

ДЕГРАДАЦИЯ МИТОХОНДРИЙ В ЛИПОФУСЦИН ПРИ НАГРЕВЕ И ОСВЕЩЕНИИ

© 2015 г. М.С. Фролова, А.М. Сурин*, А.В. Браславский**, Н.Л. Векшин

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3;

**Институт общей патологии и патофизиологии РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8;*

***BRL Laboratory 2F-1, 10651, Тайбей, Тайвань*

E-mail: nvekshin@rambler.ru

Поступила в редакцию 10.07.15 г.

После доработки 21.07.15 г.

Показано, что выделенные митохондрии могут подвергаться трансформации в липофусциновые гранулы без участия каких-либо дополнительных факторов (насыщение кислородом, прооксиданты) медленно спонтанно при невысокой температуре, быстро при нагреве (термолитофусцин) или при УФ-облучении (фотолипофусцин). Основной вклад в образование митохондриального липофусцина вносят денатурированные белки. При этом образование термолитофусцина зависит от перекисного окисления липидов, а образование фотолипофусцина при облучении УФ не требует наличия липидов. Показано, что для корректного измерения количества липофусцина по его флуоресценции необходимо использование детергента, разрушающего митохондрии.

Ключевые слова: митохондрии, липофусцин, флуоресценция, митофагия, активные формы кислорода, митохондриальные болезни.

Митохондрии нормальных клеток стареют и затем подвергаются разрушению, перевариваясь лизосомами в процессе митофагии или лизируясь протеосомами [1,2]. Если активность лизосом и протеасом недостаточна, то митохондрии деградируют в гранулы липофусцина. Почти век назад было установлено [3,4], что гранулы липофусцина имеют преимущественно белковую природу. В состав гранул липофусцина могут входить также окисленные липиды и другие вещества [5–7]. Например, в модельных опытах [8] конъюгаты шиффовых оснований, образовавшихся при конденсации двух молекул трансретиналя и фосфотидилэтаноламина, обладали спектрами флуоресценции, сходными с флуоресценцией внутриклеточных гранул липофусцина. В работе [9] при взаимодействии лизина и гидроксиноненала (одного из основных продуктов перекисного окисления липидов) был детектирован липофусцин-подобный флуоресцирующий конъюгат. Таким образом, существуют разные виды липофусцин-подобных продуктов, в зависимости от объектов, из которых они получаются.

В живой клетке основным источником гранул липофусцина служат стареющие митохондрии. Это связано, во-первых, с тем, что ми-

тохондрии имеют достаточно крупный размер (около 1 мкм) и поэтому хорошо видны в оптический микроскоп, во-вторых, их очень много (500–5000 штук на клетку) и, в-третьих, они генерируют супероксид (в норме, как известно, ~ 5% от всего потребляемого кислорода), который инициирует перекисное окисление липидов.

Количество липофусцина в клетках увеличивается при старении организма, а также при патологиях, при атрофии органов. Накопление липофусцина в тканях придает им бурый цвет. Особенно резко темнеют сердце и печень. Основные факторы, которые обуславливают появление липофусцина в клетках, до сих пор в деталях неизвестны. Одним из важных агентов может быть супероксид [10,11].

Чем быстрее митохондрии стареют, тем больше липофусцина образуется в них. Наиболее подверженными накоплению липофусцина являются долгоживущие постмитотические (неделяющиеся) специализированные клетки: нейроны, кардиомиоциты и др. [11]. Накопление липофусцина способствует развитию таких нейромышечных дегенеративных синдромов, как паркинсонизм и бурая атрофия сердца [11].

