



## ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ ЛИПИДНОГО ФРАГМЕНТА НА ВСТРАИВАНИЕ И ВЫХОД ГЛИКОЛИПИДОВ ИЗ КЛЕТОК: ИЗУЧЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ

© 2022 г. Е. В. Сливка\*, А. Б. Тузиков\*, С. В. Хайдуков\*, В. А. Комарова\*, С. Генри\*\*,  
Н. В. Бовин\*, Е. М. Рапопорт\*.\*#

\*ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,  
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*\*Centre for Kode Technology Innovation, School of Engineering, Auckland University of Technology,  
Private Bag 92006, Auckland, 1142 New Zealand

Поступила в редакцию 15.02.2022 г.

После доработки 28.03.2022 г.

Принята к публикации 30.03.2022 г.

Многие важные аспекты межклеточного транспорта гликофинголипидов (ГСЛ) остаются неизвестными, в частности, как ГСЛ преодолевают гликокаликс клетки-донора и клетки-акцептора. Изучение этого процесса значительно облегчается, если использовать не природные ГСЛ, а их синтетические аналоги. Однако для получения адекватных результатов мы должны знать, как упрощенная структура молекулы-пробы влияют на принципиально важные ее свойства, в частности, как замена керамидного остатка в ГСЛ на синтетический аналог влияет на кинетику выхода и встраивания. Целью данного исследования было сравнение свойств синтетических аналогов ГСЛ, в составе одного из которых находится природный керамид, а других – более удобные с точки зрения синтеза липидные остатки. Для этого использовали конструкторы FSL (Function-Spacer-Lipid), содержащие липидный остаток в трех вариантах: DOPE (1,2-*O*-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин), холестерин (Chol) и C18-керамид (Cer). Во всех трех молекулах липидный остаток связан с биотином посредством гидрофилизующего спейсера CMG2. С помощью конфокальной микроскопии показано сходство паттернов локализации этих трех липидов между собой и с изученными ранее (где в качестве F были гликаны разного размера), FSL обнаруживались в виде ограниченных зон (патчей) среднего размера 0.3 мкм и не выявлялись в клеточных рафтах. В то же время наблюдались следующие различия в свойствах трех FSL: 1) процесс встраивания керамидного конструктора выходит на плато в течение 3 ч, в то время как двух других – в течение 1 ч; 2) количество встроенного керамидного конструктора меньше, чем двух других; 3) выход холестеринового конструктора из клеток, куда он предварительно встроен, происходит медленнее, чем двух других. Таким образом, несмотря на некоторые количественные различия, качественно все три конструктора ведут себя похожим образом, что делает их привлекательными при изучении встраивания и выхода ГСЛ из клетки.

*Ключевые слова:* гликаны, гликофинголипиды, клетка, плазматическая мембрана, молекулярные пробы

