показано, що всі сіалові кислоти еритроцитів декількох тваринних різновидів знаходяться на мембранній поверхні. Для еритроцитів більшості різновидів негативний поверхневий заряд передусім забезпечується карбоксильними групами сіалових кислот. Еритроцити людини містять найбільшу кількість сіалових кислот, яка вдвічі перевищує кількість у клітинах курчати, коня і теляти.

Є поодинокі дані щодо зміни поверхневого потенціалу клітин після заморожування-відтаювання [193,194]. Наприклад в роботі [193] показано зв'язок між поверхневим потенціалом лактобактерій *Lactobacillus acidophilus* після їх кріоконсервування та їх здатністю до репарації кріоушкоджень, і відновлення здатності до росту і утворення колоній. Показано, що поверхневий потенціал розморожених клітин може бути мірою оборотності пошкодження клітин, тобто відбиває інші властивості, які не виявляє тест на життєздатність.

Виходячи з припущення про те, що збереження поверхневих властивостей клітин після заморожування-відтаювання, яке характеризується зокрема поверхневим потенціалом і пов'язаною з цим здатністю клітин до міжклітинної адгезії, можуть бути характеристикою успішності кріоконсервування, нами було проведено дослідження впливу заморожування еритроцитів людини за різними режимами на їх поверхневий заряд та адгезію на них мікроорганізмів *Streptococcus thermophilus*.

Еритроцити людини заморожували за трьома різними режимами: під захистом ПЕО-1500 за методом Бабійчук Л.О. [21]; під захистом гліцерину за методом, розробленим в Інституті гематології і переливання крові (Москва) [19] та під захистом 1,2-пропандіолу за методом Воротіліна [20].

В результаті проведених експериментів отримали показники адгезії лактобактерій *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах до та після кріоконсервування трьома різними методами та характеристики зв'язування АС еритроцитами в тих же умовах (рис. 5.1., 5.2.; табл. 5.1.).

Сумарна втрата клітин після розморожування та відмивання при кріоконсервуванні трьома представленими методами порівняна між собою.

На рисунку 5.1. подано результати визначення показника адгезії до та після кріоконсервування трьома різними методами.

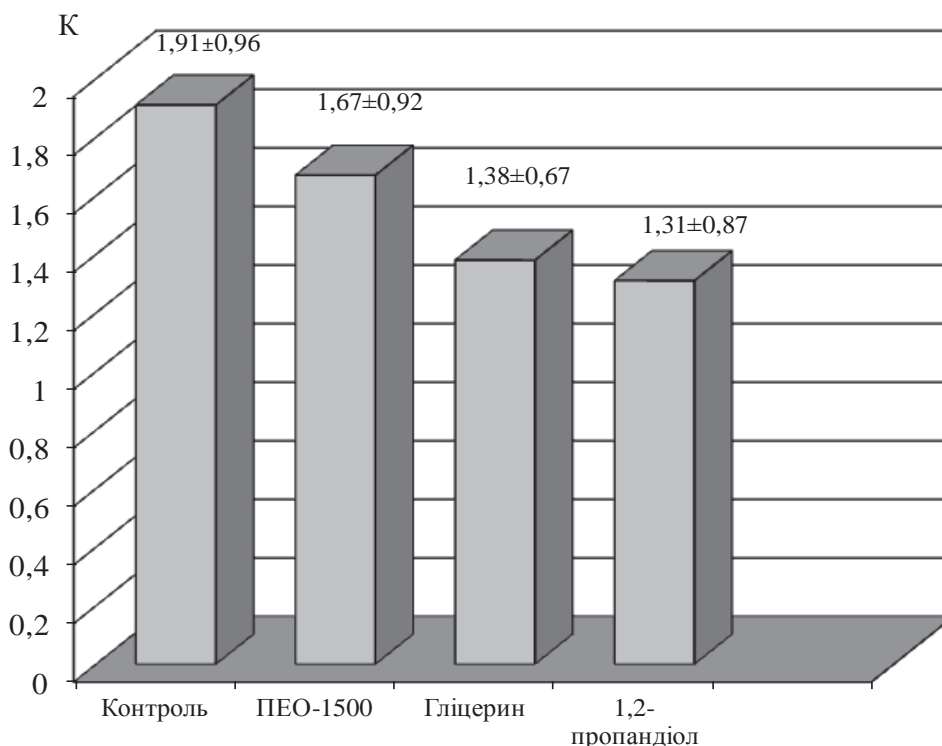


Рис. 5.1. Показник адгезії бактеріальних клітин *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини до та після кріоконсервування еритроцитів трьома різними методами.

З поданих даних випливає, що заморожування еритроцитів за режимами №2 (гліцерин) та №3 (1,2-пропандіол) приводить до вірогідного зменшення показника адгезії лактобактерій *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах, тоді як показник адгезії на еритроцитах, заморожених за режимом №1 (з ПЕО-1500) є трохи меншим, але вірогідно не відрізняється від контрольних значень.

Для подальшого виявлення причин зменшення адгезії лактобактерій на заморожених-відтаяних еритроцитах було вивчено вплив режимів заморожування на поверхневий заряд еритроцитів.

На рисунку 5.2 подано результати визначення кількості зв'язаного АВ, до та після кріоконсервування еритроцитів трьома різними методами.

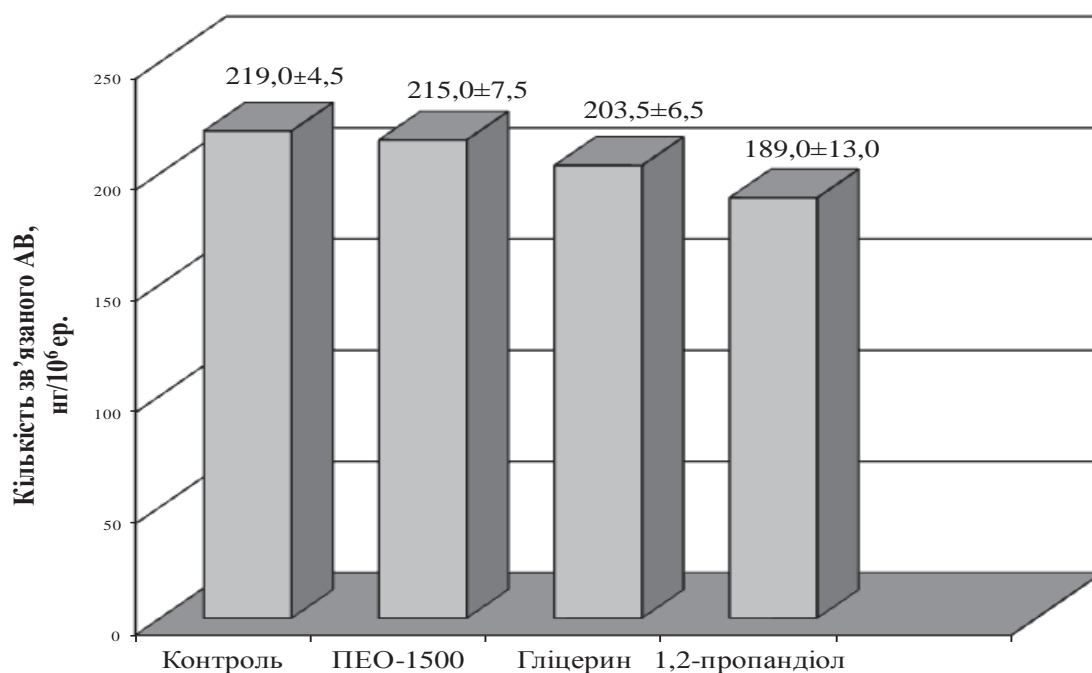


Рис. 5.2. Кількість зв'язаного АС з еритроцитами до та після кріоконсервування еритроцитів трьома різними методами.

Дані про зв'язування АС з еритроцитами корелюють з даними щодо показника адгезії з коефіцієнтом кореляції  $r=0,9$ . Після заморожування еритроцитів з гліцерином та 1,2-пропандіолом зв'язування катіонного барвника з еритроцитами вірогідно зменшується, що свідчить про зменшення негативного заряду на поверхні еритроцитів. В той же час зв'язування АС з еритроцитами, замороженими з ПЕО-1500 є меншим але вірогідно не відрізняється від такого для контролю.

Таблиця 5.1

Вплив заморожування на зв'язування АС еритроцитами людини та показник адгезії бактеріальних клітин *Streptococcus thermophilus* на них

Зразок	К, бакт/ер	Кількість зв'язаного АВ, нг/10 <sup>6</sup> ер.	Втрата клітин після заморожування-відтавання / після відмивання, %
Контроль	1,91±0,96	219,0±4,5	-
Еритроцити, заморожені з ПЕО-1500	1,67±0,92	215,0±7,5	2,0±0,5/13,2±3,2
Еритроцити, заморожені з гліцерином	1,38±0,67*	203,5±6,5 <sup>+</sup>	4,5±1,3/9,5±2,8
Еритроцити, заморожені з 1,2-пропандіолом	1,31±0,87*	189,0±13,0 <sup>+</sup>	5,7±0,8/7,9±2,5

Примітка: \* - дані вірогідно відрізняються від даних для контролю,  $p < 0,001$ ; <sup>+</sup> - дані вірогідно відрізняються від даних для контролю,  $p < 0,05$ , коефіцієнт кореляції між показником адгезії та кількістю зв'язаного АС  $r = 0,9$ .

