

<https://doi.org/10.15407/knit2021.05.035>
УДК 577.115.7:542.816:58:52-423

О. А. АРТЕМЕНКО

старш. наук. співроб., канд. біол. наук
ORCID: 0000-0002-7544-7996
E-mail: oartemenko66@gmail.com

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного Національної академії наук України
вул. Терещенківська 2, Київ, Україна, 01601

ДОСЛІДЖЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ЛІПІДНИХ РАФТІВ В ЦИТОПЛАЗМАТИЧНІЙ МЕМБРАНІ ПРОРОСТКІВ *PISUM SATIVUM* ПРИ ДІЇ КЛИНОСТАТУВАННЯ

Результати цитологічних, біохімічних і молекулярно-біологічних досліджень яскраво демонструють суттєвий вплив мікрогравітації на основні процеси розвитку рослин, розкриваючи механізми, які лежать в основі реакцій рослин на дію мікрогравітації та забезпечують пристосування рослин до дії цього чинника. Ключова роль у функціонуванні клітини належить цитоплазматичній мембрані (ЦМ); насамперед за своїми якостями та функціями вона може відігравати важливу роль в адаптації рослин до мікрогравітації. Проте дані щодо впливу зміненої гравітації на фізико-хімічні властивості ЦМ обмежені. Останнім часом багато уваги дослідників приділяється вивченню функціональних мікродоменив ліпідного бішару із специфічною локалізацією та вмістом ліпідів і білків — ліпідних рафтів. Їх визначають як динамічну нанорозмірну збагачену стеролом та сфінголіпідами впорядковану асоціацію специфічних білків, в якій метастабільний стан спокою може бути активований об'єднанням специфічних ліпід-ліпідних, білково-ліпідних та білок-білкових взаємодій. З'являється все більше експериментальних даних, які підтверджують їхню участь у таких життєво важливих процесах, як ендоцитоз, апоптоз, інтерналізація токсинів, бактерій, вірусів тощо, а також їхню важливу роль у захисних механізмах клітини при різних стресових впливах. В даній роботі для підтвердження наявності в ЦМ ліпідних рафтів, збагачених холестерином і сфінголіпідами, а також впливу повільного горизонтального клиностатування на функціональний стан мембрани та рухливість її доменів, використовували флуоресцентний маркер стеринів філіпін і флуоресцентний зонд лаурдан. Отримані нами результати стосовно збільшення генералізованої поляризації в умовах клиностатування корелюють з даними, отриманими у попередніх дослідженнях і вказують на чутливість ЦМ до більш тривалої дії клиностатування.

Ключові слова: цитоплазматична мембрана, рослини, ліпідні рафти, клиностатування, холестерин, сфінголіпіди, генералізована поляризація.

Фундаментальні дослідження можливостей адаптації рослин до умов космічного польоту, що мають безпосереднє прикладне значення для розробки технологій космічного рослинництва у біорегенеративних системах життєзабезпечення в тривалих космічних польотах, в останні роки

піднялися на новий рівень завдяки удосконаленню методів клітинної та молекулярної біології. Це дозволило виявляти вплив мікрогравітації на експресію та локалізацію генів, склад та вміст білків. Результати цитологічних, біохімічних і молекулярно-біологічних досліджень яскраво

Цитування: Артеменко О. А. Дослідження функціонального стану ліпідних рафтів в цитоплазматичній мембрані проростків *Pisum sativum* при дії клиностатування. *Космічна наука і технологія*. 2021. 27, № 5 (132). С. 35—46. <https://doi.org/10.15407/knit2021.05.035>



Рис. 1. Структурні особливості двох доменів мембрани. Колірне кодування ліпідних компонентів: зелений колір використовується для насичених ліпідів (фаза L_o (формується рафтами)), червоний — для поліненасичених (фаза L_d). Стрілкою помічено холестерин (сірого кольору) [15]

демонструють суттєвий вплив мікрогравітації на ключові процеси розвитку рослин, розкриваючи в той же час механізми, які лежать в основі реакцій рослин на дію мікрогравітації та забезпечують пристосування рослин до дії цього чинника. Наприклад, змінюється експресія значної кількості генів, задіяних у широкому колі клітинних процесів, зокрема у відповідях на стрес, передачі сигналів, зокрема при участі іонів кальцію, синтезі білків, загальному метаболізмі, білків, зв'язаних з хлорофілом *a/b* тощо [29]. Сучасна методологія молекулярно-біологічних досліджень відкриває нові горизонти у розумінні гравічутливості та гравізаложності структурно-функціональної організації та адаптивних стратегій рослин до мікрогравітації. Біологічні мембрани, насамперед цитоплазматична мембрана, за своїми якостями та функціями можуть відігравати важливу роль в адаптації рослин до мікрогравітації.

Незважаючи на ключову роль цитоплазматичної мембрани у функціонуванні клітини, літературні дані щодо впливу зміненої гравітації на її фізико-хімічні властивості обмежені. Останнім часом багато уваги дослідників приділяється вивченню функціональних мікродоменів ліпідного бішару із специфічною локалізацією та вмістом ліпідів і білків, які дістали назву «ліпідних рафтів» [19, 24, 22]. Рафти є щільно упакованими доменами цитоплазматичної мембрани, збагаченими на холестерин, сфінголіпіди, насичені фосфоліпіди [15]. Будучи відносно нерозчинним в навколишніх ліпідах, рафт є досить гете-

рогенною та нестабільною структурою розміром від 50 до 200 нм. Вбудовування специфічних мембранних білків у ліпідний рафт призводить до його стабілізації, а подальше зв'язування лігандів з рецепторами або глікофінголіпідами, що локалізовані в таких рафтах, призводить до їхнього злиття і запускає передачу внутрішньоклітинного сигналу. Такі домени стабільні, здатні існувати тривалий час і переміщуються у мембрані як одне ціле. Вони відрізняються від основної частини мембрани як за білковим і ліпідним складом, так і за функціями, які вони виконують [16]. Крім специфічного ліпідного складу ці мембранні домени характеризуються й певним білковим профілем. У рафтах плазматичних мембран рослин ідентифіковано АТФази Р- і V-типів, протеїнкінази, мономірні та гетеромірні білки, аквапорини та ін. [8, 15]. Останнім часом цікавість до рафтів викликана тим, що з'являється все більше експериментальних даних, які підтверджують їхню участь в таких життєво важливих процесах, як внутрішньоклітинна передача сигналів, ендоцитоз, апоптоз, сортування білків, інтерналізація токсинів, бактерій, вірусів тощо [14]. Плаваючи на поверхні ліпідного біслою, рафти можуть взаємодіяти один з одним, регулюючи проведення сигналу ззовні всередину клітини. Відповіді при цьому можуть бути найрізноманітніші: від активації клітинного поділу до апоптозу [3]. Високий вміст стеринів вважається особливістю рафтів. Холестерин утворює структури, які надають еукаріотичним мембранам міцність і особливу функціональну гетерогенність [15, 30]. Дослідами щодо дії на рослини холодного стресу, посухи, засолення доведено важливу роль ліпідних рафтів у захисних механізмах клітини при різних стресових впливах [4].

