

ПОСТМИТОЛИПОФУСЦИН И ТЕРМОМИТОЛИПОФУСЦИН В ГОМОГЕНАТАХ ОРГАНОВ КРЫСЫ

© 2019 г. А.В. Чаплыгина, Н.Л. Векшин

*Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение Федерального исследовательского центра
«Пуцинский научный центр биологических исследований РАН»,
142290, Пушкино Московской области, Институтская ул., 3*

E-mail: nvekshin@rambler.ru

Поступила в редакцию 21.12.17 г.

После доработки 20.09.18 г.

Принята к публикации 13.12.18 г.

Проведено сравнение содержания липофусцина – «пигмента старения» – в четырех органах крысы (печень, почки, сердце, мозг), а также, для сравнения, в суспензии «теней» митохондрий печени. Доказано, что в случае печени липофусцин, поглощающий ультрафиолетовый свет при 360 нм и флуоресцирующий при 460 нм, имеет в основном постмитохондриальную природу. Показано, что наименьшее содержание липофусцина наблюдается в сердце, при этом количество липофусцина в остальных органах, рассчитанное на 1 мг белка, примерно совпадает. На основании спектральных данных и измерения времени жизни возбужденного состояния предполагается, что значительный вклад в флуоресценцию липофусцина органов вносят останки старых митохондрий – постмитохондрий, содержащих постмитолипофусцин. Помимо флуоресцирующего липофусцина во всех органах обнаруживаются нефлуоресцирующие белковые агрегаты, наибольшее количество которых присутствует в сердце, а наименьшее – в печени. Среди них значительную долю составляют ковалентно сшитые агрегаты, не разрушаемые детергентом. С помощью умеренного нагрева гомогенатов указанных органов получен термолипофусцин. Наименьшей способностью к его образованию обладает гомогенат сердца, а наибольшей – гомогенат мозга. Значительный вклад в термолипофусцин гомогенатов органов вносят, по-видимому, термомитолипофусцин из мембран поврежденных митохондрий. В формировании термолипофусцина активно участвуют ароматические остатки – тирозины и триптофаны.

Ключевые слова: старение, липофусцин, митохондрии, белковые агрегаты, флуоресцентная спектроскопия.

DOI: 10.1134/S0006302919010125

Старение – сложный биологический процесс, представляющий собой совокупность нарушений клеточных и межклеточных механизмов саморегуляции, накопления метаболических повреждений в клетках и сдвигов нейрогуморальной регуляции [1]. Клетка претерпевает значительные дегенеративные изменения, в частности, происходит нарушение структуры и функции митохондрий, что приводит к сокращению генерации энергии. Структурные изменения в различных клетках при старении весьма разнообразны: в некоторых клетках увеличивается число ядер, изменяются размеры митохондрий, появляется излишняя шероховатость эндоплазматической сети и наблюдается увеличение числа рибосом [2].

Особенно отчетливые изменения в процессе клеточного старения проявляются в накоплении «внутриклеточного мусора» – в виде гранул

липофусцина [3,4]. Количество липофусцина в клетках увеличивается не только при старении организма, но также при патологиях и атрофии органов. Накопление большого количества липофусцина в тканях придает им бурый цвет [5]. Наиболее подверженными накоплению липофусцина являются долгоживущие неделящиеся специализированные клетки: нейроны, кардиомиоциты и др. (соответственно имеем нейролипофусцин, кардиолипофусцин и т.д.) [6]. Основные факторы, которые обуславливают появление липофусцина в клетках, до сих пор в деталях неизвестны, но считается, что важную роль играют перекиси липидов, возникающие под действием супероксида [6,7].