У роботі представлені результати порівняння поверхневих властивостей еритроцитів після кріоконсервування трьома різними методами. Метод заморожування еритроцитів з гліцерином був розроблений в середині минулого століття і досі з деякими модифікаціями застосовується в клінічній практиці [195]. Основним недоліком цього методу є необхідність багатоетапного відмивання клітин від гліцерину. Це пов'язано з тим, що, хоча гліцерин і є проникаючим кріопротектором, швидкість його проникнення в еритроцити недостатньо висока. Так, характерний час проникнення гліцерину в еритроцити людини при кімнатній температурі становить порядку 10-20 хвилин, при 37°C - близько 5-7 хвилин. У той же час, для таких кріопротекторів, як, приміром, ДМСО, ацетамід або 1,2-пропандіол, характерний час проникнення становить порядку 1-10 секунд [196,197]. Тому

багато дослідників шукали альтернативу гліцерину. Такою альтернативою могли бути або швидко проникаючі кріопротектори, що легко видаляються з клітин, або непроникаючі високомолекулярні речовини, такі як гідроксиетилкрахмаль, полівінілпіролідон, низка гліколів з різними молекулярними масами [195,21]. Було запропоновано думку, що видалення таких не проникаючих речовин з розморожених еритроцитів до переливання не потрібно [198]. Тим не менш, на сьогоднішній день, непроникаючі добавки не були ліцензовані або використані в клінічній практиці [199,200]. Останнім часом все частіше пропонуються комбіновані середовища, що містять як проникаючі, так і непроникаючі кріопротектори [201,202]. Тому, в нашій роботі, поряд з гліцериновим методом, було використано для порівняння методи заморожування з 1,2-пропандіолом і непроникаючим ПЕО-1500.

Вплив кріоконсервування на поверхневі властивості клітин крові досліджували у доволі давній роботі [194], в якій методом розділення клітин в двофазних водно-полімерних системах було показано, що у кріоконсервованих і відновлених фагоцитів крові людини спостерігалась істотна втрата загального негативного поверхневого заряду без виявленої зміни в гідрофобних властивостях мембрани.

В роботі [203] автори показали, що мікрочастинки тромбоцитів (PMPs), які використовували для збільшення приживлення після трансплантації кордової крові шляхом їх адгезії на CD34+-клітинах, отримані після заморожування-відтаювання кордової крові, адгезували не так добре до CD34+ клітин, ніж від свіжої кордової крові, і CD34+-клітини, покриті цими PMPs, мали слабку адгезію до ендотелію.

В роботах [204-205] показано, що додавання до загальноприйнятого середовища заморожування стабілізатора мембрани трегалози та антиоксиданта каталази приводить до кращого захисту рецепторів чинника росту, адгезійних молекул, і функціональності гемопоетичних клітин (моноядерних клітин кордової крові та клітин фетальної печінки),

спричиняючи кращу якість приживання. Автори не виявили ніякого впливу цих добавок на такі параметри як життєздатність і відновлення ядерних клітин але отримували краще утворення колоній в зразках, де були використані добавки у середовище заморожування. При цьому автори спостерігали також підвищену експресію адгезійних молекул у кріоконсервованих клітинах. В роботі [206] також показано, що заморожування-відтаювання підвищує адгезію на поверхні судинних ендотеліальних клітин внаслідок підвищення експресії адгезивних молекул. Але за такої постановки досліджень очевидно, що результат є наслідком включення клітинних механізмів відновлення після стресу заморожуванням-відтаюванням і не відображає ушкоджуючої дії заморожування-відтаювання на поверхневі властивості клітин.

Найбільше робіт про вплив заморожування на поверхневі властивості клітин та їх здатність до адгезії стосуються бактерій. Наприклад в роботі [193] показано, що після заморожування-відтаювання лактобактерій *Lactobacillus acidophilus* без кріопротектора бактеріальна популяція складалась з клітин в трьох станах: неушкоджені або нормальні клітини; необоротно пошкоджені чи мертві клітини; і оборотно ушкоджені клітини. Після заморожування і розморожування, клітинна стінка має нерегулярну і неоднорідну структуру і зменшений дзета-потенціал до -32 мВ порівняно з -45 мВ у не заморожених клітин в стаціонарній фазі. Незаморожена культура показувала гладке зростання дзета-потенціалу з часом, тоді як після заморожування і розморожування було різке збільшення дзета-потенціалу від -32 до -38 мВ. Еволюція дзета-потенціалу до більше негативних величин за умов в яких немає ніякого клітинного росту, на думку авторів, може бути пов'язана з відновленням пошкоджених клітин впродовж перших двох годин. Автори роботи показали, що клітини частково репарують свої пошкодження впродовж цього періоду. При заморожуванні-відтаюванні під захистом гліцерину гинуло менше клітин, ніж в контролі без гліцерину. Число клітин, що виживало, досягало постійного значення, коли концентрація гліцерину

перевищувала 1 М. Проте, для отримання дзета-потенціалу, порівнянного до потенціалу в не заморожених клітинах, бактерії необхідно було заморожувати і відтаювати в 2 М гліцерині. Ці результати свідчать, що, хоча число клітин, що виживають, в 1 М гліцерині таке ж високе, як і в 2 М гліцерині стан клітинної поверхні дуже відрізняється. Іншими словами, дзета-потенціал відбиває інші властивості, які не виявляє тест на життєздатність. Величина дзета-потенціалу краще корелює з пропорцією пошкоджених клітин. Зміни у дзета-потенціалі свідчать, що клітинна стінка пошкоджена і це може впливати на такі властивості як адгезія.

В роботі [207] досліджували вплив циклів заморожування-відтаювання на життєздатність і стратегічні для виживання властивості (а саме рухливість і утворення біоплівки) бактерій на модельному патогені *Bacillus subtilis*. Автори показали, що хоча дія заморожування-відтаювання не мала істотного впливу на темпи росту бактерій, вона в той же час істотно зменшувала утворення біоплівки *B. subtilis*, а жорсткість зв'язків між *B. subtilis* і кварцовою поверхнею зменшувалась.

В роботах [208,209] автори прийшли до висновку, що поверхнева гідрофобність, що є узагальненою характеристикою клітинних поверхонь, є важливим параметром для передбачення здатності неушкоджених бактерій пробіотика витримувати екстремальне довкілля, в тому числі заморожування. Певний баланс клітинних компонентів, які можуть характеризуватися по зменшених значеннях гідрофобності клітинної поверхні, очевидно допомагає гарантувати опір, вдосконалену життєздатність і отже загальні пробіотичні властивості бактерій. Автори роботи [210] також вважають, що кореляція між фізико-хімічними властивостями і адгезією видимо, демонструє роль композиції поверхневого шару, зокрема роль білків, більш ніж роль гідрофобності, на їх адгезійну здатність. Так вони показали, що на поверхні лінії D41 присутні білки з кінцевими групами  $\text{NH}_2$  і  $\text{NCO}$  і знайшли, що ця лінія адгезує до поверхонь з нержавіючої сталі, скла, або тефлону в набагато вищій кількості (2 порядки величини), ніж дві інші, DA і D01. Останні

збагачені залишками  $\text{COOH}$ , або сульфатами, і це робить їх більш гідрофільним і менш адгезивними до усіх підкладок.

Таким чином, виходячи з того, що збереження поверхневих властивостей клітин після заморожування-відтаювання, яке характеризується зокрема поверхневим потенціалом, і пов'язана з цим здатність клітин до міжклітинної адгезії можуть бути характеристикою успішності кріоконсервування, можна зробити висновок про доцільність оцінювання якості клітин після заморожування за цими параметрами. У нашому випадку, отримані результати вказують на те, що еритроцити, заморожені з ПЕО-1500 найкраще зберегли поверхневі властивості після відтаювання. Можливо, це пов'язано з тим, що ПЕО-1500 має високу поверхневу активність і адсорбується на поверхні клітин [211]. Тому, окрім інших механізмів кріопротекції, він може забезпечувати захист поверхневих шарів клітини від ушкоджуючих чинників заморожування-відтаювання. Можливо, саме цей механізм є причиною підвищення життєздатності клітин після заморожування у комбінованих середовищах, що містять як проникаючі, так і непроникаючі кріопротектори [201,202].

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі зроблено внесок у вирішення однієї з важливих проблем сучасної клітинної біофізики – вивчення механізму бактеріальної адгезії на еритроцитах людини. Встановлено залежність міжклітинної адгезійної взаємодії еритроцитів та лактобактерій *S. thermophilus* від рН, іонної сили середовища, концентрації двовалентних катіонів у середовищі і поверхневого заряду клітин. Проведено дослідження впливу різних режимів заморожування еритроцитів людини на їх поверхневий заряд та адгезію на них мікроорганізмів *Streptococcus thermophilus*.

