

ОБРАЗОВАНИЕ ЛИПОФУСЦИНА У ДРОЗОФИЛ ПРИ НАГРЕВАНИИ И УЛЬТРАФИОЛЕТОВОМ ОБЛУЧЕНИИ

© 2020 г. А.Е. Крылова, А.В. Чаплыгина, Н.Л. Векшин

Институт биофизики клетки РАН — обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: nvekshin@rambler.ru

Поступила в редакцию 04.09.2019 г.

После доработки 04.09.2019 г.

Принята к публикации 05.09.2019 г.

Проведено спектроскопическое изучение возникновения липофусцинового «мусора» в туловищах и головах дрозофил *Drosophila melanogaster* (*vestigial*) под действием повышенной температуры и интенсивного ультрафиолетового облучения. После часового воздействия температуры (48°C) или ультрафиолетового облучения в туловищах и головах дрозофил обнаруживается деградация триптофановых остатков белков, сопровождающаяся появлением голубой флуоресценции термолипофусцина или фотолипофусцина соответственно. Предполагается, что триптофановые остатки активно участвуют в формировании этих липофусцинов. Кроме того, наблюдалась термодеструкция и фотодеструкция ретиналя глазного родопсина.

Ключевые слова: липофусцин, ретиналь, *Drosophila melanogaster*, ультрафиолетовое облучение.

DOI: 10.31857/S0006302920010081

Накопление внутриклеточного «мусора» *липофусцина* (этот общепринятый термин неудачен, так как не в каждом липофусцине много липидов) является одним из индикаторов старения организмов [1, 2]. При естественном старении, а также при воздействии некоторых вредных экологических факторов на животных количество внутриклеточного «мусора» увеличивается [3, 4]. В зависимости от условий в разных органах могут накапливаться различные виды липофусцина, сильно варьирующего по своему составу и свойствам [4–6]. Когда «мусора» накапливается слишком много, животное умирает [7–10]. Помимо накопления липофусцина, у старых животных увеличивается количество межбелковых сшивок [6, 11], уменьшается содержание цитохромов и флавинов [12] и т.д.

Хотя продолжительность жизни животных, как известно, сильно зависит от генетических особенностей и мутаций, никакой специальной «программы» смерти, о которой иногда говорят [13], у животных не существует [7].

Плодовые мушки (*Drosophila melanogaster*) являются удобным объектом для изучения естественного и искусственного старения [8–10, 13, 14], так как у них небольшая продолжительность жизни, высокая плодовитость, маленькие размеры и неприхотливость к условиям содержания. При комнатных температурах эти мушки живут обычно 20–30 суток. При понижении температу-

ры, при особом питании и при отборе для размножения только молодых самок продолжительность жизни возрастает многократно [8].

Одним из экологических факторов, ускоряющих старение, является повышенная температура, активирующая образование перекиси водорода и перекисное окисление липидов, вызывающих денатурацию белков и накопление липофусцина в разных объектах [5, 7–9, 12, 14, 15]. Другим экологическим фактором является ультрафиолетовое облучение, которое может действовать аналогичным образом [8, 16, 17].

Целью данной работы является спектроскопическое изучение возникновения липофусцинового «мусора» в тушках и головах нелетающих дрозофил (*Drosophila melanogaster*, мутация *vestigial*) под действием двух экологических факторов — повышенной температуры и интенсивного ультрафиолетового облучения. Кроме того, показана деградация ретиналя глазного родопсина и его участие в образовании липофусцинового «мусора» в головах дрозофил после этих воздействий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проводили на нелетающих дрозофилах *Drosophila melanogaster* (мутация *vestigial*) в возрасте 10–20 суток. Дрозофил выращивали и содержали согласно протоколу, описанному в работе [8]. Чтобы минимизировать влияние компо-