В результате чрезмерного накопления клеточных повреждений и внутриклеточного мусора при недостаточной активности лизосом и протеаз (а также при патологических процессах)

именно митохондрии в первую очередь деградируют в гранулы липофусцина [8–12]. При этом, в отличие от постмитохондрий, которые обычно внутри клетки разрушаются протеазами и лизосомами [10,13], гранулы постмитохондриального липофусцина не разрушаются. Постмитолипофусцин – липофусциновый мусор, образовавшийся в клетках из постмитохондрий, т.е. из старых митохондрий, утративших свои функции. Процесс митохондриальной деградации сопровождается образованием множества межбелковых и липид-белковых ковалентных сшивок [8]. В состав постмитолипофусцина, помимо денатурированных белков, входят окисленные липиды и другие вещества [14–16].

Ранее в нашей лаборатории на прогреваемой суспензии митохондрий из печени крысы было продемонстрировано возникновение заметного количества липофусцина в отсутствие лизосом, протеаз, экзогенных прооксидантов и принудительной аэрации [8]. Такой липофусцин, образующийся из митохондрий в результате умеренного нагревания изолированных или внутриклеточных митохондрий, удобно называть термомитолипофусцином. Его свойства (полоса поглощения при 360 нм, полоса голубого излучения при 460 нм и др.) похожи на свойства митолипофусцина, содержащегося в митохондриях исходно.

Остался открытым вопрос о том, каков вклад постмитохондриального мембранного липофусцина в суммарный клеточный липофусцин печени и других органов. Кроме того, помимо флуоресцирующего липофусцина, в стареющих клетках накапливаются нефлуоресцирующие агрегаты, в которых многие белки оказались прочно сшиты без образования флуоресцирующих шиффовых оснований [8]. Поэтому целью данной работы явилось сравнение исходного уровня флуоресцирующего липофусцина и нефлуоресцирующих белковых агрегатов в четырех органах зрелых крыс (печень, почки, сердце и мозг), а также тепловая индукция липофусцина (термолипофусцина) и нефлуоресцирующих агрегатов путем умеренного нагрева гомогенатов этих органов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены на гомогенатах органов 15-ти крыс (массой около 200 г) линии Wistar. Печень, почки, сердце и мозг животных помещали в ледяную среду 10 мМ трис-фосфата (pH 7,3), продавливали через пресс и гомогенизировали в диспергаторе Ultra-Turrax Tube Drive (IKA WORKS, Inc., Германия), вследствие чего происходило почти полное разрушение

тканей и крупных частиц. Полученный гомогенат центрифугировали при 1000 об/мин в течение 3 с, в результате чего быстро оседали крупные неразрушенные частицы, которые отбрасывали. Гомогенат из супернатанта расфасовывали на льду в пробирки типа Eppendorf по 1 мл, замораживали и хранили в морозильной камере. После размораживания пробы использовали для опытов.

Фракцию «теней» митохондрий (без внутреннего содержимого) получали из печени крыс при температуре 2°C в той же гипотонической среде (10 мМ трис-фосфат, pH 7,3) без сахарозы и ЭДТА; остальные условия были как при выделении обычных митохондрий [17]. Для этого сначала центрифугировали исходную общую суспензию на центрифуге J2-21 (Beckman, США) при 1000 g в течение 10 мин, в результате чего осаждались (и затем отбрасывались) клетки и другие крупные частицы. Далее супернатант повторно центрифугировали в течение 15 мин при 5000 g, в результате чего осаждались в основном тени митохондрий, которые затем суспендировали в той же среде (9 мл на 1,5 мл осадка), расфасовывали на льду в пробирки Eppendorf по 1 мл, замораживали и в последующем использовали для опытов. В результате заморозки–разморозки тени митохондрий разрывались, т.е. получались мембранные фрагменты.

Все пробы выравнивали по содержанию белка (0,35 мг/мл). Концентрацию белка определяли УФ-экспресс-методом [18]. Белковую тирозин-триптофановую и голубую липофусциновую флуоресценцию детектировали в условиях растворения гомогената детергентом додецилсульфатом натрия. Белковую тирозин-триптофановую флуоресценцию возбуждали при 275 нм, а липофусциновую – при 360 нм.