Вважається, що рафти формують рідко впорядковану (L_o) фазу на поверхні мембранного бішару, яка оточена рідко неупорядкованою (L_d) фазою з ненасичених гліцерофосфоліпідів (рис. 1). Рідко впорядковану фазу можна вважати синонімом рафтів і ліпідних доменів у мембрані. Вона відрізняється досить високою впорядкованістю ліпідних «хвостів», а значить і більшою товщиною ліпідних доменів, які її складають, і меншою пло-

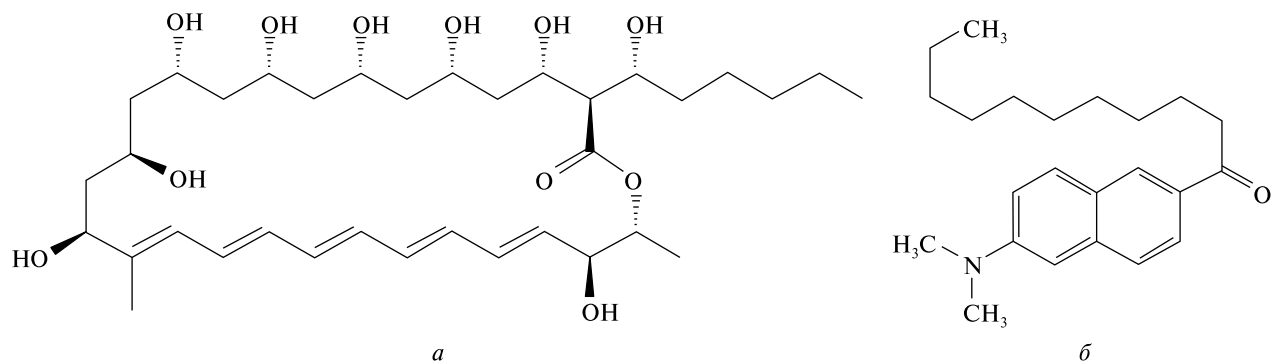


Рис. 2. Структура молекули філіпіну (а) та лаурдану (б)

щею, що припадає на одну молекулу ліпиду. При цьому L_o -фаза має високу латеральну рухливість за рахунок малого розміру рафтів у мембрані, що розташовує її приблизно між рідиною і твердою фазою, так звана «мезофаза».

Оскільки ЦМ відіграє важливу роль в адаптації рослин, нами було розпочато дослідження рафтів під дією клиностатування із застосуванням методу конфокальної мікроскопії і специфічних барвників. У подібних дослідженнях використовуються ліпофільні мембранні барвники та зонди, які або вбудовуються між рафтами і рештою мембрани, або змінюють свої флуоресцентні властивості залежно від фази мембрани. Прикладом таких барвників можуть бути філіпін та лаурдан (рис. 2).

Для обґрунтування наявності у мембрані ліпідних рафтів використовували флуоресцентний маркер стеринів — філіпін (вперше був виділений з актиномицету *Streptomyces filipinensis*, знайденого в ґрунті на Філіпінах, чим й обумовлена його назва) (рис. 2, а). На даний час встановлено, що цей полієновий антибіотик, який має власну флуоресценцію з максимумом люмінесценції при 482 нм ($\lambda_{збуд} = 340$ нм) і який взаємодіє зі стеринвмісними ділянками мембран клітин, може бути використаний як зонд на наявність та гетерогенність розподілу стеринів у біологічних мембранах [9, 18]. Не проникаючи у клітину, він зв'язується з холестерином і порушує його функціонування. Секвестрація (зв'язування з відокремлюванням від решти мембранних структур) холестерину за допомогою філіпіну дозволяє

спостерігати за змінами передачі сигналів при флуктуаціях рівня холестерину у мембрані [28].

Лаурдан — це флуоресцентний зонд, на даний час широко використовується в експериментах з вивчення особливостей структури мембран (рис. 2, б). Він здатний змішувати свої емісійні спектри залежно від розчинника або параметрів навколишнього середовища, таких як полярність, гідратація, в'язкість і т. д. [1]. Ця здатність лаурдану використовується при вивченні ліпідного бішару мембран. Таким чином, за інтенсивністю емісії лаурдану в різних частинах спектру можна розрахувати величину генералізованої поляризації (ГП), яка відображує фазовий стан мембрани. Це екологічно чутливий барвник, який демонструє червоне зміщення емісії (50 нм) у спектрі флуоресценції з полярними розчинниками в рідкій неупорядкованій фазі фосфоліпідів, оскільки мембрани піддаються фазовим переходам з гелю до рідини через зміни вмісту води в ліпідному бішарі [6, 23, 25]. У мембрані така переорієнтація молекул води є залежним від часу процесом, що призводить до повільного (в наносекундному масштабі часу) зсуву у спектрі випромінювання у напрямку довших хвиль (до човоного краю). Наявність і рухливість молекул води в різних глибинах мембрани залежить від порядку і рухливості молекул ліпідів у мембрані. Цю різницю вмісту води в цитоплазматичній мембрані можна візуалізувати. Завдяки своїй молекулярній архітектурі флуоресцентний нафталіновий фрагмент демонструє дипольний момент між 2-диметиламіно і 6-карбонільними

залишками. При збудженні дипольний момент збільшується і викликає переорієнтацію навколишніх диполів розчинника. Енергія, необхідна для переорієнтації, зменшує енергію збудженого стану лаурдану і спектр випромінювання зонду постійно зміщується до червоного краю [1]. Отже, червоне зміщення спектра випромінювання спостерігається у полярних розчинниках, тобто коли молекули води довкола реорганізуються, тоді як у неполярних розчинниках, таких як щільно упакована L_o -фаза зі зменшеним вмістом води, емісія зміщена до синього краю. Хибні, зеленого кольору зображення на малюнках відображають ліпідні впорядковані ділянки, тоді як червоні області відображають полярні, ліпідно-невпорядковані ділянки цитоплазматичної мембрани з вищим вмістом води. Для кількісної оцінки певних зсувів у спектральній поведінці лаурдану потрібно розрахувати загальні значення генералізованої поляризації (ГП) [24].

