

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

**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

**Автореферат**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата фізико-математичних наук

**Харків – 2016**

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано в Харківському національному університеті імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України.

Науковий керівник: член-кореспондент НАН України, доктор біологічних наук, професор

**Гордієнко Євген Олександрович**

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, заступник директора з наукової роботи, завідувач відділу низькотемпературного консервування, м. Харків.

Офіційні опоненти:

доктор фізико-математичних наук, професор **Довбешко Галина Іванівна**, Інститут фізики НАН України, виконуючий обов'язки завідувача відділу фізики біологічних систем (м. Київ);

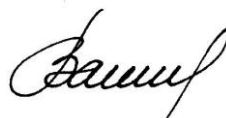
кандидат фізико-математичних наук, старший науковий співробітник **Вашенко Ольга Валеріївна**, Інститут сцинтиляційних матеріалів НАН України, старший науковий співробітник відділу молекулярних та гетероструктурованих матеріалів (м. Харків);

Захист відбудеться « 1 » вересня 2016 року о 15<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.051.13 Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна за адресою: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4, ауд. 7-4.

З дисертацією можна ознайомитись у Центральній науковій бібліотеці Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна за адресою: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4.

Автореферат розісланий « 29 » червня 2016 року.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради



Берест В.П.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**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. У зв'язку з ідентичністю глікофорина еритроцитів і глікокалікса епітеліоцитів еритроцити широко використовуються при дослідженні адгезивних властивостей бактерій. 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. 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). 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 протиіонів 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. 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:

Експериментально дослідити вплив рН, іонної сили середовища та вмісту двовалентних катіонів ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) на адгезію лактобактерій *S. thermophilus* на еритроцитах людини;

Експериментально дослідити залежність поверхневого заряду еритроцитів та лактобактерій *S. thermophilus* від рН та іонної сили середовища;

Експериментально дослідити вплив двовалентних катіонів на поверхневий заряд еритроцитів людини та лактобактерій *S. thermophilus*;

Теоретично розрахувати концентрації протиіонів біля поверхні еритроцитів, поверхневий потенціал еритроцитів у досліджуваних експериментальних розчинах та оцінити імовірність установаження адгезійного зв'язку між *S. thermophilus* та еритроцитами людини;

З'ясувати роль електростатичної складової у міжклітинній взаємодії на першому та другому етапах адгезії;

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 методіку для вивчення міжклітинної адгезії та показано можливість її використання для вивчення адгезії бактерій на клітинах людини. Дана методіка 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 [1,3,4,9] – участь в отриманні та інтерпретації експериментальних даних, обговорення результатів; [2,5,6] – проведення експериментів, інтерпретація експериментальних даних, написання статей; в роботах [7,8,12-19,23,24] – участь в отриманні та інтерпретації даних, проведенні розрахунків, написанні статей та тез; у роботах [10,11,20-22] – 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 імпаکت-фактором) та 16 тез доповідей на національних і міжнародних наукових конференціях.

**Структура та обсяг 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.

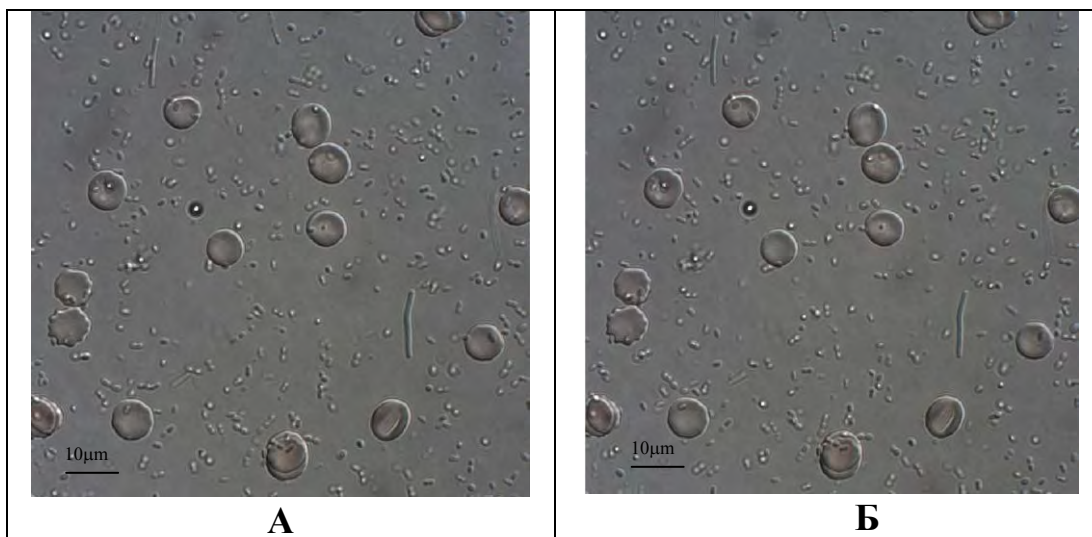
## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**У вступі** обґрунтовано актуальність обраної теми дисертації, сформульовано мету і задачі дослідження, окреслено наукову новизну та практичну цінність отриманих результатів, відзначено відомості про апробацію результатів, наведено загальну структуру дисертаційної роботи.

**У розділі 1 «Механізми клітинної адгезії (огляд літератури)»** подано опис фізичних та молекулярних механізмів клітинної адгезії. Висвітлено дві стадії клітинної адгезії. Перша стадія здійснюється за допомогою фізичних чинників, які утримують бактерії на поверхні клітини-господаря. Серед теоретичних підходів, здатних пояснити адгезію на фізичному рівні, найбільш ефективним є розширена теорія ДЛФО (теорія колоїдної стабільності Дерягіна-Ландау-Фервея-Овербека). Друга стадія клітинної адгезії включає взаємодії між адгезинами мікробних клітин і рецепторами клітин господаря. Розглянуто 5 основних груп молекул клітинної адгезії. Наведено види адгезії на молекулярному рівні: адгезія клітин до матриксу і міжклітинна адгезія. Розглянута бактеріофіксуюча здатність еритроцитів.

