

УДК 576.524

**ВПЛИВ ОДНО- ТА ДОВОАЛЕНТНИХ КАТІОНІВ НА АДГЕЗІЮ  
*STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* НА ЕРИТРОЦИТАХ ЛЮДИНИ****М.О. Анікєєва<sup>1</sup>, І.Ф. Коваленко<sup>2</sup>, С.Є. Коваленко<sup>2</sup>, О.І. Гордієнко<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, 61077, Харків, пл. Свободи, 4, Україна<sup>2</sup>Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, 61015, Харків, вул. Переяславська, 23, Україна

Надійшла до редакції 3 лютого 2014 року

Прийнята до друку 20 травня 2014 року

Бактеріальна адгезія до багатьох матеріалів була успішно описана в термінах сил колоїдної взаємодії обумовленої фізико-хімічними властивостями бактерій і поверхонь. Важливим чинником, що впливає на адгезивні процеси, є фізико-хімічні характеристики середовища, зокрема присутність в ньому одно- та двохвалентних катіонів. Проведено дослідження залежності адгезії мікроорганізмів *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини від концентрації одновалентних ( $\text{Na}^+$ ) та двовалентних ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) катіонів. Показано, що характер залежності адгезії мікроорганізмів *S.thermophilus* на еритроцитах людини від іонної сили суспензійного розчину узгоджується з положеннями розширеної DLVO теорії. Такі результати свідчать про те, що перша неспецифічна стадія відіграє важливу роль у перебігу процесу адгезії і впливає на можливість здійснення другого етапу. В той же час 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 адгезійних молекул.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** адгезія, теорія ДЛФО, еритроцити, *Streptococcus thermophilus*.**ВЛИЯНИЕ ОДНО- И ДВУХВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ НА АДГЕЗИЮ *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* НА ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА****М.А. Аникеева<sup>1</sup>, И.Ф. Коваленко<sup>2</sup>, С.Е. Коваленко<sup>2</sup>, О.И. Гордиенко<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, 61077, Харьков, пл. Свободы, 4, Украина<sup>2</sup>Институт проблем кробиологии и криомедицины НАН Украины, 61015, Харьков, ул. Переяславская, 23, Украина

Бактериальная адгезия ко многим материалам была успешно описана в терминах сил коллоидного взаимодействия, обусловленного физико-химическими свойствами бактерий и поверхностей. Важным фактором, влияющим на адгезивные процессы, являются физико-химические характеристики среды, в частности, присутствие в ней одно- и двухвалентных катионов. Проведено исследование зависимости адгезии микроорганизмов *Streptococcus thermophilus* на эритроцитах человека от концентрации одновалентных ( $\text{Na}^+$ ) и двухвалентных ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) катионов. Показано, что характер зависимости адгезии микроорганизмов *S.thermophilus* на эритроцитах человека от ионной силы суспендирующего раствора согласовывается с положениями расширенной DLVO теории. Такие результаты свидетельствуют о том, что первая, неспецифическая стадия играет важную роль в протекании процесса адгезии и влияет на возможность совершения второго этапа. В то же время, двухвалентные катионы  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$  в исследованном физиологическом диапазоне, скорее всего, влияют на вторую, необоротную стадию адгезивного процесса, влияя на заряд адгезивных молекул.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** адгезия, теория ДЛФО, эритроциты, *Streptococcus thermophilus*.**EFFECT OF MONOVALENT AND DIVALENT CATIONS ON *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* ADHESION ON HUMAN ERYTHROCYTES****M.O. Anikeeva<sup>1</sup>, I.F. Kovalenko<sup>2</sup>, S.Ye. Kovalenko<sup>2</sup>, O.I. Gordiyenko<sup>2</sup>**<sup>1</sup>V.N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., Kharkiv, 61077, Ukraine<sup>2</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine, 23 Pereyaslavskaya str., Kharkov, 61015, Ukraine

Bacterial adhesion to quite a few materials had been successfully described in terms of the interaction of the colloidal forces caused by the physical-chemical properties of bacteria and surfaces. An important factor, influencing the adhesion processes, is physical-chemical characteristics of the medium, in particular, the presence of monovalent and divalent cations therein. The dependence of adhesion of *Streptococcus thermophilus* microorganisms to human erythrocytes on the concentration of monovalent

(Na<sup>+</sup>) and divalent (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) cations has been studied. It is shown that the dependence behavior of adhesion of *S.thermophilus* microorganisms to human erythrocytes on the ionic strength of suspending solution is in accordance with the extended DLVO theory. So, the reported results indicate that the nonspecific first stage plays an important role in the course of adhesion process and affect the possibility of occurrence of the second stage. At the same time, the divalent cations Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> in the investigated physiological range likely affect the second, irreversible stage of the adhesive process, affecting the charge of adhesion molecules.