Оскільки фаза L_o характеризується вищим рівнем упаковки ліпідів порівняно з фазою L_d , вона також набагато менш гідратована (тобто менш полярна) і більш в'язка, тож сольватохромні (ті, що змінюють свій колір у відповідь на полярність навколишнього середовища) давачі можуть розрізнити ці фази [11, 17]. Генералізована (або узагальнена) поляризація клітин, мічених лаурданом, містить корисну інформацію про плинність та полярність мембран. Висока ГП зазвичай асоціюється з низькою плинністю, низькою полярністю або високим вмістом холестерину у мембранах, а низька ГП — навпаки. Таким чином, за інтенсивністю емісії лаурдану в різних частинах спектру можна розрахувати величину ГП, яка відображає фазовий стан мембрани, з використанням рівняння, адаптованого з робіт [10, 21]:

$$GP = \frac{I_{435} - I_{580}}{I_{435} + I_{580}}, \quad (1)$$

де I_{435} і I_{580} — середня інтенсивність випромінювання на цих довжинах хвиль.

Оскільки проникнення води корелює з пакуванням ліпідів і плинністю мембран [26], спектр випромінювання лаурдану у межах одного фосфоліпідного бішару центрується при $\lambda = 490...$

580 нм, коли ліпіди перебувають в неупорядкованій фазі, і зміщується до синього краю ($\lambda \approx 440$ нм), коли ліпіди перебувають у більш упакованій фазі. Функція ГП дає математично зручний і кількісний спосіб вимірювання зсуву випромінювання. Значення ГП є безрозмірним і відображає переважний стан порядку ліпідів у ліпідних бішарах.

МАТЕРІАЛ ТА УМОВИ ЕКСПЕРИМЕНТІВ

Експерименти поводити з проростками гороху (*Pisum sativum* L.) сорту Альфа. Сухе насіння стерилізували у водному розчині білизни, ретельно промивали проточною водою й викладали на мокрий фільтрувальний папір на 12—14 годин. Потім насінини, що проклюнулись, завертали в трубочки з фільтрувального паперу, орієнтуючи зародковим коренем донизу. Трубочки з таким насінням розташовували в склянках, шість склянок ставили на горизонтальний клиностаг (2 об/хв), ще шість склянок — поряд з клиностагом (стаціонарний контроль). Проростки росли в темноті при температурі 21 °С. Для досліджень використовували 3- та 6-добові проростки.

Для якісної оцінки змін концентрації холестерину в мембранах використовували філіпін, який вибірково зв'язується з холестерином мембрани і його флуоресценція є індикатором концентрації холестерину. Дослідні і контрольні варіанти проростків гороху (апикальна меристема і початок зони розтягу) були подрібнені лезом на льоду і відцентрифуговані 15 хв в режимі 600 об/хв у розчині 1 % цукрози, з наступною інкубацією філіпіном протягом 40 хв. Свічення препаратів спостерігали за допомогою конфокального мікроскопа при довжині хвилі 430 нм.

Фазовий стан цитоплазматичної мембрани визначали за допомогою конфокального мікроскопа і ліпофільного зонду лаурдан при кімнатній температурі. Готували 5мМ стоковий розчин лаурдану в DMSO. Корені проростків гороху відмивали в PBS (рН 7.3), гомогенізували, потім стабілізували в 1М сахарозі і центрифугували 15 хв в режимі 600 об/хв грг. Відбирали надосад і інкубували в темряві 40 хв в розчині лаурдану в робочій концентрації 10 мкМ [31].

Для розрахунку ГП-значень цитоплазматичної мембрани клітин ДЗР коренів 3- та 6-до-

бових проростків гороху в контролі та в умовах клиностакування, використовували метод, описаний в роботах [7, 20].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

В дослідженнях Є. Л. Кордюм та ін. [13] вперше було встановлено підвищення рівня холестерину в рафтах гороху в умовах клиностакування, що відбувається на фоні нормальної мікрів'язкості самої мембрани та призводить до збільшення жорсткості рафтів. Припускається, що флуктуації у внутрішньоклітинному вмісті іонів кальцію та перебудови організації цитоскелету в умовах реальної та модельованої мікрогравітації зумовлені змінами рівня холестерину та вмісту сфінгомієліну у рафтах цитоплазматичної мембрани.

В результаті наших досліджень було показано, що на третю добу в контролі (рис. 3, *a*) цитоплазматична мембрана набувала характерного блакитного філіпінзалежного кольору по периметру всієї клітини, тоді як в умовах клиностакування (рис. 4, *a*) маркування філіпіном набувало вигляд пунктирної лінії, що може свідчити про нерівномірний розподіл в ній холестерину. Розмір та локалізація зафарбованих філіпіном ділянок в контролі також відрізнялися від таких в умовах клиностакування і були значно вищими.

Після дослідження 6-добових проростків гороху виявилось, що в контролі цитоплазматична мембрана маркувалася філіпіном пунктирною лінією блакитного кольору (рис. 3, *б*), відбулися зміни в розмірі та локалізації зафарбованих ділянок — вони стали тонші і розташовувались рідше. Тобто відбулося розрідження мічених філіпіном ділянок, а також зменшилася інтенсивність флуоресценції філіпіну, а значить і вміст холестерину. Натомість при клиноставанні (рис. 4, *б*) спостерігалось зближення зафарбованих філіпіном ділянок мембрани і, як наслідок, інтенсифікація флуоресцентного свічення цитоплазматичної мембрани. Тобто, в умовах тривалішого клиностакування відбувається збільшення вмісту стеринзбагачених мембранних структур на одиницю площі, а в контролі навпаки — зменшення. Трафік стеринзбагачених доменів при клиноставанні характеризується високою рухливістю, а в умовах контролю —

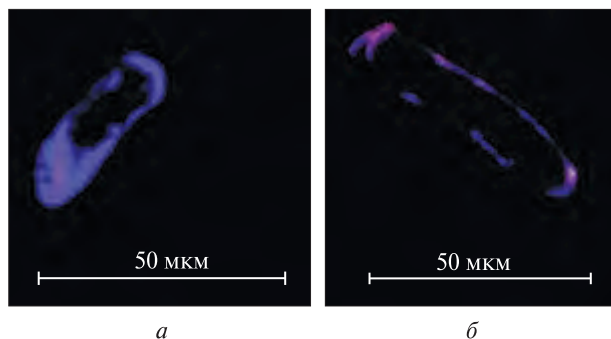


Рис. 3. Клітини дистальної зони розтягу коренів проростків гороху після обробки філіпіном в контролі: *a* — три доби, *б* — шість діб