1. Показник адгезії лактобактерій *S. thermophilus* на еритроцитах людини суттєво залежить від рН середовища та є максимальним за фізіологічного значення кислотності. При цьому зміна рН середовища в дослідженому діапазоні (5,8 – 8,0) не впливає на поверхневий заряд клітин.
2. Показник міжклітинної адгезійної взаємодії еритроцитів та лактобактерій *S. thermophilus* є найбільшим у фізіологічному сольовому розчині при варіюванні іонної сили суспензійного розчину в межах 0,044–0,312 моль/л. Зміна показника адгезії при зменшенні іонної сили розчину обумовлена фізичними взаємодіями на першому оборотному етапі адгезійного процесу, що підтверджується порівнянням експериментальних даних щодо адгезії лактобактерій *S. thermophilus* на еритроцитах людини та теоретично визначених дебаївського радіусу (змінюється від 0,81 нм до 1,98 нм) і поверхневого потенціалу еритроцитів (змінюється від -14,7 мВ до -34,4 мВ) у досліджених розчинах.

3. Молекули, що беруть участь в процесі міжклітинної адгезії еритроцитів та лактобактерій, не активуються двовалентними катіонами ( $\text{Ca}^{2+}$  або  $\text{Mg}^{2+}$ ). Присутність іонів  $\text{Ca}^{2+}$  або  $\text{Mg}^{2+}$  майже в 2 рази зменшує кількість адгезованих бактеріальних клітин *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини.
4. Іони кальцію та магнію мають різноспрямований вплив на поверхневий заряд досліджуваних клітин *S. thermophilus* на еритроцитах людини. Катіони  $\text{Ca}^{2+}$  у дослідженому концентраційному діапазоні вірогідно зменшують поверхневий заряд еритроцитів на 11-18% та не впливають на поверхневий заряд лактобактерій *S. thermophilus*, тоді як іони  $\text{Mg}^{2+}$ , навпаки, вірогідно зменшують поверхневий заряд лактобактерій на 5-13% та не змінюють його у еритроцитів.
5. Вперше за допомогою математичної моделі обчислено імовірність установлення зв'язку між *S. thermophilus* та еритроцитами людини в залежності від концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  в середовищі.
6. Двовалентні катіони впливають на другий етап адгезійного процесу, про що свідчать отримані експериментальні дані щодо впливу катіонів  $\text{Ca}^{2+}$  на поверхневий заряд, міжклітинну адгезію еритроцитів і *S. thermophilus* та результати оцінки імовірності установлення адгезійного зв'язку за проведеними теоретичними розрахунками поверхневого потенціалу (змінюється від -14,7 мВ до -12,2 мВ), концентрації іонів кальцію на поверхні еритроцитів (перевищує концентрацію в об'ємному розчині ~1,6 разів) і дебаївського радіусу. В той же час, визначальну роль в можливості здійснення міжклітинної адгезії відіграють електростатичні взаємодії.

7. Здатність клітин до міжклітинної адгезії може бути чутливою характеристикою успішності кріоконсервування і показником збереження поверхневих шарів клітин, що показано за допомогою використання різних режимів заморожування еритроцитів. Еритроцити, заморожені з ПЕО-1500, краще зберегли поверхневі властивості після заморожування-відтавання, ніж при заморожуванні з гліцерином та 1,2-пропандіолом.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Воробьев А.И. Руководство по гематологии / под ред. А.И.Воробьева. – М: Ньюдиамед, 2005.-Т.3. – 416 с.
2. Оборин В.А. Бактериофиксирующая активность эритроцитов: монография / В.А. Оборин; под научной редакцией чл.-корр. РАН Е.В. Пименова // Киров: Вятская ГСХА. – 2010. – 194 с.
3. Быков А.С. Модификация реакции иммуноприлипания бактерий к эритроцитам/ А.С. Быков, Л.М. Недвицкая, Е.П. Пашков /Лаб. дело.- 1982.- №11.-С. 671-673.
4. Богданова Е.А. Адгезивные свойства лактобактерий и эшерихий в различных отделах желудочно-кишечного тракта человека в норме и патологии / Е.А. Богданова, Ю.В. Несвижский, А.А. Воробьев //Вестник РАМН. – 2006. – №1. – С. 35-38.
5. Бондаренко В.М. Адгезивная активность клинических штаммов клебсиел / В.М. Бондаренко, W. Gang, M.M. Barcus //Журнал микробиол. – 1996. – №2. – С. 104-109.
6. Gagneux P. Human-specific regulation of  $\alpha$ 2–6-linked sialic acids / P.Gagneux, M.Chériyan, N.Hurtado-Ziola et al. // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278, No. 48. – P. 48245–48250.
7. Marshall K.C. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces / K.C. Marshall, R. Stout, R.Mitchell // J. Gen. Microbiol. – 1971. – V.68. – P. 337–348.
8. Carnazza S. New Advances in Cell Adhesion Technology, Nanoparticles and Nanodevices in Biological Applications / S.Carnazza // Bellucci (ed.). Lecture Notes in Nanoscale Science and Technology 7. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. – 2009. – P. 69-130.
9. Дерягин Б.В. Поверхностные силы / Дерягин Б.В., Чураев В.М., Муллер В.М. – М.: Наука. – 1985. – 398 с.

10. Bos R. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study / R.Bos, H.C. van der Mei, H.J.Busscher // FEMS Microbiol. Rev. – 1999. – V.23. – P. 179–230.
11. Neu T.R. Bacterial polymers: Physico-chemical aspects of their interactions at interfaces / T.R. Neu, K.C.Marshall // J. Biomater. Appl. – 1990. – V. 5. – P. 107–133.
12. van Oss C.J. Energetics of cell-cell and cell-biopolymer interactions / C.J. van Oss // Cell Biophys. – 1989. – V.14. – P. 1–16.
13. An Y.H. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces / Y.H. An, R.J.Friedman // J. Biomed. Mat. – 1998. – V. 43. – P. 338–348.
14. Morra M. Bacterial adhesion to polymer surfaces: a critical review of surface thermodynamic approaches / M. Morra, C. Cassinelli // J. Biomater. Sci. Polymer. Ed. – 1997. – V. 9. – P. 55–74.
15. Cunliffe D. Bacterial adhesion at synthetic surfaces / D. Cunliffe, C.A. Smart, C. Alexander, E.N. Vulfson // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – V. 65. – P. 4995–5002.
16. van Loosdrecht M.C.M. Hydrophobic and electrostatic parameters in bacterial adhesion / M.C.M. van Loosdrecht, J. Lyklemam, W. Norde, A.J.B. Zehnder // Aquatic Sci. – 1990. – V. 52. – P. 103–113.
17. Gambaro G. Abnormal erythrocyte charge in diabetes mellitus. Link with microalbuminuria / G. Gambaro, B. Baggio, E. Cicerello, S. Mastrosimone, G. Marzaro, A. Borsatti, G. Crepaldi // Diabetes. – 1988. – V.37. – P. 745-748.
18. Klinger M. Different erythrocyte and platelet surface electric charge in various types of glomerulonephritis / M. Klinger, S. Kramarz, D.Wendycz and W. Kopec // Nephrol Dial Transplant. – 1997. – V.12. – P. 707–712.
19. В.А. Аграненко. Методы долгосрочного хранения в замороженном состоянии эритроцитов, предназначенных для трансфузий : метод. рекомендации / сост. В.А. Аграненко, Ф.Р. Виноград-Финкель, Л.И. Федорова и др. – М.: Б.и., 1980. – С. 7-11.

20. Грищенко В.И. Криоконсервирование эритроцитов под защитой криоконсерванта «Пропандиосахароль». Методические рекомендации / В.И. Грищенко, А.М. Воротилин и др. – Харьков: МЗ СССР; АН УССР; ИПКиК. – 1990. – 11 с.
21. Бабійчук Л.О. Новий метод кріоконсервування еритроцитів для клінічної практики / Л.О. Бабійчук, Н.Г. Землянських, Л.М. Кузьміна // Трансплантологія. – 2000. – т.1, №1. – С. 296-298.
22. Анікєєва М.О. Клітинна адгезія: види, механізми, роль у функціонуванні живих систем / М.О. Анікєєва, О.І. Гордієнко // Біофізичний вісник. – 2012. – Т. 28, №1. — С. 30-36.
23. Anikieieva M. Influence of pH and ionic strength of a medium on the adhesion of *Streptococcus thermophilus* microorganisms to human erythrocytes / M. Anikieieva, O. Gordiyenko // *Periodicum biologorum*. - Zagreb (Croatia). – 2014. – V.116, №1. – P. 89-93.
24. Анікєєва М.О. Вплив одно- та двовалентних катіонів на адгезію *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини / М.О. Анікєєва, І.Ф. Коваленко, С.Є. Коваленко, О.І. Гордієнко // Біофізичний вісник. – 2014. – Т. 31, №1. — С. 29-39.
25. Анікєєва М.О. Вплив катіонів  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Mg}^{2+}$  на поверхневий заряд еритроцитів і лактобактерій *S. thermophilus* та їх адгезійну взаємодію / М.О. Анікєєва, С.Л. Розанова, С.Є. Коваленко, О.І. Гордієнко, Є.О. Гордієнко // Доповіді Національної академії наук України. – 2015. – №1. – С. 159–165.
26. Anikieieva M.O. Surface charge of erythrocytes and lactobacilli *S. thermophilus* and their intercellular adhesion depend on the concentration of bivalent cations / M.O. Anikieieva, S.L. Rozanova, S.Ye.Kovalenko, I.F. Kovalenko, O.I. Gordiyenko, E.O. Gordiyenko // *Journal of Adhesion Science and Technology*. – 2015. – V.29, №10. – P. 1039-1045.
27. Gordiyenko O.I. Development of a model to investigate red blood cells surface characteristics after cryopreservation / O.I. Gordiyenko,

M.O. Anikieieva, S.L. Rozanova, S.Ye. Kovalenko, I.F. Kovalenko, E.O. Gordiyenko // *CryoLetters*. – 2015. – V.36, №3. – P. 221-226.