DOI: 10.31857/S0132342322050232

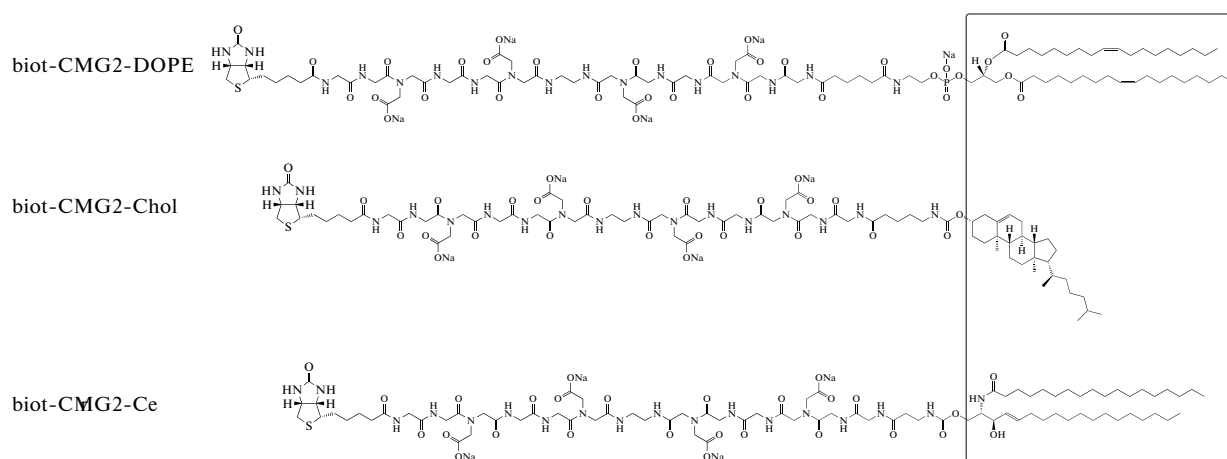
### ВВЕДЕНИЕ

Гликофинголипиды (ГСЛ) входят в состав плазматической мембраны всех эукариотических

Сокращения: ГСЛ – гликофинголипиды; biot – биотин; Cer – C18-керамид; Chol – холестерин; CMG2 – спейсер, содержащий повторяющиеся карбоксиметилглицерильные блоки; СТВ – холеротоксин В (cholera toxin B); DOPE – 1,2-*O*-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин; FCS – фе- тальная сыворотка телят; FSL – функциональный липид со спейсерной группой (Function-Spacer-Lipid), где “F” – это гликан, пептид, биотин или другая функциональная группа, “L” – гидрофобный остаток, с помощью которого конструктор закорячивается в мембрану; Str – стрептавидин.

# Автор для связи: (тел.: +7 (916) 518-15-71; эл. почта: eugenia\_raport@mail.ru).

клеток. Они вовлечены в межклеточную адгезию, регулируют пролиферацию и апоптоз клеток, участвуют в передаче клеточных сигналов [1–3]. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что ГСЛ способны не только связываться с сигнальными белками и рецепторами на поверхности клетки, но и переходить с клетки на клетку, в результате оказываясь там, где отсутствует maquinaria для их синтеза. Например, на эритроцитах выявляются Le<sup>a</sup>- и Le<sup>b</sup>-содержащие ГСЛ (определяющие антигенность системы групп крови Люблиса), которые сами эти клетки не синтезируют [4]; эти ГСЛ переносятся из плазмы крови, куда они, в свою очередь, попадают из эндотелия [4–6]. До сих пор нет объяснений, по какому меха-



**Рис. 1.** Структура конструкторов, использованных в данной работе. Обозначения: biot – биотин; CMG2 – спейсер, содержащий повторяющиеся карбоксиметилглицильные блоки; DOPE – 1,2-*O*-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин; Chol – *O*-замещенный холестерин; Cer – C18-церамид. Гидрофобный остаток в составе конструкторов выделен рамкой.

низму ГСЛ захватываются клетками из крови. Чтобы встроиться в плазматическую мембрану, ГСЛ должен дважды преодолеть гликокаликс – клетки-донора и клетки-акцептора; данных о том, как это происходит, практически нет. Отсутствие данных связано с общими проблемами исследования ГСЛ: как коммерческие реагенты они малодоступны, выделение затруднено вследствие их низкого содержания и гетерогенности по углеводному и липидному фрагментам [7].

Удобный подход в решении сформулированной выше и других задач исследования трафика ГСЛ – применение их синтетических аналогов [8], которые получили название FSL (Function-Spacer-Lipid) [9–11]. Эти конструкторы доступны в достаточных для исследования количествах [11], легко встраиваются в мембрану живой клетки, что не влияет на жизнеспособность [12] и выполнение клеткой основных ее функций.

Цель данной работы – изучить, каким образом замена керамидного остатка на синтетический аналог – DOPE или остаток холестерина – повлияет на встраивание в клеточную мембрану и выход встроеного конструктора FSL из клетки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе использовали FSL, в которых гидрофобные остатки представлены тремя вариантами: C18-церамидом (Cer), 1,2-*O*-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламином (DOPE) и холестерином (Chol). Для удобства детекции в качестве функционального остатка F все три конструктора содержали биотин, присоединенный к гидрофобному остатку с помощью гидрофилизирующего карбоксиметилглицильного спейсера CMG2. Структуры FSL приведены на рис. 1.