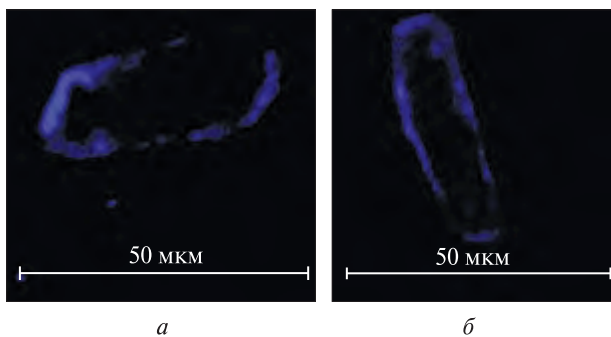


Рис. 4. Те ж в умовах клиностакування

низькою. Холестерин надає мембрані жорсткості, займаючи вільний простір між гідрофобними хвостами ліпідів і не дозволяючи їм вигинатися. Тому мембрани з невеликим вмістом холестерину більш гнучкі, а з більшим — жорсткі і крихкі. Крім того, холестерин слугує «стопором» для переміщення полярних молекул з клітини в клітину.

Отже, в умовах повільного горизонтального клиностакування на шосту добу експерименту відбувається збільшення вмісту стеринзбагачених мембранних структур, зокрема холестерину. Завдяки використанню філіпіну, флуоресценція якого є індикатором концентрації холестерину у мембрані, спостерігалось «зближення» рафтів між собою в суцільний пласт по периметру цитоплазматичної мембрани. Таке підвищення рівня холестерину в рафтах гороху в умовах клиностакування призводить до збільшення їхньої жорсткості, що збігається з попередньо отриманими

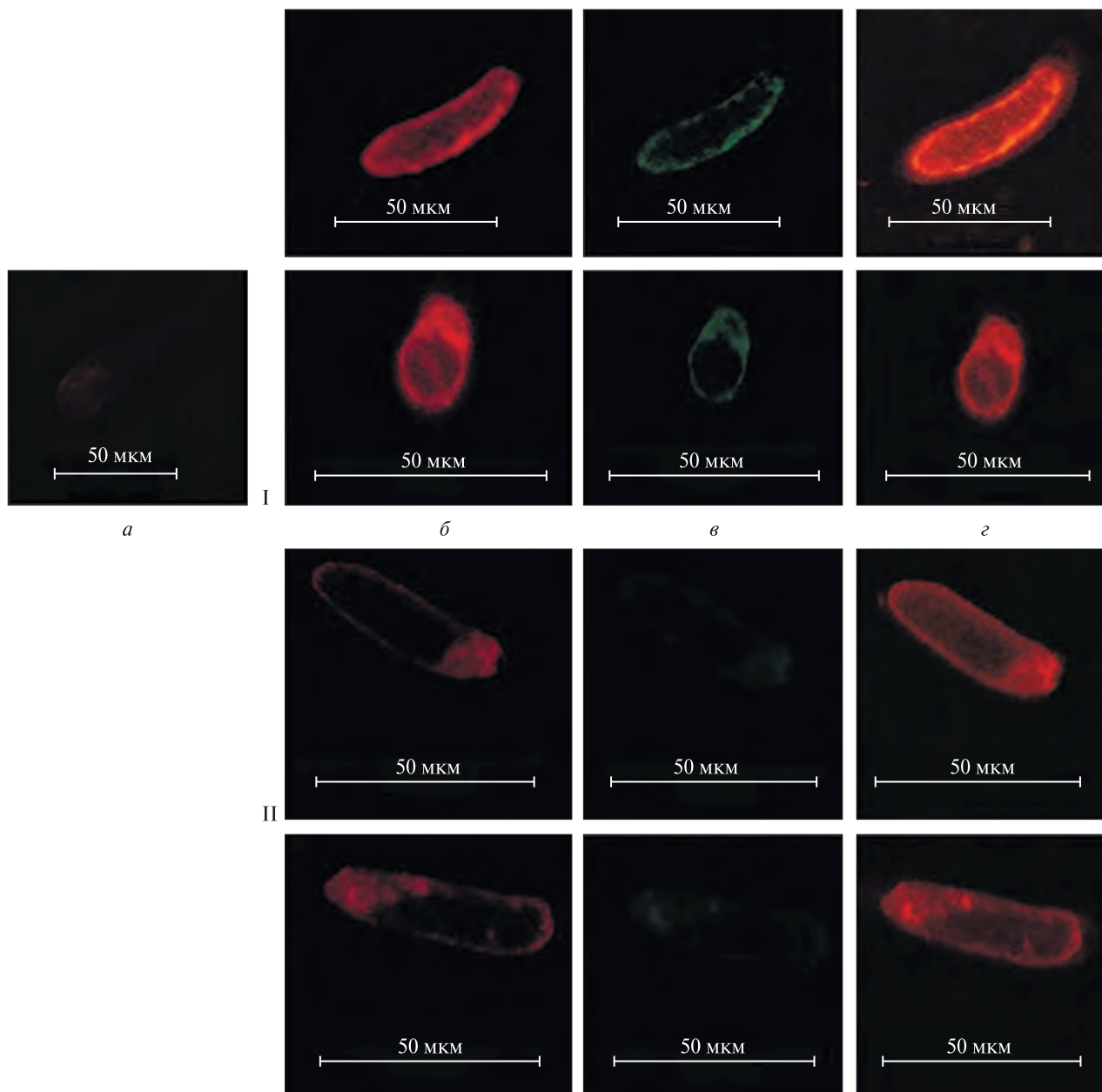


Рис. 5. Клітини дистальної зони розтягу 3-добових проростків гороху після обробки лаурданом: I — контроль, II — клиностагування. *a* — негативний контроль, *б* — зміщений до червоного краю спектр випромінювання лаурдану вказує на полярні фази з вищим вмістом води, *в* — зміщений до синього краю спектра випромінювання (зелений, хибний колір) вказує на неполярні фази, в яких міститься менше води, *з* — об'єднане зображення

даними досліджень функціональних сайтів цитоплазматичної мембрани рослинних клітин в умовах реальної та модельованої мікрогравітації. Саме через такий складний стериновий профіль цитоплазматична мембрана рослин менш чутли-

ва до дії теплового шоку та інших стресів порівняно з тваринними клітинами [5].