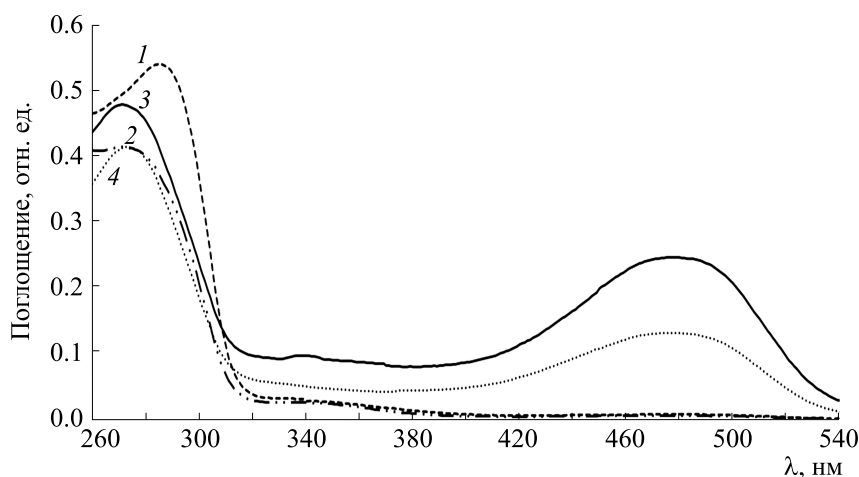


Рис. 1. Спектры поглощения экстрактов туловищ и голов дрозофил до и после часового воздействия на мушек повышенной температуры (48°C): 1 — туловище, контроль, 2 — туловище, опыт, 3 — голова, контроль, 4 — голова, опыт.

нентов пищи кишечника на регистрируемые показатели (оптическую плотность и флуоресценцию экстрактов туловищ и голов мушек), за восемь часов до опыта дрозофил оставляли без еды (давали только воду).

Для исследования воздействия повышенной температуры на мушек их помещали в пластиковую пятимиллилитровую пробирку типа Ерпендорф, устанавливаемую в камеру термостата при 48°C на 1 ч.

Для облучения дрозофил ультрафиолетовым и видимым светом (250–800 нм) использовали ксеноновую лампу мощностью 450 Вт, дополнительно снабженную водным светофильтром (в большой кварцевой ячейке), ослабляющим ближний инфракрасный свет и полностью отрезающим среднее инфракрасное (тепловое) излучение (эта лампа моделирует естественное солнечное облучение, т.к. имеет сходный спектр). Живых мушек помещали в кварцевую кювету с длиной оптического пути 1 см и облучали в течение 1 ч. При этом кювету держали открытой, чтобы не происходило сильного повышения температуры внутри кюветы.

Затем десять опытных и десять контрольных (без нагрева или облучения) мушек декапитировали, после чего отдельно гомогенизировали головы и отдельно — туловища. Гомогенизацию проводили путем тщательного растирания в фарфоровой ступке пестиком в 0,5 мл изопропанольно-водного (с соотношением 1 : 4) раствора с последующим добавлением еще 1,5 мл такого же раствора. Нерастворимые частицы (крылышки, ножки и др.) отбрасывали или отфильтровывали.

Все полученные экстракты проб были выровнены по величине поглощению при 280 нм для получения сходных концентраций по белку. Спектры поглощения экстрактов в ультрафиоле-

товой и видимой области регистрировали на спектрофотометре ПЭ-5400-УФ (ООО «Экохим», Санкт-Петербург). Спектры флуоресценции экстрактов снимали на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Agilent, США) в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см по известным методикам [17, 18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В спектрах поглощения экстрактов голов дрозофил наблюдаются две интенсивные полосы — в районе 260–290 нм и 420–520 нм (рис. 1). Первая обусловлена в основном ДНК (260 нм) и белками (270 нм — тирозины, 280 нм — триптофаны) [17, 18], а вторая — ретиналом, принадлежащем родопсину пигментных клеток глаз [19]. Кроме того, имеется слабая, едва заметная полоса в районе 330–370 нм. В этой области поглощают флавины, НАДН, НАДФН, антралиловая кислота и липофусцин [7, 11, 18], количество которых у дрозофил мало и не определено.