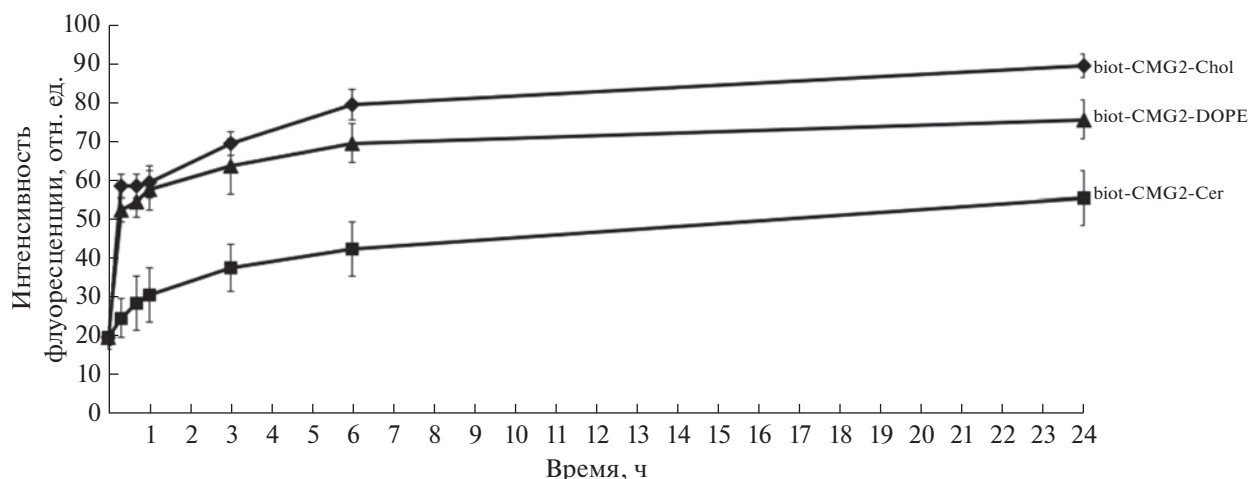
**Встраивание FSL в клетки.** Конструктор (рис. 1) встраивали в монослой клеток EA.hy 926 в среде,

содержащей фетальную сыворотку телят (FCS), которую использовали в пониженной концентрации (0.3%), чтобы избежать предполагаемого влияния сывороточного альбумина на трафик липидов [13]. Встраивание FSL подтверждали и визуализировали с помощью флуоресцентно-меченого стрептавидина (Str-FITC), измеряя среднегеометрическое значение флуоресценции.

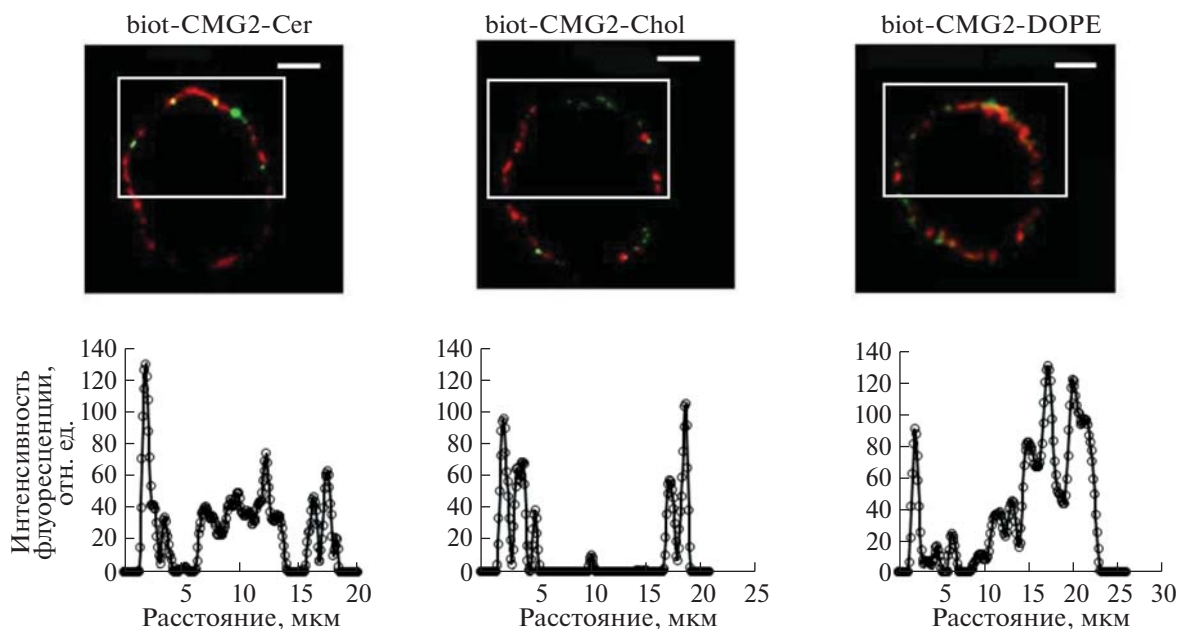
DOPE- и Chol-конструкторы выявлялись в клетках уже через 20 мин, а на плато (если быть точным, то на участок медленного роста) процесс встраивания выходил к первому часу инкубации (рис. 2). Накапливание керамидного конструктора было в разы медленнее, особенно в начальный период, выходя на плато к третьему часу. На промежутке 3–24 ч степень встраивания менялась незначительно (рис. 2); морфологических изменений клеток не наблюдалось.

