

МАС-СПЕКТРОМЕТРИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ ПОЛІГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНІДИНУ З ЛІПІДАМИ

А. В. ЛИСИЦЯ¹, А. В. РЕБРИЇВ²

¹Інститут сільського господарства Західного Полісся НААН України, Рівне;

²Інститут біохімії ім. О. В. Паладіна НАН України, Київ;

e-mail: lysyuya@ukr.net; rebriev@ukr.net

Наведено результати мас-спектрометричних досліджень композицій солей полігексаметиленгуанідину (ПГМГ) з ліпідами. Полімерні похідні гуанідину, в тому числі й ПГМГ, зазвичай застосовують як дезінфектанти. Мас-спектрометричний аналіз сумішей показав, що стійкі міжмолекулярні комплекси олігомерів ПГМГ із ліпідами не утворюються. У досліджах було використано лецитин і холестерол, які входять до складу цитоплазматичних мембран. Дослідження проведено методом MALDI-TOF MS. Запропоновано модель зв'язування полікатиона ПГМГ із мембраною клітини. У разі його адсорбції на негативно зарядженій бактеріальній мембрані може мати місце як електростатична взаємодія, так і утворення петлеподібних структур. Такий стереохімічний механізм забезпечує міцність адсорбції досліджуваного полікатиона на мембрані. У поєднанні з іншими деструктивними чинниками, це й спричинює руйнування цитоплазматичної мембрани мікроорганізму дезінфектантами, виготовленими на основі солей ПГМГ.

Ключові слова: полігексаметиленгуанідин, дезінфектант, деструкція мембрани, ліпіди, мас-спектрометрія.

Полігексаметиленгуанідин (ПГМГ) є одним із типових представників полімерних похідних гуанідину і належить до групи катіонних дезінфектантів [1]. Молекула ПГМГ може мати лінійну, розгалужену або частково замкнену структуру [1–3].

Оскільки цитоплазматична мембрана бактеріальної клітини містить значний відсоток аніонних ліпідів, то поверхня клітини має певний негативний заряд [4]. Електростатична взаємодія катіонного біоциду, зокрема ПГМГ, з аніонними фосfolіпідами вважається головною причиною його адсорбції на мембрані та подальшої деструкції ліпідного бішару. Проте біохімічні аспекти бактерицидної дії ПГМГ вивчено недостатньо. Припускається, що він може діяти подібно до свого аналога полігексаметиленбігуанідину (ПГМБ) [5]. Тобто спочатку руйнується бактеріальна стінка, потім електростатичне зв'язування препарату із цитоплазматичною мембраною (ЦПМ) призводить до порушення її функцій і руйнування, а після проникнення полікатиона всередину клітини відбувається осадження протеїнів і нуклеїнових кислот цитозолу [6]. Бактеріостатичні

концентрації дезінфектантів на основі солей ПГМГ зазвичай становлять 10^{-4} – $10^{-3}\%$, а бактерицидні від 10^{-2} до $10^{-10}\%$ [1, 5, 6]. На нашу думку, в механізмах антимікробної дії ПГМГ провідне місце належить фактору специфічної взаємодії молекул полімеру з фосfolіпідами мембрани, що в подальшому спричинює зміну властивостей і функцій останньої. Саме руйнування мембрани є основою біоцидної дії препарату, про що свідчать і результати деяких інших досліджень [7]. Оскільки адсорбція ПГМГ на ліпідний бішар або на ЦПМ клітини носить необоротний характер [8], то логічно припустити, що полікатион може утворювати міцні міжмолекулярні комплекси з мембранними ліпідами.

Для виявлення можливих комплексів між молекулами ПГМГ і ліпідами, що входять до складу мембран, доцільно використати метод мас-спектрометрії з м'яким типом іонізації. Зокрема, часоперельотну мас-спектрометрію з матричноактивованою лазерною десорбцією/іонізацією (matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS).

Метою досліджень було з'ясувати за допомогою мас-спектрометрії можливість утворення стійких міжмолекулярних комплексів ПГМГ з ліпідними компонентами мембран.

Матеріали і методи

У досліджах використовували лецитин або фосфатидилхолін яєчного жовтка (ЗАТ Біолек, Україна), холестерол (Avanti Polar Lipids, США), безводні солі: ПГМГ– хлорид, ПГМГ – малеат, ПГМГ – сукцинат, ПГМГ – валерат (ПП Терміт, Україна). Ліпіди розчиняли в суміші ацетон–хлороформ (1 : 1 за об'ємом) кваліфікації хч (Макрохім, Україна), солі ПГМГ – в суміші етанол–вода (1 : 1 за об'ємом). Розчини солей ПГМГ змішували з лецитином, холестеролом та композицією лецитин–холестерол (об'ємне співвідношення 2 : 1). Остання використовувалася також для підготовки бішарової ліпідної мембрани (БЛМ), що імітує склад ЦПМ [8]. Зразки в сумішах перед зніманням мас-спектрів витримували від кількох хвилин до 2 діб (за кімнатної температури). Для підготовки сумішей ПГМГ із ліпідами сполуки брали в еквімолярних співвідношеннях. Оскільки розміри молекул ПГМГ значною мірою залежать від технології синтезу та способу очищення, то маси окремих молекул полімеру знаходяться в досить широких межах, а саме від кількох сотень до кількох тисяч, інколи десятків тисяч Да. Тому молярну концентрацію зручніше розраховувати, орієнтуючись на масу одного мономера (рис. 1), яка становить 141 Да, тобто, концентрація ПГМГ в 1%-му розчині відповідає ≈ 70 мМ. У більшості вимірювань використовували 0,2%-ну концентрацію солей ПГМГ (≈ 14 мМ).

