

УДК 576.524

## РОЛЬ ЕЛЕКТРОСТАТИЧНИХ ВЗАЄМОДІЙ У АДГЕЗІЇ *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* НА ЕРИТРОЦИТАХ ЛЮДИНИ В СЕРЕДОВИЩАХ З РІЗНОЮ КОНЦЕНТРАЦІЄЮ 2:1 ЕЛЕКТРОЛІТУ

О.І. Гордієнко<sup>1</sup>, М.О. Баранник<sup>2</sup>, Є.О. Гордієнко<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, 61015, Харків, Україна

<sup>2</sup>Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, 61002, Харків, Україна

<sup>3</sup>Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, м.Свободи, 4, 61022, Харків, Україна

Надійшла до редакції 28 травня 2015 року

Прийнята 18 червня 2015 року

У моделі двоступеневої сорбції на першому кроці здійснюється в основному оборотне прикріплення, тоді як на другому відбувається безповоротний молекулярний і клітинний адгезійний процес. Важливим чинником, що впливає на адгезійні процеси, є фізико-хімічні характеристики середовища, зокрема присутність в ньому двохвалентних катіонів. У даній роботі оцінювалась роль електростатичної складової у міжклітинній взаємодії в середовищах з різною концентрацією 2:1 електроліту на першому оборотному етапі адгезії та імовірність подальшого утворення специфічного зв'язку. Визначальну роль в міжклітинному адгезійному процесі на першому етапі відіграють електростатичні взаємодії. Отримані експериментальні результати та теоретичні розрахунки параметрів електростатичної взаємодії вчергове підтвердили прийнятність моделі двоступеневої сорбції та теорії ДЛФО для описання міжклітинної адгезії.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** адгезія, теорія ДЛФО, еритроцити, *Streptococcus thermophilus*, електростатичні взаємодії, дебаївський радіус, поверхневий потенціал.

## РОЛЬ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В АДГЕЗИИ *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* НА ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА В СРЕДАХ С РАЗЛИЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ 2:1 ЭЛЕКТРОЛИТА

О.И. Гордиенко<sup>1</sup>, М.А. Баранник<sup>2</sup>, Е.О. Гордиенко<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем кробиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, 61015, Харьков, Украина

<sup>2</sup>Национальный фармацевтический университет, ул. Пушкинская, 53, 61002, Харьков, Украина

<sup>3</sup>Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, 61022, Харьков, Украина

В модели двухэтапной сорбции на первом этапе осуществляется в основном обратимое прикреплениe, тогда как на втором происходит необратимый молекулярный и клеточный адгезивный процесс. Важным фактором, влияющим на адгезивные процессы, являются физико-химические характеристики среды, в частности присутствие в ней двухвалентных катионов. В данной работе оценивалась роль электростатической составляющей в межклеточном взаимодействии в средах с различной концентрацией 2:1 электролита на первом обратимом этапе адгезии и вероятность дальнейшего возникновения специфической связи. Определяющую роль в межклеточном адгезивном процессе играют электростатические взаимодействия. Полученные экспериментальные результаты и теоретические расчеты параметров электростатического взаимодействия в очередной раз подтвердили приемлемость модели двухэтапной сорбции и теории ДЛФО для описания межклеточной адгезии.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** адгезия, теория ДЛФО, эритроциты, *Streptococcus thermophilus*, электростатические взаимодействия, дебаевский радиус, поверхностный потенциал.

## THE ROLE OF ELECTROSTATIC INTERACTIONS IN THE *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* ADHESION ON HUMAN ERYTHROCYTES IN MEDIA WITH DIFFERENT 2:1 ELECTROLYTE CONCENTRATION

O.I. Gordiyenko<sup>1</sup>, M.O. Barannyk<sup>2</sup>, E.O. Gordiyenko<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine, 23 Pereyaslavskaya str., Kharkiv, 61015, Ukraine

<sup>2</sup>National University of Pharmacy, 53 Pushkinskaya str., Kharkiv, 61002, Ukraine

<sup>3</sup>V.N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., Kharkiv, 61022, Ukraine

In the two-stage sorption model at the first stage is mostly reversible attachment, while at the second irreversible stage molecular and cellular adhesion processes take place. An important factor, influencing the adhesion processes, is physical-chemical characteristics of the medium, in particular, the presence of divalent cations therein. The aim of this work is to assess the role of electrostatic component of the intercellular interactions in media with different 2:1 electrolyte concentration at the first reversible stage of adhesion and probability of further occurrence of specific binding. Electrostatic interactions play a decisive role in intercellular adhesion process. The obtained experimental results and theoretical calculations of the electrostatic interaction parameters once again confirmed the acceptability of a two-stage model of sorption and DLVO theory to describe a cell-cell adhesion.