Долгое время была общепринята митохондриально-лизосомальная теория образования липофусцина [2]. По этой версии поврежденные и старые митохондрии, попадая в активные лизосомы, подвергаются разрушению с помощью гидролитических ферментов. Однако в работе [12] авторы нарушали работу H^+ -АТФазы лизосом, тем самым останавливая гидролитическую активность лизосомальных ферментов, но липофусцин в клетках все равно образовывался. В последние годы появляется все больше работ, свидетельствующих о том, что процесс образования липофусцина может идти без участия лизосом. Например, «искусственный» липофусцин получали из лизированных эритроцитов при облучении УФ-светом [13]. Также показано формирование липофусцина при УФ-облучении митохондрий [14,15]. При УФ-облучении белков происходит разрушение триптофановых и тирозиновых остатков [16] и денатурация [17], причем скорость фотолиза белков в растворе обычно ниже, чем скорость фотоденатурации [18]. Опыты по УФ-облучению митохондрий имеют прямое отношение только к поверхностным слоям клеток: эпителию, роговице, сетчатке. В пионерской работе [19] авторы инициировали перекисное окисление липидов в митохондриях, используя высокие (миллимолярные) концентрации аскорбиновой кислоты и хлорида железа (III), тем самым запуская известную реакцию Фентона с образованием флуоресцирующих шиффовых оснований. Заметное автоокисление липидов и образование липофусцина в суспензии митохондрий может идти даже без добавления железа и аскорбиновой кислоты, если устроить принудительную аэрацию – продувку кислородом [20]. Эти модельные опыты показали принципиальную возможность инициации возникновения липофусцина в митохондриях в результате перекисного окисления липидов.

Целью нашей работы было продемонстрировать возможность возникновения липофусцина в суспензии митохондрий *in vitro* в отсутствие каких-либо экзогенных прооксидантов и принудительной аэрации. Мы также сравнили полученный термолипофусцин с фотолипофусцином.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Фракцию митохондрий из печени крыс выделяли в среде, содержащей 20 мМ трис-HCl и 250 мМ сахарозы (рН 7,7), при температуре 2°C стандартным методом с некоторыми модификациями [21]. Сначала центрифугировали исходную общую суспензию на BECKMAN J2-21

при 1000 g в течение 10–15 мин, в результате чего осаждались (и затем отбрасывались) клетки и другие крупные частицы. Супернатант центрифугировали в течение 15 мин при 5000 g, в результате чего осаждались в основном зрелые тяжелые митохондрии, которые затем суспендировали в той же среде (9 мл на 1,5 мл осадка), расфасовывали на льду в пробирки типа Eppendorf по 1 мл, замораживали и далее использовали для опытов.

Все пробы выравнивали по содержанию белка с помощью буфера (100 мМ сахарозы и 10 мМ трис-фосфата, рН 7,0). Митохондрии разводили стерильным буфером до концентрации 0,3 мг/мл (в стерильных пробирках, под ламинаром). Концентрацию митохондриального белка определяли УФ-экспресс-методом [22]. Концентрация других белков – трипсина, лизоцима и бычьего сывороточного альбумина – в модельных опытах без митохондрий также составляла 0,3 мг/мл. Концентрация растворенной ядерной ДНК составляла 0,16 мг/мл и была эквивалентна (по нуклеотидам) концентрации митохондриальной ДНК.

Образование липофусцина в суспензии митохондрий детектировалось по появлению характерной полосы флуоресценции в области 460 нм при возбуждении в районе 360 нм. При этом интенсивность флуоресценции эндогенных пиридиннуклеотидов была пренебрежимо малой. Для активации процесса спонтанного образования липофусцина в митохондриях использовали длительный нагрев. Для этого разбавленную суспензию митохондрий (0,3 мг/мл), помещенную в стерильную герметичную 15-миллилитровую пластиковую пробирку, нагревали в термостате 24 ч при температуре 37°C или 3 ч при 49°C.