Сравнивая интенсивность флуоресценции клеток и калибровочных частиц, содержащих известное количество флуоресцеина, и зная, что одна молекула стрептавидина в среднем связывается с шестью молекулами FITC, а Str-FITC, в свою очередь, связывается с одной или двумя молекулами биотина, мы рассчитали, что количество конструктора, встроившегося за 40 мин, составляет  $0.6–1.1 \times 10^5$  молекул на клетку керамидного производного,  $0.9–1.9 \times 10^5$  DOPE и  $1.1–2.2 \times 10^5$  холестеринного производных, что составляет ~0.01% от количества липидов плазматической мембраны клетки [14].

**Расположение FSL в клетке.** Локализация FSL была исследована с помощью конфокальной микроскопии. На всех полученных изображениях наблюдалось неравномерное окрашивание, т.е. FSL выявлялись в виде патчей (рис. 3). Анализ распределения флуоресценции в выделенных областях дает размер патчей в интервале 0.2–2.0 мкм, преимущественно 0.3 мкм.



**Рис. 2.** Кинетика встраивания FSL в клетки EA.hy 926. Клетки инкубировали с конструктами при 37°C. Результаты цитофлуориметрического анализа представлены как среднее двух независимых экспериментов.

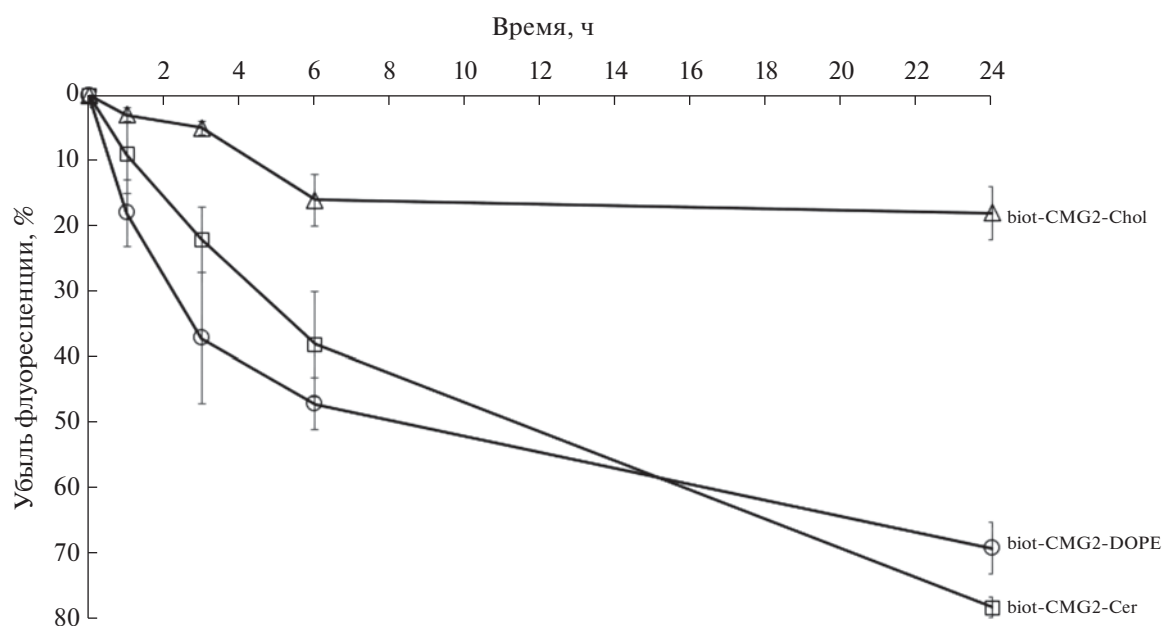


**Рис. 3.** Расположение FSL-конструктов по отношению к рафтам клеток EA.hy 926, данные конфокальной микроскопии. Клетки инкубировали с FSL в течение 2 ч при 37°C. Окрашивание рафтов (зеленый цвет) проводили с помощью конъюгата СТВ-Alexa Fluor 488, биотин в составе FSL выявляли с помощью конъюгата Str-Alexa Fluor 594 (красный цвет). На гистограммах (нижняя панель) приведено распределение флуоресценции FSL в областях, выделенных белыми прямоугольниками (верхняя панель). По оси абсцисс – координата соответствующей точки на горизонтальной стороне белого прямоугольника; масштабный отрезок 5 мкм.