На рис. 5 і 6 представлено результати дослідження фосfolіпідів цитоплазматичної мембрани 3- та 6-добових проростків гороху в контролі

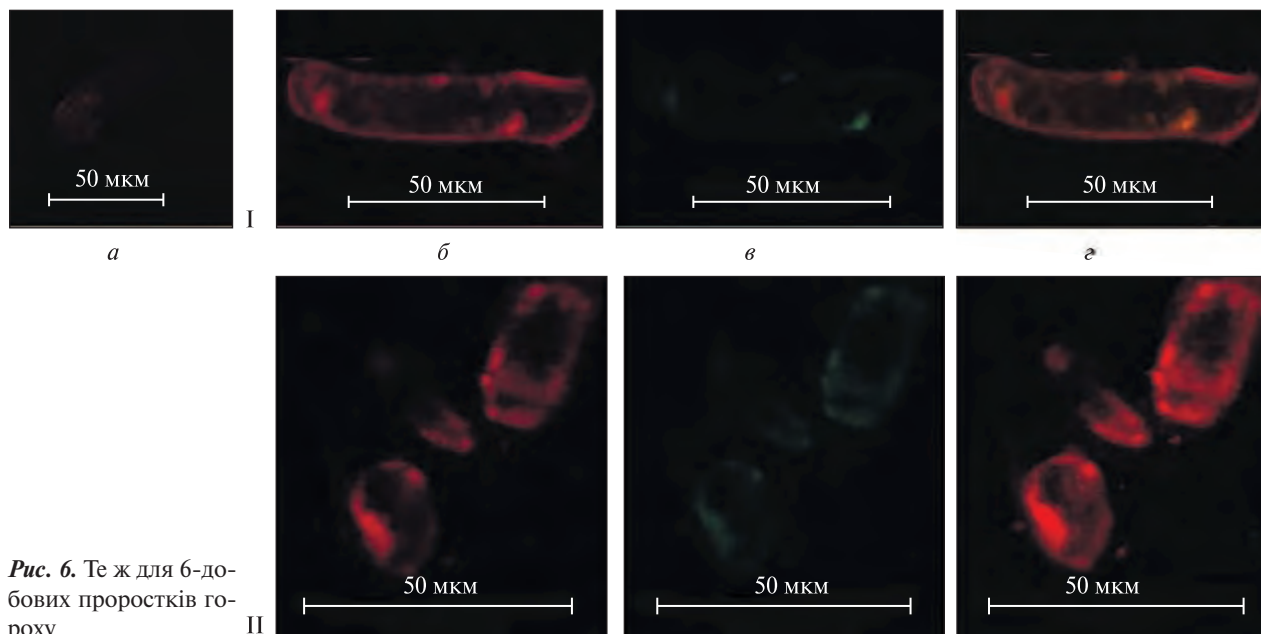


Рис. 6. Те ж для 6-добових проростків гороху

та при клиностагуванні з використанням флуоресцентного зонду лаурдан.

Спектр випромінювання, зміщений у червоний бік, вказує на полярні фази з вищим вмістом води, тоді як спектр, зміщений до синього краю (тут і надалі: зелений, хибний колір), вказує на неполярні фази, в яких вміст води менший. Так, на третю добу (рис. 5) в контролі спостерігається збільшена кількість ділянок цитоплазматичної мембрани з вищим вмістом води, тоді як в умовах клиностагування зміщення спектра випромінювання зонду в червоний колір відбувається менш інтенсивно. Підвищена емісія ліпідно-впорядкованих ділянок мембрани (зеленого кольору) зі зменшеним вмістом води, що вказує на наявність рафтів, помітна в контролі, тоді як в умовах клиностагування її рівень значно нижчий. На шосту добу експерименту (рис. 6) в контролі майже не спостерігалось суттєвих змін динаміки полярних фаз ділянок плазматичної мембрани, тоді як неполярні візуально зменшилися. В умовах же клиностагування, навпаки, зміщення спектра випромінювання відбувалося до зеленого кольору, тоді як червоні області з вищим вмістом води майже не змінилися. Отже, використання флуоресцентного зонду лаурдану дозволило відстежити зміни фазового стану цитоплазматичної мембрани

при дії клиностагування. Було помічено підвищену емісію ліпідно-впорядкованих, щільніших ділянок мембрани зі зменшеним вмістом води, що вказує на наявність рафтів. Проте інтенсивність флуоресценції лаурдану сама по собі не є інформативною для упаковки ліпідів, замість цього вимірюють флуктуацію ГП, тому що саме спектроскопічні параметри свідчать про локальну упаковку мембрани. Якщо ГП не змінюється, хоча молекули можуть дифундувати в об'ємі збудження, вважається, що немає жодної різниці в упаковці ліпідів.

Отже, застосування флуоресцентного зонду лаурдану дозволило відстежити зміни фазового стану цитоплазматичної мембрани при дії клиностагування, які також відбулися через шість діб експерименту. Було помічено підвищену емісію ліпідно-впорядкованих, щільніших ділянок мембрани зі зменшеним вмістом води, що вказує на наявність рафтів. Оскільки ліпідні рафти збагачені на сфінголіпіди (їхній вміст в цитоплазматичній мембрані рослин може перевищувати 40 % [2]), отримані нами результати узгоджуються з даними, отриманими у попередніх дослідженнях.

Наступним етапом роботи було визначення інтенсивності емісії лаурдану в різних частинах