Другим способом активации появления липофусцина было УФ-облучение. Облучение суспензии митохондрий в 1-сантиметровой кювете осуществляли с помощью ксеноновой лампы мощностью 450 Вт в течение 1 ч при перемешивании. Перед всеми образцами стоял тепловой инфракрасный фильтр (большая 2-сантиметровая кварцевая кювета с водой), пропускающий видимое и УФ-излучение. Температура образца в кювете в конце облучения не превышала 34°C. Температура в контроле была 28°C.

Спектры флуоресценции полученных образцов записывали на модернизированных спектрофлуориметрах Perkin-Elmer MPF-44B и Carry ECLIPSE (США) в 1-сантиметровых кварцевых кюветах при 20°C и нормальном парциальном давлении кислорода. В ряде опытов, где интенсивность флуоресценции была низкой,

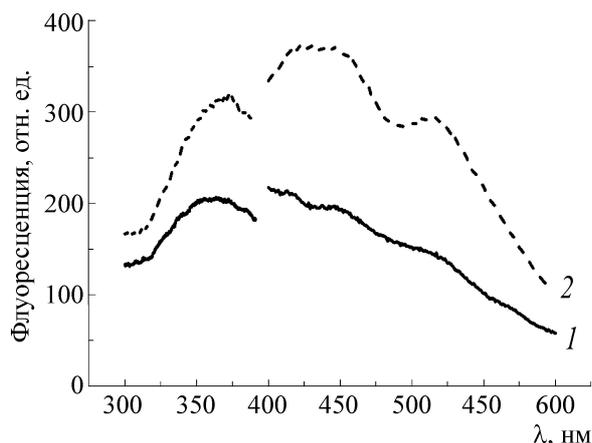


Рис. 1. Спектр возбуждения (слева; излучение – 460 нм) и излучения (справа; возбуждение – 360 нм) митохондрий (0,3 мг/мл) до инкубации (1) и после инкубации 3 ч при 49°C (2).

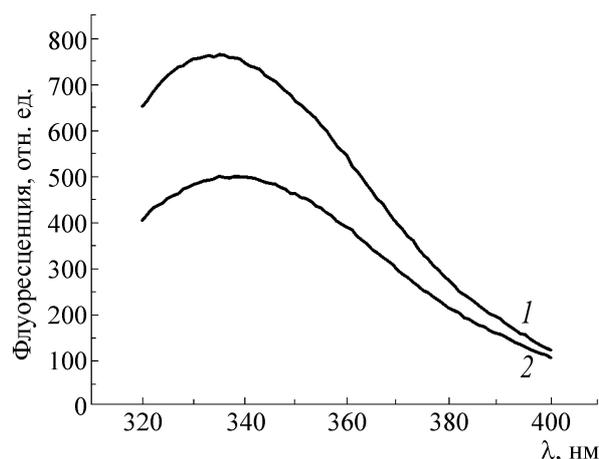


Рис. 2. Спектр триптофановой флуоресценции митохондрий (возбуждение – 286 нм) исходно (1) и после 3-часовой инкубации при 49°C (2).

использовали зеркальные кюветы, позволяющие усилить сигнал в несколько раз [23].

Уровень перекисного окисления липидов в митохондриях был определен с помощью теста с тиобарбитуровой кислотой на малоновый альдегид, модифицированного нами [24]. К суспензии митохондрий (3 мг/мл) в пробирках в ряде опытов добавляли (в контроле не добавляли) сукцинат или гидрокарбонат (по 300 мкМ) и инкубировали при 37°C в течение двух часов. Затем в каждую пробу добавляли 2 мл 17%-го раствора трихлоруксусной кислоты и 1 мл 3%-го раствора тиобарбитуровой кислоты и ставили на водяную баню при 60°C на 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры проводили измерения оптической плотности при 532 нм на спектрофотометре «ПромЭкоЛаб-5400УФ» (Санкт-Петербург) или «М-40» (ГДР).