Клеточные рафты выявляли с помощью холестерокина В (СТВ), про который известно, что он связывается с ганглиозидом GM1 – обязательным компонентом рафтовых доменов [15]. FSL локализовались преимущественно за пределами рафтов. Незначительная солокализация с GM1 наблюдалась только в случае церамидного конструкта (рис. 3). По-видимому, отсутствие конструкта в рафтах связано с высокой структурной

организацией рафтов, из-за чего встраивание в них дополнительного липидного производного (путем “разбавления” липидов рафта или их замещения) невыгодно. Отметим, что внутри клетки конструкты также не выявлялись, т.е. в выбранных условиях не наблюдалось эндоцитоза FSL.

**Выход FSL из клеток.** Далее мы исследовали, как долго остаются конструкты, нагруженные на клетку, как это описано выше. Для этого после



**Рис. 4.** Выход FSL из клеток EA.hy 926, данные цитофлуориметрии. Значение “0” соответствует флуоресценции после встраивания FSL и немедленной отмывки. По оси ординат приведена убывание флуоресценции, которую рассчитывали по формуле:  $[(F_i/F_0) \times 100] - 100$ , где  $F_i$  и  $F_0$  — значения интенсивности флуоресценции клеток в заданное время и при 0 мин соответственно.

встраивания FSL клетки помещали при 37°C в буферный раствор на сутки в CO<sub>2</sub>-инкубаторе без перемешивания. В течение первых шести часов наблюдалось значительное снижение интенсивности флуоресценции по сравнению с исходным значением для DOPE- и Cer-конструктов (рис. 4), через 6 ч их оставалось ~50 и 40% соответственно. За это же время выход холестеринного конструкта составил не более 15%, а через 24 ч его терялось всего лишь ~20%. Полученные результаты показали, что большая часть Cer- и DOPE-конструктов выходит из клетки в течение первых суток, тогда как Chol-конструкт удерживается в мембране.