**KEY WORDS:** adhesion, DLVO theory, erythrocytes, *Streptococcus thermophilus*, electrostatic interactions, Debye radius, surface potential.

### ПОСТАНОВКА ЗАДАЧІ

Адгезія є складним процесом, на який впливають як взаємодії, обумовлені фізичними чинниками, так і специфічні біологічні взаємодії, що відбуваються на молекулярному рівні. Процес адгезії зазвичай обговорюється в термінах моделі двоступеневої сорбції, вперше запропонованої Маршаллом [1]. У цій моделі клітини на першому кроці прикріплюються до поверхні іншої клітини 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 [2].

Розглянемо чинники, що впливають на процес адгезії між двома клітинами на першому етапі. Найважливішими силами далекої дії між тілами в рідинах є ван-дер-ваальсові та електростатичні. На малих відстанях (менших 1-3 нм) частіше за все домінують сольватні та інші типи стеричних сил. Потенціал ван-дер-ваальсової взаємодії практично не залежить від змін концентрації електроліту і рН, і в першому наближенні може вважатися постійним. Енергія ван-дер-ваальсових взаємодій між двома поверхнями на одиницю площі поверхні становить [3]:

$$W(D) = -\frac{A}{12kD^2}, \quad (1)$$

де  $A$  – константа Гамакера (без урахування запізнювання),  $D$  – відстань між поверхнями.

Ван-дер-ваальсові сили, що діють між амфіфільними структурами, частіше за все невеликі через наступні причини. По-перше, константа Гамакера двох вуглеводневих фаз, що взаємодіють через прошарок води, відносно мала і знаходиться в інтервалі  $(4-7) \times 10^{-21}$  Дж. Можна очікувати, що для біологічних мембран ця величина буде трохи більшою через наявність в їх структурі білків. По-друге, рівняння (1) можна застосовувати до бішарів або мембран, якщо тільки відстань між ними менше 3 нм. Якщо вона є більшою, то константа Гамакера перестає бути постійною і зменшується зі збільшенням  $D$  внаслідок ефекту запізнювання, а також того, що товщина бішарів скінченна. В результаті, якщо зазор між бішарами досягає 10 нм, то реальна сила взаємодії між ними в два рази менше, ніж розрахована за рівнянням (1) (в якому не враховується запізнювання). І головне, якщо в розчині присутній електроліт, то константа  $A$  зменшується додатково внаслідок екранування зарядів, відповідно падає внесок статичного члена  $A_{v=0}$  в константу Гамакера, що відповідає за індукційну та орієнтаційну взаємодію [3]. Так, наприклад, в розчині NaCl з концентрацією 0,15 М, де відстань Дебая  $\kappa^{-1} = 0,8$  нм, внесок статичного члена, який обумовлює приблизно половину величини взаємодії без запізнювання, практично зникає уже при  $D=1,5$  нм. Було виміряно залежність сил Ван-дер-Ваальса між двома незарядженими ліпідними бішарами в розчинах різних солей. В діапазоні від 1 до 4 нм константа Гамакера становила  $7 \times 10^{-21}$  Дж в чистій воді, і  $3 \times 10^{-21}$  Дж – в децимолярному розчині NaCl, що

узгоджується з кількісною оцінкою ефекту екранування взаємодії іонами електроліту. Отже, ван-дер-ваальсові сили, що діють між бішарами та мембранами, достатньо слабкі, особливо у присутності солі, а їх радіус дії не перевищують 15 нм, за межами якого ними взагалі можна знехтувати [3].

Оскільки клітини несуть сумарний негативний електричний заряд вони мають тенденцію відштовхуватись одна від одної електростатичними силами. Проте, ці сили суттєво екрануються іонами в середовищі, що розділяє клітини; для фізіологічних середовищ відстань екранування Дебая є порядку кількох нм. Крім того, більшість зарядів з'являється через іонізацію груп на клітинній поверхні. Наприклад, на еритроцитах більшість зарядів знайдена на карбоксильних групах сіалових кислот поверхневих глікопротеїнів. Ці групи розташовані на деякій значній відстані ( $\leq 10$  нм) від ліпідного бішару плазматичної мембрани [4].