Відзначено переваги еритроцитів як зручного джерела клітин при дослідженні адгезивної здатності мікроорганізмів бактеріальної природи. Описано адгезивні властивості лактобактерій *Streptococcus thermophilus*.

У розділі 2 «Матеріали і методи» наведено загальну характеристику матеріалів і методів дослідження. Дослідження проведено на еритроцитах донорської крові людини, яку отримували у Харківському обласному центрі служби крові. В якості консерванту використовували консервуючий розчин «Флюгіцир». Бактеріальні клітини *S. thermophilus* отримували з бактеріальної закваски «Йогурт VIVO». При дослідженні впливу рН середовища було використано сольові буферні розчини з рН 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. У експерименті щодо впливу режимів кріоконсервування еритроцитів людини на адгезію до них лактобактерій *S. thermophilus* еритроцити заморожували під захистом 1,2-пропандіолу (кріопротекторний розчин «Пропандіосахароль»), поліетиленоксиду 1500 (ПЕО-1500), гліцерину (консервуючий розчин «ЦНИИГПК №114»). Адгезію бактеріальних клітин на еритроцитах людини спостерігали за допомогою мікроскопа Axio Observer Z1 (масляно-імерсійний об'єктив  $\times 63$ ) (рисунок 1). Для підрахунку кількості адгезованих бактерій фіксували 5 різних полів зору до та після механічного струсу зразка. За отриманими мікрофотографіями після механічного струсу зразка розраховували середнє значення кількості адгезованих бактерій на еритроцит – показник адгезії (бакт/ер).

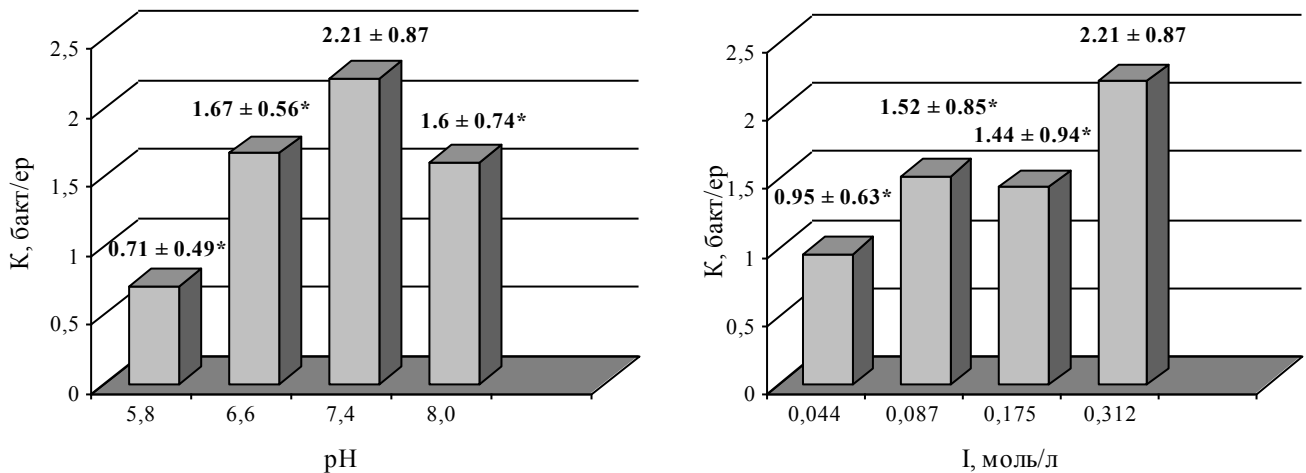


**Рисунок 1.** Мікрофотографії суспензії еритроцитів після інкубації з бактеріями *Streptococcus thermophilus*: А – до струсу зразка; Б – після струсу зразка.

Концентрацію еритроцитів і лактобактерій підраховували у камері Горяєва. Поверхневий заряд клітин оцінювали за допомогою катіонного барвника альціанового синього (АС). Оптичну щільність розчинів вимірювали на спектрофотометрі Unicam SP 8000. Заморожування проводилось за трьома різним режимам: режим №1 - заморожування за методом Воротиліна [Грищенко В.И. та ін., 1990], режим №2 - заморожування за методом Бабійчук Л.О. [Бабійчук Л.О. та ін.,

2000], режим №3 - заморожування за методом, розробленим в Інституті гематології та переливання крові (Москва) [В.А. Аграненко та ін, 1980]. Теоретичні розрахунки поверхневого потенціалу еритроцитів та концентрацій катіонів біля клітинної поверхні проведено за рівнянням Пуасона-Больцмана та рівнянням Грема. Силу електростатичної взаємодії між клітинними поверхнями оцінювали у наближенні Дерягіна за малих потенціалів [Israelachvili J., 2004].

У розділі 3 «Вплив фізико-хімічних характеристик середовища на адгезію *S. thermophilus* на еритроцитах людини» наведено результати дослідження впливу рН і одно- та двовалентних катіонів на адгезію *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини. Як видно з поданих на рисунку 2 даних, показник адгезії суттєво залежить від рН середовища та є максимальним за фізіологічного для еритроцитів значення.



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

**Рисунок 2.** Показник адгезії бактеріальних клітин *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини в залежності від рН та іонної сили середовища.

Показники адгезії для рН 5,8; 6,6 та 8,0 вірогідно відрізняються від таких для рН 7,4. В експериментах бактерії інкубували з еритроцитами впродовж 30 хвилин. Отримані дані відображають результат кінцевої (необоротної) стадії.