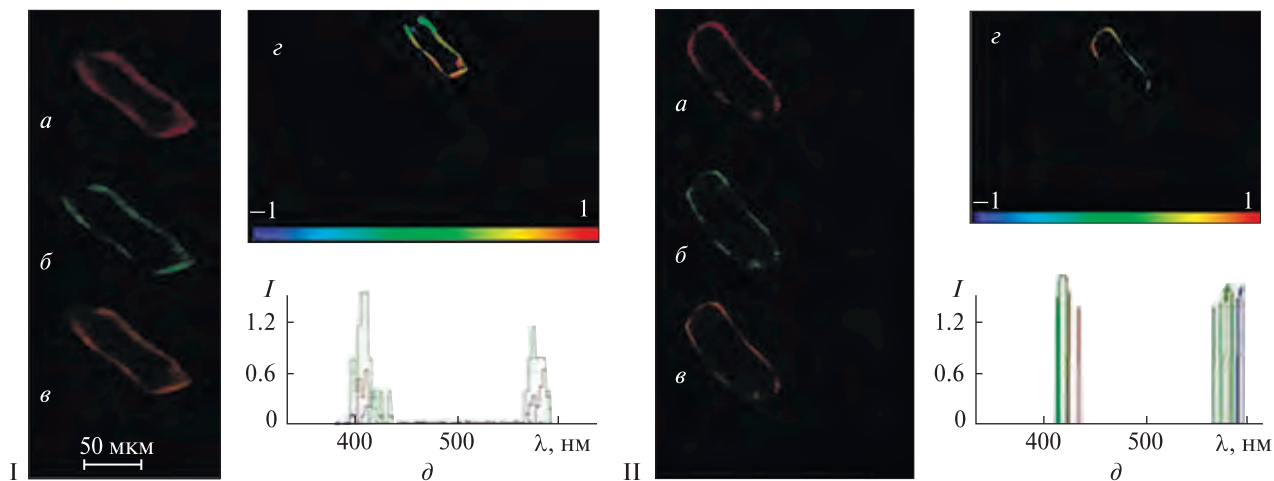


Рис. 7. Клітини дистальної зони розтягу 3-добових проростків гороху після обробки лаурданом. I — контроль, II — клиностатування. *a* — зміщений до червоного кольору спектр випромінювання лаурдану вказує на полярні фази з вищим вмістом води, *б* — зміщений до синього кольору спектр випромінювання (зелений, хибний колір) вказує на неполярні фази, в яких міститься менше води, *в* — об'єднане зображення; *z* — розподіл ліпідів, спектральна полоса показує значення ГП з зображень: червоний колір вказує на високі значення ГП, синій — на низькі; *δ* — інтенсивність флуоресценції лаурдану

спектру для розрахунку величини генералізованої поляризації, яка відображує фазовий стан мембрани. Відомо, що величина ГП може приймати значення від -1 до $+1$. Ця величина для рідких областей мембрани варіює приблизно від -1 до 0.25 , а для впорядкованих доменів мембрани — від 0.25 до 1 [7].

В даній роботі ми використовували метод, описаний в роботі [20], для розрахунку ГП-значень цитоплазматичної мембрани клітин ДЗР коренів 3- та 6-добових проростків гороху в контролі та в умовах клиностатування. Псевдоколірні зображення (так звані HSB (відтінок — насиченість — яскравість)) були створені шляхом множення значень ГП на значення інтенсивності в кожному пікселі [32]. На цих зображеннях значення ГП вказані за допомогою колірної інформації, мінімальне значення ГП встановлене на -1 (синє зображення), а максимальне — на $+1$ (червоне зображення).

На рис. 7 і 8 представлено результати дослідження фосfolіпідів цитоплазматичної мембрани 3- та 6-добових проростків гороху в контролі та при клиностатуванні з використанням флуоресцентного зонду лаурдану.

Оскільки спектр випромінювання, зміщений до червоного краю, вказує на полярні фази з вищим вмістом води, видно, що на третю добу (рис. 7, I: *a—в*) в контролі спостерігається збільшена кількість ділянок цитоплазматичної мембрани з вищим вмістом води, тоді як в умовах клиностатування зміщення спектру випромінювання зонду до червоного краю відбувається менш інтенсивно (рис. 7, II: *a—в*). Підвищена емісія ліпідно-впорядкованих ділянок мембрани (зеленого кольору) зі зменшеним вмістом води, що вказує на наявність рафтів, помітна в контролі, тоді як в умовах клиностатування її рівень значно вищий. На основі отриманих зображень проводили розрахунок значень ГП з використанням формули (1). Значення ГП для цитоплазматичної мембрани 3-добових клітин коренів етиологованих проростків варіювало у межах норми і становило приблизно $+0.04$ в контролі і $+0.04$ при клиностатуванні, що свідчить про її рідинність.

На шосту добу експерименту в контролі (рис. 8, I: *a—в*) майже не спостерігалось суттєвих змін в динаміці полярних фаз ділянок плазматичної мембрани, тоді як неполярні візуально

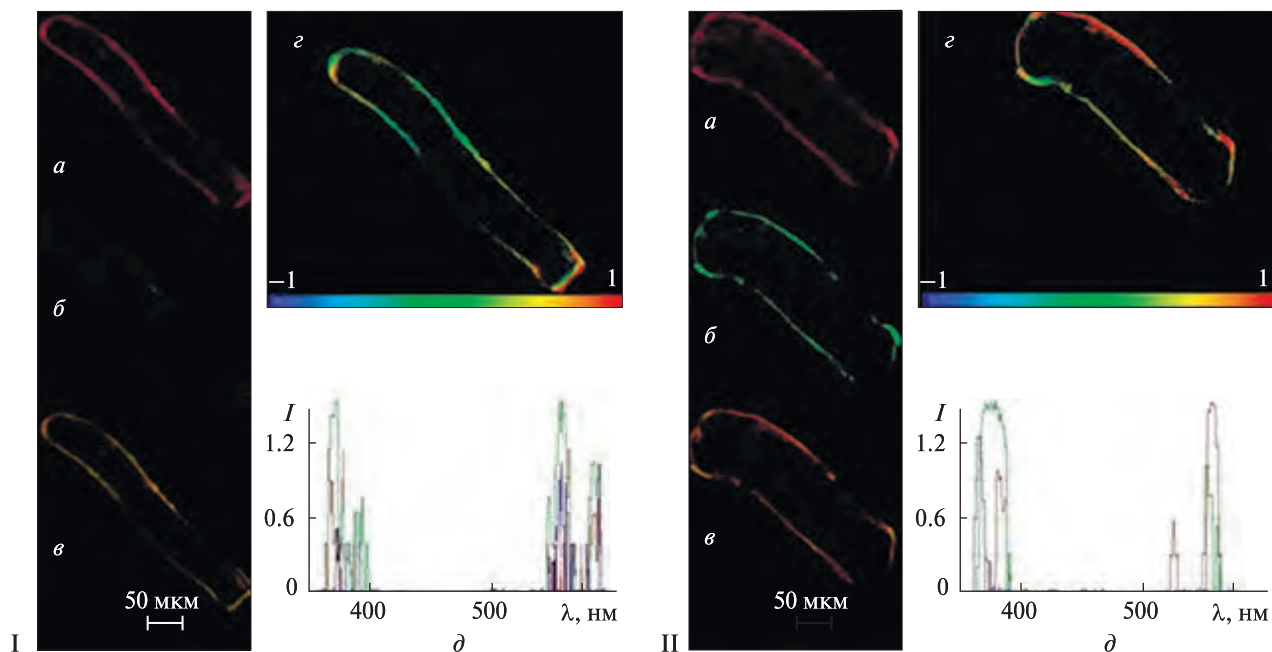


Рис. 8. Те ж для 6-добових проростків гороху

зменшилися. В умовах же клиностатування, навпаки, зміщення спектра випромінювання відбувалося до зеленого кольору (рис. 8, II: а–в), тоді як червоні області з вищим вмістом води майже не змінилися. Значення ГП для цитоплазматичної мембрани 6-добових клітин коренів етиолованих проростків варіювало у межах норми і складало приблизно -0.04 в контролі і $+0.5$ при клиностатуванні, що свідчить про наявність у цитоплазматичній мембрані клітин коренів клиностатованих проростків впорядкованих (щільних) доменів. Було проаналізовано по двадцять коренів кожного варіанту, і всі вони показали подібність зображень у межах певного варіанту. Також спостерігався асиметричний розподіл значень ГП цитоплазматичної мембрани в різних частинах клітини, тому для порівняння брали середнє значення ГП для кожного варіанту.