При коммуникации клетки обмениваются белками, нуклеиновыми кислотами и липидами, в том числе гликофинголипидами. В силу гетерогенности по керамидному остатку и многообразию по гликановому, их перенос изучать затруднительно, и поэтому доступная информация о транспорте ГСЛ крайне ограничена; в то же время применение синтетических конструктов привлекательно, т.к. позволяет синтезировать конструкты с разнообразными гликанами и варьировать липидный остаток L в FSL. В предшествующем исследовании [8] мы показали, что размер гликана не оказывает принципиального влияния ни на встраивание FSL в клетку, ни на его выход из клетки. В настоящей работе мы изучили влияние структуры липидного остатка на встраивание и выход FSL из клетки, чтобы понять, насколько оправдано использование DOPE- или Chol-конструктов для изучения процессов с участием ГСЛ,

т.е. керамид-содержащих молекул. Во всех случаях конструкты выявлялись в патчах, размер которых мало зависит от природы липидного компонента; DOPE- и Chol-конструкты накапливаются в составе клетки быстрее, чем керамидный, хотя эта разница невелика; количество молекул DOPE- и Chol-конструктов, встроенных в клетку, выше, чем керамидного; Chol-конструкт медленнее выходит из клетки, чем DOPE- и Cer-конструкты. Различия в выходе, скорее всего, объясняются удерживанием конструктов в гликокаликсе клетки. Таким образом, в использованных экспериментальных системах изученные конструкты оказались сходными, хотя в некоторых процессах к керамидному конструкту ближе по свойствам оказался холестеринный, а в других — DOPE-конструкт. Несмотря на то, что универсального “миметика” для керамидного остатка мы не нашли, полученные данные позволяют гибко использовать конструкт того или иного типа в зависимости от конкретной решаемой задачи.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реактивы.** В работе использовали культуральную среду DMEM-F12, фетальную сыворотку теленка (FCS) и глутамин (Gibco, США); конъюгаты холеротоксина В (СТВ) с Alexa Fluor 488 и стрептавидина с Alexa Fluor 594 (Invitrogen, США); бычий сывороточный альбумин (BSA) и мовиол® 4-88 (Sigma, США); частицы ImmunoBrite (10 мкм), содержащие 31000, 115000 или

450000 остатков флуоресцеина (Beckman Coulter Life Sciences, США); реактивы фирмы Реахим (Россия).

**FSL.** FSL-конструкты синтезированы, как описано ранее [16], их чистота, подтвержденная ЯМР-спектрометрией, составляет >95%.

**Встраивание FSL в клетки EA.hy 926.** Клетки EA.hy 926 предоставлены Edgell С.-J. (Chapel Hill, США). Клетки получены путем слияния эндотелиальных клеток из пупочной вены человека с клетками линии А-549 (карциномы легкого). По морфологии и фенотипу они воспроизводят клетки макрососудов [17]. Культивирование клеток проводили в среде DMEM-F12, содержащей 10%-ную фетальную сыворотку теленка и 2 мМ глутамин, при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> (инкубатор Sanyo, Япония). В лунках 24-луночного планшета (Nunc, Дания) к монослою клеток после отмывки средой DMEM-F12, содержащей 0.3%-ную фетальную сыворотку теленка (DMEM-0.3% FCS), добавляли FSL (конечная концентрация 5 мкМ). Встраивание проводили, инкубируя клетки с FSL в течение разных промежутков времени при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Далее клетки снимали с пластика раствором Версена (PBS, содержащий 0.02% ЭДТА), отмывали 3 раза РВА (PBS, содержащий 0.2% BSA) центрифугированием при 90 g, 4°C в течение 3 мин. Для измерения флуоресценции клеточной суспензии добавляли конъюгат стрептавидина с флуоресцеинизотиоцианатом (Str-FITC) в разведении 1 : 50 в РВА, инкубировали при 4°C в течение 30 мин на шейкере. Затем клетки отмывали 3 раза РВА, переносили в пробирки для цитофлуориметрии, тщательно перемешивали с 2 мл PBS. Флуоресценцию клеток измеряли на проточном лазерном цитофлуориметре FACScan (Becton-Dickinson, США) или FC500 (Beckman Coulter, США) при 488 нм и комнатной температуре. Обработку данных проводили с помощью программы FlowJo10.8.0 (Beckton-Dickinson, США) или Kaluza 1.3 (Beckman-Coulter, США). В каждой пробе анализировали не менее 5000 клеток. Параллельно измеряли флуоресценцию стандартных частиц, полученные значения использовали для построения калибровочного графика и определения количества молекул конструктов, встроенных в одну клетку.