Дослідження MALDI-TOF проводили на спектрометрі Voyager DE PRO (Applied Biosystems, США). Застосовували H^+ -матричну іонізацію за допомогою 2,5-дигідроксибензойної кислоти (DHB, Fluka, Швейцарія) під дією лазерного опромінення. Концентрація DHB у матричному реагенті становила 1 мг/мл, реактив розводили в розчині, що складався з однакових об'ємів метанолу (Sigma-Aldrich, США) та деіонізованої води. Співвідношення матричного реагенту до розчину досліджуваного зразка 1 : 1 (за об'ємом). Застосовували рефлекторний режим роботи мас-спектрометра з прикладеною напругою 20 кВ. Отримані спектри обробляли за допомогою програми Data Explorer 4.0 (Applied

Biosystems, США). Вимірювали моноізотопні значення протонованих молекул, для усереднення використовували дані 4–10 спектрів. Молекулярну масу речовини визначали відніманням 1 (маса протону 1,007 Да) від експериментального визначення m/z (співвідношення маси і заряду іона).

Результати та обговорення

Особливістю застосованого методу є те, що процеси десорбції/іонізації не спричинюють значної фрагментації молекул органічних сполук, а також можуть зберігатися окремі міжмолекулярні утворення або комплекси.

У досліджуваних сумішах молекули ПГМГ мали можливість взаємодіяти не з ліпідними бішарами (БЛМ або ліпосоми), подібними до ЦПМ клітини, а з окремими молекулами ліпідів. Проте в сумішах ПГМГ з лецитином, холестеролом та композицією лецитин–холестерол (2 : 1) в діапазоні до 3 000 m/z жодних міжмолекулярних асоціатів ліпід–олігомер ПГМГ не виявлено. Хоча ми не можемо категорично заперечувати можливу їх присутність *in vitro*.

На мас-спектрах MALDI солей ПГМГ (хлориду, малеату, валерату або сукцинату) наявні всі типові піки олігомерів, які було ідентифіковано нами раніше [9]. Характер спектрів MALDI практично не залежить від аніонної складової солей. Зокрема, для ПГМГ – сукцинату в діапазоні до 1 600 m/z (рис. 2.1) це m/z 583,5; 724,6 (725), 865,8; 1007, 1148, 1289 (1290,3), 1430,3 (кількість мономерів n від 4 до 10, кінцеві групи полімерного ланцюга –H та –NH₃) з тим самим кроком $\Delta m/z \approx 141$ (маса мономера). На мас-спектрі лецитину (рис. 2.2) помітний m/z 761,2, що належить протонованій молекулі $[M+H]^+$ 1-пальмітоїл-2-олеїл-sn-фосфатидилхоліну (C_{16:0}, C_{18:1}) з $M_m = 760$ Да. Також наявні молекулярні іони інших фосфатидилхолінів, зокрема m/z 759,2 – (C_{16:1}, C_{18:1}), m/z 789,3 –

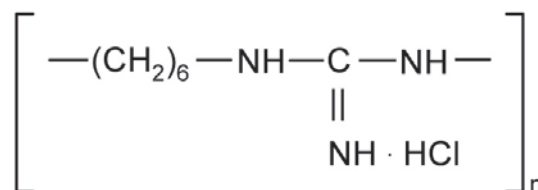


Рис. 1. Структура мономера лінійної молекули полігексаметиленгуанідину хлориду

$[M+H]^+$ – ($C_{18:0}$, $C_{18:1}$), а m/z 787,2 – належить 1,2-діолеїл-*sn*-фосфатидилхоліну ($C_{18:1}$, $C_{18:1}$), m/z 1521,5 – подвійний протонований іон $[2M+H]^+$ 1-пальмітоїл-2-олеїл-*sn*-фосфатидилхоліну ($C_{16:0}$, $C_{18:1}$). Подібні піки фосфатидилхоліну визначали й інші автори, як методом MALDI [10], так і ESI-MS [11, 12]. Відомо, що лецитин не є індивідуальною сполукою, а становить суміш речовин, які відрізняються складом жирнокислотних залишків, найтипівіші: пальмітинова ($C_{16:0}$), стеаринова ($C_{18:0}$), олеїнова ($C_{18:1}$), лінолева ($C_{18:2}$), арахідонова ($C_{20:4}$) і докозагексаєнова ($C_{22:6}$) кислоти [4]. Але за інтенсивністю піків на мас-спектрах нашого зразка лецитину видно, що серед всіх домінують саме 1-пальмітоїл-2-олеїл-*sn*-фосфатидилхолін ($C_{16:0}$, $C_{18:1}$) і 1-пальмітоїлолеїл-2-олеїл-*sn*-фосфатидилхолін ($C_{16:1}$, $C_{18:1}$).

На спектрах MALDI суміші лецитин–холестерол (рис. 2.3) також наявні всі типові піки лецитину. На спектрах сумішей ПГМГ-сукцинат + лецитин (рис. 2.4), ПГМГ + холестерол (рис. 2.5), ПГМГ + лецитин–холестерол (рис. 2.6) наявні всі характерні піки інгредієнтів. Жодного нового піка, який можна було б ідентифікувати як комплекс олігомер ПГМГ+ліпід не виявлено. Аналогічні результати одержано і для сумішей ліпідів з іншими солями ПГМГ.

Оскільки лецитин (фосфатидилхолін) не належить до числа кислих (аніонних) ліпідів, таких як фосфатидилсерин, фосфатидилгліцерол або кардіоліпін, що можуть входити до складу ЦПМ мікроорганізмів, то цілком імовірно, що електростатичні взаємодії є незначними, а міжмолекулярні комплекси, що теоретично можуть утворюватися – неміцні. Холестерол також практично не має аніонних властивостей. З іншого боку, проведені нами раніше дослідження на модельних бішарових ліпідних мембранах (БЛМ), сформованих з лецитину–холестеролу (2 : 1), показали, що полікатіон ПГМГ міцно адсорбується на них і за певних концентрацій порівняно швидко зумовлює трансмембранний іонний струм та розрив БЛМ [8, 13]. Лецитин не зовсім нейтральний ліпід, він швидше цвіттеріон, фосфоліпідна голівка якого має незначний негативний заряд. Але теза про те, що в основі взаємодії ПГМГ із ліпідами мембрани провідна роль належить саме електростатичним силам не є беззаперечною. Хоча, звичайно, вони мають місце.