После часового воздействия на дрозофил повышенной температуры (48°C) в спектрах поглощения наблюдается уменьшение оптической плотности в ультрафиолетовой области (рис. 1). В туловищах снижение оптической плотности в ультрафиолетовой области обусловлено исключительно деградацией триптофановых остатков белков. Об этом свидетельствует то, что уменьшается поглощение при 280 нм, но не при 260 нм. ДНК при умеренном нагреве не деградирует. В случае же голов после нагрева в спектре в ультрафиолетовой области не возникает коротковолнового сдвига. Это связано с тем, что значительный вклад в ультрафиолетовую полосу экстрактов голов дает ретиналь глазного родопсина, а не триптофаны белков. Ретиналевая полоса в видимой области после часового нагрева мушек уменьши-

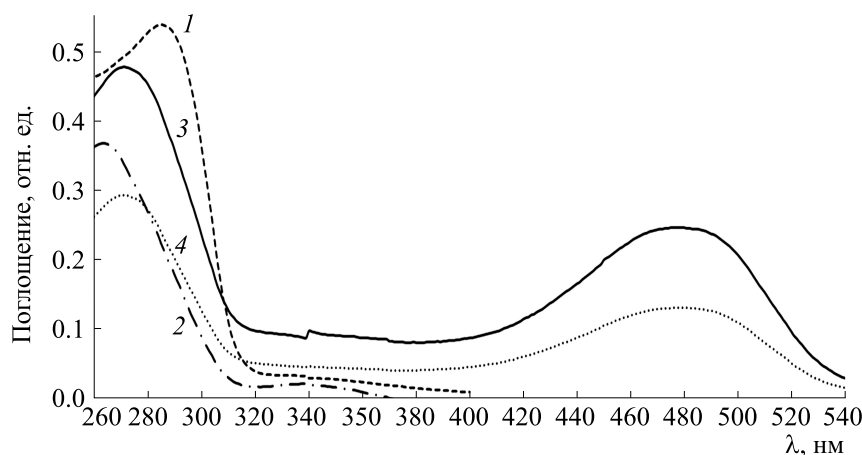


Рис. 2. Спектры поглощения экстрактов туловищ и голов дрозофил до и после часового ультрафиолетового облучения мушек: 1 — туловище, контроль, 2 — туловище, опыт, 3 — голова, контроль, 4 — голова, опыт.

лась вдвое. Значит, при высокой температуре происходит повреждение пигментных клеток глаз, сопровождающееся окислением и деградацией ретиналя. Деградировавший ретиналь можно рассматривать как внутриклеточный «мусор».

Аналогичные изменения возникают после часового ультрафиолетового облучения дрозофил (рис. 2), причем ароматические аминокислоты в этом случае деградируют сильнее, чем при нагревании, а ретиналь — почти настолько же. Интенсивный ультрафиолетовый свет поглощается триптофановыми и тирозиновыми остатками белков, вызывая денатурацию, а интенсивный видимый свет поглощается глазным ретиналем родопсина, вызывая его деградацию.

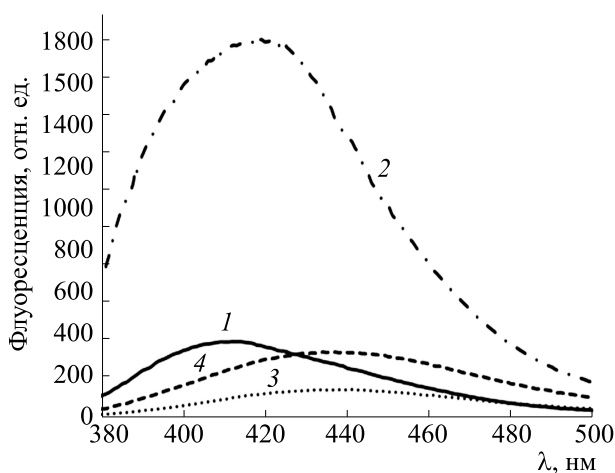


Рис. 3. Спектры голубой флуоресценции экстрактов туловищ и голов дрозофил до и после часового воздействия на мушек повышенной температуры (48°C): 1 — туловище, контроль, 2 — туловище, опыт, 3 — голова, контроль, 4 — голова, опыт. Возбуждение флуоресценции — 360 нм.