Для активации процесса образования липофусцина в гомогенатах *in vitro* использовали длительный умеренный нагрев, в результате чего получали термолипофусцин. Для этого разбавленные в 10 мМ трис-фосфатном буфере (pH 7,0) гомогенаты, помещенные в стерильные герметичные пробирки типа Eppendorf, нагревали и выдерживали 3 ч или 24 ч при 60°C в термошейкере TS-100 («Вектор-Бест», Россия).

Для предотвращения загрязнения гомогенатов микроорганизмами проводили стерилизацию и герметизацию пробирок. Контроль отсутствия загрязнения проводили с помощью оптической микроскопии.

Определение содержания липофусцина (по возгоранию голубой флуоресценции) и других агрегированных белков (по падению тирозин-триптофановой флуоресценции) в гомогенатах

органов проводили с помощью спектрофлуориметра Cary Eclipse (Agilent Technologies, США) в односантиметровых кварцевых кюветах при 20°C.

Поскольку при длительном умеренном нагревании возникала также агрегация частиц гомогената, приводящая к дополнительному светорассеянию, то количественные цифры по содержанию липофусцина мы получали в условиях растворения гомогенатов детергентом додецилсульфатом натрия, который разрушает мембраны и почти полностью дезинтегрирует нековалентные белковые комплексы. При этом липофусцин детергентом не разрушается, так как в нем между денатурированными белками имеются довольно прочные химические связи, как минимум – конъюгаты шиффовых оснований, флуоресцирующие в голубой области. Добавление указанного детергента к гомогенатам (после завершения инкубации) резко уменьшало величину светорассеяния и устраняло тиндаль-релеевский гипохромизм [19], что позволяло надежно измерять малые количества липофусцина по интенсивности его флуоресценции (на фоне сравнительно больших концентраций общего белка).

Дополнительно к этому проводили измерения времени жизни возбужденного состояния (τ) липофусцина фазово-модуляционным методом [18] при помощи спектрофлуориметра SLM-4800 (ISS, Inc., США). Частота модуляции составляла 30 МГц. Для усиления слабой липофусциновой флуоресценции использовали зеркальные кюветы [18].

Образование нефлуоресцирующих сшивок между белками детектировали (после обработки 1%-м раствором додецилсульфата натрия) на спектрофотометре ПЭ-5400 УФ («Промэколаб», Россия) по изменению светорассеяния – оптической плотности образца при 700 нм, где отсутствуют полосы поглощения. Стоит учитывать, что в этом случае оптическая плотность при 700 нм эквивалентна рассеиванию, так как в этой области не происходит поглощения света никакими из присутствующих в образце веществ [19].

Обработку данных производили с помощью программы Sigma Plot 12.5. Значения в графиках и таблицах являются усредненными данными по всем экспериментам. Для анализа достоверности наблюдаемых различий использовали непараметрические критерии Вилкоксона и Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Все спектры приведены за вычетом фонового спектра буфера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее в нашей лаборатории были проведены опыты по получению термомитолипофусцина непосредственно на суспензии очищенных печеночных митохондрий [8]. При этом в качестве среды выделения и хранения митохондрий использовался буфер, содержащий сахарозу и ЭДТА. Применение сахарозы и ЭДТА является общепринятым, так как они стабилизируют сохранность митохондрий [20]. Однако недавно мы выяснили, что ЭДТА замедляет образование термолитофусцина, а сахароза – ускоряет (данные не приводятся), поэтому в данной работе при гомогенизации органов и их инкубации использовали буфер без ЭДТА и сахарозы, чтобы не влиять на образование термолитофусцина в ходе инкубации.

Одним из важных свойств липофусцина является его интенсивная флуоресценция в голубой области при возбуждении в ближней УФ-области [18]. Заметное количество липофусцина, флуоресцирующего в районе 460 нм, обнаруживается исходно в гомогенатах всех четырех органов (табл. 1), т.е. у зрелых крыс в печени, почках, сердце и мозге уже есть небольшое количество липофусцина, детектируемое высокочувствительным спектрофлуориметрическим методом, но не обнаруживаемое с помощью оптической микроскопии. Стоит отметить, что количество нерастворимых компонент в образце пренебрежимо мало и не вносит разностного вклада в измерение флуоресценции образцов.