Сили відштовхування подвійного електричного шару, на відміну від ван-дер-ваальсова притягання, значно більш чутливі до типу і концентрації електроліту, рН і поверхневої щільності заряду (або поверхневого потенціалу). Незалежно від механізму виникнення заряду, поверхневий заряд завжди скомпенсований зарядом протиіонів, одна частина яких зв'язана, як правило, оборотно з поверхнею і утворює шар Штерна або шар Гельмгольца, а інша знаходиться в тепловому русі поблизу поверхні та утворює дифузний подвійний електричний шар. Наявність двовалентних катіонів викликає кардинальні зміни поверхневого потенціалу і розподілу протиіонів біля негативно зарядженої поверхні. Показано, що навіть при постійній поверхневій щільності заряду порівняно мала добавка двовалентних іонів суттєво знижує величину поверхневого потенціалу  $\Psi_0$ . Величина  $\Psi_0$  великою мірою визначається двовалентними катіонами, якщо їх концентрація перевищує 3% від концентрації одновалентних іонів. Більше того, навіть якщо концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  в об'ємі розчину набагато менше концентрації  $\text{Na}^+$ , концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  на поверхні може бути вищою. При високих концентраціях двовалентні іони часто вступають в хімічні зв'язки з негативно зарядженими групами на поверхні, тим самим знижуючи щільність поверхневого заряду  $\sigma$  і ще більше зменшуючи поверхневий потенціал  $\Psi_0$ , так що в багатьох випадках поверхні виявляються повністю нейтралізованими ( $\sigma \rightarrow 0$ ,  $\Psi_0 \rightarrow 0$ ) у присутності мілімолярних концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  [3].

В залежності від концентрації електроліту і щільності поверхневого заряду енергія взаємодії може мати різну залежність від відстані між поверхнями. Між сильно зарядженими поверхнями в розбавленому електроліті (великий дебаївський радіус) спостерігається сильне далеко діюче відштовхування, яке досягає максимуму (енергетичного бар'єра) на деякій відстані, як правило, між 1 і 4 нм. В більш концентрованому розчині електроліту перед бар'єром з'являється достатньо глибокий так званий дальній потенціальний мінімум, як правило, далі 3 нм (мінімум енергії при контакті називається ближнім потенціальним мінімумом). Не дивлячись на те, що термодинамічно рівноважним може бути знаходження часток в ближньому потенціальному мінімумі, енергетичний бар'єр може бути таким високим, що частки будуть не здатні подолати його за розумний час. В такому випадку частки (клітини) будуть або знаходитись в дальньому мінімумі, або роз'єднуються і залишаються диспергованими в розчині. Характерна відстань дальнього мінімуму у розчинах з концентраціями, близькими до фізіологічних, становить за даними деяких авторів від 1 до 3 нм [3]. За розрахунками інших авторів вторинні мінімуми були оцінені по розділенню клітин  $\leq 7$  нм [4]. Такі відстані цілком достатні для специфічних взаємодій між клітинами. Таким чином, тривале знаходження взаємодіючих клітин в дальньому

потенціальному мінімумі може привести до утворення специфічного зв'язку між адгезинами та лігандами.

### МАТЕМАТИЧНА МОДЕЛЬ

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

$$\rho_{xi} = \rho_{\infty i} e^{\frac{z_i e \psi_x}{kT}} \quad (2)$$

а на поверхні, при  $x = 0$ , значення щільності  $\rho$  і потенціалу  $\Psi$  зв'язані відношенням

$$\rho_{0i} = \rho_{\infty i} e^{\frac{z_i e \psi_0}{kT}}, \quad (3)$$

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

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

$$\begin{aligned} [\text{Na}^+]_x &= [\text{Na}^+]_{\infty} e^{\frac{e\psi_x}{kT}}, & [\text{Na}^+]_0 &= [\text{Na}^+]_{\infty} e^{\frac{e\psi_0}{kT}}, \\ [\text{Ca}^{2+}]_x &= [\text{Ca}^{2+}]_{\infty} e^{-\frac{2e\psi_x}{kT}}, & [\text{Ca}^{2+}]_0 &= [\text{Ca}^{2+}]_{\infty} e^{-\frac{2e\psi_0}{kT}}, \\ [\text{Cl}^-]_x &= [\text{Cl}^-]_{\infty} e^{+\frac{e\psi_x}{kT}}, & [\text{Cl}^-]_0 &= [\text{Cl}^-]_{\infty} e^{+\frac{e\psi_0}{kT}} \end{aligned} \quad (4)$$