28. Гордієнко О.І. Роль електростатичних взаємодій у адгезії *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини в середовищах з різною концентрацією 1:1 електроліту / О.І. Гордієнко, М.О. Баранник, Є.О. Гордієнко // *Біофізичний вісник*. – 2015. – № 33(1). – С. 30-37.

29. Гордієнко О.І. Роль електростатичних взаємодій у адгезії *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини в середовищах з різною концентрацією 2:1 електроліту / О.І. Гордієнко, М.О. Баранник, Є.О. Гордієнко // *Біофізичний вісник*. – 2015. – № 33(1). – С. 38-47.

30. Anikieieva M. Influence of physical-chemical characteristics of the medium on bacteriumfixing activity of the human erythrocytes /M. Anikieieva, O. Gordiyenko // 3rd Congress of Croatian physiological society, September 13-15, 2013: abstract. – Rijeka (Croatia). – 2013. – Period. biologorum, Vol 115, Suppl 2. – P.15.

31. Anikieieva M.O. Effect of ionic strength on *Streptococcus thermophilus* microbial adhesion on human erythrocytes [Электронный ресурс] / M.O. Anikieieva // 13<sup>th</sup> Kharkiv Young Scientists Conference on Radiophysics, Electronics, Photonics and Biophysics», 2013. – Kharkiv (Ukraine). – 2013. –Bio-5\_en.

32. Анікеєва М.О. Вплив кислоотно-лужного балансу середовища на бактеріофіксуючу активність еритроцитів людини / М.О. Анікеєва // *Матеріали VIII Міжнародної конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери», 3-6 грудня, 2013 р.– Харків (Україна).* – 2013. – С. 27.

33. Anikieieva M. The Dependence of Adhesion of Microorganisms to Erythrocytes on the Concentration of Divalent Cations / M. Anikieieva, O. Gordiyenko // *Scientific Youth: Priorities of the World Science. Festschrift of the IV International Scientific-Practical Conference. February 20, 2014.* – Luhansk (Ukraine). – 2014. – P. 10–13.

34. Anikieieva M. The dependence of microorganisms adhesion to erythrocytes on the concentration of monovalent cations / M. Anikieieva, O. Gordienko // Fundamental And Applied Research In Biology: Abstracts of the IIIrd International conference of young scientists, February 24-27, 2014. – Donetsk (Ukraine). – 2014. – P. 299.

35. Аникеева М.А. Влияние режимов криоконсервирования эритроцитов человека на адгезию на них лактобактерий *Streptococcus thermophilus* / М.А. Аникеева, С.Е. Коваленко, И.Ф. Коваленко, В.А. Киреев, О.И. Гордиенко // Материалы Международной конференции «Теоретические и практические аспекты современной криобиологии», 24 марта 2014. – Сыктывкар (Россия). - С. 18-22.

36. Anikieieva M. The dependence of lactobacilli *Streptococcus thermophilus* adhesion to human erythrocytes on the concentration of monovalent ( $\text{Na}^+$ ) and divalent ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) cations / M. Anikieieva, O. Gordienko // Youth and Progress of Biology: Book of Abstracts of X International Scientific Conference for Students and PhD Students, 8 – 11 April 2014. – Lviv (Ukraine). – 2014. – P. 16-17.

37. Анікєєва М.О. Вплив криоконсервування еритроцитів під захистом ПЕО-1500 на їх адгезивну здатність до лактобактерій *Streptococcus thermophilus* / М.О. Анікєєва, О.І. Гордієнко // матеріали науково-технічної конференції «Фізика, електроніка, електротехніка – 2014», 21-26 квітня, 2014. – Суми (Україна). – 2014. – с. 36.

38. Anikieieva M.O. Influence of cryopreservation models of human erythrocytes on their adhesion to *Streptococcus thermophilus* lactobacilli / M.O. Anikieieva, O.I. Gordiyenko // V International Conference for Young Scientists “Low Temperature Physics”, June 2-6, 2014. – Kharkiv (Ukraine). – 2014. – P. 151.

39. Анікєєва М.О. Вплив двовалентних катіонів на поверхневий заряд лактобактерій *S. thermophilus* / М.О. Анікєєва, О.І. Гордієнко // І Всеукраїнська науково-практична конференція «Сучасні проблеми

викладання та наукових досліджень біології у ВНЗ України», 8-9 жовтня, 2014. – Дніпропетровськ (Україна). – 2014. – с. 13-14.

40. Anikieieva M.O. Effect of divalent cations on erythrocyte surface charge / M.O. Anikieieva, O.I. Gordiyenko [Электронный ресурс] // Proc. «14<sup>th</sup> Kharkiv Young Scientists Conference on Radiophysics, Electronics, Photonics and Biophysics», October, 14 – 17, 2014. – Kharkiv (Ukraine). – 2014. - Bio-4\_en.

41. Anikieieva M.O. Effect of erythrocytes cryopreservation protected 1,2-propanediol on its adhesiveness to lactobacilli *S. thermophilus* / M.O. Anikieieva // Abstracts of the IX international young scientists' conference "Biology: from a molecule up to biosphere", November, 18–20, 2014. – Kharkiv (Ukraine). – 2014. – P. 26.

42. Boakye D. Gyabaah. Research of surface and adhesion energies of Van der Waals forces between surfaces / Boakye D. Gyabaah, M.O. Anikieieva // Abstracts of international scientific and practical conference of young scientists and student "Topical issues of new drugs development", April 23, 2015. – Kharkiv (Ukraine). – 2015. – P. 523.

43. Emegbo E. Investigation of dependence of lactobacilli surface charge on the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  in the incubation medium / E. Emegbo, M.O. Anikieieva // Abstracts of international scientific and practical conference of young scientists and student "Topical issues of new drugs development", April 23, 2015. – Kharkiv (Ukraine). – 2015. – P. 525.

44. Anikieieva M.O. Examining erythrocytes surface charge in relation to cryopreservation models/ M.O. Anikieieva, O.I. Gordiyenko // VI International Conference for Young Scientists "Low Temperature Physics", June 2 - 5, 2015. – Kharkiv (Ukraine). – 2015. – P. 106.

45. Gordiyenko O.I. Estimation of the surface potential of erythrocytes and Debye length in solutions with different concentration of NaCl / O.I. Gordiyenko, M.O. Varannyk // Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання сучасної науки», 16-17 жовтня 2015 року. – Львів (Україна). – Ч. I. – С. 31- 33.

46. An Y.H. Mechanisms of bacterial adhesion and pathogenesis of implant and tissue infection / An Y.H., Dickinson R.B., Doyle R.J. // Handbook of bacterial adhesion: principles, methods and applications. Human Press, Totowa. – 2000. – P. 1-27.
47. Dubreuil J.D. Helicobacter pylori interaction with host serum and extracellular matrix proteins: potential role in the infectious process / J.D. Dubreuil, G. Del Giudice, R. Rappuoli // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2002. – V. 66, N4. – P. 617-629.
48. Dunne W.M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? / W.M. Dunne // Clin. Microbiol. Rev. – 2002. – V.15, N8. – P. 155-166.
49. Whittaker C. J. Mechanisms of adhesion by oral bacteria / C. J. Whittaker, C. M. Klier, P. E Kolenbrander // Annual review of microbiology. – 1996. – V.50. – P. 513-552.
50. Bos R. Influence of ionic strength and substratum hydrophobicity on the co-adhesion of oral microbial pairs / R. Bos, H. C. van der Mei, H. J. Busscher // Microbiology. – 1996. – V.142. — P. 2355-2361.
51. Verwey E.J.W. Theory of the stability of lyophobic colloids / E.J.W. Verwey, J.Th.G. Overbeek // Amsterdam etc.: Elsevier. - 1948. - 205 p.
52. London F. Theorie und systematik der molekularkrafte / F. London // Zeitschrift für Physik. – 1930. – Bd.63. -S. 245-279.
53. London F. Über einige Eigenschaften und Anwendungen der Molekularkräfte / F. London // Z.Phys. Chem. Abt. – 1930. – Bd.11. - S.222-251.
54. Каплан И. Г. Введение в теорию межмолекулярных взаимодействий / И. Г. Каплан // М.: Наука. - 1982. — 312 с.
55. Onsager L. Electric moments of molecules in liquids / L. Onsager // J. Amer. Chem. Soc. – 1936. – V.58 (8). – P. 1486-1493.
56. Лифшиц Е.М. Теория молекулярных сил притяжения между твердыми телами. / Е.М. Лифшиц // ЖЭТФ. - 1955. - Т.29, №1. - С. 94-112.