Во всех гомогенатах небольшой вклад в исходную голубую флуоресценцию в принципе могли давать также НАДН и НАДФН. Однако поскольку каждый гомогенат обрабатывали детергентом лишь через три часа инкубации (при 60°C в опытах с нагревом и 6°C – в контрольных опытах без нагрева), то НАДН и НАДФН успевали за это время полностью окислиться до нефлуоресцирующих НАД и НАДФ (данные не приводятся). Поэтому голубая флуоресценция принадлежала исключительно липофусцину.

На рис. 1 приведены спектры излучения в голубой области гомогената мозга крысы, полностью разрушенного и растворенного при помощи додецилсульфата натрия. Аналогичные липофусциновые спектры получены для гомогенатов печени, почек и сердца, причем в этих трех органах обнаруживается также интенсивная полоса флавиновой флуоресценции (при 525 нм, данные не приведены). В гомогенате мозга такой полосы нет, т.е. в мозге чрезвычайно мало флавопротеинов. Это облегчает детекцию нейролитофусцина. В остальных слу-

Таблица 1. Количество нативных белков и липофусцина, измеряемое по их флуоресценции, до и после тепловой инкубации гомогенатов при 60°C

	$F_{\text{трп}} \text{ исх.}$	$F_{\text{трп}} \text{ 3 ч}$	%	$F_{\text{трп}} \text{ 24 ч}$	%	$F_{\text{лф}} \text{ исх.}$	$F_{\text{лф}} \text{ 3 ч}$	%	$F_{\text{лф}} \text{ 24 ч}$	%
Тени МХ печени	326	248*	24	172*	47	33,9	39,1	15	50,2*	48
Печень	336	248*	26	190*	43	31,3	39,7*	27	67,8*	116
Почки	333	179*	46	140*	58	25,3	31,7*	25	68,5*	170
Сердце	319	227*	29	183*	42	13,9	16,5	19	22,2*	60
Мозг	321	190*	40	135*	58	24,5	45,3*	85	109,3*	346

Примечание. Тирозин-триптофановая флуоресценция (возбуждение 275 нм, излучение от 290 до 390 нм) и липофусциновая флуоресценция (возбуждение 360 нм, излучение от 400 до 480 нм) измерены при 20°C после растворения гомогенатов в 1%-м растворе додецилсульфата натрия; цифры по липофусциновой флуоресценции приведены за вычетом вклада флавиновой полосы; содержание белка везде 0,35 мг/мл. Значения интенсивности флуоресценции выражены в относительных единицах; * – $p < 0,05$.

чаях вычитание вклада флавиновой полосы проводили математически: для образцов подбирали концентрацию флавиномононуклеотида таким образом, чтобы его пик совпадал с флавиновым пиком гомогената, после чего из максимума флуоресценции липофусцина вычитали величину флуоресценции флавина в этой же точке.

Содержание липофусцина в разных органах не одинаково, особенно его мало в сердце – примерно вдвое меньше (табл. 1).

В суспензии теней печеночных митохондрий содержание липофусцина сравнимо с содержанием в гомогенате печени (на мг белка), то есть можно предположить, что в печени липофусцин образуется преимущественно из мембран митохондрий. Внутреннее содержимое ми-

тохондрий не дает существенного вклада. Это согласуется с тем, что ДНК и РНК не участвуют в образовании липофусцина [8].

Трехчасовой прогрев гомогената мозга при 60°C вызывает увеличение содержания липофусцина на 85% относительно исходного уровня, а 24-часовой – в 3,5 раза (рис. 1, табл. 1). Этот термолипофусцин спектрально сходен с тем, который образовывался в печени, а также в суспензии теней печеночных митохондрий. Можно предположить, что он имеет в значительной степени митохондриальную природу, т.е. это в основном термомитопофусцин.

Аналогичные данные по образованию термолипофусцина получены на гомогенатах почек, сердца и печени (табл. 1). Интересно, что хуже всего термолипофусцин образуется в сердце, а лучше всего – в мозге и почках.