**KEY WORDS:** adhesion, DLVO theory, erythrocytes, *Streptococcus thermophilus*.

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 [1]. 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, глікофінголіпідів і гангліозидів, які ідентичні або близькі до рецепторів адгезину на епітеліальних клітинах. Отже, еритроцити можуть використовуватись в модельних експериментах, оскільки є зручним джерелом клітин ссавців, які мають велику кількість експонованих складних вуглеводів, що представляють потенційно споріднені вуглеводні послідовності для бактерійних адгезинів [2].

Адгезія є складним процесом, що контролюється багатьма спеціальними системами. Процес бактеріальної адгезії зазвичай обговорюється в термінах моделі двоступеневої сорбції, вперше запропонованої Маршаллом [3]. У цій моделі, бактерії на першому кроці швидко прикріплюються до поверхні слабкими фізичними взаємодіями, здійснюючи в основному оборотне прикріплення, тоді як на другому кроці відбувається безповоротний молекулярний і клітинний адгезійний процес, і формуються агрегати, стійкі до будь-якого відмивання або обробки. [4]. Вважається, що перша стадія прикріплення є дуже важливою і безумовно впливає на кінцевий результат. Із загальної фізико-хімічної точки зору, початкова, миттєва фаза мікробної адгезії опосередкована неспецифічними взаємодіями з характеристиками далекої дії, у

тому числі силами Ліфшиця – Ван дер Ваальса, електростатичними силами, кислотно-лужними та гідрофобними взаємодіями, броунівським рухом. Вона зазвичай розглядається в рамках розширеної теорії Дерягіна-Ландау-Фервея-Овербека (ДЛФО) [5-8]. Бактеріальна адгезія до багатьох матеріалів була успішно описана в термінах сил колоїдної взаємодії, обумовленої фізико-хімічними властивостями бактерій і поверхонь [6]. Бактерії можуть мати численні адгезини для різних субстратів, зазвичай лектини або лектиноподібні білки або вуглеводи, частини поверхневих полімерних структур, які включають капсули, ворсинки або пілі. Проте, в багатьох роботах стверджувалось, що ці структурні особливості мають менше значення на початкових стадіях процесу прикріплення [9-12]. Важливим чинником, що впливає на адгезивні процеси, є фізико-хімічні характеристики середовища, зокрема присутність в ньому одно- та двохвалентних катіонів.

Було проведено моніторинг здатності низки лактобактерій адгезувати на еритроцитах людини. Для досліджень були вибрані бактеріальні клітини *Streptococcus thermophilus*. Метою даної роботи було дослідження залежності адгезії мікроорганізмів *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини від концентрації одновалентних ( $\text{Na}^+$ ) та двовалентних ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) катіонів.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Еритроцити виділяли з донорської крові людини, яку отримували у Харківському обласному центрі служби крові. Еритроцити двічі відмивали фізіологічним розчином на 0,1М фосфатному буфері рН 7,4 и осаджували центрифугуванням 700 g впродовж 10 хвилин. Висушені бактеріальні клітини суспендували у фізіологічному розчині з додаванням 5% глюкози та інкубували при 37°C впродовж 30 хвилин, відмивали у буферному фізіологічному розчині и осаджували центрифугуванням 4000 g впродовж 10 хвилин. Осад обох видів клітин ресуспендували у відношенні 1:2 у буферному розчині з відповідним фізико-хімічними характеристиками.

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

Адгезію бактеріальних клітин на еритроцитах людини спостерігали за допомогою мікроскопа Axio Observer Z1 (масляно-імерсійний об'єктив х63). Для підрахунку кількості адгезованих бактерій фіксували 5 різних полів зору до та після механічного струшування зразка. У кожному полі зору підраховували кількість адгезованих бактерій на кожному еритроциті (рис.1) та розраховували середнє значення кількості адгезованих бактерій на еритроцит – показник адгезії.

