



ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АМФОТЕРИЦИНА В С ХОЛЕСТЕРИНОМ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Л.О. СОКОЛОВА, Е.А. КАЛАЕВА, В.Г. АРТЮХОВ, О.В. ПУТИНЦЕВА

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»,
Университетская площадь, д.1, г. Воронеж, 394018, Россия, e-mail: lyudmila.sokolova.94@mail.ru

Аннотация. Цель работы – анализ флуоресцентных свойств ассоциатов холестерина – амфотерицина В в составе мембран лимфоцитов периферической крови человека. **Материалы и методы исследования.** Лимфоциты выделяли из крови доноров методом седиментации в градиенте плотности фиколл-тразографа ($\rho=1,077 \text{ г/см}^3$). В экспериментах применяли рабочую концентрацию лимфоцитарной суспензии 1×10^6 кл./мл. Мембраны лимфоцитов получали методом гипоосмотического шока с последующим осаждением. Лимфоциты и лимфоцитарные мембраны инкубировали в течение 30 мин. с амфотерицином В в конечных концентрациях $2,5 \times 10^{-5}$ и $5,4 \times 10^{-5}$ моль/л. Готовили микропрепараты интактных и окрашенных амфотерицином В клеток и исследовали их на флуоресцентном микроскопе при увеличении 40х, длине волны возбуждения 340 нм, эмиссии – 480 нм. Спектры флуоресценции лимфоцитов и их мембран регистрировали в диапазоне длин волн 350-550 нм при длине волны возбуждения 328 нм. **Результаты и их обсуждение.** Интактные лимфоциты и их мембраны слабо флуоресцировали при 455-462 и 425-447 нм, соответственно. Мембраны лимфоцитов, окрашенных амфотерицином В, демонстрировали способность к флуоресценции в диапазоне длин волн 465-470 нм с интенсивностью $4,35 \pm 0,43$ и $5,07 \pm 0,65$ ед. при концентрациях антибиотика $2,5 \times 10^{-5}$ и $5,4 \times 10^{-5}$ моль/л, соответственно. **Заключение.** Показано, что ассоциаты «холестерин-амфотерицин В» характеризуются флуоресцентными свойствами, подобными описанным ранее для эритроцитов. Это позволяет визуализировать и изучать стерол-содержащие области плазмалеммы. Повышение интенсивности флуоресценции образцов при увеличении концентрации амфотерицина В подтверждает наличие количественной связи между анализируемыми показателями и открывает возможности для разработки количественного метода анализа содержания холестерина в мембранах.

Ключевые слова: лимфоциты, спектры флуоресценции, амфотерицин В, холестерин, флуоресцентная микроскопия.

USAGE OF FLUORESCENT ASSAYS FOR STUDYING THE INTERACTION OF AMPHOTERICIN B WITH LYMPHOCYTES CHOLESTEROL OF HUMAN BLOOD

L.O. SOKOLOVA, E.A. KALAEVA, V.G. ARTYUKHOV, O.V. PUTINTSEVA

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Voronezh State University”,
Universitetskaya Square, 1, Voronezh, 394018, Russia, e-mail: lyudmila.sokolova.94@mail.ru.

