



УДК 577.352.5:576.524

М. О. Анікеєва, С. Л. Розанова, С. Є. Коваленко, О. І. Гордієнко,
член-кореспондент НАН України Є. О. Гордієнко

Вплив катіонів Ca^{2+} і Mg^{2+} на поверхневий заряд еритроцитів і лактобактерій *Streptococcus thermophilus* та їх адгезійну взаємодію

*Запропоновано просту і доступну модель адгезії лактобактерій на еритроцитах людини. Досліджено вплив двовалентних катіонів (Ca^{2+} і Mg^{2+}) на поверхневий заряд еритроцитів і лактобактерій *S. thermophilus* та їх адгезійну взаємодію. Показано, що, незважаючи на зовнішньо схожий односпрямований вплив катіонів Ca^{2+} і Mg^{2+} на адгезію лактобактерій *S. thermophilus* на еритроцитах людини, причини такого впливу різняться. Якщо іони Ca^{2+} впливають на поверхневий заряд еритроцитів, не змінюючи його у *S. thermophilus*, то іони Mg^{2+} , навпаки, впливають на поверхневий заряд лактобактерій та не змінюють його в еритроцитів. Цей результат підтверджує думку, що в даному випадку двовалентні катіони впливають на другу необоротну стадію адгезійного процесу, а не на фізичні взаємодії на першій оборотній стадії.*

У попередніх роботах [1, 2] нами було показано, що вплив таких фізико-хімічних характеристик середовища, як рН та іонна сила, на адгезію лактобактерій *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини можна пояснити на підставі розширеної теорії Дерягіна–Ландау–Фервея–Овербека (ДЛФО) [3, 4]. Як показали наші дослідження, показник адгезії істотно залежить від рН середовища та є максимальним при фізіологічному для еритроцитів значенні. При фізіологічних значеннях рН показник адгезії був найбільшим у фізіологічному сольовому розчині. Зменшення іонної сили середовища спричиняло вірогідне зменшення адгезії. Згідно з теорією 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 разі супроводжується зниженням бар'єра відштовхування. При досягненні певної концентрації електроліту сили притягання стають домінуючими на всіх відстанях [3].

У наших експериментах бактерії інкубували з еритроцитами протягом 30 хв. Отже, отримані дані відображають результат кінцевої (необоротної) стадії адгезії. Проте характер перебігу першої стадії прикріплення мікроорганізмів до еритроцитів, безумовно, впливає на кінцевий результат. За загальною фізико-хімічною точкою зору початкова, швидка

© М. О. Анікеєва, С. Л. Розанова, С. Є. Коваленко, О. І. Гордієнко, Є. О. Гордієнко, 2015

фаза мікробної адгезії опосередкована неспецифічними взаємодіями з характеристиками далекої дії, у тому числі силами Ліфшица–Ван-дер-Ваальса, електростатичними силами, кислотно-лужними та гідрофобними взаємодіями [4]. Бактерії можуть мати численні адгезини для різних субстратів, зазвичай лектини або лектиноподібні білки чи вуглеводи, частини поверхневих полімерних структур, які включають капсули, ворсинки або пілі. Проте в багатьох роботах стверджується, що ці структурні особливості мають менше значення на початкових стадіях процесу прикріплення, ніж термодинамічні чинники. Результати низки детальних досліджень свідчать на користь цього твердження [5].