57. Tabor D. Direct measurement of normal and retarded van der Waals forces / D. Tabor, R.H. Winterto // *Proc. R. Soc. Lond. Ser. A: Math. Phys. Sci.* – 1969. – V.312. – P. 435–450.
58. Keesom W.H. The second virial coefficient for rigid spherical molecules whose mutual attraction is equivalent to that of a quadruplet placed at its center / W.H. Keesom // *Proc. R. Acad. Sci.* – 1915. – V.18. – P. 636–646.
59. Gerschel A. Dipole-induced static and dynamic liquid structures / A. Gerschel // *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2 Mol. Chem. Phys.* – 1987. – V.83. – P. 1765–1776.
60. Debye P. Die van der Waalsschen Kohäsionskräfte / P. Debye // *Physikalische Zeitschrift.* – 1920. – V.21. – P. 178–187.
61. London F. Zur Theorie und Systematik der Molekularkräfte / F. London // *Zeitschrift für Physik A Hadrons Nuclei.* – 1930. – V.63. – P. 245–279.
62. Leite F.L. Theoretical Models for Surface Forces and Adhesion and Their Measurement Using Atomic Force Microscopy / F.L. Leite, C.C. Bueno, A.L. Da Róz, E.C. Ziemath, O.N. Oliveira // *Int. J. Mol. Sci.* – 2012. – V.13. – P. 12773–12856.
63. Israelachvili J. Intermolecular and Surface Forces / J. Israelachvili // London: Academic Press. – 1985–2004. — 450 p.
64. Hamaker H.C. The London—Van der Waals attraction between spherical particles / H.C. Hamaker // *Physica.* – 1937. – V.4. – P. 1058–1072.
65. Mahanty J. Dispersion Forces / J. Mahanty, B.W. Ninham // Academic Press, New York. – 1976. – 236 p.
66. Marra J. Controlled deposition of lipid monolayers and bilayers onto mica and direct force measurements between galactolipid bilayers in aqueous-solutions / J. Marra // *J. Colloid Interface Sci.* – 1985. – V.107. – P. 446–458.
67. Carfi D. The pointwise Hellmann–Feynman theorem / D. Carfi // *AAPP Physical, Mathematical, and Natural Sciences.* – 2010. – V.88 (1). – P. 1–14.

68. Hunter R. J. Foundations of Colloid Science / R.J. Hunter // Clarendon Press, Oxford. – 1987. – V. 1.
69. Hermansson M. The DLVO theory in microbial adhesion / M. Hermansson // Colloids Surf. B Biointerfaces. – 1999. – V.14. – P.105–119.
70. Perutz M. F. Electrostatic effects in proteins / M.F. Perutz // Science. – 1978. –V. 201. – P. 1187–1191.
71. Besteman K. Charge inversion accompanies DNA condensation by multivalent ions / K. Besteman, K. van Eijk, S.G. Lemay / Nat. Phys. – 2007. – V. 3. – P. 641–644.
72. Mulgrew-Nesbitt A. The role of electrostatics in protein-membrane interactions / A. Mulgrew-Nesbitt, K. Diraviyam D. Murray // Biochim. Biophys. Acta. – 2006. – V. 1761. – P. 812–826.
73. Sheinerman F. B. Electrostatic aspects of protein-protein interactions / F.B. Sheinerman, R. Norel, B. Honig // Curr. Opin. Struct. Biol. – 2000. –V. 10. – P. 153–159.
74. Misra V.K. Electrostatic contributions to the binding free energy of the  $\lambda$ cI repressor to DNA / V.K. Misra, J.L. Hecht, B. Honig // Biophys. J. – 1998. – V. 75. – P. 2262–2273.
75. Marra J. Effects of counterion specificity on the interactions between quaternary ammonium surfactants in monolayers and bilayers / J. Marra // J. Phys. Chem. – 1986. — V. 90. – P. 2145-2150.
76. Marra J. Direct measurement of the interactions between phosphatidylglycerol bilayers in aqueous-electrolyte solutions/ J. Marra // J.Biophys. – 1986. – V. 50. – P. 815-825
77. Guldbrand L. Electrical double layer forces. A Monte Carlo study / L. Guldbrand, B. Jonsson, H. Wennenstrom, P. Linse // J. Chem. Phys. – 1984. – № 80. – P. 2221-2228.
78. Дерягин Б. В. Теория устойчивости сильно заряженных лиофобных золь и слипания сильно заряженных частиц в растворах

электролитов / Б.В. Дерягин, Л.Д. Ландау / ЖЭТФ. – 1941. – т. 11, № 2. – С. 802 – 821.

79. Henderson D. A Simple Theory for the Force between Spheres Immersed in a Fluid / D. Henderson, M. Lozada-Cassou // Journal of Colloid and Interface Science. – 1986. – № 114. – P. 180–183.

80. Evans R. Liquids at interfaces: what can a theorist contribute? / R. Evans, A.O. Parry // J. Phys. (Condens. Matter). – 1990. – V. 2. – SA15-SA32.

81. Caffrey M. Real-time x-ray diffraction using synchrotron radiation: system characterization and applications / M. Caffrey, D. H. Bilderback // Nucl. Instrum. And Meth. – 1983. – № 208. – P. 495-510.

82. Caffrey M. Water adsorption isotherms and hydration forces for lysolipids and diacylphospholipids / M. Caffrey, D.H. Bilderback // Biophys. J. – 1989. – V. 55. – P. 1093– 1100.

83. Rand R.P. Hydration Forces Between Phospholipid Bilayers / R.P. Rand, V.A. Parsegian // Biochim.Biophys. Acta. – 1989. – V.988. – P. 351-376.

84. Day E.P. Reversibility of sodium-induced aggregation of sonicated phosphatidylserine vesicles / E.P. Day, A.Y.W. Kwok, S.K. Hark, J.T. Ho, W.J. Vail, J. Bentz, S. Nir // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1980. – V. 77. – P. 4026–4029.

85. Wilschut N. Calcium/magnesium specificity in membrane fusion: kinetics of aggregation and fusion of phosphatidylserine vesicles and the role of bilayer curvature / N.D. Wilschut, D. Papahadjopoulos // Biochemistry. – 1981. – V. 20. – P. 3126–3133.

86. McIver D.J.L. Control of membrane-fusion by interfacial water – model for the actions of divalent-cations / D.J.L. McIver // Physiological chemistry and physics. – 1979. – V. 11 (4). – P. 289–302.

87. Marra J. Direct Measurements of Forces between Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine Bilayers in Aqueous Electrolyte Solutions / J. Marra, J.N. Israelachvili // Biochemistry. 1985. – V. 24. – P. 4608–4618.

88. Самоделкин Е.И. Ранние клеточные реакции на микробные антигены и новые методы детекции антигенов: автореф. дис. докт. мед. наук / Е.И. Самоделкин // Челябинск. – 2001 – 40 с.
89. Молчанова Т.П. Основы молекулярной организации белков мембраны эритроцитов и их дефекты, приводящие к гемолитическим анемиям / Т.П. Молчанова // Гематология и трансфузиология. – 1989. – № 7. – С. 32 – 41.
90. Evans D.G. Adhesion Properties of *Helicobacter pilori* / D.G. Evans, D.J. Evans // Methods in Enzimology, Academic Press. – 1995. – V. 253. – P. 336-360.
91. Masuda M. Assay of catechol-O-methyltransferase activity in human erythrocytes using norepinephrine as a natural substrate / M. Masuda, M. Tsunoda, Y. Yusa et al. // Ann Clin Biochem. – 2002. - Vol. 39. –Pt 6 - P. 589-594.
92. Погорелов В.М. Лабораторно-клиническая диагностика анемий / В.М. Погорелов, Г.И. Козинец, Л.Г. Ковалева // М.: Медицинское информационное агентство. – 2004. – 173 с.
93. Бойчук Н.В. Гистология / Н.В. Бойчук, Р.Р. Исламов, С.Л. Кузнецов, Е.Г. Улумбеков, Ю.А. Челышев // М.: ГЕОТАР-МЕД. – 2001. – 672 с.
94. Гилберт С. Биология развития / С. Гилберт // М.: «Мир». – 1995. – Т.3. – 352 с.
95. Lyons A.J. Cell adhesion molecules, the extracellular matrix and oral squamous carcinoma / A.J. Lyons, J. Jones // Int J Oral Maxillofac Surg. – 2007. – V. 36. – P. 671–679.
96. Hynes R.O. Integrins: versatility, modulation, and signalling in cell adhesion / R.O. Hynes // Cell. – 1992. – V. 69. – P. 11–25.
97. Gogali A. Integrin receptors in primary lung cancer / A. Gogali, K. Charalabopoulos, S. Constantopoulos // Exp Oncol. – 2004. – V. 26. – P. 106-110.