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

Повна концентрація іонів біля ізольованої поверхні зі щільністю заряду  $\sigma$  становить [3]:

$$\sum_i \rho_{0i} = \sum_i \rho_{\infty i} + \frac{\sigma^2}{2\varepsilon\varepsilon_0 kT} \quad (5)$$

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

Співвідношення між щільністю поверхневого заряду  $\sigma$  і поверхневим потенціалом  $\Psi_0$  для суміші електролітів  $\text{NaCl} + \text{CaCl}_2$  отримуємо з формули (5):

$$\begin{aligned} \sigma^2 &= 2\varepsilon\varepsilon_0 kT \left( \sum_i \rho_{0i} - \sum_i \rho_{\infty i} \right) = \\ &= 2\varepsilon\varepsilon_0 kT \left\{ [\text{Na}^+]_{\infty} e^{-\frac{e\psi_0}{kT}} + [\text{Ca}^{2+}]_{\infty} e^{-\frac{2e\psi_0}{kT}} + [\text{Cl}^-]_{\infty} e^{+\frac{e\psi_0}{kT}} - [\text{Na}^+]_{\infty} - [\text{Ca}^{2+}]_{\infty} - [\text{Cl}^-]_{\infty} \right\} \end{aligned} \quad (6)$$

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

$$\sigma^2 = 2\varepsilon\varepsilon_0 kT \left\{ [\text{Na}^+]_{\infty} \left( e^{-\frac{e\psi_0}{kT}} + e^{+\frac{e\psi_0}{kT}} - 2 \right) + [\text{Ca}^{2+}]_{\infty} \left( e^{-\frac{2e\psi_0}{kT}} + 2e^{+\frac{e\psi_0}{kT}} - 3 \right) \right\}, \quad (7)$$

Тоді кінцевий результат запишеться у вигляді:

$$\sigma = (8\varepsilon\varepsilon_0kT)^{\frac{1}{2}} \sinh\left(\frac{e\psi_0}{2kT}\right) \left\{ [Na^+]_{\infty} + [Ca^{2+}]_{\infty} \left( 2 + e^{-\frac{e\psi_0}{kT}} \right) \right\}^{\frac{1}{2}} \quad (8)$$

або при 37°C, де концентрації  $[NaCl] = [Na^+]_{\infty}$ , и  $[CaCl_2] = [Ca^{2+}]_{\infty}$ , виражені в одиницях М, щільність заряду  $\sigma$  в Кл/м<sup>2</sup> і потенціал  $\psi_0$  в мВ:

$$\sigma = 0.119 \sinh\left(\frac{\psi_0}{53.4}\right) \left\{ [NaCl] + [CaCl_2] \left( 2 + e^{-\frac{\psi_0}{26.7}} \right) \right\}^{\frac{1}{2}} \quad (9)$$

Рівняння (8), відоме як рівняння Грема, дозволяє обчислити значення поверхневого потенціалу  $\psi_0$ , якщо відома величина щільності поверхневого заряду  $\sigma$ , після чого концентрації  $\rho_0$  індивідуальних іонів на поверхні можна розрахувати за формулами (3) або (4).

Для еритроцитів щільність поверхневого заряду  $\sigma = -1.31 \cdot 10^{-2}$  Кл/м<sup>2</sup> [5]. Або  $1.31 \cdot 10^{-2}$  Кл·м<sup>-2</sup>/1,602·10<sup>-19</sup> Кл = 0,82·10<sup>17</sup> зар/м<sup>2</sup>=0,082 зар/нм<sup>2</sup>, тобто 1 елементарний заряд на 12,2 нм<sup>2</sup>. В наших роботах [6,7], було показано що уведення в середовище навіть невеликих концентрацій кальцію приводить до зменшення поверхневого заряду. Для концентрації CaCl<sub>2</sub> 0,9·10<sup>-3</sup> М зменшення поверхневого заряду становило ~18%, для концентрацій 1,8·10<sup>-3</sup> М, 2,7·10<sup>-3</sup> М, 3,6·10<sup>-3</sup> М ~11%. Отже будемо вважати, що в першому розчині  $\sigma \approx 1,074 \cdot 10^{-2}$  Кл/м<sup>2</sup>, в інших -  $\sigma \approx 1.166 \cdot 10^{-2}$  Кл/м<sup>2</sup>.