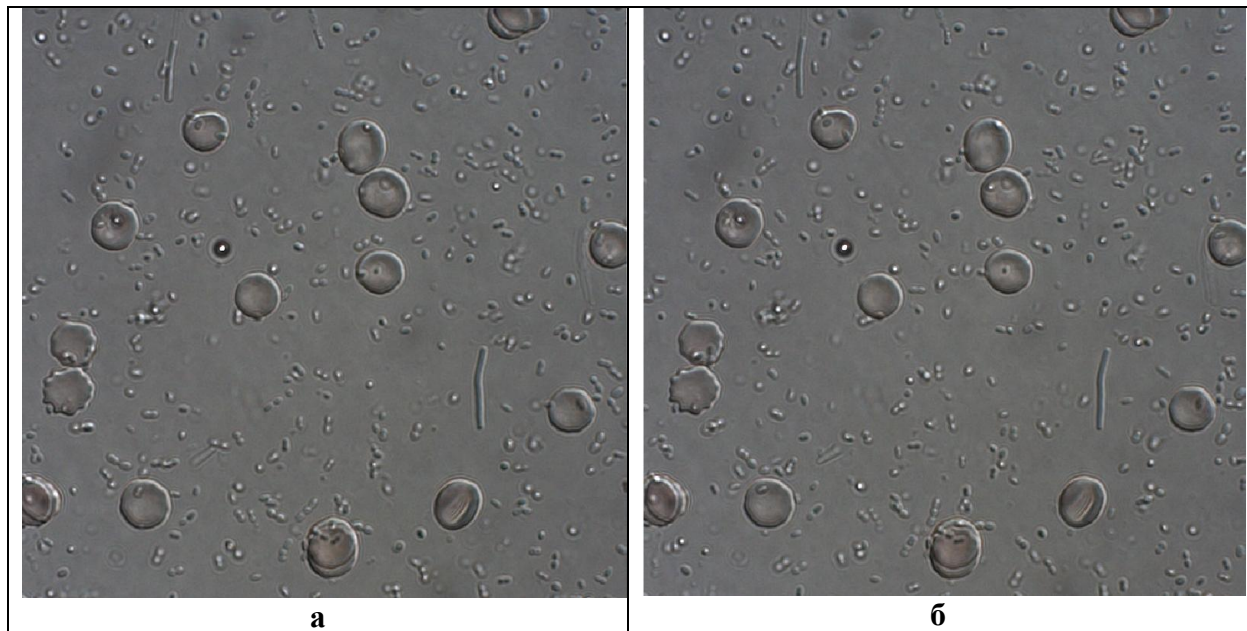


Рис. 1. Мікрофотографія суспензії еритроцитів після інкубації з бактеріями *Streptococcus thermophilus*: а – до струшування; б- після струшування.

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. В експерименті використовували основний розчин – фізіологічний буферний розчин рН 7,4 (0,1М фосфатний буфер  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 0,05 М  $\text{NaCl}$ ) з іонною силою 0,312. Розчини зі зниженою іонною силою отримували відповідним розведенням основного розчину та додаванням до них сахарози. Розчин №1 – 0,1 М сахароза + 0,1М солей; розчин №2 – 0,2 М сахароза + 0,05 М солей; розчин №3 – 0,25 М сахароза +0,025 М солей.

При дослідженні впливу двовалентних катіонів на адгезію бактеріальних клітин на еритроцитах людини в середовищі інкубації (фізіологічний буферний розчин) варіювали концентрацію (вага/об'єм )  $\text{Ca}^{2+}$  або  $\text{Mg}^{2+}$  (0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%). При цьому фізіологічна концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  у плазмі крові становить 0,03%, а  $\text{Mg}^{2+}$  - 0,015%. рН середовища становив 7,4. Контролем слугував показник адгезії у фізіологічному буферному розчині рН 7,4 за відсутності двовалентних катіонів.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

В табл. 1 подано результати визначення показника адгезії в розчинах з різним вмістом одновалентних катіонів натрію. Як видно з представлених результатів показник адгезії є найбільшим у фізіологічному 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).

Таблиця 1.

Показник адгезії бактеріальних клітин *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини в залежності від іонної сили середовища

Розчин	Іонна сила розчину, моль/л	Показник адгезії
Контроль	0,312	2,21±0,87
1	0,175	1,44±0,94*
2	0,087	1,52±0,85*
3	0,044	0,95±0,63*

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

Дані по дослідженню впливу іонів  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Mg}^{2+}$  подані в табл. 2.

Таблиця 2.

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

Концентрація $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , %	Показник адгезії в середовищі з $\text{Ca}^{2+}$	Показник адгезії в середовищі з $\text{Mg}^{2+}$
Контроль	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	1,4±0,84*	1,37±0,85*
0,04	1,17±0,86*	1,62±0,91*

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

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  $\text{Mg}^{2+}$ .