Яким же чином поліалкіленгуанідини, взагалі, і ПГМГ, зокрема, можуть міцно зв'язуватися з ліпідними мембранами? Не виключено, що механізм закріплення молекули ПГМГ на порівняно електронейтральному лецитиновому ліпідному бішарі пов'язаний з утворенням «петель». Подібний механізм адсорбції на поверхні ліпосом описано для деяких інших полікатіонів [14]. У спрощеному вигляді для ПГМГ це може виглядати таким чином (рис. 3). Цьому процесу можуть сприяти як фліп-флоп переходи фосфоліпідів, так і локальні зміни текучості (плинності) мембрани в місцях адсорбції полікатіона та зміни конформації молекули ПГМГ за локальної зміни рН (іонного оточення). Такі петлі можуть спричинити пертурбацію всього ліпідного бішару ЦПМ і цитотидну дію дезінфектанту. При цьому також відбувається зміна мембранного дипольного потенціалу, гідратація та декомпресія ліпідів.

Доказом на користь цієї схеми можуть бути одержані нами раніше дані щодо дії ПГМГ на різні БЛМ [13]. Зокрема, на рівнішій і тоншій пласкій поверхні БЛМ із синтетичного 1,2-дифітаноїл-*sn*-гліцеро-3-фосфохоліну адсорбція полікатіона і розрив мембрани відбуваються значно швидше, ніж у разі використання грубішої та нерівної БЛМ із фосфатидилхоліну яєчного жовтка (лецитину). Непрямим доказом може бути й той факт, що низькомолекулярні мономери (до 800 Да) майже не виявляють бактерицидної активності [1, 3]. Тобто олігомери ефективно взаємодіють із мембраною (адсорбуються), починаючи з гекса-гексаметиленгуанідину ($n = 6$, $M = 864$ Да). Так само для полілізину було помічено, що пенталізін легко десорбується навіть із мембран, що містять аніонні фосфоліпіди, міцно адсорбуватися можуть лише великі молекули ($n \geq 6$) [15]. Ця модель дещо відрізняється від схеми «адсорбційно-висмикувальної» мембранодеструктивної дії поліалкіленгуанідинів, запропонованої для ПГМБ [16].

Адсорбція ПГМГ на умовно нейтральній лецитин–холестероловій мембрані може бути пов'язана, в першу чергу, з будовою мономера, а саме його розмірами, відстанню між активними гуанідиновими групами. Зазвичай для ПГМГ цей розмір коливається в межах 0,7–1,0 нм, що приблизно відповідає відстані між