Для уточнения природы термолипофусцина в разных органах мы измерили белковую (триптофановую и тирозиновую; возбуждение 275 нм) флуоресценции гомогенатов до и после их трехчасового прогревания при 60°C. Поскольку термолипофусцин возникает за счет образования конъюгатов шиффовых оснований, то в случае участия в этом триптофановых и тирозиновых остатков должно наблюдаться снижение их флуоресценции. Действительно, триптофановая и тирозиновая флуоресценция белков гомогената мозга после трехчасового прогревания при 60°C снижалась на 40% (рис. 2, табл. 1). Столь сильное падение означает, что в формировании термолипофусцина участвует примерно 40% белков гомогената. Интенсивность белковой флуоресценции при суточном прогреве (при 60°C) снизилась на 58% относительно исходного уровня. Аналогичные данные получены для гомогенатов печени, почек и сердца (табл. 1).

При этом важно отметить факт заметного падения оптической плотности в ультрафиоле-

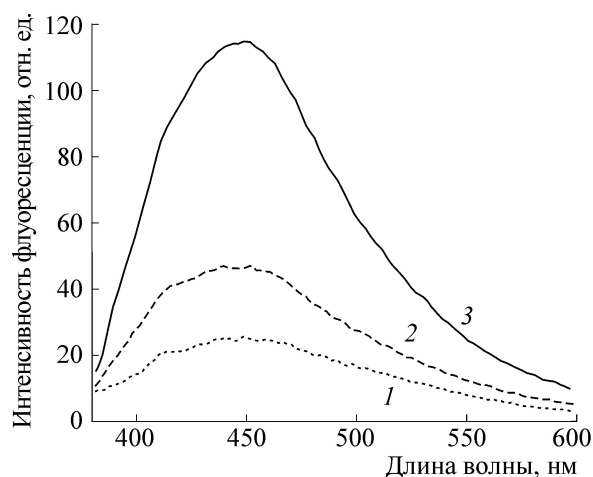


Рис. 1. Спектры липофусциновой флуоресценции гомогената мозга крысы: исходный (1), после трехчасовой инкубации гомогената при 60°C (2) и после 24-часовой инкубации при той же температуре (3). Спектры измерены после растворения гомогенатов в 1%-м растворе додецилсульфата натрия. Длина волны возбуждения – 360 нм.

Таблица 2. Оптическая плотность детергентных гомогенатов органов при 275 нм исходно и после термоинкубации гомогенатов

Орган	Исходно	Нагрев 3 ч	Нагрев 24 ч
МХ печени	0,70	0,62*	0,52*
Печень	0,71	0,59*	0,50*
Почки	0,72	0,52	0,47*
Сердце	0,72	0,66*	0,50*
Мозг	0,75	0,60*	0,44*

Примечание. Содержание белка везде 0,35 мг/мл, использована односантиметровая кювета, значения оптической плотности выражены в относительных единицах; * – $p < 0,05$.

Таблица 3. Время жизни возбужденного состояния липофусцина до и после термоинкубации гомогенатов

Орган	$\tau_{\text{исх.}} \text{ нс}$	$\tau_{3 \text{ ч.}} \text{ нс}$	$\tau_{24 \text{ ч.}} \text{ нс}$
Тени МХ печени	$6,8 \pm 0,5$	$11,6 \pm 0,5^*$	$14,3 \pm 0,5^*$
Печень	$7,9 \pm 1,5$	$10,4 \pm 1,5^*$	$6,8 \pm 0,5^*$
Почки	$6,4 \pm 1,5$	$8,3 \pm 1,5$	$4,6 \pm 0,5^*$
Сердце	$6,4 \pm 1,5$	$8,1 \pm 1,5$	$6,4 \pm 1,5$
Мозг	$6,6 \pm 0,5$	$9,2 \pm 0,5^*$	$11,1 \pm 0,5^*$

Примечание. Длина волны возбуждения 360 нм, излучения – 460 нм. Измерено после растворения гомогенатов в 1%-м растворе додецилсульфата натрия, * – $p < 0,05$.