Теорія ДЛФО не передбачає значних змін характеру розподілу електростатичного потенціалу поверхні навіть при повній заміні в розчинах електроліту одновалентних катіонів на двовалентні при дії однакової іонної сили, зменшується лише величина протяжності дифузного шару протиіонів $1/\chi$, де χ — обернена дебаївська довжина. У випадку 1–1 електроліту $\chi^2 = 8\pi e^2 n_1 / \varepsilon kT$, у випадку 2–1 електроліту $\chi^2 = 24\pi e^2 n_2 / \varepsilon kT$ (де ε — діелектрична проникність середовища, e — елементарний заряд, n_1 та n_2 — концентрація іона) [3], що повинно було б привести до полегшення адгезії у другому випадку. Оскільки використані нами близькі до фізіологічних концентрації двовалентних катіонів Ca^{2+} та Mg^{2+} були значно меншими за концентрацію Na^+ і неістотно впливали на іонну силу розчину та протяжність дифузного шару протиіонів, можна вважати, що електростатична складова розклинювального тиску при цьому істотно не змінювалася. Що стосується структурної складової, то збільшення концентрації електролітів зменшує радіус дії відштовхуючих структурних сил і приводить до більш різкого їх спаду, що також повинно полегшити адгезію.

Проте отримані результати показали значний вплив двовалентних катіонів на показник адгезії у напрямку його зменшення. Такий результат можна пояснити впливом двовалентних катіонів на другому (необоротному) етапі адгезійного процесу. Значна кількість великих білків, залучених у взаємодію клітина–поверхня і клітина–клітина містять кальцієзв'язувальні домени [6, 7]. Однак, як свідчать результати дослідження впливу Ca^{2+} і Mg^{2+} на адгезію *S. thermophilus* на еритроцитах людини [2], адгезійні молекули, що беруть участь у даному процесі, не є Ca^{2+} - або Mg^{2+} -залежними, тобто не активуються цими катіонами. На це вказує однаковий негативний вплив цих катіонів на адгезію. Отриманий результат, очевидно, є наслідком впливу двовалентних катіонів на ліганди та/або рецептори і не пов'язаний з їх активацією.

Для подальшого вивчення цього питання нами було проведено дослідження впливу двовалентних катіонів (Ca^{2+} і Mg^{2+}) на поверхневий заряд еритроцитів та лактобактерій *S. thermophilus*.

Матеріали і методи. Розчини готували на деіонізованому бідистиляті.

Еритроцити виділяли з донорської крові людини, двічі відмивали фізіологічним розчином на 0,1 М фосфатному буфері, рН 7,4, і осаджували центрифугуванням при 2000 об/хв. Висушені бактеріальні клітини *S. thermophilus* суспендували у фізіологічному розчині з додаванням 5% глюкози та інкубували при 37 °С протягом 30 хв, відмивали в буферному фізіологічному розчині та осаджували центрифугуванням при 6000 об/хв. Осад обох видів клітин ресуспендували у співвідношенні 1 : 2 у буферному розчині з визначеними фізико-хімічними характеристиками.

Суспензії обох видів клітин змішували у співвідношенні 1 : 1 та інкубували при 37 °С протягом 30 хв, струшуючи суспензію кожні 5 хв. Адгезію бактеріальних клітин на еритроцитах людини спостерігали за допомогою мікроскопа Axio Observer Z1 (масляно-імерсійний об'єктив х63). Для підрахунку кількості адгезованих бактерій фіксували п'ять різних полів

зору до та після механічного струсу зразка. У кожному полі зору підраховували кількість адгезованих бактерій на кожному еритроциті та розраховували середнє значення кількості адгезованих бактерій на одному еритроциті — показник адгезії.

Заряд на еритроцитах оцінювали за допомогою катіонного барвника альціанового синього (Alcian blue 8GX) (АС) [8]. 50 мг АС повністю розчиняли в 1 мл 100% етанолу. Розчин барвника фільтрували через паперовий фільтр і розбавляли у 100 разів у фосфатному буферному розчині або відповідному експериментальному розчині, отримуючи кінцеву концентрацію етанолу 1%. Для визначення реальної концентрації АС у розчині після фільтрації враховували його втрати на стінках бюкса, в якому розчиняли барвник, та втрати АС і розчинника (спирту) шляхом зважування бюкса та фільтра до приготування і фільтрації розчину та після фільтрації, а також фільтра після його висихання. Безпосередньо перед використанням розчину кожного разу його оптичну щільність вимірювали на спектрофотометрі (Pye Unicam SP 8000, Велика Британія) на 650 нм.