Проведені дослідження показали, що характер залежності адгезії мікроорганізмів *S. thermophilus* на еритроцитах людини від рН узгоджується з даними інших авторів [Vadillo-Rodríguez V., 2004; Granato D., 1999] і можуть бути наслідком впливу рН як на першій, так і на другій стадії адгезійного процесу. При визначенні показника адгезії в розчинах з різним вмістом катіонів натрію було встановлено, що він є найбільшим у фізіологічному розчині (рисунок 2). Зменшення іонної сили середовища призводить до вірогідного зменшення адгезії, показник адгезії при цьому є найменшим в середовищі з мінімальною дослідженою іонною силою. Підвищення концентрації електроліту призводить до зниження електростатичного потенціалу поверхні внаслідок адсорбції протиіонів та до стиснення дифузного іонного шару, що супроводжується зниженням бар'єра відштовхування. При досягненні певної концентрації електроліту сили притягання стають домінуючими на всіх відстанях. Результати свідчать про те, що перша стадія



відіграє важливу роль у протіканні процесу адгезії і впливає на можливість здійснення другого необоротного етапу.

Дані щодо впливу двовалентних катіонів  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Mg}^{2+}$  на адгезію *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини подано в таблиці 1. Результати експериментів показали, що присутність двовалентних 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  $\text{Mg}^{2+}$ .

Таблиця 1

Показник адгезії бактеріальних клітин *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини в залежності від концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  або  $\text{Mg}^{2+}$  в середовищі інкубації

$[\text{Ca}^{2+}]$ , $[\text{Mg}^{2+}]$ , %	К ( $\text{Ca}^{2+}$ ), бакт/ер	К ( $\text{Mg}^{2+}$ ), бакт/ер
0,00	2,21±0,87	2,21±0,87
0,01	0,97±0,84*	1,08±0,82*
0,02	1,57±0,96*	1,22±0,83*
0,03	1,40±0,84*	1,37±0,85*
0,04	1,17±0,86*	1,62±0,91*

Примітка: \* - дані вірогідно відрізняються від даних для контролю,  $p < 0,001$  ( $n > 200$ )

Електростатичні сили можуть впливати на початкову стадію бактеріальної адгезії. 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, що повинно було б привести до полегшення адгезії. Враховуючи, що використані 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. Збільшення концентрації електролітів зменшує радіус дії відштовхуючих сил і приводить до більш різкого їх спаду, що також повинно полегшити адгезію. З іншого боку, отримані результати впливу  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Mg}^{2+}$  на адгезію *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини вказують на те, що молекули клітинної адгезії, що приймають участь в даному процесі, не є  $\text{Ca}^{2+}$ - або  $\text{Mg}^{2+}$ -залежними, тобто не активуються цими катіонами. Про це свідчить однаковий негативний вплив цих катіонів на адгезію. Можна зробити припущення, що двовалентні катіони  $\text{Mg}^{2+}$  і  $\text{Ca}^{2+}$  у дослідженому фізіологічному діапазоні, скоріше за все, впливають на другу, необоротну стадію адгезивного процесу, впливаючи на заряд адгезивних молекул.

**Розділ 4 «Вплив рН, концентрації одно- та двовалентних катіонів на поверхневий заряд еритроцитів і лактобактерій та їх адгезійну взаємодію»** присвячено дослідженню впливу рН, іонної сили та двовалентних катіонів на

поверхневий заряд еритроцитів та лактобактерій *S.thermophilus*, і оцінці ролі електростатичних взаємодій у адгезії *S.thermophilus* на еритроцитах людини в середовищах з різною концентрацією 1:1 і 2:1 електролітів. Метою даного етапу роботи було дослідження залежності поверхневого заряду еритроцитів людини та лактобактерій *S.thermophilus* від рН та іонної сили середовища. Дані щодо впливу рН та іонної сили подано у таблиці 2.

Результати дослідження поверхневого заряду еритроцитів за зв'язуванням катіонного барвника АС наведено у таблиці 3. Експерименти показали, що ця характеристика вірогідно не змінювалась в дослідженому діапазоні змін рН розчину (5,8 – 8,0) та іонної сили (0,15 - 0,025 М NaCl).

Таблиця 2

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 3

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

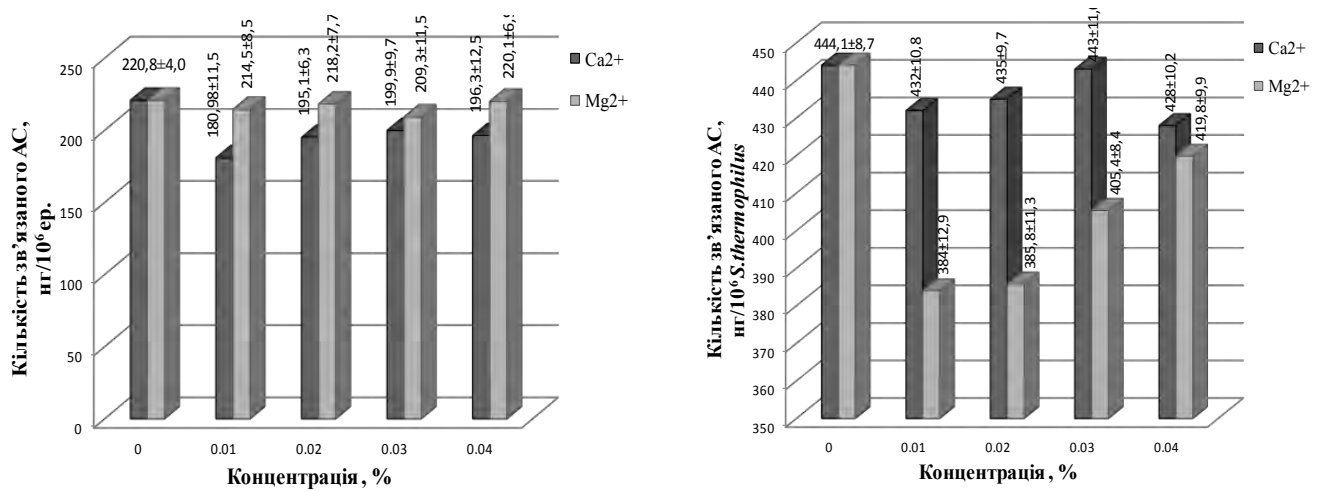
I, Моль/л	К, бакт/ер	Кількість зв'язаного АС	
		еритроцитами, нг/10 <sup>6</sup> ер.	лактобактеріями, нг/10 <sup>6</sup> <i>S.thermophilus</i>
0,312(контроль)	2,21±0,87	220,8±4,0	444,1±8,7
0,175	1,44±0,94*	228,2±7,7	438,4±9,6
0,087	1,52±0,85*	226,8±9,8	427,3±13,3
0,044	0,95±0,63*	226,8±9,3	438,4±8,8