товой области спектра при 275 нм (где поглощают триптофаны и тирозины) при нагреве всех образцов (табл. 2). Этот факт означает, что триптофаны и тирозины как-то химически изменяются (разрушаются). Это еще раз подтверждает наше предположение о том, что ароматические остатки белков активно участвуют в образовании термолипофусцина.

Фазово-модуляционным методом мы измерили время жизни возбужденного состояния (τ) липофусцина и термолипофусцина разных органов (табл. 3). Оказалось, что исходное время жизни липофусцина не сильно различается у всех гомогенатов, что говорит о сходстве липофусцина разных органов.

Поскольку τ липофусцина суспензии теней печеночных митохондрий не слишком (в пределах ошибки измерения) отличается от τ липофусцина гомогената печени (табл. 3), то это еще раз свидетельствует в пользу того, что в печени липофусцин образуется преимущественно из мембран митохондрий.

Интересно, что время жизни τ термолипофусцина, измеренное после термоинкубации, в некоторых образцах выше, чем исходное значение. Особенно сильно (примерно вдвое) τ выросло в случае 24-часового прогрева теней

митохондрий печени и гомогената мозга. Можно предположить, что либо термолипофусцин в разных органах попадает в разное микроокружение, или же возникает второй центр излучения – с высоким τ .

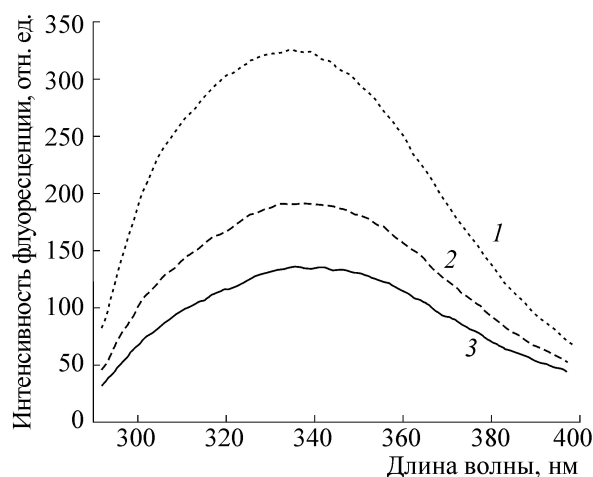


Рис. 2. Спектры белковой тирозин-триптофановой флуоресценции гомогената мозга крысы: исходный (1), после трехчасовой инкубации гомогената при 60°C (2) и после 24-часовой инкубации при той же температуре (3). Измерено после растворения гомогенатов в 1%-м растворе додецилсульфата натрия. Длина волны возбуждения – 275 нм.

Таблица 4. Оптическая плотность проб при 700 нм

Орган	Исходно	Через 3 ч	Через 24 ч
Тени МХ печени	0,009	0,028*	0,054*
Печень	0,003	0,014*	0,061*
Почки	0,006	0,027*	0,050*
Сердце	0,012	0,020*	0,055*
Мозг	0,010	0,026*	0,046*

Примечание. Содержание белка везде 0,35 мг/мл, значения оптической плотности выражены в относительных единицах;
* – $p < 0,05$.

Дополнительно мы проводили измерение нефлуоресцирующих белковых ковалентных сшивок, определяемых по изменению светорассеяния при 700 нм после разрушения гомогенатов детергентом (табл. 4). Оказалось, что все органы зрелых крыс содержат небольшое количество таких белковых сшивок. Наибольшее количество межбелковых сшивок исходно имеется в сердце.