В експериментах по оцінюванню поверхневого заряду еритроцитів використовували таку ж концентрацію клітин, як і в роботі [8]. Для оцінки поверхневого заряду лактобактерій *S. thermophilus* була підібрана оптимальна кількість клітин 10 мг/мл, що відповідало їх концентрації $5 \cdot 10^9$ кл./мл.

0,1 мл суспензії еритроцитів ($1,25 \cdot 10^9$ кл./мл) або бактеріальних клітин ($5 \cdot 10^9$ кл./мл) змішували з 2 мл кінцевого розчину АС. Суміш інкубували 30 хв при 37 °С. Після виділення клітин центрифугуванням залишок АС визначали на спектрофотометрі за оптичною щільністю при 650 нм. Кількість зв'язаного АС на клітину розраховували за різницею між оптичною густиною початкового розчину АС і супернатанту. Вона виражалась в нанограмах на 10^6 клітин. Експерименти виконували у п'яти повторях.

Результати та обговорення. Проведені дослідження показали, що зв'язування катіонного барвника АС з еритроцитами вірогідно не змінювалося в дослідженому діапазоні рН розчину (5,8–8,0) та іонної сили (0,15–0,025 М NaCl) (дані не наводяться). Натомість, введення в середовище фізіологічних концентрацій катіонів Ca^{2+} призвело до вірогідного зменшення кількості зв'язаного АС еритроцитами. При цьому зміни цієї характеристики корелюють зі змінами показника адгезії з коефіцієнтом кореляції $r = 0,935$ (табл. 1). Водночас зв'язування АС з клітинами *S. thermophilus* вірогідно не змінювалося у дослідженому діапазоні концентрацій іонів Ca^{2+} (див. табл. 1).

За умов введення в середовище Mg^{2+} кількість зв'язування барвника еритроцитами вірогідно не змінювалася, тоді як у досліді з *S. thermophilus* спостерігалось вірогідне зменшення кількості зв'язаного АС, що корелює зі змінами в адгезії з коефіцієнтом кореляції

Таблиця 1. Показник адгезії бактеріальних клітин *S. thermophilus* на еритроцитах людини та зв'язування клітинами АС в залежності від концентрації іонів Ca^{2+} в середовищі інкубації

Концентрація Ca^{2+} , %	Показник адгезії	Кількість зв'язаного АС	
		еритроцитами, нг/10 ⁶ ер.	лактобактеріями, нг/10 ⁶ <i>S. thermophilus</i>
0,00 (контроль)	2,21 ± 0,87	220,8 ± 4	444,1 ± 8,7
0,01	0,97 ± 0,84*	180,98 ± 11,5 [×]	432 ± 10,8
0,02	1,57 ± 0,96*	195,1 ± 6,3 [×]	435 ± 9,7
0,03	1,4 ± 0,84*	199,9 ± 9,7 [×]	443 ± 11
0,04	1,17 ± 0,86*	196,3 ± 12,5 [×]	428 ± 10,2

*, [×] Дані вірогідно відрізняються від контролю, $p < 0,01$.

$r = 0,98$ (табл. 2). Отримані результати щодо впливу іонів Mg^{2+} узгоджуються з даними [8] про те, що $MgCl_2$ не змінює прикріплення АС до еритроцитів.