Поскольку спектрофотометрически детектировать липофусцин практически невозможно (слишком слаба полоса в районе 360 нм из-за его малого количества), то он был детектирован спектрофлуориметрически. Одним из свойств липофусцина является его интенсивная флуоресценция в голубой области при возбуждении в ближней ультрафиолетовой области [12, 16, 20]. При этом наибольший вклад часто вносит митохондриальный липофусцин [5, 6, 10, 12, 16].

В спектре изопропанольно-водных экстрактов контрольных дрозофил видна полоса голубой флуоресценции (при возбуждении на 360 нм, см. рис. 3). Интенсивность и положение максимума спектров экстрактов туловищ и голов различаются. В экстрактах туловищ голубая полоса втрое сильнее, чем в экстрактах голов, и имеет максимум при 410 нм, а не при 435 нм. В голубую полосу могут вносить неопределенный вклад несколько флуорофоров: шиффовый хромофор липофусцина, НАДН, НАДФН, антралиловая кислота и др., что, по-видимому, и обуславливает существенный спектральный сдвиг между экстрактами из туловищ и голов.

После часового прогрева дрозофил при температуре 48°C в экстрактах туловищ возникает очень интенсивная полоса с максимумом при 420 нм (рис. 3), принадлежащая исключительно образовавшемуся термолипофусцину. Спектр термолипофусцина сдвинут в длинноволновую сторону относительно исходной полосы (до нагрева). Нельзя исключить, что одной из флуорофорных групп термолипофусцина является антралиловая кислота — продукт деградации белкового триптофана.

В экстрактах голов после часового прогрева дрозофил при температуре 48°C интенсивность голубой полосы возрастает вдвое, но без суще-

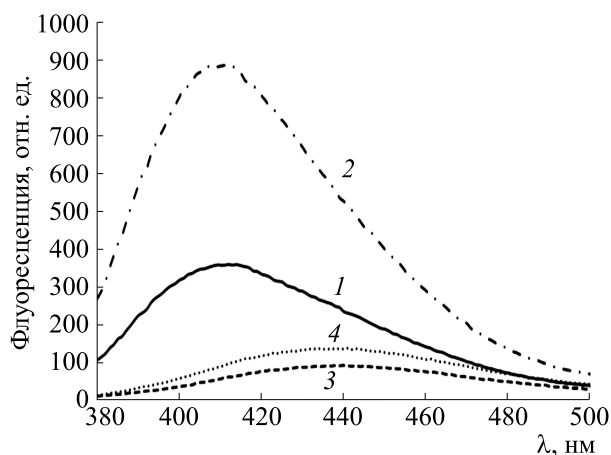


Рис. 4. Спектры голубой флуоресценции экстрактов туловищ и голов дрозофил до и после часового ультрафиолетового облучения мушек: 1 — туловище, контроль, 2 — туловище, опыт, 3 — голова, контроль, 4 — голова, опыт. Возбуждение флуоресценции — 360 нм.

ственного спектрального сдвига (рис. 3). Значит, в этом случае термолипофусцин сильно схож с исходным липофусцином. Можно предположить, что они оба в значительной степени являются продуктами деградации ретиналя, а не только белков.

После часового ультрафиолетового облучения дрозофил в спектрах голубой флуоресценции экстрактов туловищ и голов наблюдаются явления, аналогичные наблюдаемым при нагреве (рис. 4). Однако, в отличие от нагрева, для экстрактов туловищ при этом не наблюдается длинноволнового сдвига. Фотолипофусцин туловищ отличен от термолипофусцина туловищ. В случае же голов фотолипофусцин спектрально не отличается от исходного липофусцина голов. Вероятно, фотолипофусцин голов в значительной степени является продуктом фотодеградации ретиналя, а не только триптофановых остатков белков.