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

В наступній частині розділу було проведено оцінку впливу двовалентних катіонів Ca<sup>2+</sup> та Mg<sup>2+</sup> на поверхневий заряд еритроцитів і лактобактерій *S.thermophilus*. На рисунку 3 подано результати зв'язування АС з еритроцитами та лактобактеріями *S.thermophilus* в залежності від концентрації іонів Ca<sup>2+</sup> або Mg<sup>2+</sup> в середовищі інкубації. Отримані результати свідчать про те, що введення в середовище фізіологічних концентрацій катіонів Ca<sup>2+</sup> призводить до вірогідного зменшення кількості зв'язаного еритроцитами АС. При цьому зміни цієї характеристики корелюють зі змінами показника адгезії з коефіцієнтом кореляції r=0,935. В той же час, зв'язування АС з клітинами *S.thermophilus* вірогідно не змінювалось у дослідженому діапазоні концентрацій іонів Ca<sup>2+</sup>.

Додавання до суспендууючого середовища іонів Mg<sup>2+</sup>, навпаки, вірогідно не змінювало кількість зв'язаного барвника еритроцитами, тоді як клітини

*S.thermophilus* демонструють вірогідне зменшення кількості зв'язаного АС, що корелює зі змінами в адгезії з коефіцієнтом кореляції  $r=0,98$ .



**Рисунок 3.** Кількість зв'язаного еритроцитами людини або лактобактеріями *S. thermophilus* АС в залежності від концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  або  $\text{Mg}^{2+}$  в середовищі інкубації.

Отримані дані щодо впливу іонів  $\text{Mg}^{2+}$  узгоджуються з даними [Gambaro G., 1988] про те, що  $\text{MgCl}_2$  не змінює прикріплення АС до еритроцитів. Результати 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.

У наступному підрозділі визначено роль електростатичних взаємодій у адгезії *S.thermophilus* на еритроцитах людини в середовищах з різною концентрацією  $\text{NaCl}$  і  $\text{CaCl}_2$ . Згідно теорії ДЛФО, енергія взаємодії часток (клітин) може мати різну залежність від відстані між поверхнями в залежності від концентрації електроліту і густини поверхневого заряду. Характерна відстань дальнього потенціального мінімуму енергії взаємодії двох поверхонь у розчинах з концентраціями, близькими до фізіологічних, становить від 1 до 5 нм. Такі відстані цілком достатні для взаємодій між клітинами. Таким чином, тривале знаходження взаємодіючих клітин в дальньому потенціальному мінімумі енергії може привести до утворення зв'язку між адгезинами та лігандами.

Значення густини протиіонів  $\rho_0$  і електростатичного потенціалу  $\varphi_0$  на поверхні зв'язані наступним відношенням [Israelachvili J., 2004]:

$$\rho_{0i} = \rho_{\infty i} e^{\frac{z_i e \varphi_0}{kT}}, \quad (1)$$

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

Повна концентрація іонів біля ізольованої поверхні з густиною заряду  $\sigma$  становить:

$$\sum_i \rho_{0i} = \sum_i \rho_{\infty i} + \frac{\sigma^2}{2\varepsilon_0 kT} \quad (2)$$

Звідки можна отримати наступне співвідношення:

$$\sigma^2 = 2\varepsilon_0 kT \left( \sum_i \rho_{0i} - \sum_i \rho_{\infty i} \right) \quad (3)$$

Для еритроцитів густина поверхневого заряду  $\sigma = -1,31 \times 10^{-2}$  Кл/м<sup>2</sup> [Petelska A. D., 2012]. За допомогою рівнянь (1) і (2) було отримано рівняння для розрахування поверхневих потенціалів еритроцитів в розчинах з різною концентрацією хлориду натрію:

$$\cosh \frac{\varphi_0}{26.7} = \frac{1.7161 + 73.04 \times [NaCl]}{73.04 \times [NaCl]} \quad (4)$$

Поверхневий потенціал було розраховано за припущення, що густина поверхневих зарядів у розчинах NaCl з іонною силою, що знижувалась, залишається незмінною. Це припущення ґрунтується на отриманих даних щодо зв'язування альціанового синього еритроцитами, яке вірогідно не відрізнялось у досліджених розчинах. Для малих величин потенціалу, менше 25 мВ, що справедливо у випадку еритроцитів, рівняння Грема (3) спрощується до вигляду

$$\sigma = \varepsilon_0 \kappa \varphi_0 \quad (5)$$

де обернена довжина Дебая:

$$\kappa = \left( \frac{\sum_i \rho_{\infty i} e^2 z_i^2}{\varepsilon_0 kT} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (6)$$

Величина дебаївського радіусу  $1/\kappa$  у водних розчинах NaCl становить:

$$\frac{1}{\kappa} = \frac{(\varepsilon_0 kT)^{\frac{1}{2}}}{\left\{ (\rho_{Na} e^2 z_{Na}^2 + \rho_{Cl} e^2 z_{Cl}^2) \times N_A \times 10^3 \right\}^{\frac{1}{2}}} \quad (7)$$

де  $\rho_i$  – концентрація іонів, м<sup>-3</sup>;  $z_i$  – заряд  $i$ -ого іону (для NaCl  $z_i = \pm 1$ );  $e$  – елементарний заряд;  $N_A$  – число Авогадро. Множник  $N_A \times 10^3$  використовується для переходу у вираженні концентрації від м<sup>-3</sup> до моль/л.

Розраховані за формулою (7) значення дебаївського радіусу ( $1/\kappa$ ), а також за формулою (4) поверхневі потенціали еритроцитів ( $\varphi_0$ ) в розчинах з різною концентрацією хлориду натрію подано в таблиці 4.