Відомо, що електростатичні сили можуть впливати на початкову стадію бактеріальної адгезії, а також є важливими для молекулярних процесів розпізнавання, у тому числі Ca^{2+} -зв'язування і міжклітинної адгезії. Роль двовалентних катіонів, зокрема кальцію, у процесах життєдіяльності є дуже складною і не може бути зведена до примітивного односпрямованого впливу в тих чи інших процесах. Ca^{2+} регулює багато біологічних процесів через взаємодії з білками, що мають різні конформаційні, динамічні і металозв'язувальні властивості. Він, зокрема, впливає на багатоклітинну поведінку різних мікроорганізмів. Значна кількість великих білків, залучених у взаємодію клітина–поверхня і клітина–клітина містять кальцієзв'язувальні домени [6, 7]. Кальцій пов'язаний з різноманітними біологічними процесами в бактеріях, але дані щодо його ролі в розвитку біоплівки суперечливі. Зокрема, у роботі [6] показано, що кальцій викликає прискорене утворення біоплівки *Pseudomonas putida*, а також у інших мікроорганізмів, наприклад *Xylophaga fastidiosa* [9] або *Vibrio vulnificus* [10]. У *Staphylococcus aureus*, навпаки, Ca^{2+} викликає пригнічення утворення біоплівки і міжклітинну адгезію для ліній, де присутній великий адгезин *Vap*. Цей білок містить чотири кальцієзв'язувальних елемента; при їх мутації пригнічувальний ефект Ca^{2+} втрачається [7]. Отже, кальцій, може регулювати утворення біоплівки в протилежних напрямках у різних бактерій, тобто як посилювати, так і послаблювати адгезійні процеси. Молекулярне підґрунтя його ролі залишається нез'ясованим.

В експериментах на моделі культуральних клітин Сасо-2 (що є добре описаною клітинною моделлю, створеною від аденокарциноми товстої кишки людини) [11] досліджено адгезійну здатність 25 ліній лактобактерій. На думку авторів, дослідження механізму бактерійної адгезії дуже б полегшилось при використанні відповідної моделі клітинної культури. Ідеальним було б використання ізольованих ентероцитів, але людська кишкова тканина не є легкодоступною. Більше того, слабка життєздатність ізольованих ентероцитів людини і варіації між ентероцитами різних донорів призводять до підвищення варіабельності результатів при вивченні бактерійної адгезії *in vitro*. Автори роботи [11] показали, що серед досліджених лактобактерій тільки *Lactobacillus acidophilus* людини лінії LB, лінія ізоляту курчати С2, лінії ізоляту свині РА3 і РА19 і *L. casei* лінії GG мали високу кальцієнезалежну здатність до зв'язування з диференційованими клітинами Сасо-2 в культурі. Те, що здатність лактобактерій адгезувати до диференційованих клітин Сасо-2 значно варіює для різних ліній, показує, на думку авторів, що адгезійні властивості не є універсальною особливістю лактобактерій. Автори вважають, що адгезія лактобактерій до кишкових клі-

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

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

*, [×] Дані вірогідно відрізняються від даних для контролю, $p < 0,01$.

тин, якій сприяють двовалентні катіони кальцію, відмінна від адгезії, що має місце при відсутності катіонів.

Про різний вплив іонів кальцію та магнію на адгезію різних ліній лактобактерій повідомляється в роботі [12]. За даними цієї роботи, додавання Ca^{2+} спричиняло істотне ($p < 0,05$) підвищення адгезії ліній *L. acidophilus* GK20, *L. paracasei* GK74 і *P. pentosaceus* MLK67. Найбільший ефект спостерігався для *L. acidophilus* GK20 і *L. paracasei* GK74, для яких адгезія підвищувалася на 31,70 і 22,19% відповідно порівняно з контролем. Проте адгезійна здатність *L. plantarum* GK81 і *L. brevis* MLK27 не відрізнялася від контролю при додаванні кальцію. Не спостерігалось істотної зміни в адгезії усіх досліджених ліній при додаванні Mg^{2+} іонів.

Різний вплив Ca^{2+} та Mg^{2+} іонів на різні адгезійні молекули може бути пов'язаний з різним іонним радіусом цих молекул. Так, у роботі [13] показано, що центральною особливістю взаємодії інтегрину CD11b/CD18 з фізіологічними лігандами є мономодальне зв'язування карбоксилату ліганду з Mg^{2+} іоном на залежному від іона металу адгезійному сайті (metal ion-dependent adhesion site — MIDAS) в А-доміні інтегрину. Ця взаємодія стабілізує А-доміні у високоспорідненому стані, який відрізняється від пасивного низькоспорідненого стану змінами третинної структури в домені, що завершується клітинною адгезією. З двох двовалентних катіонів Mg^{2+} і Ca^{2+} , яких більш ніж достатньо в периферійній крові, восьмигранне оточення біля MIDAS ідеально відповідає вимогам для закріплення Mg^{2+} . Було показано, що пристосування більшого Ca^{2+} (іонний радіус 1,0 Å) порівняно з Mg^{2+} (іонний радіус 0,72 Å) у восьмигранному оточенні MIDAS є термодинамічно несприятливим і призводило б до істотної структурної перебудови оточення і зменшення спорідненості для природних лігандів.