Предположение о важной роли триптофановых остатков белков в формировании голубой флуоресценции термолипофусцина и фотолипофусцина подтверждается данными по белковой флуоресценции.

На рис. 5 приведены спектры белковой флуоресценции экстрактов туловищ и голов после часового воздействия на дрозофил повышенной температуры. В обоих пробах после воздействия обнаруживается снижение интенсивности триптофановой полосы. Это согласуется со спектрофотометрическими данными. Значит, количество триптофановых остатков после прогрева дрозофил действительно заметно уменьшается. По-видимому, термолипофусцин, как и фотолипофусцин, образуется из любых триптофансодержащих белков. Повышенная температура может

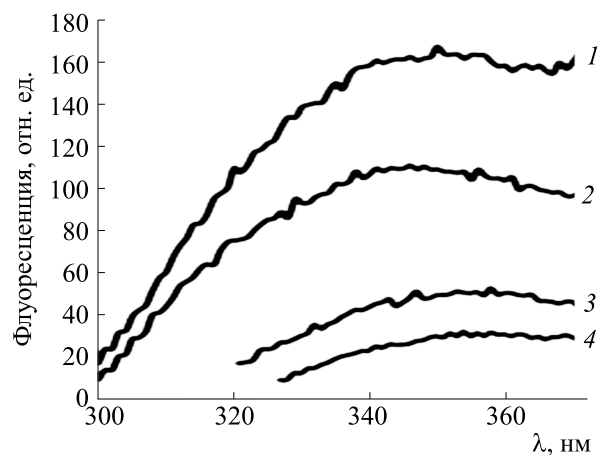


Рис. 5. Спектры белковой флуоресценции экстрактов туловищ и голов дрозофил после часового воздействия повышенной температуры (48°C): 1 — туловище, контроль, 2 — туловище, опыт, 3 — голова, контроль, 4 — голова, опыт. Возбуждение флуоресценции — 280 нм.

приводить как к образованию шиффовых оснований белков с окисленными липидами, так и к деградации триптофановых остатков до анраниловой кислоты. В обоих случаях должна возникать голубая флуоресценция термолипофусцинового «мусора» (при возбуждении на 360 нм), что и наблюдалось нами (см. рис. 3).

Сходное, но еще более выраженное падение триптофановой флуоресценции наблюдается в экстрактах туловищ после часового ультрафиолетового облучения (рис. 6). В экстрактах голов снижение тоже имело место, но было существенно меньше. Данный факт хорошо согласуется с тем, что при ультрафиолетовом облучении дрозофил в их головах возникает мало фотолипофусцина (рис. 4). Это можно объяснить тем, что ретиналь, поглощая ультрафиолетовый свет, экранирует собой белки, защищая триптофаны от ультрафиолетового воздействия. Вероятно, именно поэтому белки туловищ менее подвержены фотодеструкции, чем белки голов.

Вышеприведенные результаты хорошо согласуются с ранее полученными на митохондриях печени крысы [1, 6, 16,] и на нематодах [11] данными о важной роли деградации триптофановых остатков в формировании двух типов внутриклеточного «мусора» — нефлуоресцирующих межбелковых сшивок и флуоресцирующего липофусцина.

Итак, возникновение липофусцинового «мусора» в тушках и головах нелетающих дрозофил (*Drosophila melanogaster*, *vestigial*) под действием повышенной температуры или интенсивного ультрафиолетового облучения весьма сходно. Оно в значительной степени обусловлено дегра-