98. Mousa S.A. Cell adhesion molecules: potential therapeutic and diagnostic implications / S.A. Mousa // *Mol. Biotechnol.* – 2008. – V. 38. – P. 33-40.
99. Cagle P.T. Cell adhesion molecules / P.T. Cagle, T.C. Allen (etc.) // *Basic Concepts of Molecular Pathology, Molecular Pathology Library 2.* – 2009. – P. 19–28.
100. Charalabopoulos K. Cadherin superfamily of adhesion molecules in primary lung cancer / K. Charalabopoulos, A. Gogali, O.K. Kostoula (etc.) // *Exp Oncol.* – 2004. – V. 26. – P. 256–260.
101. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as morphogenetic regulator / M. Takeichi // *Science.* – 1991. – V. 251. – P. 1451–1459.
102. Kemler R. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion / R. Kemler // *Trends Genet.* – 1993. – V. 9. – P. 317–321.
103. Ozawa M. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvamorulin associates with three independent proteins structurally related in different species / M. Ozawa, H. Baribault, R. Kemler // *EMBO J.* – 1989 – V. 8. – P. 1711–1717.
104. Hirano S. Identification of a neural  $\alpha$ -catenin as a key regulator of cadherin function and multicellular organization / S. Hirano, N. Kinoto, Y. Shimoyama (etc.) // *Cell.* – 1992. – V. 70. – P. 293–301.
105. Breier G. Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial cadherin in early stage development of cardiovascular system / G. Breier, F. Breviario, L. Caveda et al. // *Blood.* – 1996. – V. 87. – P. 630–641.
106. Kneuer C. Selectins potential pharmacological targets / C. Kneuer, C. Ehrhardt, M.W. Radomski (etc.) // *Drug Discov Today.* – 2006. – V. 11. – P. 1034–1040.
107. Petruzzelli L. Structure and function of cell adhesion molecules / L. Petruzzelli, M. Takami, H.D. Humes // *Am J Med.* – 1999. – V. 106. – P. 467-476.

108. Carlos T.M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules / T.M. Carlos, J.M. Harlan // *Blood*. – 1994. – V. 84. – P. 2068–2101.
109. Springer T. Adhesion receptors of the immune system / T. Springer // *Nature*. – 1990. – V. 346. – P. 425–434.
110. Aplin A.E. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins / A.E. Aplin, A. Howe, S.K. Alahari (etc.) // *Pharmacol Rev*. – 1998. – V. 50. – P. 197–263.
111. Rosales C. Signal transduction by cell adhesion receptors / C. Rosales, V. O'Brian, L. Kornberg (etc.) // *Biochim Biophys Acta*. – 1995. – V. 1242. – P. 77–98.
112. Nair K.S. Expression of cell adhesion molecules in oesophageal carcinoma and its prognostic value / K.S. Nair, R. Naidoo, R. Chetty // *J Clin Pathol*. – 2005. – V. 58. – P. 343–351.
113. Miyake K. Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition / K. Miyake, C.B. Underhill, J. Lesley (etc.) // *J. Exp. Med.* - 1990. – V. 172. – P. 69-75.
114. Curtis A.S.G. Substrate hydroxylation and cell adhesion / A.S.G. Curtis, J.V. Forrester, P. Clark // *J. Cell Sci*. – 1998. – V. 86. – P. 9-24.
115. Mrksich M. A surface chemistry approach to studying cell adhesion / M. Mrksich // *Chem. Soc. Rev*. – 2000. – V. 29. – P. 267–273.
116. Hillery C. A. Increased adhesion of erythrocytes to components of the extracellular matrix: isolation and characterization of a red blood cell lipid that binds thrombospondin and laminin / C.A. Hillery, M.C. Du, R.R. Montgomery (etc.) // *J. Blood*. – 1996. – V. 87, №11. – P. 4879-4886.
117. Hoover R. Adhesion of normal and sickle erythrocytes to endothelial monolayer cultures / R. Hoover, R. Rubin, G. Wise (etc.) // *J. Blood*. – 1979. – V. 54, № 4. – P. 872-876.

118. Walther B.T. A quantitative assay for intercellular adhesion / B.T. Walther, R. Ohman, S. Roseman // *Proc Nat Acad Sci. USA.* – 1973. – V. 70. – P. 1569.
119. Bell G. Models for the specific adhesion of cells to cells / G. Bell // *Science.* – 1978. - V. 200. – P. 618-627.
120. Rutishauser U. Neural cell adhesion between spinal cord molecule mediates initial interactions neurons and muscle cells in culture / U. Rutishauser, M. Grumet, G.M. Edelman // *J. Cell Biol.* – 1983. – V. 97. – P. 145-152.
121. Takeichi M. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis / M. Takeichi // *Development.* – 1988. – V.102. – P. 639-655.
122. Granger D.N. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion / D.N. Granger, P. Kubes // *J. Leukocyte Biol.* – 1994. – V. 55. – P. 639-655.
123. Андреева Л.Н. Реакция прилипания стафилококков к эритроцитам как показатель естественной резистентности организма / Л.Н. Андреева, Т.Н. Любавина, А.М. Смирнова // *Гигиена и санитария.* – 1980. - № 5. – С. 30-32.
124. Дмитриева Н.Ф. Персистенция *Streptococcus pyogenes* / Н.Ф. Дмитриева, Ю.М. Тимофеев, Н.И. Брико // *Журн. микробиол.* – 2009. - № 3. - С. 104 -109.
125. Симонова Е.В. Роль нормальной микрофлоры в поддержании здоровья человека / Е.В. Симонова, О.А. Пономарева / *Сибирский медицинский журнал.* – 2008. - № 8. - С. 20-25.
126. Кузнецов В.Ф. Эффекты начального специфического взаимодействия антигена с кровью и экспериментальное обоснование ранней специфической диагностики инфекций: автореф. дис. канд. мед. наук / В.Ф. Кузнецов // Пермь. – 1985. – 22 с.

127. Мушкамбаров Н.Н. Молекулярная биология. Учебное пособие для студентов медицинских вузов / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов // М.: ООО «Медицинское информационное агентство». – 2003. – 544 с.

128. Крылов В.Н. Электромагнитные поля и излучения в биологии и медицине / В.Н. Крылов // Вестник Нижегородского университета им. Лобачевского. Серия Биология. – 2003. — Вып. 1(6). – С.14-24.

129. Базеров М.А. Адгезивные свойства и характеристика поверхности стрептококков, колонизирующих клетки буккального эпителия / М.А. Базеров, С.Е. Воскун, Л.Ф. Новикова // Журн. микробиол. – 1993. - № 4. - С.37-41.

130. Брилис В.И. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов./ В.И. Брилис, Т.А. Брилене Х.П. Ленцнер и др. // Лаб. дело. –1986. – № 4. – С.210-212.

131. Гизатулина С.С. Способ оценки состояния микрофлоры кишечника человека по количеству адгезивно-активных колоний и типу адгезинов / С.С. Гизатулина, М.О. Биргер, Л.И. Кулинич и др. // Журн. микробиол. – 1991. - №4. - С.21 -23.

132. Зайцева Е.А. Влияние температуры на адгезивные свойства листерий / Е.А. Зайцева, Г.П. Сомов // Журн. микробиол. – 2006. - №3. - С.20-23.

133. Богданова Е.А. Адгезивные свойства лактобактерий и эшерихий в различных отделах желудочно-кишечного тракта человека в норме и патологии / Е.А. Богданова, Ю.В. Несвижский, А.А. Воробьев и др. // Вестник РАМН. – 2006. – № 1. – С.35-38.

134. Holzapfel W.H. Overview of gut flora and probiotics / W.H. Holzapfel, P. Haberer, J. Snel, U. Schillinger, J.H.J. Huis in't Veld // Int. J. Food Microbiol. – 1998. – V.41. – P.85-101.

135. Sanders M.E. Effect of consumption of lactic cultures on human health / M.E. Sanders // Adv. Food Nutr. Res. – 1993. – V.37. – P.67-130.

136. Boonaert C.J.P. Surface of lactic acid bacteria: Relationships between chemical composition and physicochemical properties / C.J.P. Boonaert, P.G. Rouxhet // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – V. 66. – P. 2548–2554.
137. Schar-Zammaretti P. The cell wall of lactic acid bacteria: Surface constituents and macromolecular conformations / P. Schar-Zammaretti, J. Ubbink // *Biophys. J.* – 2003. – V. 85. – P. 4076–4092.
138. Delcour J. The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria / J. Delcour, T. Ferain, M. Deghorain, E. Palumbo, P. Hols // *Anton. Leeuw. Int. J. G.* – 1999. – V. 76. – P. 159–184.
139. Neuhaus F.C. A continuum of anionic charge: Structures and functions of D-Alanyl-Teichoic acids in Gram-positive bacteria / F.C. Neuhaus, J. Baddiley // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2003. – V. 67. – P. 686–723.
140. Desvaux M. Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: From single protein to macromolecular protein structure / M. Desvaux, E. Dumas, I. Chafsey, M. Hebraud // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2006. – V. 256. – P. 1–15.
141. Sanchez B. Exported proteins in probiotic bacteria: Adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host / B. Sanchez, P. Bressollier, M.C. Urdaci // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2008. – V. 54. – P. 1–17.
142. Avall-Jaaskelainen S. Lactobacillus surface layers and their applications / S. Avall-Jaaskelainen, A. Palva // *FEMS Microbiol. Rev.* - 2005. – V. 29. – P. 511–529.
143. Van der Mei H.C. Cell surface hydrophobicity is conveyed by S-layer proteins- a study in recombinant lactobacilli / H.C. Van der Mei, B. Van der Belt-Gritter, P.H. Pouwels, B. Martinez, H.J. Busscher // *Colloids Surf. B: Biointerf.* – 2003. – V. 28. – P. 127-134.
144. Millsap K. Adhesion of Lactobacillus species in Urine and Phosphate Buffer to Silicone Rubber and Glass Under Flow / K. Millsap, G. Reid, H.C. van der Mei, H.J. Busscher // *Biomaterials.* – 1997. – V.18 (1). – P. 87-91.