Комп'ютерне обчислення поверхневого потенціалу еритроцитів в ізотонічному розчині NaCl з додаванням указаних концентрацій CaCl<sub>2</sub> (близьких до концентрацій в плазмі крові) за формулою (9) дають наступні величини:

0,15 М NaCl+0,9·10 <sup>-3</sup> М CaCl <sub>2</sub>	$\psi_0 = -12,2$ мВ
0,15 М NaCl+1,8·10 <sup>-3</sup> М CaCl <sub>2</sub>	$\psi_0 = -13,2$ мВ
0,15 М NaCl+2,7·10 <sup>-3</sup> М CaCl <sub>2</sub>	$\psi_0 = -13,1$ мВ
0,15 М NaCl+3,6·10 <sup>-3</sup> М CaCl <sub>2</sub>	$\psi_0 = -13,0$ мВ

для 0,15 М NaCl розрахований поверхневий потенціал становив  $\psi_0 = -14,7$  мВ.

Отримавши значення поверхневого потенціалу, за рівняннями (4) можна розрахувати концентрацію іонів на поверхні еритроцитів.

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

$$[Na^+]_0 = 0.15 \times e^{\frac{\psi_0}{kT}} = 0.15 \times e^{\frac{14.7}{26.7}} = 0.26(M)$$

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

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

$$[Na^+]_0 = 0.15 \times e^{\frac{\psi_0}{kT}} = 0.15 \times e^{\frac{12.2}{26.7}} = 0.237(M)$$

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

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

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

$$[Na^+]_0 = 0.15 \times e^{\frac{\psi_0}{kT}} = 0.15 \times e^{\frac{13.17}{26.7}} = 0.246(M)$$

$$\begin{aligned} [Ca^{2+}]_0 &= 1.8 \times 10^{-3} \times e^{\frac{13.17}{26.7}} = 2.95 \times 10^{-3} (M) \\ [Cl^-]_0 &= (0.15 + 0.0036) \times e^{\frac{-13.17}{26.7}} = 0.094 (M) \end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned} [Na^+]_0 &= 0.15 \times e^{\frac{\psi_0}{kT}} = 0.15 \times e^{\frac{13.07}{26.7}} = 0.245 (M) \\ [Ca^{2+}]_0 &= 2.7 \times 10^{-3} \times e^{\frac{13.07}{26.7}} = 4.40 \times 10^{-3} (M) \\ [Cl^-]_0 &= (0.15 + 0.0054) \times e^{\frac{-13.07}{26.7}} = 0.095 (M) \end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned} [Na^+]_0 &= 0.15 \times e^{\frac{\psi_0}{kT}} = 0.15 \times e^{\frac{12.97}{26.7}} = 0.244 (M) \\ [Ca^{2+}]_0 &= 3.6 \times 10^{-3} \times e^{\frac{12.97}{26.7}} = 5.85 \times 10^{-3} (M) \\ [Cl^-]_0 &= (0.15 + 0.0072) \times e^{\frac{-12.97}{26.7}} = 0.097 (M) \end{aligned}$$

Дебаївський радіус можна визначити з формули [3]

$$\frac{1}{\kappa} = \left( \frac{\varepsilon \varepsilon_0 kT}{\sum \rho_{\infty i} e^2 z_i^2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (10)$$

Бачимо, що величина дебаївського радіусу залежить тільки від властивостей розчину і не залежить від властивостей поверхні, таких, як її заряд або потенціал. Для наших концентрацій CaCl<sub>2</sub> від 0,9 мМ до 3,6 мМ в 0,15 М NaCl дебаївський радіус становитиме

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

при [Ca] = 0,9 · 10 <sup>-3</sup> М	→ 1/κ = 0,80 нм
при [Ca] = 1,8 · 10 <sup>-3</sup> М	→ 1/κ = 0,79 нм
при [Ca] = 2,7 · 10 <sup>-3</sup> М	→ 1/κ = 0,79 нм
при [Ca] = 3,6 · 10 <sup>-3</sup> М	→ 1/κ = 0,78 нм
при [Ca] = 0 в 0,15 М NaCl	→ 1/κ = 0,81 нм