Отже, фазовий перехід з рідкої неупорядкованої фази до щільно впорядкованої спостерігався за збільшенням значень ГП лаурдану в цитоплазматичній мембрані коренів проростків гороху з $+0.04$ до $+0.5$ на шосту добу в умовах клиностатування. В контролі не спостерігалось

суттєвих змін значень ГП, їхня варіабельність була у межах рідкої неупорядкованої фази від -0.04 до $+0.04$, що свідчить про відсутність зміненого фазового стану мембрани на цих строках експерименту. Таким чином, можна зробити висновок, що під впливом клиностатування через шість діб збільшуються фракції щільно організованих доменів з низьким вмістом води (рафти), про що свідчить збільшення значень ГП.

ВИСНОВКИ

Аналіз літературних джерел і отриманих нами даних відкриває нові підходи до розв'язку фундаментальної проблеми біології, особливо космічної та гравітаційної біології — гравічутливості життєво важливих процесів функціонування клітин [12]. Одержано нові докази, що асоціація із рафтами може бути вирішальним фактором у визначенні активності інтегральних білків, регуляції іонних каналів, у першу чергу механочутливих, зв'язку мембрани із цитоскелетом. Вперше проведене нами вивчення складу ліпідів і стеринів рафтів цитоплазматичної мембрани коренів проростків гороху показало, що вони за своєю структурою та складом відповідають ха-

рактерним особливостям ліпід-білкових мікро-доменів інших рослин і чутливі до дії модельованої мікрогравітації.

Попередньо отримані нами дані щодо підвищення рівня холестерину в рафтах гороху в умовах клиностакування, що відбувається на фоні нормальної мікрів'язкості самої мембрани та призводить до збільшення жорсткості рафтів, підтверджуються завдяки використанню філіпіну, флуоресценція якого є індикатором концентрації холестерину у мембрані. На шосту добу експерименту спостерігалось «зближення» рафтів між собою в суцільний пласт по периметру цитоплазматичної мембрани. Саме через такий складний стеріновий профіль рослинні плазматичні мембрани менш чутливі до дії теплового шоку та інших стресів у порівнянні з тваринними клітинами [2]. Зміни фазового стану цитоплазматичної мембрани при дії клиностакування, визначені після застосування флуоресцентного зонду лаурдану, відбулися також через

шість діб експерименту. Було помічено підвищену емісію ліпідно-впорядкованих, щільніших ділянок мембрани зі зменшеним вмістом води, що вказує на наявність рафтів. Отримані нами результати стосовно збільшення ГП в умовах клиностакування на цих строках корелюють з даними, отриманими у попередніх дослідженнях і вказують на чутливість ЦМ до більш тривалої дії клиностакування. Порівняння і аналіз результатів проведених нами експериментів свідчить про те, що рідкокристалічні структури дуже чутливі до змін умов навколишнього середовища, і це визначає динамічність ліпідних бішарів мембрани — вони змінюють свою структуру при різноманітних, навіть незначних змінах зовнішніх умов. Для нормального функціонування мембрана має бути в рідкокристалічному стані, тому при будь-яких змінах середовища відбувається адаптаційна зміна хімічного складу мембрани, що забезпечує зменшення передумов для фазового переходу.

REFERENCES

1. Allen J. A., Halverson-Tamboli R. A., Rasenick M. M. (2007). Lipid raft microdomains and neurotransmitter signaling. *Nature reviews. Neuroscience*, **8** (2), 128—140. doi:10.1038/nrn2059 [in English].
2. Beck J. G., Mathieu D., Loudet C., Buchoux S., Dufourc E. J. (2007). Plant sterols in “rafts”: a better way to regulate membrane thermal shocks. *FASEB J.*, **21**(8), 1714-23. doi: 10.1096/fj.06-7809com [in English].
3. Brown D.A., London E. (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.*, **275** (23), 17221-4. doi: 10.1074/jbc.R000005200 [in English].
4. Chen Y., Qin J., Cai J., Chen Z. W. (2009). Cold Induces Micro- and Nano-Scale Reorganization of Lipid Raft Markers at Mounds of T-Cell Membrane Fluctuations. Published: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005386> [in English].
5. Dietrich C., Bagatolli L. A., Volovyk Z. N., Thompson N. L., Levi M., Jacobson K., Gratton E. (2001). Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys. J.*, **80**, 1417—1428. doi: 10.1016/S0006-3495(01)76114-0 [in English].
6. Gaus K., Gratton E., Kable E. P., Jones A. S., Gelissen I., Kritharides L., Jessup W. (2003). Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy. *PNAS*, **100**, 15554—15559. doi: 10.1073/pnas.2534386100 [in English].
7. Gaus K., Le Lay S., Balasubramanian N., Schwartz M. A. (2006). Integrin-mediated adhesion regulates membrane order. *J. Cell. Biol.*, **174**(5), 725—734. doi:10.1083/jcb.200603034 [in English].
8. Hancock J.F. (2006). Lipid rafts: Contentious only from simplistic standpoints. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 456—462 [in English].
9. Harmaza Y. V. (2008). Cholesterol and Zn-induced membrane changes. *Science and innovation*, **9**, 40—42 [in Russian].
10. Harris F. M., Best K. B., Bell J. D. (2002). Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1565**(1), 123—128. doi: 10.1016/s0005-2736(02)00514-x. PMID: 12225860 [in English].
11. Klymchenko A. S., Kreder R. (2014). Fluorescent Probes for Lipid Rafts: From Model Membranes to Living Cells. *Chemistry & Biology*, **21**(1), 97—113 [in English].
12. Kordyum E. L. (2014). Plant cell gravisensitivity and adaptation to microgravity. *J. Plant Biology*, **16** (1), 79—90 [in English].