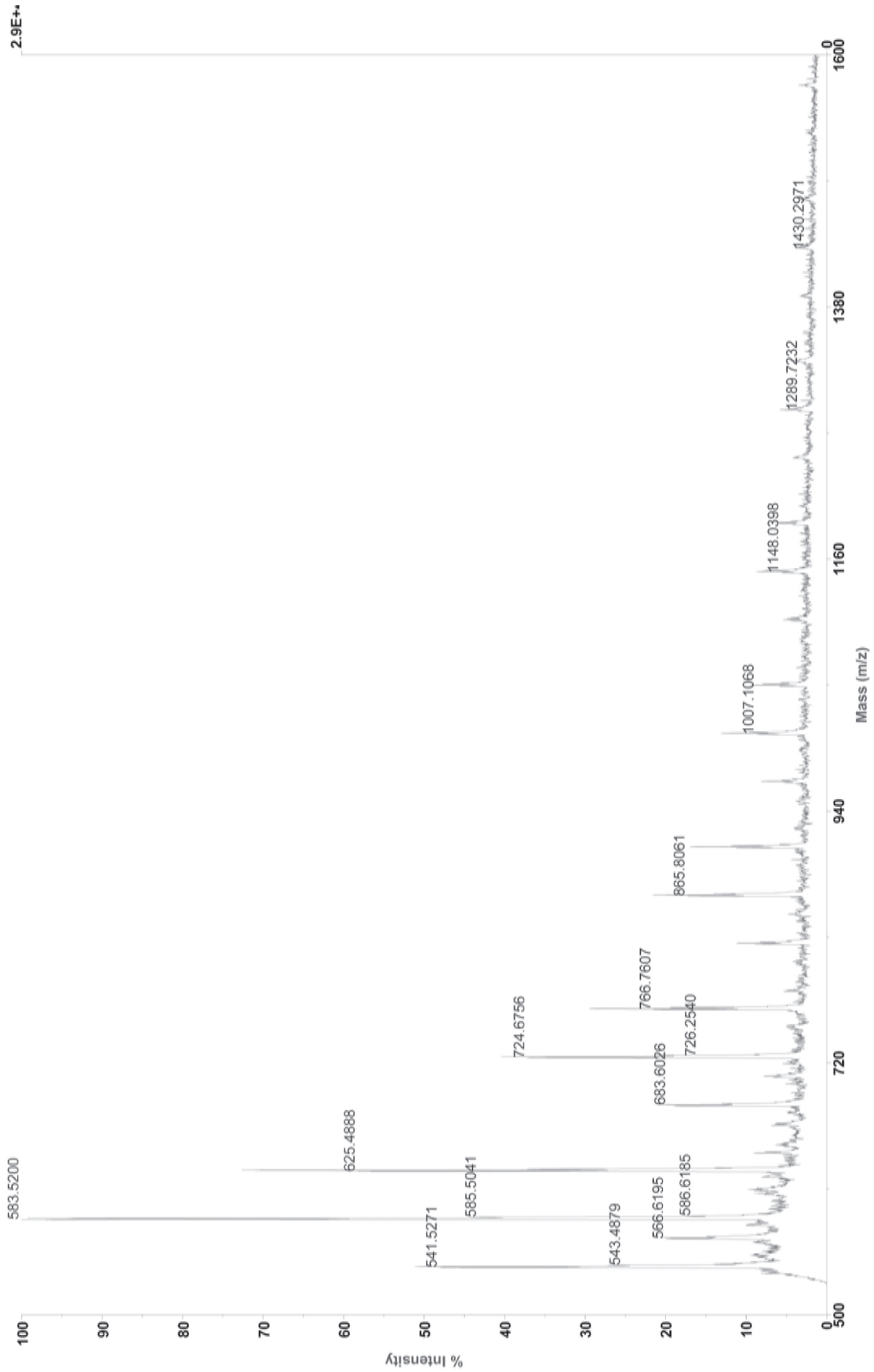


Рис. 2.1. Мас-спектр 0,2%-го розчину ППМГ сукцинату

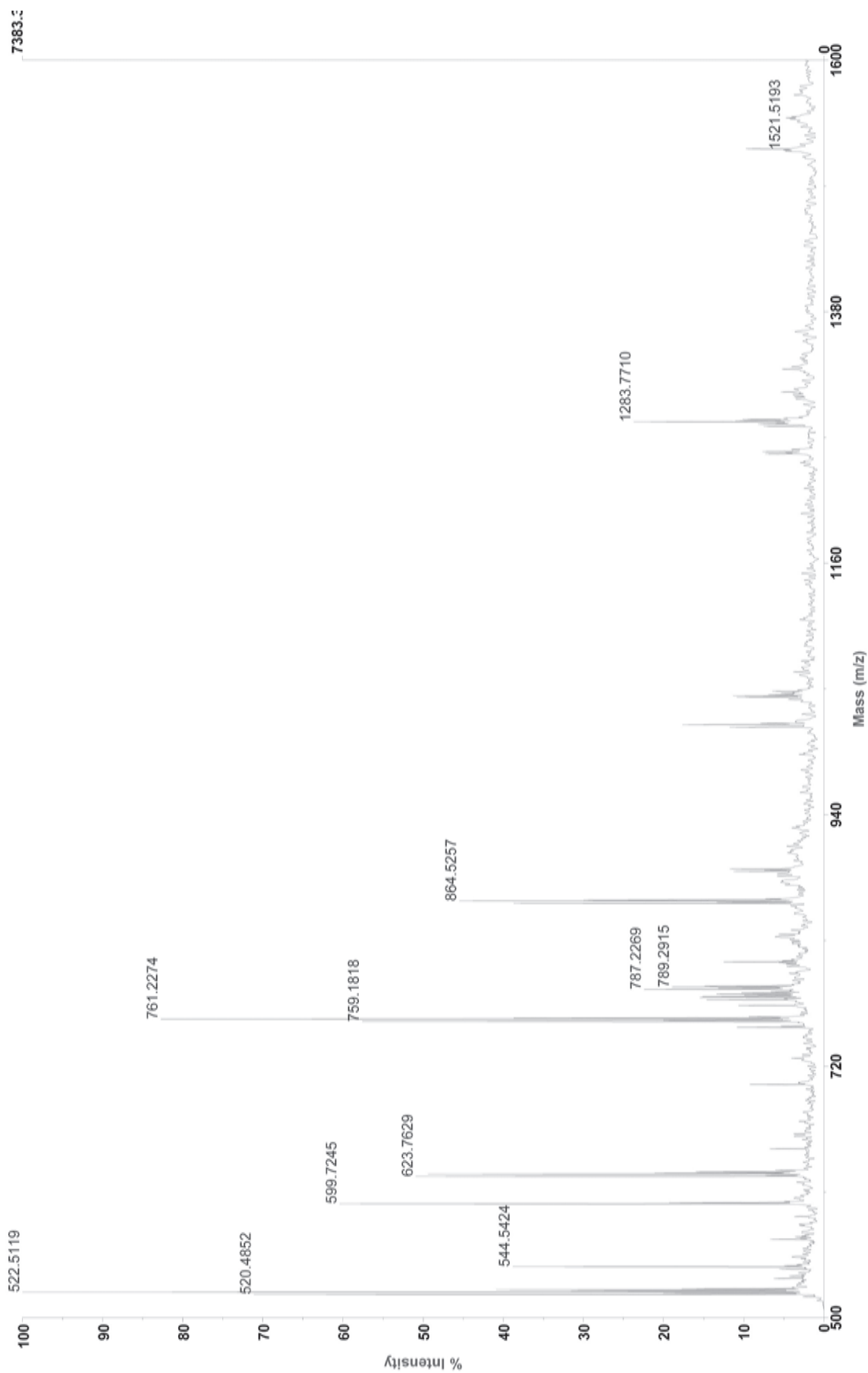


Рис. 2.2. Мас-спектр лецитину (концентрація 5 мг/мл)