Отже, отримані нами результати свідчать про те, що, незважаючи на зовнішньо схожий односпрямований вплив катіонів Ca^{2+} і Mg^{2+} на адгезію лактобактерій *S. thermophilus* на еритроцитах людини, причини такого впливу різняться. Якщо іони Ca^{2+} впливають на поверхневий заряд еритроцитів, не змінюючи його у *S. thermophilus*, то іони Mg^{2+} , навпаки, впливають на поверхневий заряд лактобактерій та не змінюють його у еритроцитів. Цей результат ще раз підтверджує висловлену нами думку, що в даному випадку двовалентні катіони впливають на другу необоротну стадію адгезійного процесу, а не на фізичні взаємодії на першій оборотній стадії.

Крім того, ми запропонували просту і доступну модель адгезії лактобактерій на еритроцитах людини, яка ґрунтується на тому, що ті ж самі вуглеводні частини рецепторів, що і на цільових тканинах, які використовуються як місця прикріплення великої кількості і широкої різноманітності мікробних патогенів і їх токсинів, а також дружніх бактерій [14], часто знаходяться в таких же глікосполуках, білках, або сіалоглікопротеїнах клітинних мембран в інших місцях, крім цільової тканини або органу. Так, еритроцити демонструють величезну різноманітність складних глікопротеїнів, глікофінголіпідів і гангліозидів, які ідентичні або близькі до рецепторів адгезину на епітеліальних клітинах [15]. Отже, еритроцити є зручним джерелом клітин ссавців, які мають велику кількість експонованих складних вуглеводів, що представляють потенційно споріднені вуглеводні послідовності для бактерійних адгезинів.

1. Anikieieva M., Gordiyenko O. Influence of medium pH and ionic strength of a medium on the adhesion of *Streptococcus thermophilus* microorganisms to human erythrocytes // Periodicum biologorum. – 2014. – 116, No 1. – P. 89–93.

2. Аникеева М. О., Коваленко І. Ф., Коваленко С. Є., Гордієнко О. І. Вплив одно- та двовалентних катіонів на адгезію *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини // Біофіз. вісн. – 2014. – **31**, № 1. – С. 35–41.
3. Israelachvili J. Intermolecular and Surface forces. – 3rd ed. – Burlington: Academic Press, 2011. – 674 p.
4. Bos R., van der Mei H. C., Busscher H. J. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study // FEMS Microbiol. Rev. – 1999. – **23**. – P. 179–230.
5. An Y. H., Friedman R. J. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials surfaces // J. Biomed. Mat. – 1998. – **43**. – P. 338–348.
6. Martinez-Gil M., Romero D., Kolter R., Espinosa-Urgela M. Calcium causes multimerization of the large adhesion LapF and modulates biofilm formation by *Pseudomonas putida* // J. Bacteriol. – 2012. – **194**, No 24. – P. 6782–6789.
7. Arrizubieta M. J., Toledo-Arana A., Amorena B. et al. Calcium inhibits Bap-dependent multicellular behavior in *Staphylococcus aureus* // J. Bacteriol. – 2004. – **186**. – P. 7490–7498.
8. Gambaro G., Baggio B., Cicerello E. et al. Abnormal erythrocyte charge in diabetes mellitus. Link with microalbuminuria // Diabetes. – 1988. – **37**. – P. 745–748.
9. Cruz L. F., Cobine P. A., De La Fuente L. Calcium increases surface attachment, biofilm formation, and twitching motility in *Xylella fastidiosa* // Appl. Environ. Microbiol. – 2012. – **78**. – P. 1321–1331.
10. Garrison-Schilling K. L. Calcium promotes exopolysaccharide phase variation and biofilm formation of the resulting phase variants in the human pathogen *Vibrio vulnificus* // Environ. Microbiol. – 2011. – **13**. – P. 643–654.
11. Chauviere G., Coconnier M.-H., Kerneis S. et al. Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells // J. Gen. Microbiol. – 1992. – **138**. – P. 1689–1696.
12. Lim S.-M., Ahn D.-H. Factors affecting adhesion of lactic acid bacteria to Caco-2 cells and inhibitory effect on infection of *Salmonella typhimurium* // J. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – **22**, No 12. – P. 1731–1739.
13. Mahalingam B., Ajroud K., Alonso J. L. et al. Stable coordination of the inhibitory Ca²⁺ 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 // J. Immunology. – 2011. – **187**. – P. 6393–6401.
14. Gagneux P., Cheriyan M., Hurtado-Ziola N. et al. Human-specific regulation of α 2-6-linked sialic acids // J. Biol. Chem. – 2003. – **278**, No 48. – P. 48245–48250.
15. Evans D. G., Evans D. J. Adhesion properties of *Helicobacter pylori* // Methods in Enzymology. – 1995. – **253**. – P. 336–360.