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 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.

Таблиця 4

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.	$\varphi_0$ , мВ	$1/\kappa$ , 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  $r=-0,87$ .

Для визначення ролі електростатичних взаємодій у адгезії *S. thermophilus* на еритроцитах людини в середовищах з різною концентрацією CaCl<sub>2</sub> співвідношення між густиною поверхневого заряду  $\sigma$  і поверхневим потенціалом  $\varphi_0$  для суміші електролітів NaCl + CaCl<sub>2</sub> було отримано з формули (2), оскільки  $[Cl^-]_{\infty}=[Na^+]_{\infty}+2[Ca^{2+}]_{\infty}$ , то кінцеве рівняння має вигляд:

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

Як уже було зазначено, введення в середовище навіть невеликих концентрацій кальцію приводить до зменшення поверхневого заряду еритроцитів. Для концентрації CaCl<sub>2</sub>  $0,9 \times 10^{-3}$  М (0,01%) зменшення поверхневого заряду становило ~18%, для концентрацій  $1,8 \times 10^{-3}$  М,  $2,7 \times 10^{-3}$  М,  $3,6 \times 10^{-3}$  М ~11%. Для розрахунків було прийнято, що в першому розчині  $\sigma \approx 1,074 \times 10^{-2}$  Кл/м<sup>2</sup>, в інших –  $\sigma \approx 1,166 \times 10^{-2}$  Кл/м<sup>2</sup>. Поверхневі потенціали еритроцитів в ізотонічному розчині NaCl з додаванням указаних концентрацій CaCl<sub>2</sub> (близьких до концентрацій в плазмі крові) було розраховано за формулою (8).

З використанням отриманих значень поверхневого потенціалу, концентрації іонів на поверхні еритроцитів було розраховано за рівняннями:

$$\begin{aligned}
[Na^+]_x &= [Na^+]_\infty e^{-\frac{e\varphi_x}{kT}}, & [Na^+]_0 &= [Na^+]_\infty e^{-\frac{e\varphi_0}{kT}}, \\
[Ca^{2+}]_x &= [Ca^{2+}]_\infty e^{-2\frac{e\varphi_x}{kT}}, & [Ca^{2+}]_0 &= [Ca^{2+}]_\infty e^{-2\frac{e\varphi_0}{kT}}, \\
[Cl^-]_x &= [Cl^-]_\infty e^{+\frac{e\varphi_x}{kT}}, & [Cl^-]_0 &= [Cl^-]_\infty e^{+\frac{e\varphi_0}{kT}}.
\end{aligned} \tag{9}$$

Для концентрацій  $CaCl_2$  від 0,9 мМ до 3,6 мМ в 0,15 М NaCl дебаївський радіус було розраховано за формулою:

$$\frac{1}{\kappa} = \frac{(\varepsilon_0 kT)^{\frac{1}{2}}}{\left(\rho_{Na} e^2 z_{Na}^2 + \rho_{Cl} e^2 z_{Cl}^2 + \rho_{Ca} e^2 z_{Ca}^2 + 2\rho_{Cl} e^2 z_{Cl}^2\right)^{\frac{1}{2}}} \tag{10}$$

При оцінці імовірності адгезії лактобактерій *S. thermophilus* на еритроцитах людини в залежності від концентрації іонів  $Ca^{2+}$  було враховано вплив іонів  $Ca^{2+}$  на силу електростатичного відштовхування клітин та на імовірність встановлення адгезійного зв'язку внаслідок зв'язування цих іонів з рецепторами, що викликає їх інактивацію.

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

$$P_1 \sim \frac{1}{F} = \frac{1}{\left(2\pi R \varepsilon_0 \kappa \varphi_0^2 e^{-\kappa D}\right)} = \frac{A}{\kappa \varphi_0^2 e^{-\kappa D}} \tag{11}$$

де  $A = \frac{1}{2\pi R \varepsilon_0}$ ,  $F$  - сила електростатичної взаємодії між сферою і пласкою поверхнею,  $R$  - радіус сфери,  $D$  - відстань між сферою і пласкою поверхнею.

Імовірність встановлення адгезійного зв'язку з бактеріальною клітиною, що знаходиться на відстані дальнього потенціального мінімуму, вважаємо пропорційною кількості не зв'язаних з кальцієм рецепторів

$$P_2 \sim \alpha b \sigma_0 = \alpha N \tag{12}$$

де  $\alpha$  - частина не зв'язаних з  $Ca^{2+}$  рецепторів,  $b$  - частина рецепторів, що відповідають за адгезію з лактобактеріями,  $N$  - вихідна поверхнева густина рецепторів.

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

$$P = P_1 \times P_2 \sim \frac{\alpha N A}{\kappa \varphi_0^2 e^{-\kappa D}} \tag{13}$$

В таблиці 5 подано результати розрахунків поверхневих потенціалів еритроцитів, концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  на їх поверхні та радіуса Дебая в залежності від концентрації  $\text{CaCl}_2$  в середовищі, а також зведені експериментальні та розраховані теоретично дані, прийняті для обчислення імовірності устанавлення адгезійного зв'язку між *S. thermophilus* та еритроцитами людини. Дебайвський радіус змінюється в даних розчинах з додаванням  $\text{CaCl}_2$  несуттєво. 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  $\text{NaCl}$ . З розрахованих величин найбільше змінюється поверхневий потенціал клітин та концентрація кальцію біля поверхні еритроцитів.

Результати оцінки імовірності (у відносних одиницях) встановлення адгезійного зв'язку показано на рисунку 4. 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 устанавлення 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.

