

АМФОТЕРИЦИН В КАК ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ ЗОНД ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ХОЛЕСТЕРИНА В МЕМБРАНАХ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Литвинов Н.В., Калаева Е.А., Соколова Л.О., Артюхов В.Г.

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Важную роль в организации и поддержании устойчивости биологических мембран играет особый класс органических соединений – стерины (стеролы), к которым относится холестерин (холестерол) [3]. Информация о локализации и количестве холестерина в мембранах является одним из ключевых аспектов для понимания механизмов развития заболеваний, связанных с нарушением обмена холестерина, и разработки подходов к их лечению [5]. Одним из эффективных методов идентификации холестерина в клеточной мембране является спектрофлуориметрия с применением в качестве зонда амфотерицина В, который может связываться с молекулами холестерина, образуя комплекс «антибиотик-холестерин» [2].

Целью работы явилось обнаружение холестерина в мембранах лимфоцитов крови человека методом спектрофлуориметрии с применением амфотерицина В в качестве флуоресцентного зонда. Лимфоциты выделяли методом центрифугирования крови доноров в градиенте плотности фиколл-урографина (плотность – 1,077 г/см³). Мембраны лимфоцитов получали методом гипоосмотического гемолиза с последующим осаждением на центрифуге MiniSpin при 13400 об/мин в течение 10 мин с 3-кратной отмывкой трис-НСI буфером (рН 7,4) [1]. В полученную суспензию, содержащую нативные мембраны, было добавлено 2 мл раствора амфотерицина В (ОАО «Синтез», Россия) в концентрации $3,24 \cdot 10^{-4}$ моль/л, после чего для обеспечения максимального взаимодействия антибиотика и холестерина в составе лимфоцитарных мембран проводилась темновая инкубация суспензии в течение 30 мин. Измерение показателей интенсивности флуоресценции проводили с помощью спектрофлуориметра RF-1501 (Shimadzu, Япония) в диапазоне длин волн 350-550 нм при длине волны возбуждения 328 нм. Описываемая методика была разработана и использована нами ранее для детекции холестерина в мембранах эритроцитов периферической крови человека [4]. Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью пакета статистических программ «STADIA 7.0 Professional» (InCo, Россия).

Было установлено, что неокрашенные мембраны лимфоцитов не флуоресцировали в исследуемом диапазоне длин волн. Максимум эмиссии комплекса «холестерин-амфотерицин В» приходился на длину волны 470 нм. Интенсивность флуоресценции суспензии мембран лимфоцитов, окрашенных амфотерицином В, составила $10,2 \pm 1,4$ ед. Таким образом, ассоциаты «холестерин-амфотерицин В» в мембранах лимфоцитов способны к флуоресценции и могут быть обнаружены по наличию свечения в области 470 нм.

Библиографические ссылки

1. Практикум по биофизике / Под общ. ред. В. Г. Артюхова. — Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2016. — 314 с.
2. Самедова А.А.Г. Противогрибковые полиеновые антибиотики и их активность в клеточных и липидных мембранах // Проблемы медицинской микологии. 2010. № 2. С. 43-48.
3. Шевченко О. Г. Роль холестерина в структурной организации мембран эритроцитов // Вестник института биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН. 2010. № 6. С. 10-14.
4. Amphotericin B as a Cholesterol Identifier in Human Erythrocyte's Membrane / E.A. Kalaeva, L.O. Sokolova, V.G. Artyukhov, M.A. Nakvasina, O.V. Putintseva // Opera Medica et Physiologia. 2022. Vol. 9. No 1. P. 42-48.
5. Cellular cholesterol and how to find it / V. Schoop, A. Martello, R. Eden, D. Hoglinger // Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 2021. № 1866 (9). P. 1-12.