Abstract. Purpose is to analyze the fluorescence properties of cholesterol-amphotericin B associations in the membranes of human peripheral blood lymphocytes. **Materials and methods.** Lymphocytes were isolated from the blood of donors using sedimentation in the Ficoll-Trazograph density gradient ($\rho=1,077 \text{ g/cm}^3$). A working concentration of 1×10^6 cells/ml lymphocyte suspension was used in the experiments. Lymphocyte membranes were obtained using hypoosmotic shock followed by precipitation. Lymphocytes and lymphocyte membranes were incubated for 30 min with amphotericin B at final concentrations of 2.5×10^{-5} and 5.4×10^{-5} mol/L. Micro specimens of intact and amphotericin B-stained cells were prepared and examined using a fluorescence microscope at a magnification of 40x, excitation wavelength of 340 nm, and emission wavelength of 480 nm. Fluorescence spectra of lymphocytes and their membranes were recorded in the wavelength range of 350-550 nm at excitation wavelength of 328 nm. **Results and their discussion.** Intact lymphocytes and their membranes fluoresced weakly at 455-462 and 425-447 nm, respectively. Membranes of lymphocytes stained with amphotericin B showed the ability to fluoresce in the wavelength range of 465-470 nm with intensities of 4.35 ± 0.43 and 5.07 ± 0.65 units at antibiotic concentrations of 2.5×10^{-5} and 5.4×10^{-5} mol/L, respectively. **Conclusion.** It has been shown that cholesterol-amphotericin B associations are characterized by fluorescent properties similar to those described previously for erythrocytes. This makes it possible to visualize and study sterol-containing regions of the plasmalemma. The increase in the fluorescence intensity of the samples with increasing amphotericin B concentration confirms the existence of a quantitative relationship between the analyzed param-

ters and opens up possibilities for the development of a quantitative method for the analysis of cholesterol content in membranes.

Key words: lymphocytes, fluorescence spectra, amphotericin B, cholesterol, fluorescence microscopy.

Введение. Холестерин служит структурным компонентом плазматических мембран клеток человека и животных, регулирует их текучесть, поддерживает оптимальное соотношение насыщенных и ненасыщенных липидов в плазмалемме. Также холестерин действует как медиатор, участвуя в работе сигнальных путей и регулируя множество процессов в организме [9]. Метаболизм холестерина играет решающую роль в координации реакций противоопухолевого иммунитета, воздействуя на клетки, участвующие во врожденных и адаптивных иммунных реакциях (рис. 1). Дефицит холестерина является основной характеристикой мембран опухолеассоциированных макрофагов при раке легких человека, а высокий уровень холестерина в мембранах крупных макрофагов может быть связан с развитием колоректального рака [10].

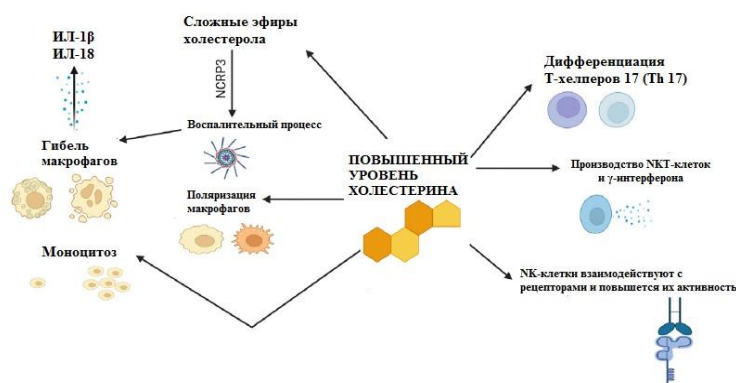


Рис. 1. Примеры изменений в иммунной системе, связанных с метаболизмом холестерина у млекопитающих [10]

Чрезмерное накопление холестерина в мембранах способствует развитию ряда патологических состояний сердечно-сосудистой и кровеносной систем. Это связано со снижением эластичности плазмалеммы. Следовательно, уровень холестерина в мембранах лимфоцитарных клеток может служить маркером для оценки развития ряда заболеваний сердечно-сосудистой системы [4, 13]. Стоит также отметить, что нарушение гомеостаза холестерина и других липидов наблюдается при таких патологиях, как болезнь Альцгеймера и шизофрения [5].

Таким образом, количественный анализ содержания холестерина не только в сыворотке, но и в составе клеточных мембран, позволит выявить механизмы формирования и разработать подходы к коррекции широкого спектра заболеваний человека и животных.

Известно, что полиеновый антибиотик *амфотерицин В* (*AmB*) обладает способностью избирательно связываться со стеролами [12]. Ассоциаты амфотерицина *В* с холестерином способны к индуцированной флуоресценции, что позволяет предложить этот антибиотик для качественного и количественного определения холестерина в плазматических мембранах [14]. Использование *AmB* как флуоресцентного зонда для детекции холестерина в мембранах эритроцитов периферической крови человека было предложено ранее сотрудниками нашей лаборатории [7]. Однако на других типах клеток крови подобные исследования не проводились.