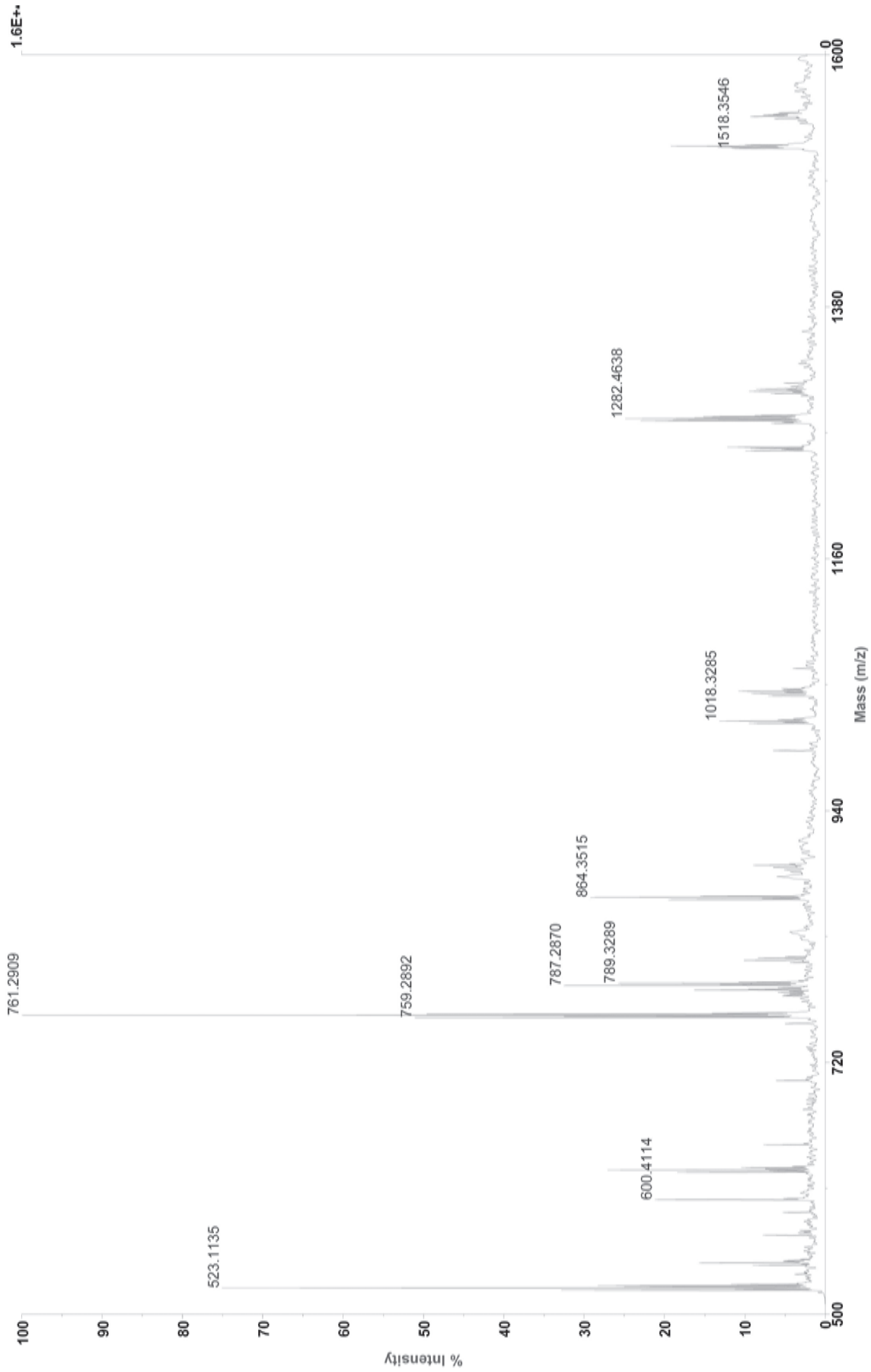


Рис. 2.3. Мас-спектр суміші ліпідів лецитин-холестерол (співвідношення 2 : 1 за об'ємом)

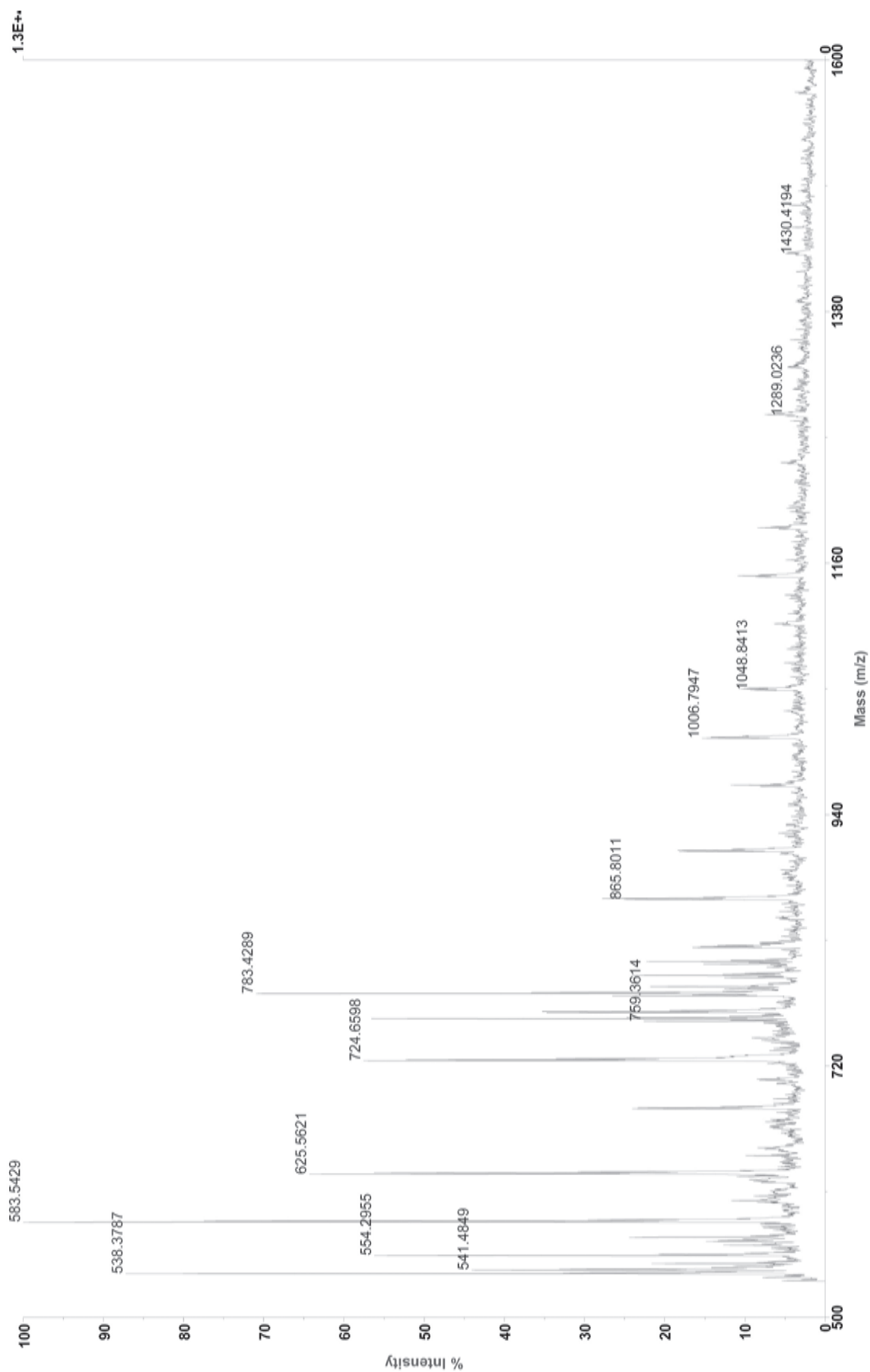


Рис. 2.4. Мас-спектр суміші ПГМГ – сукцинату з лецитином (в еквімолярному співвідношенні)