Обработку данных производили с помощью программ MS Office Excel 2007 и OriginPro 8.5. Значения в графиках и таблицах являются усредненными данными по трем–пяти экспериментам. Все спектры приведены за вычетом фонового спектра буфера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из важных свойств липофусцина является его интенсивная флуоресценция в синей области [1,5,13] при возбуждении в ближней УФ-области. В наших опытах наблюдалось возникновение интенсивной липофусциновой флуоресценции после длительного нагрева суспензии митохондрий (рис. 1). В спектре возбуждения видна полоса с максимумом при 360 нм. В спектре излучения проявилась характерная для

липофусцина полоса с максимумом при 460 нм (при возбуждении 360 нм). Нужно отметить, что небольшое количество липофусцина в суспензии митохондрий есть даже исходно, без нагрева.

Для выяснения природы происхождения липофусцина была измерена триптофановая флуоресценция суспензии митохондрий до и после нагревания при 49°C в течение трех часов (рис. 2). Оказалось, что после нагревания произошел небольшой длинноволновый сдвиг максимума триптофановой флуоресценции белков митохондрий – от 335 нм до 338 нм, спектр немного уширился (от 60 до 64 нм) и существенно снизилась интенсивность – на 35%. Отсюда можно сделать заключение о наличии термоиндуцированных конформационных изменений белков, вызвавших приближение триптофановых остатков ближе к поверхности водной фазы (флуоресценция тушится молекулами воды). Наблюдаемые изменения по сути являются признаками мягкой денатурации белков. Этот результат подтверждает наш вывод о том, что липофусцин в митохондриях является продуктом агрегации и сшивок денатурированных белков.

Старение изолированных митохондрий в суспензии при длительном хранении без нагрева (в холодильнике при 4°C в течение суток, табл. 1) также сопровождалось появлением характерной полосы липофусциновой флуоресценции с максимумом в районе 460 нм. Это означает, что фактор времени является весьма важным.

Спонтанный процесс возникновения липофусцина в митохондриях заметно зависит от температуры. Инкубация митохондрий в тече-

Таблица 1. Образование липофусцина (измеренное по интенсивности флуоресценции) после нагрева и облучения различных объектов в разных условиях

Объект	Липофусцин, %
МХ исходно	100
МХ 2 ч при 37°C	130
МХ 24 ч при 4°C	190
МХ 24 ч при 37°C	270
МХ 3 ч при 49°C	190
МХ + аргон 5 мин* + 3 ч при 49°C	160
МХ + облучение в стеклянной кювете 1 ч	180
МХ + облучение 1 ч в кварцевой кювете (здесь и далее)	410
МХ + аргон 5 мин + облучение 1 ч	320
МХ + сукцинат 30 мин + облучение 1 ч**	230
БСА + облучение 1 ч	410
Лизоцим + то же	820
Трипсин + то же	240
ДНК + то же	110

Примечание. *После 5-минутной продувки митохондрий (МХ) аргоном в герметичной кювете количество кислорода (измеренного полярографически) было снижено на 50%, после чего проводилось облучение. **Преинкубация с 10 мМ сукцинатом 30 мин в герметичной кювете и последующее 1-часовое облучение. Приведены среднеарифметические округленные значения. БСА – бычий сывороточный альбумин.

ние 24 ч при 37°C давала гораздо больше липофусцина, чем при 4°C. Инкубация в течение 2 ч при 37°C была гораздо менее эффективной (табл. 1). Такая существенная зависимость от температуры означает, что суммарная скорость процесса лимитируется не стадией перекисного окисления липидов (свободно-радикальные реакции, как известно, не слишком сильно зависят от температуры), а какой-то более медленной