145. Absolom D.R. Surface thermodynamics of bacterial adhesion / D.R. Absolom, F.V. Lamberti, Z. Policova, W. Zingg, C.J. van Oss, and A.W. Neumann // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1983. – V. 46. – P. 90-97.
146. Vadillo-Rodriguez V. Dynamic cell surface hydrophobicity of *Lactobacillus* strains with and without surface layer proteins // V. Vadillo-Rodriguez, H.J. Busscher, W. Norde, J. De Vries, H.C. van der Mei // *J. Bacteriol.* – 2004. – V. 186 (19). – P. 6647-6650.
147. Derjaguin B. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes / B. Derjaguin, L. Landau // *Acta Physico Chemica URSS.* – 1941. – V. 14. — P. 633.
148. Van Oss C.J. Hydrophobicity of biosurfaces - Origin, quantitative determination and interaction energies / C.J. van Oss // *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* – 1995. – V. 5. – P. 91-110.
149. Marshall K.C. Interfaces in microbial ecology / K.C. Marshall // Harvard University Press, Cambridge, Mass. – 1976. – P. 131.
150. Van der Mei H. C. Electrophoretic mobility distributions of single-strain microbial populations / H.C. van der Mei, H.J. Busscher // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – V. 67. – P. 491–494.
151. Deepika G. Surface and adhesion properties of lactobacilli / G. Deepika, D. Charalampopoulos // *Advances in applied microbiology.* – 2010. – V. 70. – P. 127-152.
152. Pelletier C. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains / C. Pelletier, C. Bouley, C. Cayuela, S. Bouttier, P. Bourlioux, M.N. Bellon-Fontaine // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – V. 63. – P. 1725–1731.
153. Winkel J.G.J. Red blood cell surface charge and alcian blue binding/ J.G.J. Winkel, J.F.M. Wetzels, J.L.P. Duijnhoven, R.A.P. Koene, P.J.A. Capel // *Nephrol Dial Transplant.* – 1987. – V. 2. – P. 280–281.

154. Vadillo-Rodríguez V. Atomic force microscopic corroboration of bond aging for adhesion of *Streptococcus thermophilus* to solid substrata / V. Vadillo-Rodríguez, H.J. Busscher, W. Norde, J. De Vries, H.C. van der Mei // Journal of Colloid and Interface Science.- 2004. - V. 278. - P. 251–254.

155. Reid G. Correlation between genetic, physico-chemical surface characteristics and adhesion of four strains of *Lactobacillus* / G. Reid, H. Bialkowska-Hobrzanska, H. C. van der Mei, H.J. Busscher // Colloid Surf. – 1999. – B 13. – P. 75–81.

156. Granato D. Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells / D. Granato, F. Perotti, I. Masserey, M. Rouvet, M. Golliard, A. Servin, and D. Brassart. // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – V. 35. – P. 1071-1077.

157. London J. Purification and Characterization of a *Bacteroides loeschei* Adhesin That Interacts with Prokaryotic and Eukaryotic Cells / J. London, J. Allen // J. of bacteriology. – 1990. – No. 5. – P. 2527-2534.

158. McEldowney S. Variability of the Influence of physicochemical factors affecting bacterial adhesion to polystyrene substrata // S. McEldowney, M. Fletcher // Appl. Environ. Microbiol. – 1986.- V. 52. – P. 460-465.

159. Borinski R. Surface characteristics of *Wolinella recta* ATCC 33238 and human clinical isolates: correlation of structure with function / R. Borinski, S.C. Holt // Infect Immun. – 1990. – V.58, N 9. – P. 2770–2776.

160. Millsap K.W. Adhesion of *Lactobacillus* species in urine and phosphate buffer to silicone rubber and glass under flow / K.W. Millsap, G. Reid, H.C. Van der Mei, H.J. Busscher // Biomaterials. – 1996. –V.18. – P. 87-91.

161. Machado M.C. Osmotic response in *Lactobacillus casei* ATCC 393: biochemical and biophysical characteristics of membrane / M.C. Machado, C.S. López, H. Heras, E.A. Rivas // Arch Biochem Biophys. – 2004. – V.422, N.1. – P. 61-70.

162. Vadillo-Rodriguez V. Role of lactobacillus cell surface hydrophobicity as probed by AFM in adhesion to surfaces at low and high ionic strength / V. Vadillo-Rodriguez, H.J. Busschera, H.C. van der Mei et al. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2005. – V. 41. – P. 33–41.
163. Martinez-Gil M. Calcium causes multimerization of the large adhesin *LapF* and modulates biofilm formation by *Pseudomonas putida* / M. Martinez-Gil, D. Romero, R. Kolter, M. Espinosa-Urgela // *J. Bacteriol.* – 2012. – V. 194, N 24. – P. 6782–6789.
164. Arrizubieta M.J. Calcium inhibits Bap-dependent multicellular behavior in *Staphylococcus aureus* / M.J. Arrizubieta, A. Toledo-Arana, B. Amorena et al. // *J. Bacteriol.* - 2004. – V. 186. – P. 7490 –7498.
165. Yousef-Coronado F. In silico analysis of large microbial surface proteins / F. Yousef-Coronado, M. Espinosa-Urgel // *Res. Microbiol.* – 2007. – V. 158. – P. 545–550.
166. Herrenknecht K. Cadherins In: *Molecular biology of cell adhesion molecules* / K. Herrenknecht // ed. M.A. Horton. John Wiley, NY. – 1996. – P. 45-69.
167. Driscoll P.C. Structure of domain 1 of rat T lymphocyte CD2 antigen / P.C. Driscoll, J.G. Cyster, I.D. Campbell, A.F. Williams // *Nature*. - 1991. – V. 353. – P.762–765.
168. Blattman J.N. Cancer immunotherapy: A treatment for the masses / J.N. Blattman, P.D. Greenberg // *Science*. - 2004. – V. 305 – P. 200–205.
169. van der Merwe P.A. Topology of the CD2–CD48 cell-adhesion molecule complex: Implications for antigen recognition by T cells / P.A. van der Merwe, P.N. McNamee, E.A. Davies et al. // *Curr. Biol.* – 1995 – V. 5. – P. 74–84.
170. Jones L. Rational design of a novel calcium-binding site adjacent to the ligand-binding site on CD2 increases its CD48 affinity / L.M. Jones, W. Yang, A.W. Maniccia et al. // *Protein Science*. – 2008. – V. 17. – P. 439–449.
171. Chen H.A. Determination of pKa values of carboxyl groups in the N-terminal domain of rat CD2: Anomalous pKa of a glutamate on the ligand-binding

surface / H.A. Chen, M. Pfuhl, M.S. McAlister, P.C. Driscoll // *Biochemistry*. – 2000. – V. 39. – P. 6814–6824.

172. Davis S.J. The role of charged residues mediating low affinity protein–protein recognition at the cell surface by CD2 / S.J. Davis, E.A. Davies, M.G. Tucknott et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1998. – V. 95. – P. 5490–5494.

173. Yang W. Structural analysis, identification, and design of calcium-binding sites in proteins / W. Yang, H.W. Lee, H. Hellinga, J.J. Yang // *Proteins*. – 2002. – V. 47. – P. 344–356.

174. Marsden B.J. Calcium binding proteins. Elucidating the contributions to calcium affinity from an analysis of species variants and peptide fragments / B.J. Marsden, G.S. Shaw, B.D. Sykes // *Biochem. Cell Biol.* – 1990. – V. 68. – P. 587–601.

175. Boyd C.D. LapG, required for modulating biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1, is a calcium-dependent protease / C.D. Boyd, D. Chatterjee, H. Sondermann, G.A. O'Toole // *J. Bacteriol.* – 2012. – V.194. – P. 4406–4414.

176. Cruz L.F. Calcium increases surface attachment, biofilm formation, and twitching motility in *Xylella fastidiosa* / L.F. Cruz, P.A. Cobine, L. De La Fuente // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2012. – V. 78. – P. 1321–1331.

177. Garrison-Schilling K.L. Calcium promotes exopolysaccharide phase variation and biofilm formation of the resulting phase variants in the human pathogen *Vibrio vulnificus* / K.L. Garrison-Schilling et al.// *Environ. Microbiol.* – 2011. – V. 13. – P. 643– 654.