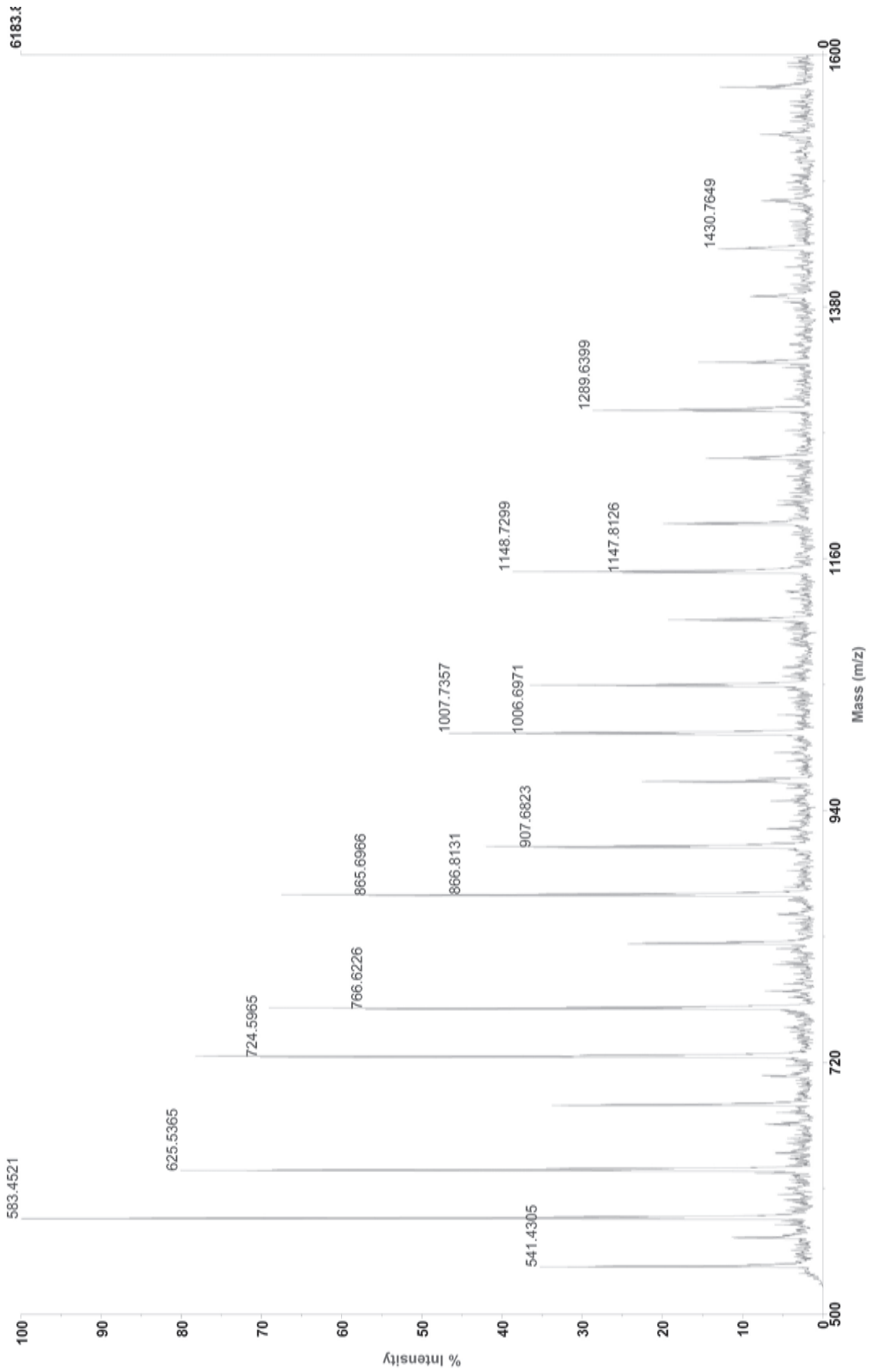


Рис. 2.5. Мас-спектр суміші ТГМГ сукцинату з холестеролом (в еквімолярному співвідношенні)