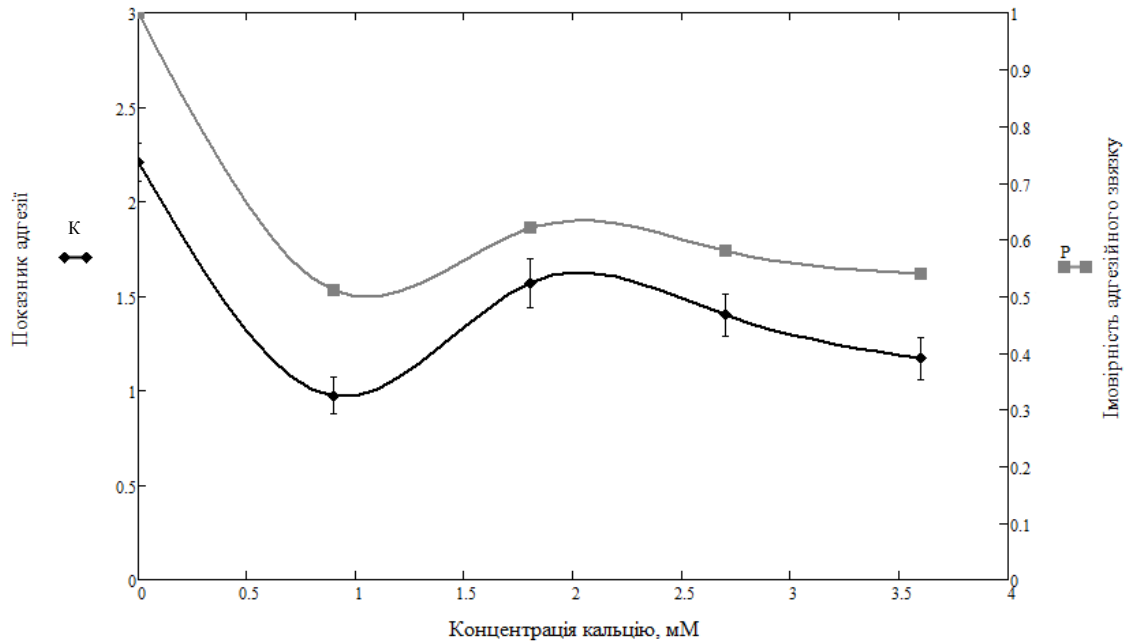
Таблиця 5

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	К, бакт/ер	Кількість зв'язано- го АС еритро- цитами, нг/10 <sup>6</sup> ер.	$\varphi_0$ , мВ	1/к, нм	$[\text{Ca}^{2+}]_0$ , мМ	$\alpha$	P
0,0	2,21 ± 0,87	220,8 ± 4,0	-14,70	0,81	0,00	1	1
0,9	0,97 ± 0,84	181,00 ± 11,5	-12,20	0,80	1,42	0,82	0,51
1,8	1,57 ± 0,96	195,1 ± 6,3	-13,17	0,79	2,95	0,89	0,62
2,7	1,40 ± 0,84	199,9 ± 9,7	-13,07	0,79	4,40	0,89	0,58
3,6	1,17 ± 0,86	196,3 ± 12,5	-12,97	0,78	5,85	0,89	0,54

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

де  $[\text{Ca}^{2+}]$  - концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  у розчині (мМ), К - індекс адгезії (бакт/ер), 1/к - довжина Дебая (нм),  $\varphi_0$  - поверхневий потенціал еритроцитів (мВ),  $[\text{Ca}^{2+}]_0$  - концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  на поверхні еритроцита (мМ),  $\alpha$  - частина не зв'язаних з  $\text{Ca}^{2+}$  рецепторів, P - імовірність встановлення адгезійного зв'язку.



**Рисунок 4.** Показник адгезії (◆) та імовірність утворення зв'язку (■) між лактобактеріями *S. thermophilus* та еритроцитами людини в залежності від концентрації  $\text{CaCl}_2$ .

У розділі 5 «Вплив режимів кріоконсервування еритроцитів людини на адгезію на них лактобактерій *S. thermophilus*» наведено результати впливу режимів заморожування еритроцитів на їх поверхневий заряд (таблиця 6).

**Таблиця 6**

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

Зразок	Показник адгезії	Кількість зв'язаного АС, нг/10 <sup>6</sup> ер.	Втрата клітин після заморожування-відтаювання / 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  $r = 0,9$ .

Виявлено, 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 меншим, але вірогідно не відрізняється від контрольних значень. 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.

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.

Отримані результати вказують на те, що еритроцити, заморожені з ПЕО-1500, краще зберегли поверхневі властивості після відтаювання. Можливо, це пов'язано з тим, що ПЕО-1500 має високу поверхневу активність і адсорбується на поверхні клітин. Тому, окрім інших механізмів кріопротекції, він може забезпечувати захист поверхневих шарів клітини від ушкоджуючих чинників заморожування-відтаювання.

## 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 ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. 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.
2. Anikieieva M. Influence of pH and ionic strength of a medium on the adhesion of *Streptococcus thermophilus* microorganisms to human erythrocytes / М. Anikieieva, O. Gordiyenko // Periodicum biologorum. – Zagreb (Croatia). – 2014. – V.116, №1. – P. 89-93.
3. 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.
4. 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 та ін. // Доповіді Національної академії наук України. – 2015. – №1. – С. 159-165.

5. Anikieieva M.O. Surface charge of erythrocytes and lactobacilli *S. thermophilus* and their intercellular adhesion depend on the concentration of bivalent cations / **М.О. Anikieieva**, S.L. Rozanova, S.Ye.Kovalenko et al. // Journal of Adhesion Science and Technology. – 2015. – V.29, №10. – P. 1039-1045.

6. Gordiyenko O.I. Development of a model to investigate red blood cells surface characteristics after cryopreservation / O.I. Gordiyenko, **М.О. Anikieieva**, S.L. Rozanova et al. // CryoLetters. – 2015. – V.36, №3. – P. 221-226.

7. 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.

8. 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.

9. Anikieieva M. Influence of physical-chemical characteristics of the medium on bacteriumfixing activity of the human erythrocytes / **М. Anikieieva**, O. Gordiyenko // – Period. biologorum, Vol 115, Suppl 2, 2013. – P. 15.