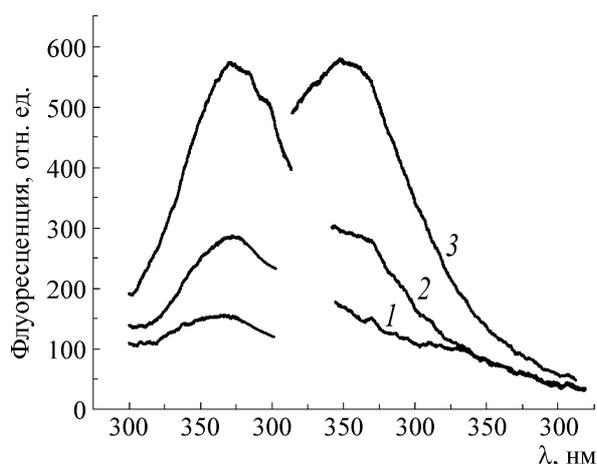


Рис. 3. Влияние облучения ксеноновой лампой на образование липофусцина в митохондриях (0,3 мг/мл): исходно (1), 1 ч в стеклянной кювете (2) и 1 ч в кварцевой кювете (3). Спектры возбуждения измерены при излучении 460 нм, а спектры излучения – при возбуждении 360 нм.

стадией. Можно предположить, что это – денатурация белков и их сшивки.

Одновременно с возникновением флуоресцентного пика липофусцина при 460 нм в суспензии стареющих митохондрий обнаруживается пик при 520 нм (рис. 1). Этот пик обусловлен, как было нами ранее показано [25], выходом эндогенных флавинов, прежде всего – FMN, из митохондрий в раствор (внутри митохондрий флавины флуоресцируют вдвое хуже, чем в растворе [26] из-за тиндаль-релеевского гипохромизма [27]). Выход FMN в раствор сопровождается утратой NADH-оксидазной активности дыхательной цепи, что ведет, как известно, к усилению NADH-индуцированной генерации супероксида, к супероксид-зависимым деструктивным процессам в митохондриях.

При продувании суспензии митохондрий аргоном образование липофусцина происходило гораздо хуже (табл. 1). Поскольку аргон, как известно, вытесняет из раствора кислород, то полученный результат означает, что образование термолипофусцина в митохондриях является кислород-зависимым, аналогично перекисному окислению липидов в модельной реакции Фентона [19].

Образование липофусцина в митохондриях резко активировалось мощным световым облучением (рис. 3). При этом наибольший вклад давал УФ-свет в диапазоне 220–320 нм (в стек-

лянной кювете, не пропускающей УФ короче 320 нм, количество образующегося липофусцина было гораздо меньше, чем в кварцевой кювете, хорошо пропускающей УФ). Полоса флуоресценции липофусцина, возникшего в ходе УФ-облучения митохондрий в течение 1 ч, характеризуется четким максимумом при 460 нм. Флавинового пика при 520 нм не обнаруживается из-за фотодеструкции FMN и FAD на сильном свете [18]. В спектре возбуждения образовавшегося липофусцина видна полоса при 360 нм (рис. 3).

Поскольку форма спектров возбуждения и излучения фотолитофусцина заметно отличается от формы спектров термолитофусцина, то это означает, что это два разных продукта деградации митохондрий.

При продувании суспензии митохондрий аргоном количество образующегося фотолитофусцина тоже заметно снижалось. Это означает, что образование фотолитофусцина происходит с участием кислорода. Заметное снижение образования фотолитофусцина наблюдалось также при предварительной 30-минутной инкубации митохондрий с 10 мМ сукцинатом в герметичной кювете (табл. 1), что обусловлено исчерпанием кислорода в результате дыхания митохондрий.

Поскольку и при УФ-облучении, и при длительном нагревании возникала агрегация митохондрий, приводящая к светорассеянию, то количественные цифры по содержанию липофусцина мы получали в условиях разрушения агрегатов детергентом додецилсульфатом натрия. В работе [20] авторы не использовали детергент, осаждавая центрифугированием основную массу частиц и используя только супернатант, они теряли тем самым большую часть липофусцина. Додецилсульфат натрия разрушает не только агрегаты, но и мембраны, дезинтегрируя белковые комплексы. Но он не разрушает липофусцин, так как между денатурированными белками и окисленными липидами в липофусцине образуются прочные химические связи типа конъюгатов шиффовых оснований. Добавление детергента в наших опытах резко уменьшает светорассеяние и устраняет тиндаль-релеевский гипохромизм [26], что позволяет измерять интенсивность флуоресценции липофусцина при большой концентрации взятых митохондрий.