Таблиця 1

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

Концентрація $\text{Ca}^{2+}$ $10^{-3}$ М	Індекс адгезії, А [6]	Кількість зв'язаного АВ еритроцитами, нг/ $10^6$ ер.[6]	Поверхневий потенціал, мВ	Дебаївський радіус при $37^\circ\text{C}$ , нм	Концентрація $\text{Ca}^{2+}$ на поверхні еритроцита, $10^{-3}$ М
0.00	$2.21 \pm 0.87$	$220.8 \pm 4$	-14.7	0.81	0.00
0.9	$0.97 \pm 0.84^*$	$180.98 \pm 11.5^+$	-12.2	0.80	1.42
1.8	$1.57 \pm 0.96^*$	$195.1 \pm 6.3^+$	-13.2	0.79	2.95
2.7	$1.4 \pm 0.84^*$	$199.9 \pm 9.7^+$	-13.1	0.79	4.40
3.6	$1.17 \pm 0.86^*$	$196.3 \pm 12.5^+$	-13.0	0.78	5.85

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

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

При оцінці імовірності адгезії лактобактерій *S. thermophilus* на еритроцитах людини в залежності від концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  візьмемо до уваги вплив іонів  $\text{Ca}^{2+}$  на силу електростатичного відштовхування клітин та на імовірність встановлення специфічного адгезійного зв'язку внаслідок зв'язування цих іонів зі специфічними рецепторами, що викликає їх інактивіацію. Тобто, слідом за [4] будемо вважати, що утворення адгезійного зв'язку між двома клітинами, здійснюється у два етапи. Щоб оцінити ступінь імовірності використовується поняття комплексу зіткнення. У цьому підході реакція концептуально розділяється на два кроки. На першому етапі реагенти просто зустрічаються (стикаються) один з одним, тобто вони дифундують на достатньо близьку відстань, щоб дозволити другий етап реакції. В нашому випадку першим (оборотним) етапом реакції будемо вважати наближення клітин до відстані дальнього потенціального мінімуму.

Таким чином реакція, може бути написана як



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

У наближенні Дерягіна [3] сила взаємодії між двома сферами може бути виражена через енергію взаємодії на одиницю площі двох плоских поверхонь на відстані  $D$ .

$$F(D) \approx 2\pi \left( \frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2} \right) W(D) \quad (12),$$

де  $W$  – вільна енергія взаємодії.

Ця формула застосовна до будь-якого типу закону сили, режиму притягання, відштовхування або перемінної взаємодії, якщо радіус взаємодії та відстань  $D$  набагато менше, ніж радіуси сфер. У випадку взаємодії клітин на відстані  $\sim$  дальнього мінімуму (3-4 нм) ця вимога виконується. Якщо одна сфера є дуже великою, так що  $R_2 \gg R_1$ ,

отримуємо  $F(D) = 2\pi R_1 W(D)$ , що відповідає граничному випадку сфери біля плоскої поверхні. Діаметр лактобактерій *S. thermophilus* становить  $\sim 1$  мкм, тоді як діаметр еритроцита становить  $\sim 7-8$  мкм. Крім ми можемо прийняти указане наближення, оскільки, хоча форма еритроцита є достатньо складною, більшу частину його поверхні можна вважати плоскою по відношенню до майже сферичних клітин *S. thermophilus* (тобто радіус кривизни поверхні еритроцита « радіусу кривизни лактобактерій »).

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

$$F \approx 2\pi R \epsilon \epsilon_0 \kappa \psi_0^2 e^{-\kappa D} = \frac{2\pi R \sigma^2 e^{-\kappa D}}{\kappa \epsilon \epsilon_0} \quad (13)$$

В цих рівняннях  $\psi_0$  і  $\sigma$  пов'язані виразом  $\sigma = \epsilon \epsilon_0 \kappa \psi_0$ , яке справедливо за малих потенціалів.

Вирази (12,13) для сили взаємодії двох подвійних електричних шарів є точними тільки на відстанях між поверхнями, більших приблизно одного дебаївського радіуса, що як показано нашими розрахунками (Табл.1) справедливо для взаємодії клітин на відстані дальнього мінімуму і більше. Ми бачимо, що взаємодія подвійного електричного шару між сферичною частинкою та поверхнею експоненціально зменшується з відстанню, причому характерним масштабом затухання є дебаївський радіус екранування.