**Выход FSL из клеток.** FSL инкубировали с клетками EA.hy 926 в лунках 24-луночного планшета в течение 2 ч при 37°C, как указано выше. Клетки отмывали в среде, содержащей 0.3% FCS, и оставляли в этой же среде без перемешивания при 37°C в атмосфере CO<sub>2</sub> (5%) на определенные промежутки времени, после чего снимали с пластика раствором Версена, отмывали трижды РВА в течение 3 мин при 4°C, как описано выше. Флуоресценцию клеток анализировали методом цитофлуориметрии при 488 нм и комнатной температуре.

**Конфокальная микроскопия.** Детекцию встроенного FSL проводили, инкубируя клетки EA.hy 926 с конъюгатом стрептавидина с Alexa Fluor 594 (разведение 1 : 200 в РВА) при 4°C в течение 20 мин.

Для окрашивания рафтов клетки отмывали PBS и инкубировали с конъюгатом CTB-Alexa Fluor 488 (разведение 1 : 100 в PBS) на льду в течение 20 мин.

На предметные стекла наносили 15 мкл смеси, содержащей 2.4 г мовиола, 6 г глицерина, 6 мл воды и 12 мл 0.2 М Tris-HCl (pH 8.5), далее добавляли 10 мкл суспензии клеток. Изображения получали с помощью конфокального микроскопа Eclipse TE-2000-E (Nicon, Япония), в каждом опыте было проанализировано не менее десяти случайно выбранных клеток. Обработку данных проводили с помощью программы ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе проведено сравнение трех FSL, имеющих одинаковый полярный участок FS и разные липидные остатки L: остаток C18-церамида, DOPE или холестерина, показана их схожесть в отношении встраивания в клеточную мембрану и выхода этих FSL из нее. Это означает, что при исследовании межклеточного переноса гликофинголипидов, липидная часть которых представлена церамидом, оправдано использование синтетических аналогов, в которых церамидный фрагмент заменен на другой липидный остаток, в частности на легко синтезируемые производные DOPE. По той же причине DOPE-аналоги природных гликофинголипидов, встроенные во внеклеточные микровезикулы, обещают стать перспективными молекулами-векторами для увеличения селективности доставки микровезикул, нагруженных терапевтическими молекулами.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00672).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tettamanti G., Bassi R., Viani P., Riboni L.* // *Biochimie*. 2003. V. 85. P. 423–437.  
[https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(03\)00047-6](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(03)00047-6)
2. *Hakomori S.-I.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. P. 225–232.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.012540899>
3. *Hakomori S.-I., Handa K.* // *Glycoconj. J.* 2015. V. 32. P. 1–8.  
<https://doi.org/10.1007/s10719-014-9572-4>
4. *Marcus D.M.* // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* V. 169. P. 161–163.  
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1970.tb55982.x>
5. *Hirsch H.F., Graham H.A.* // *Transfusion*. 1980. V. 20. P. 474–475.  
<https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1980.20480260286.x>
6. *Oriol R., Danilovs J., Lemieux R., Terasaki P., Bernoco D.* // *Hum. Immunol.* 1980. V. 3. P. 195–205.  
[https://doi.org/10.1016/0198-8859\(80\)90014-2](https://doi.org/10.1016/0198-8859(80)90014-2)
7. *Riboni L., Paola Giussani P., Paola Viani P.* // In *Sphingolipids as Signaling and Regulatory Molecules* / Eds. Chalfant C., Poeta M.D. *Adv. Exp. Med. Biol.* V. 688. New York: Springer, 2010. P. 25–45.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6741-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6741-1_2)
8. *Rapoport E.M., Khasbiullina N.R., Komarova V.A., Ryzhov I.M., Gorbach M.M., Tuzikov A.B., Khaidukov S.V., Popova I.S., Korchagina E.Y., Henry S.M., Bovin N.V.* // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2021. V. 1863. P. 183645.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2021.183645>
9. *Henry S.* // *Curr. Opin. Hematol.* 2009. V. 16. P. 467–472.  
<https://doi.org/10.1097/moh.0b013e328331257e>
10. *Oliver C., Blake D., Henry S.* // *Transfusion*. 2011. V. 51. P. 1723–1730.  
<https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.03034.x>
11. *Korchagina E., Tuzikov A., Formanovsky A., Popova I., Henry S., Bovin N.* // *Carbohydr. Res.* 2012. V. 356. P. 238–246.  
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.03.044>
12. *Blake D., Bovin N., Bess D., Henry S.* // *J. Vis. Exp.* 2011. V. 54. P. e3289.  
<https://doi.org/10.3791/3289>
13. *Schwarzmann G., Hoffmann-Bleihauer P., Schubert J., Sandhoff K., Marsh D.* // *Biochemistry*. 1983. V. 22. P. 5041–5048.  
<https://doi.org/10.1021/bi00290a025>
14. *Alberts B., Johnson A., Lewis Ju., Raff M., Roberts K., Walter P.* // In *Molecular Biology of the Cells*, 4th ed. New York, Garland Science, 2002.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26871>
15. *Nichols B.J.* // *Curr. Biol.* 2003. V. 13. P. 686–690.  
[https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(03\)00209-4](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(03)00209-4)
16. *Henry S., Williams E., Barr K., Korchagina E., Tuzikov A., Ilyushina N., Abayzeed S.A., Webb K.F., Bovin N.* // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 2845.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-21186-3>
17. *Baranska P., Jerczynska H., Pawlowska Z., Koziolkiewicz V., Cherniewski C.* // *Cancer Genomics Proteomics*. 2005. V. 2. P. 265–270.