После нагрева гомогенатов разных органов во всех них наблюдалось увеличение светорассеяния, не устранимого детергентом. Это означает, что при прогревании образуется много прочных межбелковых сшивок, а не только шиффовы основания липофусцина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. В. Медведев, Д. А. Москалев, А. А. Кауров и др., *Клин. геронтология* **16** (9–10), 52 (2010).
2. А. А. Кишкун, *Биологический возраст и старение: возможности определения и пути коррекции* (ГЭОТАР-Медиа, Москва, 2008).
3. J. W. Boellaard, K. Harzer, and W. Schlote, *Ultrastruct. Pathol.* **30**, 387 (2006).
4. U. T. Brunk and A. Terman, *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 611 (2002).
5. О. В. Зайратьянц, С. П. Бойкова и Д. А. Дорофеев, *Патологическая анатомия. Атлас: учебное пособие* (ГЭОТАР-Медиа, Москва, 2010).
6. A. Terman and U. T. Brunk, *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scandinavica* **106**, 265 (1998).
7. T. Jung, N. Bader, and T. Grune, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1119**, 97 (2007).
8. М. С. Фролова, А. М. Сури, А. В. Браславский и Н. Л. Векшин, *Биофизика* **60**, 1125 (2015).
9. L. A. Granier, K. Langley, C. Leray, and L. Sarlieve, *Eur. J. Clin. Invest.* **11**, 1011 (2000).
10. U. T. Brunk and A. Terman, *Eur. J. Biochem.* **269**, 1996 (2002).
11. A. Hohn, A. Sittig, T. Jung, et al., *Redox Biol.* **1** (1), 140 (2013).
12. T. von Zglinicki, E. Nillson, W. D. Docke, and U. T. Brunk, *Gerontology* **41**(2), 95 (1995).
13. A. Höhn and T. Grune, *Redox Biol.* **1**, 140 (2013).
14. F. Schutt, B. Ueberle, M. Schnulzer, et al., *FEBS Lett.* **528**, 217 (2002).
15. S. Warburton, K. Southwick, R. M. Hardman, et al., *Molec. Vision* **11**, 1122 (2005).
16. S. M. Azarian, I. McLeod, C. Lillo, et al., *Proteome Res.* **5**, 521 (2006).
17. Н. Л. Векшин, *Биол. науки* **4**, 107 (1998).
18. Н. Л. Векшин, *Флуоресцентная спектроскопия биополимеров* (Фотон-век, Пушино, 2009).
19. Н. Л. Векшин, М. С. Фролова, В. И. Ковалев и Е. А. Бегунова, *Биофизика* **60**, 129 (2015).
20. V. Prachayasittikul, C. Isarankura-Na-Ayudhya, T. Tantimongkolwat, et al., *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **39**, 901 (2007).

Mitochondrial Lipofuscin and Thermomitochondrial Lipofuscin in Organ Homogenates of Rats

A.V. Chaplygina and N.L. Vekshin

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

We compared lipofuscin (age pigment) amounts in four organs of rats: the liver, kidney, heart muscle, brain, and in a suspension of “shadows” of hepatic mitochondria. It has been proven that in the liver lipofuscin, that absorbs UV at 360 nm and emits fluorescence at 460 nm, is predominantly formed due to mitochondrial processes. The presence of the lowest amount of lipofuscin was found in the heart muscle, but the lipofuscin level, calculated per mg of protein, in other tissues was approximately the same. Based on spectral data and the measurement of the lifetime of the excited state, it is assumed that a considerable contribution to the fluorescence of lipofuscin in various organs belongs to mitochondrial lipofuscin. In contrast to lipofuscin, a fluorescent pigment, there exist non-fluorescent protein aggregates in all organs: the highest amount of these aggregates is detected in the heart muscle, and the smallest one in the liver. Among them, a significant proportion are covalently cross-linked aggregates that are not destroyed by the detergent. Thermolipofuscin was formed upon moderate heating of homogenates from the said organs. The level of thermolipofuscin formation is higher in brain than in heart homogenate. Thermomitochondrial lipofuscin from the membranes of damaged mitochondria appears to have significantly contributed to the formation of thermolipofuscin in organ homogenates. Aromatic residues, tyrosine and tryptophan, are actively involved in the formation of thermolipofuscin.

Keywords: aging, lipofuscin, mitochondria, protein aggregates, fluorescent spectroscopy