Цель исследования — в связи с изложенным выше целью данной работы явился анализ флуоресцентных свойств ассоциатов холестерин – амфотерицин *В* в составе мембран лимфоцитов периферической крови человека.

Материалы и методы исследования. Суспензии лимфоцитов и их мембран выделяли из крови доноров, полученной в филиале БУЗ ВО БСМП № 1 «Воронежская областная станция переливания крови». Все процедуры проводились в соответствии с Хельсинкской декларацией 1975 года и последующих поправок к ней или сопоставимых этических стандартов.

Цельную кровь разводили буферным раствором Хенкса с глюкозой (*pH* 7,4) в соотношении 1:1. Лимфоциты получали методом седиментации гепаринизированной донорской крови в градиенте плотности фиколл- тразографа ($\rho=1,077 \text{ г/см}^3$) в соотношении 4:1, соответственно, на центрифуге *MPW-340* («*MPW MED INSTRUMENTS*», Польша) в течение 15 мин при 1500 об./мин. Лимфоцитарную фракцию отбирали пипеткой Пастера и отмывали в растворе Хенкса в течение 10 мин при 1000 об./мин. При наличии других форменных элементов крови в суспензии лимфоцитов повторяли процедуру отмывания.

Применяли рабочую концентрацию 1×10^6 кл./мл, которую контролировали с помощью камеры Горяева [2].

Мембраны лимфоцитов получали методом гипосмотического шока с последующим осаждением на центрифуге *MiniSpin (Eppendorf AG, Германия)* при 13400 об/мин в течение 10 мин и 3-кратной отмывкой трис-*HCl* буфером (*pH* 7,4) [3].

Суспензию лимфоцитов и лимфоцитарных мембран инкубировали в течение 30 мин с раствором амфотерицина В (ОАО «Синтез», Россия) в конечных концентрациях $2,5 \times 10^{-5}$ и $5,4 \times 10^{-5}$ моль/л в стерильных условиях при 37°C в суховоздушном термостате ТС-1/80 СПУ (Россия).

Суспензии интактных и окрашенных *AmB* лимфоцитарных клеток наносили на предметные стекла и высушивали на воздухе. Затем образцы исследовали на флуоресцентном микроскопе *NIKON ECLIPSE Ni-E (Nikon, Япония)* при увеличении 40х. Длина волны возбуждения составляла 340 нм, длина волны эмиссии – 480 нм. Спектры флуоресценции лимфоцитов и их мембран, окрашенных амфотерицином В, регистрировали на спектрофлуориметре *RF-1501 (Shimadzu, Япония)* в диапазоне длин волн 350-550 нм при длине волны возбуждения 328 нм. Данная длина волны возбуждения была выбрана нами на основании анализа спектров поглощения полиенового антибиотика [7].

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью пакета прикладных статистических программ «*Stadia 8.0 Professional*» (*InCo, Россия*), результаты представлены в формате «среднее \pm ошибка среднего» (*M \pm m*) [1].

Результаты и их обсуждение. Нами были получены микрофотографии мембран и лимфоцитов, окрашенных амфотерицином В. На снимках видны флуоресцирующие участки, обусловленные наличием ассоциатов холестерина с антибиотиком (рис. 2).