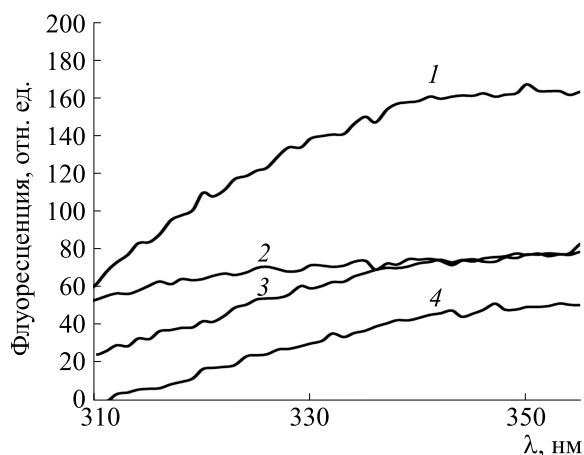


Рис. 6. Спектры белковой флуоресценции экстрактов туловищ и голов дрозофил после часового ультрафиолетового облучения: 1 – туловище, контроль, 2 – туловище, опыт, 3 – голова, контроль, 4 – голова, опыт. Возбуждение флуоресценции – 280 нм.

дацией триптофановых остатков белков и рети-
наля.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность А.М. Львову за участие в проведении предварительных экспериментов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. U. T. Brunk and A. Terman, *Eur. J. Biochem.* **269**, 1996 (2002).
2. A. Terman and U. T. Brunk, *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **106** (2), 265 (1998).
3. A. Höhn and T. Grune, *Redox Biol.* **1**, 140 (2013).
4. T. Jung, N. Bader, and T. Grune, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1119**, 97 (2007).
5. А. В. Чаплыгина и Н. Л. Векшин, *Биофизика* **64** (1), 101 (2019).
6. А. В. Чаплыгина и Н. Л. Векшин, *Успехи геронтологии* **31** (2), 197 (2018).
7. Н. Л. Векшин и М. С. Фролова, *Биофизика* **64** (1), 162 (2019).
8. N. Linford, C. Bilgir, J. Ro, and S. Pletcher, *J. Visual. Exp.* **71**, 1 (2013).
9. J. Miquel, P. Lundgren, K. Bensch, and H. Atlan, *Mechanisms of Ageing and Development* **5**, 347 (1976).
10. F. Scialo, A. Sriram, J. Enriquez, et al., *Cell Metabolism* **23**, 725 (2016).
11. Е. Л. Гагаринский и Н. Л. Векшин, *Успехи геронтологии*, № 5, 676 (2017).
12. M. S. Frolova and N. L. Vekshin, *Biochem. & Analyt. Biochem.* **7** (3), 357 (2018).
13. D. Denton, M. T. Aung-Htat, and S. Kumar, *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 3499 (2013).
14. F. Wood and J. H. Nordin, *Insect. Biochem.* **10**, 95 (1980).
15. R. S. Sohal, I. Svensson, and U. T. Brunk, *Mechanisms of Ageing and Development* **53**, 209 (1990).
16. М. С. Фролова, А. М. Сурин, А. В. Браславский и Н. Л. Векшин, *Биофизика* **60** (5), 1125 (2015).
17. N. L. Vekshin, *Photonics of Biopolymers* (Springer, 2002).
18. N. L. Vekshin, *Fluorescence Spectroscopy of Biomacromolecules* (Photon-Vek, Pushchino, 2009).
19. F. Schutt, B. Ueberle, M. Schnölzer, et al., *FEBS Lett.* **528** (1–3), 217 (2002).
20. H. Donato and R. S. Sohal, *Exp. Gerontol.* **13** (3–4), 171 (1978).

The Formation of Lipofuscin in *Drosophila* after Exposure to Elevated Temperature and UV Radiation

A.E. Krylova, A.V. Chaplygina, and N.L. Vekshin

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

In this work, we studied by spectroscopy how exposure to elevated temperature regime or intense UV radiation leads to the occurrence of lipofuscin debris in carcasses and heads of *Drosophila melanogaster* (*vestigial*). After one-hour exposure to elevated temperature (48°C) or UV radiation degradation of tryptophan residues followed by the appearance of blue fluorescence of thermo-lipofuscin or photo-lipofuscin, respectively, was observed in *Drosophila* carcasses and heads. Evidence suggests that tryptophan residues are actively involved in the formation of these lipofuscins. Thermal and photo-destruction of retinal of the eye rhodopsin were also seen.

Keywords: lipofuscin, retinal, *Drosophila melanogaster*, ultraviolet irradiation