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

$$P_1 \sim \frac{1}{F} = \frac{1}{(2\pi R \epsilon \epsilon_0 \kappa \psi_0^2 e^{-\kappa D})} = \frac{A}{\kappa \psi_0^2 e^{-\kappa D}} \quad (14)$$

де  $A = \frac{1}{2\pi R \epsilon \epsilon_0}$ . Приймаємо  $D \approx 4$  нм [3],  $R \approx 0,5$  мкм  $= 0,5 \cdot 10^{-6}$  м (радіус клітин *S. thermophilus*).

У багатьох випадках при зміні властивостей розчину ні  $\sigma$ , ні  $\psi_0$  не залишаються постійними. Так відбувається через те, що лише у виняткових випадках іонізовані групи на поверхні дисоційовані повністю, і, як правило, вони частково нейтралізовані при зв'язуванні відповідних іонів з розчину. Наприклад, в нашому випадку з негативно зарядженими рецепторами на поверхні еритроцитів зв'язуються іони кальцію. Тоді рівноважна концентрація рецепторів на поверхні задається виразом:



Концентрацію кальцію на поверхні позначаємо як і раніше  $[\text{Ca}^{2+}]_0$ , концентрацію або поверхневу щільність не зв'язаних з  $\text{Ca}^{2+}$  рецепторів на поверхні як  $[\text{Re}^{2-}]_0$  і щільність зв'язаних з  $\text{Ca}^{2+}$  рецепторів як  $[\text{ReCa}]_0$ . Величина  $[\text{Re}^{2-}]_0$  пов'язана з  $\sigma$  співвідношенням  $\sigma = -b[\text{Re}^{2-}]_0$ , де  $b$  частка рецепторів, що відповідають за адгезію з лактобактеріями, відносно всіх негативно заряджених груп на поверхні еритроцитів.  $b\sigma_0 = N$  – вихідна поверхнева щільність рецепторів, а  $a$  - частка не зв'язаних з  $\text{Ca}^{2+}$  рецепторів. Величину  $a$  беремо з наших експериментальних даних щодо зміни поверхневого заряду в розчинах з додаванням 2:1 електроліту  $\text{CaCl}_2$  за зв'язуванням катіонного фарбника (табл.1).

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



$$P_2 \sim \alpha b \sigma_0 = \alpha N \quad (16)$$

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

$$P = P_1 \times P_2 \sim \frac{\alpha NA}{\kappa \psi_0^2 e^{-\kappa D}} \sim \frac{\alpha NA}{\kappa \psi_0^2 e^{-4\kappa}} \quad (17)$$

В таблиці 2 зведені експериментальні та розраховані нами теоретично дані, прийняті для обчислення імовірності установаження специфічного адгезійного зв'язку між *S. thermophilus* та еритроцитами людини.

Таблиця 2

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

Концентрація Ca, $10^{-3}$ М	$\alpha$	$\kappa$ , $\text{nm}^{-1}$	$\Psi_0$ , мВ	P, відносні одиниці
0.0	1	1.23	-14.7	1
0.9	0.82	1.25	-12.2	0.51
1.8	0.89	1.26	-13.2	0.62
2.7	0.89	1.27	-13.1	0.58
3.6	0.89	1.28	-13.0	0.54

Для графічної ілюстрації та порівняння експериментальних даних по визначенню індексу адгезії та теоретично розрахованої імовірності утворення специфічного адгезійного зв'язку результати представлені показані на рис. 1.