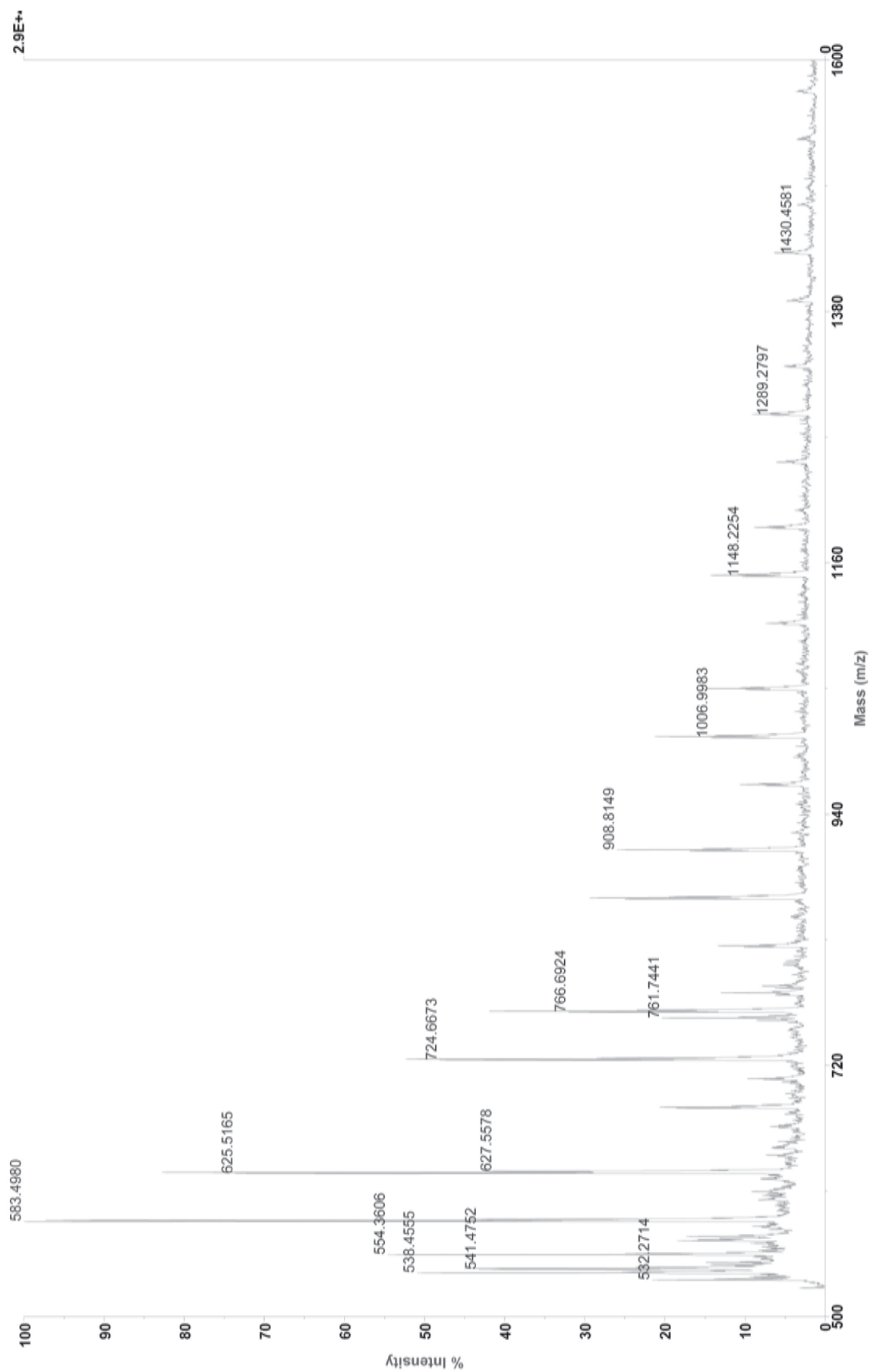


Рис. 2.6. Мас-спектр суміші ПГМГ сукцинату з лецитин-холестеролом (2 : 1 за об'ємом)

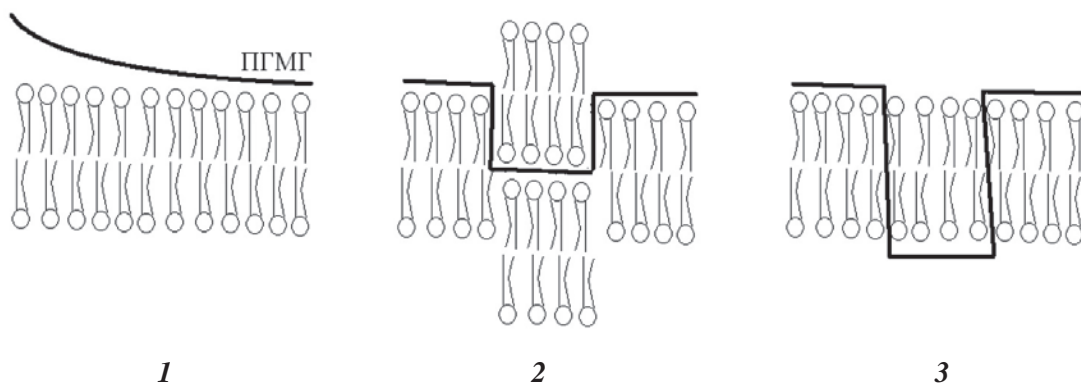


Рис. 3. Схема можливого способу закріплення молекули ПГМГ на фосфоліпідному бішарі: 1, 2, 3 – послідовні стадії адсорбції

сусідніми фосфоліпідними голівками в щільно упакованому бішарі. Тому може відбуватися свого роду «комплементарна» взаємодія позитивно заряджених іміногруп ПГМГ із більш чи менш негативно зарядженими групами молекул фосфоліпідів. Внутрішнє напруження, що виникає в молекулі ПГМГ після адсорбції, спричинює зміни конформації та проникнення полікатиона всередину ліпідного бішару. Відомо, що реакція зв'язування ПГМГ із фосфоліпідними голівками екзотермічна, а проникнення полікатиона в гідрофобну частину ліпідного бішару процес ендотермічний [7]. Для порівняння, такі полікатиони як полілізини [15] або полі-N-етил-4-вінілпіридиній бромід [14, 17] можуть міцно адсорбуватися лише на мембранах, що містять кислі фосфоліпіди. А для поліалкіленгуанідинів, у тому числі й ПГМГ, зміна довжини алкільної ділянки мономера призводить до погіршення адсорбції та зменшення бактерицидної активності [1, 3, 7, 16].

Таким чином, в досліджених сумішах солей ПГМГ із ліпідами методом MALDI-TOF MS стійких міжмолекулярних комплексів ПГМГ–ліпід не виявлено. Принаймні це стосується низькомолекулярної складової ПГМГ, тобто його олігомерів масою до 1,5–2,0 кДа. Тому характер закріплення полікатиона за адсорбції на фосфоліпідну мембрану може носити не лише електростатичний, а й стереохімічний («петлеподібний») характер. Міцність адсорбції полікатиона забезпечується множинністю утворених ним зв'язків із фосфоліпідами і зростає зі збільшенням молекулярної маси полімеру. Дуже важливим є доступність мембранних ліпідів: протеїнові оболонки спор та воскоподібні обо-

лонки мікобактерій можуть істотно знижувати біоцидну активність препарату.

Загалом, на нашу думку, механізм взаємодії ПГМГ із ліпідними мембранами носить комбінований характер. Він включає в себе електростатичну взаємодію полікатиона з фосфоліпідами мембрани, можливу сегрегацію кислих та нейтральних фосфоліпідів внаслідок їх латеральної дифузії, закріплення полімеру на ліпідному бішарі, в т.ч. з утворенням своєрідних «петель», пертурбацію ліпідного бішару, зміну мембранного дипольного потенціалу, гідратацію та декомпресію ліпідів. У кінцевому підсумку, у разі переходу концентрацій дезінфектанту на основі солей ПГМГ від бактериостатичних до бактерицидних, це спричинює руйнування ЦПМ мікроорганізму.