13. Kordyum E. L., Klymenko O. M., Bulavin I. V., Zhupanov I. V., Vorobyova T. V., Ruelland E. (2018). Lipid rafts in plant cells are sensitive to the influence of simulated microgravity (clinorotation). *Space Science and Technology*, **24** (4), 48–58. <https://doi.org/10.15407/knit2018.04.051> [in Russian].
14. Lefebvre B., Furt F., Hartmann M. A., Michaelson L. V., Carde J. P., Sargueil-Boiron F., Rossignol M. (2007). Characterization of lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: a proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system. *Plant Physiol.*, **144**, 402–418 [in English].
15. Lingwood D., Simons K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, **327** (5961), 46–50. doi: 10.1126/science.1174621 [in English].
16. London E., Brown D. A. (2000). Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim. Biophys. Acta*, **1508** (1-2), 182-95. doi: 10.1016/s0304-4157(00)00007-1 [in English].
17. M'Baye G., Mély Y., Dupontail G., Klymchenko A. S. (2008). Liquid ordered and gel phases of lipid bilayers: fluorescent probes reveal close fluidity but different hydration. *Biophys. J.*, **95**, 1217–1225 [in English].
18. Mongrand S., Morel J., Laroche J., Claverol S., Carde J. P., Hartmann M. A., Bonneau M., Simon-Plas F., Lessire R., Bessoule J. J. (2004). Lipid rafts in higher plant cells. *The J. Biolog. Chemistry*, **279** (35), 36277–36286. doi: 10.1074/jbc.M403440200 [in English].
19. Nickels J. D., Smith M. D., Alsop R. J., Himbert S., Yahya A., Cordner D., Zolnierczuk P., Stanley C. B., Katsaras J., Cheng X., Rheinstädter M. C. (2019). Lipid Rafts: Buffers of Cell Membrane Physical Properties. *J. Phys. Chem. B.*, **123**(9), 2050–2056. doi: 10.1021/acs.jpcc.8b12126 [in English].
20. Owen D. M., Rentero C., Magenau A., Abu-Siniyeh A., Gaus K. (2011). Quantitative imaging of membrane lipid order in cells and organisms. *Nat. Protoc.*, **7**(1), 24–35. doi: 10.1038/nprot.2011.419 [in English].
21. Parasassi T., De Stasio G., d'Ubaldo A., Gratton E. (1990). Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. *Biophys. J.*, **57**(6), 1179–1186. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(90\)82637-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(90)82637-0) [in English].
22. Parasassi T., Gratton E., Yu W., Wilson P., Levi M. (1997). Two photon fluorescence microscopy of LAURDAN generalized polarization domains in model and natural membranes. *Biophys. J.*, **72**, 2413–2429. doi: 10.1016/S0006-3495(97)78887-8 [in English].
23. Parasassi T., Krasnowska E. K., Bagatolli L., Gratton E. (1998). Laurdan and prodan as polarity-sensitive fluorescent membrane probes. *J. Fluoresc.*, **8** (4), 365–373. doi: 10.1023/A:1020528716621 [in English].
24. Risselada H. J., Marrink S. J. (2008). The molecular face of lipid rafts in model membranes. *PNAS*, **105** (45), 17367–17372. doi: 10.1073/pnas.0807527105 [in English].
25. Sanchez S. A., Tricerri M. A., Gunther G., Gratton E. (2007). Laurdan generalized polarization: from cuvette to microscope. *Modern Research and Educational Topics in Microscopy (Formatex)*, **2**, 1007–1014 [in English].
26. Sanchez S. A., Tricerri M. A., Gratton E. (2012). Laurdan GP fluctuations. *PNAS*, **109** (19), 7314–7319. doi: 10.1073/pnas.1118288109 [in English].
27. Sezgin E., Levental I., Mayor S., Eggeling C. (2017). The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 361–374. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16> [in English].
28. Shevyreva T. A. (2008). Vesicular transport of PIP-aquaporins in a plant cell under osmotic stress. *Phd dissertation abstract*. Moscow: IPP [in Russian].
29. Simons K., Gerl M. (2010). Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 688–699. <https://doi.org/10.1038/nrm2977> [in English].
30. Vesnina L. (2013). Lipid rafts: the role in the regulation of the functional state of cell membranes. *Actual problems of modern medicine*, **13** (2), 5–10 [in Russian].
31. Wheeler G., Tyler K. M. (2011). Widefield microscopy for live imaging of lipid domains and membrane dynamics. *Biochim. Biophys. Acta*, **1808** (3), 634–641. doi: 10.1016/j.bbamem.2010.11.017 [in English].
32. Zhao X., Zhang X., Qu Y., Li R., Baluška F., Wan Y. (2015). Mapping of membrane lipid order in root apex zones of *arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.*, **6**, 1151. doi: 10.3389/fpls.2015.01151 [in English].

Стаття надійшла до редакції 01.02.2021
Після доопрацювання 01.02.2021
Прийнято до друку 30.08.2021

Received 01.02.2021
Revised 01.02.2021
Accepted 30.08.2021

O. A. Artemenko

Senior Researcher, Ph.D. in Biol.

ORCID: 0000-0002-7544-7996

E-mail: oartemenko66@gmail.com

M. G. Kholodny Institute of botany, NAS of Ukraine

2, Tereshchenkivska Str., Kyiv, 01601 Ukraine

THE STUDY OF THE FUNCTIONAL STATE OF LIPID RAFTS IN THE CYTOPLASMIC MEMBRANE OF *PISUM SATIVUM* SEEDLINGS UNDER CLINOROTATION

The results of cytological, biochemical, and molecular biological studies clearly demonstrate the significant influence of microgravity on the main processes of plant development, revealing the mechanisms which underlie the reactions of plant responses to microgravity and ensure their adaptation to this factor. The key role in cell function belongs to the cytoplasmic membrane (CM). First of all, by its qualities and functions, it can play an important role in the adaptation of plants to microgravity. However, data about the effect of altered gravity on the physicochemical properties of CM are limited. Recently, much attention has been paid to the study of functional microdomains of the lipid bilayer that have a specific localization and content of lipids and proteins - lipid rafts. They are defined as a dynamic nanosized, sterol- and sphingolipid-enriched ordered association of specific proteins, in which a metastable resting state can be activated by a combination of specific lipid-lipid, protein-lipid, and protein-protein interactions. There are more and more experimental data that confirm their participation in such live processes as endocytosis, apoptosis, internalization of toxins, bacteria, viruses, etc., as well as their important role in the protective mechanisms of the cell under different stressors. In this work, a fluorescent marker of sterols — filipin and a fluorescent probe laurdan were used to confirm the presence of cholesterol and sphingolipid-enriched lipid ranges in CM. Our results regarding the increase in generalized polarization in the clinorotation conditions correlate with the data obtained in previous studies and indicate the sensitivity of the CM to a longer action of the clinorotation.

Keywords: cytoplasmic membrane, plants, lipid rafts, clinorotation, cholesterol, sphingolipids, generalized polarization.