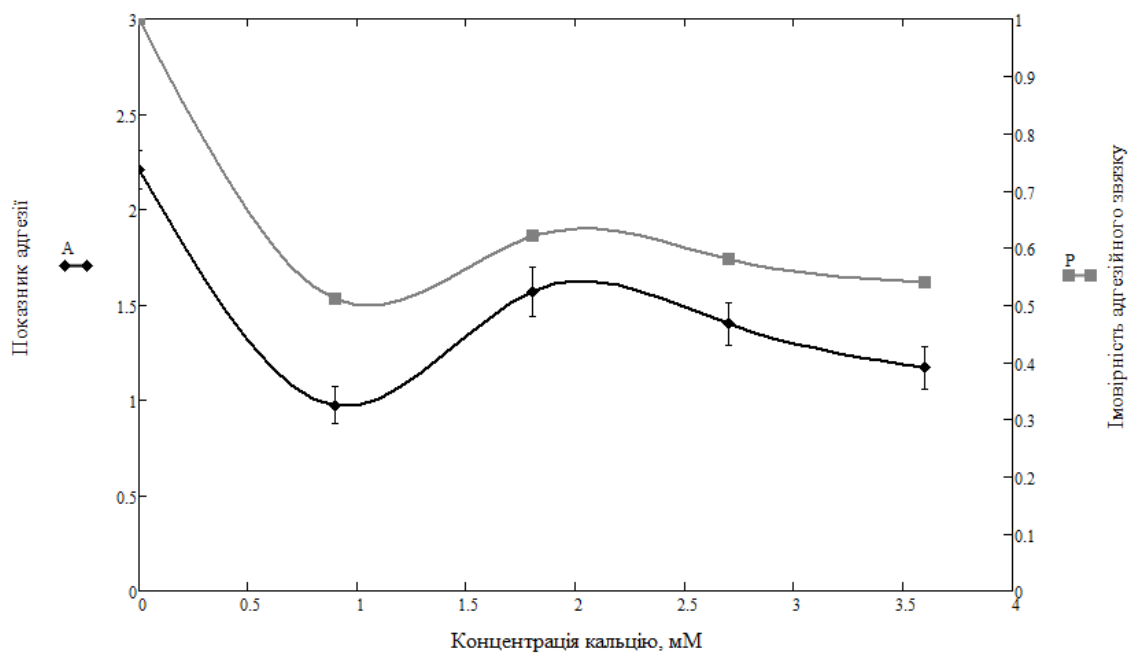


Рис.1. Показник адгезії (◆) та імовірність утворення специфічного зв'язку (■) між лактобактеріями *S. thermophilus* та еритроцитами людини в залежності від концентрації  $\text{CaCl}_2$

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

### ВИСНОВКИ

Як ми і припускали в попередніх роботах [6,7], отримані залежності показника адгезії від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в середовищі можна пояснити блокуванням специфічних рецепторів зв'язування двовалентними катіонами. В той же час визначальну роль в міжклітинному адгезійному процесі також відіграють електростатичні взаємодії. Отримані експериментальні результати та теоретичні розрахунки параметрів електростатичної взаємодії вчергове підтвердили прийнятність моделі двоступеневої сорбції та теорії ДЛФО для описання міжклітинної адгезії.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. 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.
2. Carnazza S. New advances in cell adhesion Technology / S. Carnazza // Nanoparticles and Nanodevices in Biological Applications, Lecture Notes in Nanoscale science and technology / Stefano Bellucci (Ed.) – V4. – New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009. – V. 4. – P. 69 – 130. – ISBN 978–3–540–70943–5.
3. Israelachvili J. Intermolecular and Surface forces / J. Israelachvili // 3<sup>rd</sup> ed. – Burlington: Academic Press, 2011. – 674 p. – ISBN 978 – 0–12–375182–9.
4. Bell G.I. Models for the specific adhesion of cells to cells / G.I. Bell // Science. – 1978. – V. 200. – P.618–627.
5. Petelska A. D. The effect of contrast medium SonoVue on the electric charge density of blood cells/ A.D. Petelska, J.R. Janica, J.Kotynska, U.Lebkowska, Z.A. Figaszewski //J. Membrane Biol. – 2012. – V.245. – P.15–22.
6. Anikieieva M.O. Surface charge of erythrocytes and lactobacilli *S. thermophilus* and their intercellular adhesion depend on the concentration of bivalent cations / M.O. Anikieieva, S.L. Rozanova, S.Ye.Kovalenko, I.F. Kovalenko, O.I. Gordiyenko, E.O. Gordiyenko // Journal of Adhesion Science and Technology. – 2015. – V.29, №10. – P.1039-1045.
7. Анікеєва 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. Анікеєва, С.Л. Розанова, С.Є. Коваленко, О.І. Гордієнко, Є.О. Гордієнко // Доповіді Національної академії наук України. – 2015. – №1. – С.159–165. / Anikjejeva M.O. Vplyv kationiv  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Mg}^{2+}$  na poverhnevuj zarjad erytrocytiv i laktobakterij *S. thermophilus* ta i'h adgezijnu vzajemodiju / M.O. Anikjejeva, S.L. Rozanova, S.Je. Kovalenko, O.I. Gordijenko, Je.O. Gordijenko // Dopovidi Nacional'noi' akademii' nauk Ukrai'ny. – 2015. – №1. – S.159–165.