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 [5], 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 [5] (метод ізодинамічних кривих) показано, що при взаємодії двох однойменно, але не однаково заряджених поверхонь їх розклинювальний тиск проходить через максимум 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 й тому, електростатичний внесок є відштовхувальним. В залежності від концентрації електроліту в оточуючому середовищі можна виділити три різні ситуації: (i) за низьких концентрацій 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 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 [5,13]. В роботі [14] експериментально показано, що  $\zeta$ -потенціал мікроорганізмів *S. oralis* зменшувався за абсолютною величиною від -20 мВ у 2 мМ КСІ до -10 мВ у 100 мМ КСІ. 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 КСІ, ніж у 15 мМ КСІ, та зменшувалась у 250 мМ КСІ.

У розширеній теорії ДЛФО для описання початкової стадії адгезії крім електростатичних та дисперсійних взаємодій розглядають також так звані структурні сили (гідрофобні/гідратаційні ефекти). Відомо [5], 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 [5].

Для деяких мікроорганізмів показано також вплив іонної сили суспензійного розчину на гідрофобність клітинної поверхні. Автори роботи [15] показали, що гідрофобність клітинної поверхні деяких ліній лактобактерій змінюється у відповідь на зміни в іонній силі. Автори вважають, що ця динамічна поведінка бактерійних клітинних поверхонь при змінах в іонній силі надає для певних ліній лактобактерій багатосторонній механізм адгезії до гідрофобних і гідрофільних поверхонь у розчинах з низькою і високою іонною силою, відповідно. Крім того, були показано, що деякі різновиди *L. acidophilus*, є чутливим до іонної сили через зміни у проникності клітинної мембрани, що, ймовірно впливає на фізико-хімічні властивості бактерійної клітинної поверхні. Тому, з цих досліджень було зроблено висновок, що клітинні поверхні лактобактерій, можливо, пристосовують гідрофобність клітинної поверхні у відповідь на зміни оточуючого середовища з вірогідним потенційним впливом на їх адгезійні властивості.

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 величина протяжності дифузного шару протиіонів ( $1/\chi$ , де  $\chi$  - обернена дебаївська довжина). У випадку 1-1 електроліту  $\chi^2 = 8\pi e^2 n_1 / \epsilon kT$ , у випадку 2-1 електроліту  $\chi^2 = 24\pi e^2 n_2 / \epsilon kT$  (де  $\epsilon$  - діелектрична проникність середовища,  $e$  – елементарний заряд,  $n_1$  та  $n_2$  – концентрація іона) [5], 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 розклинювального тиску при цьому суттєво не змінювалась. Що стосується структурної складової розклинювального тиску, 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'язувальні домени [16-18].

$\text{Ca}^{2+}$ -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 [19]. 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 клітинами, що несуть антиген, або клітинами-мішенями і відіграють важливу роль в передачі сигналів [20-22]. Мембрано-периферичний імуноглобулін-подібний домен CD2 відповідальний за молекулярне розпізнавання і має топологію подібну до  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної молекули клітинної адгезії кадгерину [23]. 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'язувальних сайтів заряджені, у порівнянні з 19% для середньої величини експонованих у розчин поверхневих білків [24]. Було показано, що мутації з реверсією поверхневих зарядів призводять до слабкого зв'язування або втрати зв'язування з CD48 [22]. Здатність до зв'язування ліганду відновлюється, якщо є комплементарна реверсія заряду на CD48 поверхні; це передбачає важливість електростатичної складової для їх взаємодії [25]. 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 [26]. Високий відсоток заряджених залишків ліганду спостерігається у природних  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальних сайтів [27]. Спостережувана сильна перевага Asp і Glu у природно, створених  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальних білках узгоджується з електростатичною природою  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язування, оскільки майже усі зв'язувальні сайти досліджені до сьогодні мають щонайменше два негативно заряджених залишки ліганду. Велике число заряджених залишків на клітинній адгезійній поверхні, на додаток до компліментарності форми, є найголовнішим для цільової специфічності [25].

Показано, що кальцій може регулювати утворення біоплівки, яке безпосередньо пов'язано зі здатністю бактерій до адгезії, 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 *Vap* [17]. Цей білок містить чотири кальцій-зв'язувальних елемента, при їх мутації пригнічування катіоном  $\text{Ca}^{2+}$



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 [28]. З іншого боку, кальцій сприяє утворенню біоплівки у інших мікроорганізмів, як, наприклад, *Xylophilus fastidiosus* або *Vibrio vulnificus* [29,30]. 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 *VfpA* [31].