## Influence of the Lipid Moiety Structure on the Insertion/Release of Glycolipids in/from the Cell: A Study with Synthetic Analogues

E. V. Slivka\*, A. B. Tuzikov\*, S. V. Khaidukov\*, V. A. Komarova\*, S. Henry\*\*,  
N. V. Bovin\*, and E. M. Rapoport\*<sup>\*,#</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (916) 518-15-71; e-mail: eugenia\_rapoport@mail.ru

\*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

\*\*Centre for Kode Technology Innovation, School of Engineering, Auckland University of Technology,  
Private Bag 92006, Auckland, 1142 New Zealand

Many important aspects of intercellular glycosphingolipid (GSL) transport remain unknown, in particular how GSLs cross the glycocalyx of the cell-donor and cell-acceptor. The use of synthetic analogues instead of natural GSLs alleviates the study. However, in order to obtain adequate results, we must know how simplifications in the structure of a synthetic probe affect its properties of interest to us. In particular, how the replacement of a ceramide residue in GSL with a synthetic analogue affects the release and insertion kinetics. To this end, we compared the properties of synthetic analogues, one of which contains natural ceramide moiety, while two others have lipid residues that are more convenient in terms of the probes chemical synthesis. FSL (Function-Spacer-Lipid) constructs containing DOPE (1,2-*O*-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho ethanolamine), cholesterol (Chol), or C18-ceramide (Cer) lipid fragments (L) were applied. In all three probed, the lipid residues were linked to biotin with hydrophilizing CMG2-spacer-arm. Using confocal microscopy, the similarity of the localization patterns of these three probes, both with each other and with the previously studied glycoprobes (F = glycan), was shown, namely: they were observed in the form of patches of an average size of 0.3  $\mu\text{m}$ , but were not detected at all in cell rafts. At the same time, the following differences were observed in the properties of the three studied FSLs: 1) the process of insertion of the ceramide construct reaches a plateau within 3 hours, while the other two – within 1 hour; 2) the amount of inserted ceramide construct is less than the other two; 3) release of the cholesterol construct from the cells where it is pre-inserted is slower than the other two. Thus, despite some quantitative differences, qualitatively all three constructs behave similarly, that is, they are interchangeable when studying the incorporation/release of the FSL into/from the cell.

*Keywords:* glycans, glycosphingolipids, cell, plasma membrane, molecular probes