10. Anikieieva M.O. Effect of ionic strength on *Streptococcus thermophilus* microbial adhesion on human erythrocytes [Электронный ресурс] / **М.О. Anikieieva** // Proceedings of 13<sup>th</sup> Kharkiv Young Scientists Conference on Radiophysics, Electronics, Photonics and Biophysics, 2–6 December, 2013, Kharkiv, Ukraine. – 2013. – Bio-5\_en.

11. Анікєєва М.О. Вплив кислотно-лужного балансу середовища на бактеріофіксуючу активність еритроцитів людини / **М.О. Анікєєва** // Матеріали VIII Міжнародної конференції молодих науковців “Біологія: від молекули до біосфери”, 3-6 грудня, 2013 р. м. Харків, Україна. – Х.: ФОП Шаповалова Т.М., 2013. – С. 27.

12. Anikieieva M. The Dependence of Adhesion of Microorganisms to Erythrocytes on the Concentration of Divalent Cations / **М. Anikieieva**, O. Gordiyenko // Festschrift of the IV International Scientific-Practical Conference “Scientific Youth: Priorities of the World Science”, February 20, 2014, Luhansk, Ukraine. – Luhansk: “LNU”, LLC “Virtualnaya realnost”. – 2014. – P. 10–13.

13. Anikieieva M. The dependence of microorganisms adhesion to erythrocytes on the concentration of monovalent cations / **М. Anikieieva**, O. Gordienko // Abstracts of the IIIrd International conference of young scientists “Fundamental And Applied Research In Biology”, February 24-27, 2014, Donetsk / Donetsk national university, Ukraine. – Donetsk: Publishing house “Knowledge” (Donetsk branch), 2014. – P. 299.

14. Анікєєва М.А. Влияние режимов криоконсервирования эритроцитов человека на адгезию на них лактобактерий *Streptococcus thermophilus* / **М.А. Анікєєва**, С.Е. Коваленко, И.Ф. Коваленко, В.А. Киреев, О.И. Гордиенко // Материалы Международной конференции “Теоретические и практические аспекты современной криобиологии”, 24 марта 2014 г., Россия–Украина.– Федеральное

государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, Сыктывкар, 2014. - С. 18-22.

15. 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. Gordiyenko // Book of Abstracts of X International Scientific Conference for Students and PhD Students –“Youth and Progress of Biology”, 8-11 April 2014, Lviv, Ukraine. – Lviv: SPOLOM, 2014. – P. 16-17.

16. Анікєєва М.О. Вплив кріоконсервування 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. – Сумський державний університет, Суми, 2014. – с. 36.

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

18. Анікєєва М.О. Вплив двовалентних катіонів на поверхневий заряд лактобактерій *S. thermophilus* / **М.О. Анікєєва**, О.І. Гордієнко // матеріали I Всеукраїнської науково-практичної конференції –“Сучасні проблеми викладання та наукових досліджень біології у ВНЗ України”, 8-9 жовтня, 2014, м. Дніпропетровськ, Україна / за заг. ред. Федюченко О.В. – Дніпропетровськ: Вид-во ДНУ, 2014. – с.13-14.

19. Anikieieva M.O. Effect of divalent cations on erythrocyte surface charge / **M.O. Anikieieva**, O.I. Gordiyenko [Электронный ресурс] // Proceedings of –44<sup>th</sup> Kharkiv Young Scientists Conference on Radiophysics, Electronics, Photonics and Biophysics”, October, 14-17, 2014. – Kharkiv. – 2014. – Bio-4\_en.

20. 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, 18th–20th 2014, Kharkiv, Ukraine. – Kh.: FLP Shapovalova T.N., 2014. – P. 26.

21. 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.

22. 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, National pharmaceutical university, Kharkiv, Ukraine. – 2015. – P. 525.

23. Anikieieva M.O. Examining erythrocytes surface charge in relation to cryopreservation models/ **M.O. Anikieieva**, O.I. Gordiyenko // Book of Abstracts of VI

International Conference for Young Scientists “Low Temperature Physics”, June 2 - 5, 2015, Kharkiv, Ukraine. – 2015. – P. 106.

24. 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. Barannyk** // Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання сучасної науки», 16–17 жовтня 2015 року, м. Львів, Україна. Херсон: Видавничий дім «Гельветика» – 2015. – Ч. I. – С. 31–33.

Прізвище Анікєєва змінено на Баранник у зв'язку зі вступом у шлюб.

### АНОТАЦІЯ

Баранник М.О. Вплив фізико-хімічних чинників середовища на міжклітинну адгезію лактобактерій *Streptococcus thermophilus* та еритроцитів людини. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика. – Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків, 2016.

Запропоновано методику для вивчення міжклітинної адгезії та показано можливість її використання для вивчення адгезії бактерій на еритроцитах людини. Визначено, що рН та іонна сила середовища впливають на адгезію *S. thermophilus* на еритроцитах та не впливають на поверхневий заряд клітин.

Встановлено вплив електростатичних взаємодій на перший етап адгезійного процесу. Виявлено високі кореляційні залежності між експериментально визначеним показником адгезії та теоретично розрахованими дебаївським радіусом і поверхневим потенціалом еритроцитів при варіюванні концентрації NaCl. Показано, що присутність двовалентних катіонів зменшує кількість адгезованих лактобактерій на еритроцитах, що свідчить про те, що адгезивні молекули даних клітин не активуються цими катіонами. За допомогою методу спектрофотометрії виявлено різноспрямований вплив іонів  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Mg}^{2+}$  на поверхневий заряд еритроцитів та лактобактерій. На основі математичної моделі обчислено імовірність установаження зв'язку між лактобактеріями та еритроцитами в залежності від концентрації іонів кальцію в середовищі. Встановлено вплив катіонів  $\text{Ca}^{2+}$  на адгезійного процесу. Досліджено вплив різних кріопротекторів на поверхневий заряд еритроцитів та їх адгезивну здатність.

**Ключові слова:** міжклітинна адгезія, еритроцити, *S. thermophilus*, поверхневий заряд клітини, кріоконсервація клітин.