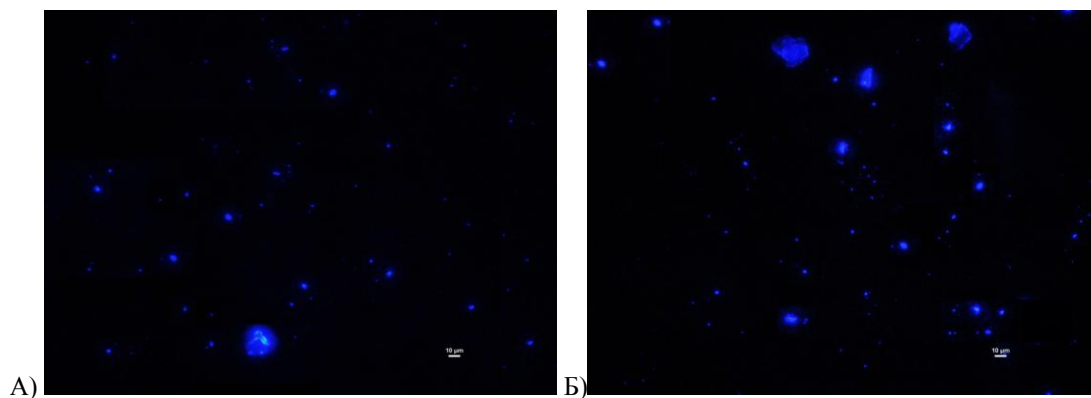


Рис. 2. Микрофотографии лимфоцитарных клеток, окрашенных амфотерицином В в концентрациях $2,5 \times 10^{-5}$ моль/л (А) и $5,4 \times 10^{-5}$ моль/л (Б) (увеличение 40х).

Нами было установлено, что интактные лимфоцитарные клетки и их мембраны очень слабо флуоресцировали в диапазоне длин волн 455-462 и 425-447 нм, соответственно (интенсивность флуоресценции составила $0,88 \pm 0,14$ и $1,70 \pm 0,31$ отн.ед., соответственно).

Таблица 1

Интенсивность флуоресценции лимфоцитов и их мембран до и после инкубации с амфотерицином В

Образец	λ_{max} , нм	<i>I</i> фл., отн. ед.
Интактные лимфоциты	455-462	$0,88 \pm 0,14$
Лимфоциты + <i>AmB</i> $2,5 \times 10^{-5}$ моль/л	466-470	$1,26 \pm 0,20$
Лимфоциты + <i>AmB</i> $5,4 \times 10^{-5}$ моль/л	467-469	$3,99 \pm 1,09$
Интактные мембраны лимфоцитов	425-447	$1,70 \pm 0,31$
Мембраны лимфоцитов + <i>AmB</i> $2,5 \times 10^{-5}$ моль/л	465-470	$4,35 \pm 0,43$
Мембраны лимфоцитов + <i>AmB</i> $5,4 \times 10^{-5}$ моль/л	466-468	$5,07 \pm 0,65$

Мембраны лимфоцитов, окрашенные амфотерицином В, также выявили способность к испусканию квантов флуоресценции в диапазоне длин волн 465-470 нм с интенсивностью, равной $4,35 \pm 0,43$ и $5,07 \pm 0,65$ ед. при концентрациях антибиотика $2,5 \times 10^{-5}$ и $5,4 \times 10^{-5}$ моль/л, соответственно (табл. 1).

Заключение. Нами было показано, что ассоциаты «холестерин-амфотерицин В» характеризуются флуоресцентными свойствами, подобными тем, что описаны для эритроцитов. Это позволяет визуализировать и изучать стерол-содержащие области плазмалеммы с более высокой точностью.

Повышение интенсивности флуоресценции образцов при увеличении концентрации амфотерицина В подтверждает наличие количественной связи между анализируемыми показателями. Это открывает возможности для разработки количественного метода анализа содержания холестерина в мембранах клеток с использованием флуоресцентных зондов. Такой метод позволит проводить более точные и надежные исследования в области биофизики и клинической лабораторной диагностики, а также открыть новые пути для изучения роли холестерина в клеточных процессах и патологиях, связанных с его нарушением: ишемической болезни сердца, инсульте, артериальной гипертензии, артериальной недостаточности сосудов нижних конечностей, болезни Альцгеймера и др. Таким образом, представленная в данной статье методика имеет широкий потенциал применения в биомедицинских исследованиях и может существенно улучшить наше понимание физиологических и патологических процессов, связанных с содержанием и метаболизмом холестерина.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект № FZGU-2023-0009.