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПОЛИГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНИДИНА С ЛИПИДАМИ

А. В. Лисица¹, А. В. Ребриев²

¹Інститут сільськогосподарського господарства Західного
Полесья НААН України, Ровно;

²Інститут біохімії ім. А. В. Палладина
НАН України, Київ;
e-mail: lysyca@ukr.net; rebriev@ukr.net

Приведены результаты масс-спектрометрических исследований смесей солей полигексаметиленгуанидина (ПГМГ) с липидами. Полимерные производные гуанидина, в том числе и ПГМГ, часто используют в качестве дезин-

фектантов. Масс-спектрометрический анализ смесей показал, что стойкие межмолекулярные комплексы олигомеров ПГМГ с липидами не образуются. В опытах были использованы лецитин и холестерол, которые входят в состав цитоплазматических мембран. Исследования проводили методом MALDI-TOF MS. Предложена модель связывания поликатиона ПГМГ с мембраной клетки. При его адсорбции на отрицательно заряженной бактериальной мембране может иметь место как электростатическое взаимодействие, так и образование петлеобразных структур. Подобный стереохимический механизм обеспечивает прочность адсорбции исследуемого поликатиона на мембране. Вместе с другими деструктивными факторами это и вызывает разрушение цитоплазматической мембраны микроорганизма дезинфектантами, приготовленными на основе солей ПГМГ.

Ключевые слова: полигексаметиленгуанидин, дезинфектант, деструкция мембраны, липиды, масс-спектрометрия.

THE MASS-SPECTROMETRY STUDIES OF THE INTERACTION OF POLYHEXAMETHYLENEGUANIDINE WITH LIPIDS

A. V. Lysytsya¹, A. V. Rebriev²

¹Agriculture Institute of the West Polissya, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Rivne;

²Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: lysytsya@ukr.net; rebriev@ukr.net

In this work the integral components of the cytoplasmic membrane, lecithin and cholesterol were used for mass spectrometry analysis carried out on polyhexamethyleneguanidine (PHMG) mixtures with lipids. The study was performed by mass-spectrometry methods of the MALDI-TOF MS. Our results showed that despite the common use of PHGM polymer derivatives as disinfectants the persistent intermolecular complexes of PHMG oligomers with lipids were not formed. The binding of polycation PHMG with the membrane has been explained by the model proposed. According to this model PHGM can adhere to negatively charged plasma membrane of bacterial cell due to electrostatic interaction and the formation of loop-like structures. Similar stereochemistry mechanism makes the adsorption of the

investigated polycation to membrane robust. The mechanism described together with additional destructive factors provides a reasonable explanation for the PHMG induced damage of bacterial cell plasma membrane and the biocide action of disinfectants prepared on the basis of the PHMG salts.

Key words: polyhexamethyleneguanidine, disinfectant, membrane destruction, lipids, mass-spectrometry.

1. *Воинцева И. И.* Полигуанидины – дезинфекционные средства и полифункциональные добавки в композиционные материалы / И. И. Воинцева, П. А. Гембицкий. – М.: ЛКМ-пресс, 2009. – 304 с.
2. *Weia D., Maa Q., Guana Y. et al.* // Mater. Sci. Eng. – 2009. – **29**, N 6. – P. 1776–1780.
3. *Albert M., Feiertag P., Hayn G. et al.* // Biomacromolecules. – 2003. – **4**, N 6. – P. 1811–1817.
4. *Геннис Р.* Биомембраны: Молекулярная структура и функции [пер. с англ.]. – М.: Мир, 1997. – 624 с.
5. *Oule M. K., Azinwi R., Bernier A. et al.* // J. Med. Microbiol. – 2008. – **57**. – P. 1523–1528.
6. *McDonnell G., Russell A.* // Clin. Microbiol. Rev. – 1999. – **12**, N 1. – P. 147–179.
7. *Zhou Z., Zheng A., Zhong J.* // Acta Biochem. Biophys. Sinica. – 2011. – **43**, N 9. – P. 729–737.
8. *Лисиця А. В., Кривошия П. Ю., Шатурський О. Я.* // Біотехнологія. – 2010. – **3**, № 2. – С. 56–61.
9. *Лисиця А. В., Ребрів А. В., Поліщук В. В.* // Біотехнологія. – 2012. – **5**, № 5. – С. 109–113.
10. *Fuchs B., Süß R., Schiller J.* // Prog. Lipid Res. – 2010. – **49**, N 4. – P. 450–475.
11. *Fong-Fu Hsu, Turk J.* // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 2008. – **19**, N 11. – P. 1681–1691.
12. *Pulfer M., Murphy R.* // Mass Spectrom. Rev. – 2003. – N 22. – P. 332–364.
13. *Лисиця А. В., Шатурський О. Я.* // Наук. вісник Волинського нац. ун-ту ім. Лесі Українки. – 2012. – № 2. – С. 79–83.
14. *Сыбачин А. В.* Комплексы поликатионов с липидными мембранами: структура и свойства: автореф. дис. ... канд. хим. наук: спец. 02.00.06 «Высокомолекулярные соединения» / А. В. Сыбачин. – Москва, 2010. МГУ им. М. В. Ломоносова – 22 с.

15. *Финогенова О. А.* Электрические потенциалы на границах липидных мембран при адсорбции одновалентных катионов и синтетических поликатионов: автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук: спец. 03.00.02 «Биофизика» / О. А. Финогенова. – Москва, 2009. – 20 с.
16. *Gilbert P., Moore L.* // *J. Appl. Microbiol.* – 2005. – **99**. – P. 703–715.
17. *Сыбачин А. В., Царькова Л. А., Ярославов А. А.* // *Биологические мембраны.* – 2010. – **27**. – С. 218–224.

Отримано 28.02.2013