Інститут проблем кріобіології та кріомедицини
НАН України, Харків

Надійшло до редакції 08.09.2014

М. А. Аникеева, С. Л. Розанова, С. Е. Коваленко, О. І. Гордієнко,
член-корреспондент НАН України Е. А. Гордієнко

Влияние катионов Ca²⁺ и Mg²⁺ на поверхностный заряд эритроцитов и лактобактерий *Streptococcus thermophilus* и их адгезивное взаимодействие

Предложена простая и доступная модель адгезии лактобактерий на эритроцитах человека. Исследовано влияние двухвалентных катионов (Ca²⁺ и Mg²⁺) на поверхностный заряд эритроцитов и лактобактерий *S. thermophilus* и их адгезивное взаимодействие. Показано, что, несмотря на внешне похожее однонаправленное влияние катионов Ca²⁺ и Mg²⁺ на адгезию лактобактерий *S. thermophilus* на эритроцитах человека, причины такого влияния различаются. Если ионы Ca²⁺ влияют на поверхностный заряд эритроцитов, не изменяя его у *S. thermophilus*, то ионы Mg²⁺, наоборот, влияют на поверхностный заряд лактобактерий и не изменяют его у эритроцитов. Этот результат подтверждает мнение, что в данном случае двухвалентные катионы влияют на вторую необратимую стадию адгезивного процесса, а не на физические взаимодействия на первой обратимой стадии.

M. A. Anikieieva, S. L. Rozanova, S. Ye. Kovalenko, O. I. Gordiyenko,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine E. A. Gordiyenko

Effect of Ca^{2+} and Mg^{2+} cations on surface charges of erythrocytes and lactobacilli *Streptococcus thermophilus* and their adhesive interaction

*We propose a simple accessible model of lactobacilli adhesion to human erythrocytes. The effects of divalent (Ca^{2+} , Mg^{2+}) cations on the surface charge of erythrocytes and lactobacilli *S. thermophilus* and their adhesive interaction have been studied. We have shown that, despite the similar unidirectional influence of Ca^{2+} and Mg^{2+} cations on lactobacillus *S. thermophilus* adhesion to human erythrocytes, the underlying causes of these influences are different. While the Ca^{2+} ions affect erythrocyte's surface charge but do not change it in *S. thermophilus*, the Mg^{2+} ions, on the contrary, influence the lactobacilli surface charge and do not affect the charge of erythrocytes. This result supports the assumption that, in this case, the divalent cations affect the second irreversible stage of the adhesive process rather than the physical interactions of the first reversible stage.*