Литература

1. Калаева Е.А., Артюхов В.Г., Калаев В.Н. Теоретические основы и практическое применение математической статистики в биологических исследованиях и образовании. Воронеж: Изд-во ВГУ, 2016. 284 с.
2. Колтаков И. А., Артюхов В. Г., Лавриненко И. А. Проточная цитофлуориметрия в современных биофизических исследованиях: Учебно-методическое пособие. Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2018. 113 с.
3. Практикум по биофизике / В. Г. Артюхов [и др.]. Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2016. 314 с.
4. Чеснокова Н. П., Понукалина Е. В., Бизенкова М. Н. Особенности структуры и функций эритроцитарной мембраны // Успехи современного естествознания. 2015. № 2. С. 328–331.
5. Błaszczyk M., Koziół A., Palko-Łabuz A., Środa-Pomianek K., Wesolowska O. Modulators of cellular cholesterol homeostasis as antiproliferative and model membranes perturbing agents // *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes*. 2023. № 1865(6). P. 184163.
6. Cavassin F.B., Baú-Carneiro J.L., Vilas-Boas R.R., Queiroz-Telles F. Sixty years of amphotericin B: an overview of the main antifungal agent used to treat invasive fungal infections // *Infectious Diseases and Therapy*. 2021. № 10(1). P.115–147.
7. Kalaeva E.A., Sokolova L.O., Artyukhov V.G., Nakvasina M.A., Putintseva O.V. Amphotericin B as a cholesterol identifier in human erythrocyte's membrane // *Opera Medica et Physiologia*. 2022. Vol. 9. № 1. P. 42–48.
8. Kamin'ski D.M. Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments // *European Biophysics Journal*. 2014. №3. P. 453–467.
9. Kawakami L.M., Yoon B.K., Jackman J.A., Knoll W., Weiss P.S., Cho N.J. Understanding how sterols regulate membrane remodeling in supported lipid bilayers // *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*. 2017. № 33(51). P. 14756–14765.
10. King R.J., Singh P.K., Mehla K. The cholesterol pathway: impact on immunity and cancer // *Trends in Immunology*. 2022. Vol. 43. P. 78–92.
11. Matsumori N., Eiraku N., Matsuoka S., Oishi T., Murata M., Aoki T., Ide T. An amphotericin B-ergosterol covalent conjugate with powerful membrane permeabilizing activity // *Chemistry & Biology*. 2004. Vol. 11. P. 673–679.
12. Schoop V., Martello A., Eden R., Hoglinger D. Cellular cholesterol and how to find it // *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*. 2021. Vol. 1866(9). P. 1–12.
13. Selvaggio S., Abate A., Brugaletta G., Musso C., Di Guardo M., Di Guardo C., Vicari E.S., Romano M., Luca S., Signorelli S.S. Platelet to lymphocyte ratio, neutrophil to lymphocyte ratio and monocyte to HDL cholesterol ratio as markers of peripheral artery disease in elderly patients // *International Journal of Molecular Medicine*. 2020. Vol. 46. P. 1210–1216.
14. Wang J., Sun R., Hao C., Li T., Tian Y., Zhang L. Influence of metal cations and cholesterol on lipid-amphotericin membrane // *Chemical Research in Chinese Universities*. 2017. Vol. 33. P. 447–453.

References

1. Kalaeva EA, Artjuhov VG, Kalaev VN. Teoreticheskie osnovy i prakticheskoe primenenie

matematicheskoy statistiki v biologicheskikh issledovaniyakh i obrazovanii [Theoretical foundations and practical application of mathematical statistics in biological research and education]. Voronezh: Izd-vo VGU, 2016. Russian.

2. Koltakov IA, Artjuhov VG, Lavrinenko IA. Protochnaja citofluorimetrija v sovremennykh biofizicheskikh issledovaniyakh [Flow cytofluorimetry in modern biophysical research: An educational and methodological guide.]: Uchebno-metodicheskoe posobie. Voronezh: Izdatel'skij dom VGU, 2018. Russian.

3. Praktikum po biofizike [Workshop on biophysics] / V. G. Artjuhov [i dr.]. Voronezh: Izdatel'skij dom VGU, 2016. Russian.