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. [32]. 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  $Mg^{2+}$  [33]. Було показано, що пристосування більшого за розмірами іона  $Ca^{2+}$  (іонний радіус 1.0Å) у порівнянні з  $Mg^{2+}$  (іонний радіус 0.72Å) [34] у восьмигранному оточенні MIDAS є термодинамічно несприятливим і призводить би до істотної структурної перебудови оточення і зменшення спорідненості для природних лігандів [35].

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, імовірно, наслідком нівелювання зарядів лігандів та/або рецепторів в результаті взаємодії з двовалентними катіонами.

## ВИСНОВКИ

Характер залежності адгезії мікроорганізмів *S.thermophilus* на еритроцитах людини від іонної сили суспензійного розчину, а саме збільшення показника адгезії зі збільшенням іонної сили середовища, узгоджується з положеннями розширеної ДЛФО теорії. Такі результати свідчать про те, що перша неспецифічна стадія відіграє важливу роль у перебігу процесу адгезії і впливає на можливість здійснення другого етапу. В той же час двовалентні катіони  $Mg^{2+}$  і  $Ca^{2+}$  у дослідженому фізіологічному діапазоні, скоріше за все, впливають на другу, необоротну стадію адгезійного процесу, змінюючи заряд адгезійних молекул.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Human-specific regulation of  $\alpha$ 2–6-linked sialic acids / P. Gagneux, M. Cheriyan, N. Hurtado-Ziola [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278, N. 48. – P. 48245–48250.
2. Evans D. G. Adhesion properties of *Helicobacter pilori* / D. G. Evans, D. J. Evans // *Methods in Enzymology*. Academic Press. – 1995. – V.253. – P. 336–360.
3. 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.
4. Carnazza S. New Advances in Cell Adhesion Technology / S. Carnazza // *Nanoparticles and Nanodevices in Biological Applications, Lecture Notes in Nanoscale Science and Technology*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. – 2009. – V. 4. – P. 69–130.
5. Israelachvili J. Intermolecular and Surface forces / J. Israelachvili // 3<sup>rd</sup> ed. In: Academic Press, Burlington, 2011. – 674 p.
6. 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.
7. 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.
8. van Oss C. J. Energetics of cell-cell and cell-biopolymer interactions / C. J. van Oss // *Cell Biophys.* – 1989. – V.14. – P. 1–16.
9. 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.
10. 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.
11. Bacterial adhesion at synthetic surfaces / D. Cunliffe, C. A. Smart, C. Alexander, E. N. Vulfson // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – V. 65. – P. 4995–5002.
12. Hydrophobic and electrostatic parameters in bacterial adhesion / M. C. M. van Loosdrecht, J. Lyklema, W. Norde, A. J. B. Zehnder // *Aquatic Sci.* – 1990. – V. 52. – P.103–113.
13. Vadillo-Rodríguez V. Role of lactobacillus cell surface hydrophobicity as probed by AFM in adhesion to surfaces at low and high ionic strength / V. Vadillo-Rodríguez, H. J. Busscher, H. C. van der Mei [et al.] // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* – 2005. – V. 41. – P. 33–41.
14. 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.
15. Vadillo-Rodríguez V. Dynamic cell surface hydrophobicity of *Lactobacillus* strains with and without surface layer proteins / V. Vadillo-Rodríguez, H.J. Busscher, W. Norde [et al.] // *J. Bacteriology.* – 2004. – V. 186, N. 19. – P. 6647–6650.
16. 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., N24. – P. 6782–6789.
17. 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.
18. Yousef-Coronado F. In silico analysis of large microbial surface proteins / F. Yousef-Coronado, M. Espinosa-Urgel // *Res. Microbiol.* – 2007. – 158. – P. 545–550.
19. Herrenknecht K. Cadherins / K. Herrenknecht // *Molecular biology of cell adhesion molecules*. ed. M. A. Horton, John Wiley, NY, 1996. – P. 45–69.
20. 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.
21. Blattman J.N. Cancer immunotherapy: A treatment for the masses / J. N. Blattman, P. D. Greenberg // *Science.* – 2004. – V. 305 – P. 200–205.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.

26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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 et al. // *Res. Microbiol.* – 2010. – V. 161. – P. 144–152.
32. 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.
33. 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. – V. 108. – P. 4546–4557.
34. Marcus Y. Ionic radii in aqueous solutions / Y. Marcus // *Chem. Rev.* 1988. – V. 88. – P. 1475–1498.
35. 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.