178. Theunissen S. The 285 kDa Bap/RTX hybrid cell surface protein (SO4317) of *Shewanella oneidensis* MR-1 is a key mediator of biofilm formation / S. Theunissen // *Res. Microbiol.* – 2010. – V. 161. – P. 144 –152.

179. Mahalingam B. Stable Coordination of the Inhibitory Ca<sup>2+</sup> Ion at the Metal Ion-Dependent Adhesion Site in Integrin CD11b/CD18 by an Antibody-Derived Ligand Aspartate: Implications for Integrin Regulation and Structure-

Based Drug Design / B. Mahalingam, K. Ajroud, J.L.S. Alonso et al. // J. Immun. – 2011. – V.187. – P. 6393–6401.

180. Dudev T. Monodentate versus bidentate carboxylate binding in magnesium and calcium proteins: what are the basic principles? / T. Dudev, C. Lim // J. Phys. Chem. – 2004. – 108. – P. 4546–4557.

181. Marcus Y. Ionic radii in aqueous solutions / Y. Marcus // Chem. Rev. 1988. – V.88. – P. 1475–1498.

182. San Sebastian E. On the affinity regulation of the metal-ion-dependent adhesion sites in integrins / E. San Sebastian, J.M. Mercero, R.H. Stote et al.// J. Am. Chem. Soc. – 2006. – V. 128. – P. 3554–3563.

183. Abramson H.A. Electrophoresis of Proteins / H.A. Abramson, L.S. Moyer, M.H. Gorin.; Reinhold, New York. – 1942.

184. Heard D.H. The influence of pH and ionic strength on the electrokinetic stability of the human erythrocyte membrane / D.H. Heard, G.V. Seaman // J Gen Physiol. – 1960. – V. 43. – P. 635–654.

185. Bangham A. D. The charged groups at the interface of some blood cells / A. D. Bangham, B. A. Pethica, G. V. Seaman // Biochem. J. – 1958. – V. 69. – P. 12-19.

186. Furchgott R.F. Electrophoretic studies on human red blood cells / R.F. Furchgott, E. Ponder // J Gen Physiol. – 1941. – V.24, N.4. – P. 447–457.

187. Eylar E.H. The Contribution of Sialic Acid to the Surface Charge of the Erythrocyte / E.H. Eylar, M.N.A. Madoff, O.V. Brody, J.L. Oncley // J. Biol. Chem.- 1962.-Vol. 237, No. 6. - P. 1992-2000.

188. Matsuo Y. Receptor-like Molecules on Human Intestinal Epithelial Cells Interact with an Adhesion Factor from *Lactobacillus reuteri* / Y. Matsuo, Y. Miyoshi, S. Okada, E. Saton // Bioscience of Microbiota, Food and Health. – 2012. – V.31. – P. 93–102.

189. Chauviere G. Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells / G. Chauviere, M.-H.Coconnier, S. Kerneis et al., // J. Gen. Microbiol. – 2012. – V.138. – P. 1689-1696.

190. Lim S.-M. Factors Affecting Adhesion of Lactic Acid Bacteria to Caco-2 Cells and Inhibitory Effect on Infection of *Salmonella Typhimurium* / S.M. Lim , D.H. Ahn //J. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – V. 22. – P. 1731–1739.
191. Larsen N. The effect of calcium ions on adhesion and competitive exclusion of *Lactobacillus* ssp. and *E. coli* O138 / N. Larsen, P. Nissen, and W.G.T. Willats. // Int. J. Food Microbiol. – 2007. – V. 114. – P. 113-119.
192. Petelska A. D. The effect of contrast medium SonoVue on the electric charge density of blood cells/ A.D. Petelska, J.R. Janica, J.Kotynska, U.Łebkowska, Z.A. Figaszewski //J. Membrane Biol. – 2012. – V. 245. – P. 15–22.
193. Murga M. L. F. Changes in the Surface Potential of *Lactobacillus acidophilus* under Freeze–Thawing Stress / M. L. F. Murga, G. F. de Valdez, A. E. Disalvo // Cryobiology. - 2000.- Vol. 41.- P. 10–16.
194. Hill R.S. Surface charge and hydrophobic properties of fresh and cryopreserved blood phagocytes as determined by partition in two-phase aqueous polymer systems / R.S. Hill, R. Norris-Jones, B. Still, D.E. Brooks // Am J Hematol. – 1986. – V. 21, № 3. – P. 249-257.
195. Henkelman S. Utilization and quality of cryopreserved red blood cells in transfusion medicine / S. Henkelman, F. Noorman, J.F. Badloe and J.W.M. Lagerberg // Vox Sang. – 2015. – V. 108. – P. 103–112.
196. Gordiyenko O.I. Experimental determination of human erythrocyte membrane permeability coefficients for a series of amides / O.I. Gordiyenko, Yu.E. Gordiyenko, T.P. Linnik, E.O. Gordiyenko // Cryo Letters. – 2005. – V. 26, № 1. – P. 65-72.
197. Gordienko O.I. Erythrocyte membrane permeability for a series of diols / O.I. Gordienko, T.P. Linnik, E.O. Gordienko //Bioelectrochemistry. – 2004. – V. 62, № 2. – P. 115-118.
198. Sputtek A. Cryopreservation of red blood cells and platelets / A. Sputtek // Methods Mol Biol. – 2007. – V. 368. – P. 283–301.
199. Hess J.R. Red cell freezing and its impact on the supply chain / J.R. Hess // Transfus Med. – 2004. – V. 14. – P. 1–8.

200. Scott K.L. Biopreservation of red blood cells: past, present, and future / K.L. Scott, J. Lecak, J.P. Acker // *Transfus Med Rev.* – 2005. – V. 19. – P. 127-142.

201. Пахомова Ю.С. Криозащитные свойства растворов на основе непроницающего ОЭГ<sub>n=25</sub> в комбинации с проникающими криопротекторами при замораживании эритроцитов человека / Ю.С. Пахомова, В.В. Чеканова, А.М. Компаниец // *Пробл. криобиол.криомед.* -2013.- 23, № 1. - С. 26-39.

202. Рамазанов В.В. Криозащитная эффективность комбинированной среды с непроницающим и проникающим криопротекторами при замораживании эритроцитарных суспензий различного объема / В.В. Рамазанов // *Пробл. криобиол.криомед.* -2013.- 23, № 2. - С. 124-134.

203. Liu B. Platelet characteristic antigens of CD34+ cells in cryopreserved cord blood: a study of platelet-derived microparticles in transplant processing / B. Liu , J.S. Chen, M. Cao, S.L. Gu, C. Liao , D.Z. Li , H.Z. Zhong. // *Vox Sang.* – 2004. – V.87, № 2. – P. 96-104.

204. Limaye L.S. Cryopreservation of human hematopoietic cells with membrane stabilizers and bioantioxidants as additives in the conventional freezing medium / L.S. Limaye, V.P. Kale // *Hematother Stem Cell Res.* 2001. - V10, № 5. – P. 709-718.

205. Sasnoor L.M. Supplementation of conventional freezing medium with a combination of catalase and trehalose results in better protection of surface molecules and functionality of hematopoietic cells / L.M. Sasnoor, V.P. Kale, L.S. Limaye // *J Hematother Stem Cell Res.* – 2003. – V.12, № 5. –P. 553-564.

206. Liu J.Y. Role of cellular adhesion molecule ICAM-1 in freezing/thawing injury of vascular endothelial cells / J.Y. Liu, Q.L. Shan, Z.R. Yang, P.H. Yan, F.R. Sun // *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi.* 2006. – V.22, № 2. – P.153-157.

207. Asadishad B. Transport, motility, biofilm forming potential and survival of *Bacillus subtilis* exposed to cold temperature and freeze-thaw /

B. Asadishad, A.L. Olsson, D.H. Dusane, S. Ghoshal, N. Tufenkji // Water Res. – 2014. – V. 58. – P. 239-247.

208. Shakirova L. Relationship between the cell surface hydrophobicity and survival of bacteria *Zymomonas mobilis* after exposures to ethanol, freezing or freeze-drying / L. Shakirova, L. Auzina, M. Grube, P. Zikmanis // J Ind Microbiol Biotechnol. – 2008. – V. 35, № 10. – P. 1175-1180.

209. Shakirova L. *Lactobacillus acidophilus* La5 and *Bifidobacterium lactis* Bb12 cell surface hydrophobicity and survival of the cells under adverse environmental conditions / L. Shakirova, M. Grube, M. Gavare, L. Auzina, P. Zikmanis // J Ind Microbiol Biotechnol. – 2013. – V. 40, № 1. – P. 85-93.

210. Pradier C.M. Surface characterization of three marine bacterial strains by Fourier transform IR, X-ray photoelectron spectroscopy, and time-of-flight secondary-ion mass spectrometry, correlation with adhesion on stainless steel surfaces / C.M. Pradier, C. Rubio, C. Poleunis, P. Bertrand, P. Marcus, C. Compère // J Phys Chem B. – 2005. – V. 109, № 19. – P. 9540-9549.

211. Криопротекторы / [Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В.] – К.: Наук. думка, 1977. – 204 с.