4. Chesnokova NP, Ponukalina EV, Bizenkova MN. Osobennosti struktury i funkcij jeritrocitarnoj membrany [Features of the structure and functions of the erythrocyte membrane]. Uspehi sovremennogo estestvoznaniya. 2015;2:328–331. Russian.

5. Błaszczuk M, Kozioł A, Palko-Łabuz A, Środa-Pomianek K, Wesołowska O. Modulators of cellular cholesterol homeostasis as antiproliferative and model membranes perturbing agents. *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes*. 2023;1865(6):184163.

6. Cavassin FB, Baú-Carneiro JL, Vilas-Boas RR, Queiroz-Telles F. Sixty years of amphotericin B: an overview of the main antifungal agent used to treat invasive fungal infections. *Infectious Diseases and Therapy*. 2021;10(1):115–147.

7. Kalaeva EA, Sokolova LO, Artyukhov VG, Nakvasina MA, Putintseva OV. Amphotericin B as a cholesterol identifier in human erythrocyte's membrane. *Opera Medica et Physiologia*. 2022;9(1):42-8.

8. Kamin'ski DM. Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments. *European Biophysics Journal*. 2014;453-67.

9. Kawakami LM, Yoon BK, Jackman JA, Knoll W, Weiss PS, Cho NJ. Understanding how sterols regulate membrane remodeling in supported lipid bilayers. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*. 2017;33(51):14756–14765.

10. King RJ, Singh PK, Mehla K. The cholesterol pathway: impact on immunity and cancer. *Trends in Immunology*. 2022;43:78–92.

11. Matsumori N, Eiraku N, Matsuoka S, Oishi T, Murata M, Aoki T, Ide T. An amphotericin B-ergosterol covalent conjugate with powerful membrane permeabilizing activity. *Chemistry & Biology*. 2004; 11: 673–9.

12. Schoop V, Martello A, Eden R, Hoglinger D. Cellular cholesterol and how to find it. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*. 2021;1866(9):1–12.

13. Selvaggio S, Abate A, Brugaletta G, Musso C, Di Guardo M, Di Guardo C, Vicari ES, Romano M, Luca S, Signorelli SS. Platelet to lymphocyte ratio, neutrophil to lymphocyte ratio and monocyte to HDL cholesterol ratio as markers of peripheral artery disease in elderly patients. *International Journal of Molecular Medicine*. 2020;46:1210-6.

14. Wang J, Sun R, Hao C, Li T, Tian Y, Zhang L. Influence of metal cations and cholesterol on lipid-amphotericin membrane. *Chemical Research in Chinese Universities*. 2017;33:447-53.

Библиографическая ссылка:

Соколова Л.О., Калаева Е.А., Артюхов В.Г., Путинцева О.В. Использование флуоресцентных методов анализа для изучения взаимодействия амфотерицина В с холестерином лимфоцитов крови человека // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2024. №3. Публикация 3-5. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2024-3/3-5.pdf> (дата обращения: 10.06.2024). DOI: 10.24412/2075-4094-2024-3-3-5. EDN LBRLOO*

Bibliographic reference:

Sokolova LO, Kalaeva EA, Artyukhov VG, Putintseva OV. Ispol'zovanie fluorescentnykh metodov analiza dlja izuchenija vzaimodejstvija amfotericina V s holesterinom limfocitov krovi cheloveka [Usage of fluorescent assays for studying the interaction of amphotericin B with lymphocytes cholesterol of human blood]. *Journal of New Medical Technologies, e-edition*. 2024 [cited 2024 Jun 10];3 [about 5 p.]. Russian. Available from: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2024-3/3-5.pdf>. DOI: 10.24412/2075-4094-2024-3-3-5. EDN LBRLOO

* номера страниц смотреть после выхода полной версии журнала: URL: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2024-3/e2024-3.pdf>

**идентификатор для научных публикаций EDN (eLIBRARY Document Number) будет активен после выгрузки полной версии журнала в eLIBRARY