### АННОТАЦИЯ

Баранник М.А. Влияние физико-химических факторов среды на межклеточную адгезию лактобактерий *Streptococcus thermophilus* и эритроцитов человека. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.00.02 – биофизика. – Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Харьков, 2016.

Предложена модель для изучения межклеточной адгезии и показана возможность ее использования для изучения адгезии бактерий на эритроцитах человека. Установлено, что pH и ионная сила среды влияют на адгезию *S. thermophilus* на эритроцитах и не влияют на поверхностный заряд клеток. Установлено влияние электростатических взаимодействий на первый этап адгезионного процесса. Обнаружено высокие корреляции между экспериментально определенным показателем адгезии и теоретически рассчитанными дебаевским радиусом и поверхностным потенциалом эритроцитов при варьировании концентрации NaCl. Показано, что присутствие двухвалентных катионов уменьшает количество адгезированных лактобактерий на эритроцитах, что свидетельствует о том, что адгезивные молекулы данных клеток не активируются этими катионами. С помощью метода спектрофотометрии определено разнонаправленное влияние ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  на поверхностный заряд эритроцитов и лактобактерий. На основе математической модели вычислено вероятность установления связи между лактобактериями и эритроцитами в зависимости от концентрации ионов кальция в среде. Установлено влияние катионов  $\text{Ca}^{2+}$  на адгезионный процесс. Исследовано влияние различных криопротекторов на поверхностный заряд эритроцитов и их адгезивную способность.

**Ключевые слова:** межклеточная адгезия, эритроциты, *S. thermophilus*, поверхностный заряд клетки, криоконсервация клеток.

## SUMMARY

Barannyk M.O. Effect of physical and chemical environment factors on intercellular adhesion of lactobacilli *Streptococcus thermophilus* and human erythrocytes. – Manuscript.

Thesis for scientific degree of candidate of sciences in physics and mathematics by speciality 03.00.02 – biophysics. – V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, 2016.

In the case of bacterial contamination of a bloodstream, germs are most likely to come in contact with erythrocytes. The process of bacterial adhesion is usually discussed in terms of the two-stage sorption model. According to the model, at the first stage bacteria quickly attaches to the surface by weak physical interactions. At the second stage irreversible molecular and cellular adhesion processes take place when aggregates, resistant to washing out or processing, are formed. It is believed that the first stage of the attachment is very important and certainly affects the final result. From physical and chemical point of view, the initial instantaneous phase of microbial adhesion is mediated by nonspecific interactions with the characteristics of a long-range action, including van der Waals forces, electrostatic forces, steric and structural forces and hydrophobic interactions. It is usually discussed in the extended Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek theory (DLVO). Mechanisms of bacterial adhesion to the surface of red blood cells had been poorly studied. Therefore a more detailed study of the influence of the environment parameters on bacterium fixing activity to erythrocytes is of importance.

In the present work the dependence of intercellular adhesion interaction of erythrocytes and lactobacilli *S. thermophilus* on the composition and physical and chemical characteristics of the environment, which most significantly affect the process as well as the cell surface charge, has been examined. A comprehensible model was proposed for studying intercellular adhesion and the possibility of its use for studying bacterial adhesion to human cells was demonstrated. We determined that the adhesion index of lactobacilli *S. thermophilus* to human erythrocytes considerably depends on the pH and reaches its maximum at physiological value of pH. The change in the pH range measured (5.8 - 8.0) does not affect cell surface charge. We show that index of intercellular adhesion interaction of red blood cells and lactobacilli *S. thermophilus* is the largest in physiological saline by varying the ionic strength of suspension solution. Comparison of the experimental data of adhesion of lactobacilli *S. thermophilus* to human erythrocytes and theoretical estimation of the Debye radius and the erythrocytes surface potential in the experimental solutions showed that with decreasing ionic strength of the solution the change in the experimental adhesion index is fully in line with the theory DLVO predictions. Thus the adhesion index change is caused by physical interactions at the first reversible stage of adhesion process. It is shown that the presence of divalent cations ( $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$ ) significantly reduces the number of *Streptococcus thermophilus* bacterial cells attached to human erythrocytes, suggesting that adhesion molecules, that take part in this process, are not activated by these cations.

Using alcian blue cationic dye it was shown that  $\text{Ca}^{2+}$  ions, which affect the surface charge of erythrocytes, do not change the charge of *S. thermophilus*.  $\text{Mg}^{2+}$  ions, conversely, affect the surface charge of lactobacilli and do not change it in erythrocytes. The effect of  $\text{Ca}^{2+}$  cations on the surface charge, intercellular adhesion of erythrocytes and *S. thermophilus* was investigated. The probability of specific adhesive bond establishing has been determined. The surface potential and the Debye radius have been theoretically calculated. We conclude that in this case the bivalent cations affect the second irreversible stage of adhesion process. Here we also investigated for the first time the effect of different freezing modes on the surface charge of red blood cells and therefore their ability to adhere bacterial cells. It is shown that the ability of cells to intercellular adhesion may be a sensitive characteristic of successful cryopreservation and preservation of cells' surface layers. These results demonstrate that erythrocytes frozen with PEG-1500, better maintained surface properties after thawing compared to erythrocytes cryopreserved by two other methods. Therefore, PEG-1500 can provide additional protection mechanisms to the cell surface layers against damaging factors during freezing-thawing.

**Keywords:** intercellular adhesion, erythrocytes, *S. thermophilus*, cells surface charge, cryopreservation of cells.







Формат 60x84/16. Ум. друк. арк. 0.9. Тир. 100 прим. Зам. 301-16.  
Підписано до друку 17.03.16. Папір офсетний.

Надруковано з макету замовника у ФОП Бровін О.В.  
61022, м. Харків, вул. Трінклера, 2, корп.1, к.19. Т. (057) 758-01-08, (066) 822-71-30  
Свідоцтво про внесення суб'єкта до Державного реєстру  
видавців та виготовників видавничої продукції серія ДК 3587 від 23.09.09 р.