Помимо регистрации интенсивности флуоресценции, мы измеряли степень поляризации флуоресценции липофусцина, по величине которой можно определить, в каком состоянии он находится – связанном или свободном. Оказалось, что липофусцин в митохондриях имеет

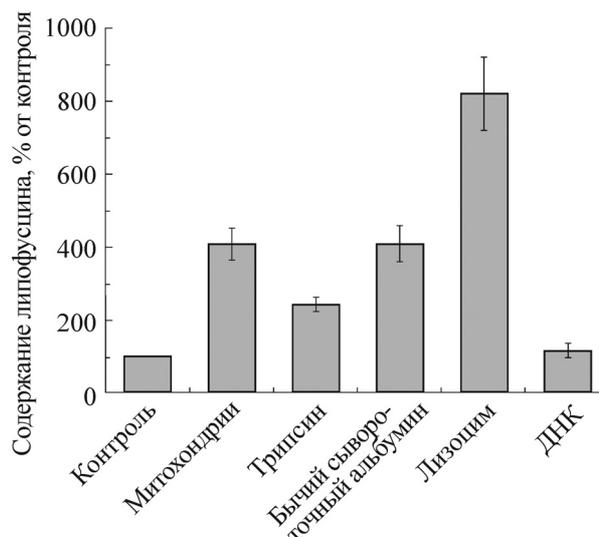


Рис. 4. Количество фотолитофусцина, возникшего в результате 1-часового УФ-облучения суспензии митохондрий, растворов индивидуальных белков и раствора ДНК. Измерено по интенсивности флуоресценции (возбуждение – 360 нм, излучение – 460 нм).

достаточно высокую степень поляризации ($> 0,3$), что обусловлено низкой вращательной подвижностью крупных белковых комплексов. Величина степени поляризации липофусцина в течение 3-часовой инкубации митохондрий при 49°C не изменялась, хотя количество липофусцина возрастало. Это означает, что липофусцин не выходит из митохондрий в раствор (при выходе в водную фазу степень поляризации должна была бы снизиться).

Мы провели также ряд контрольных опытов без митохондрий. Для этого мы использовали отдельные водорастворимые белки. В случае индивидуальных белков – альбумина, трипсина, лизоцима – длительный нагрев не приводил к образованию липофусцина. Это означает, что для возникновения термолитофусцина недостаточно наличия одних только белков. Воздействие же УФ-облучения на белки в растворе приводило к появлению характерной липофусцин-подобной флуоресценции, хотя не вызывало их агрегации. Это означает, что здесь фотолитофусцин имеет внутрибелковую природу, а не межбелковую. Интенсивность флуоресценции фотолитофусцина прямо пропорциональна количеству образующихся внутрибелковых шиффовых оснований.

В других контрольных опытах мы использовали ДНК. При облучении раствора ДНК в течение 1 ч полоса при 460 нм оказалась очень слабой (рис. 4, табл. 1) Это означает, что ДНК

Таблица 2. Перекисное окисление липидов в суспензии митохондрий (МХ) после нагрева (измерено фотометрически по комплексу тиобарбитуровая кислота–малоновый диальдегид)

Образец	D при 532 нм
МХ исходно	0,1
МХ после 2 ч инкубации при 37°C	0,35
То же в присутствии 0,3 мМ сукцината	0,24
То же в присутствии 0,3 мМ гидрокарбоната	0,22

в митохондриях вряд ли непосредственно участвует в формировании липофусцина.

В процессе УФ-облучения индивидуальных белков (лизоцима, трипсина, альбумина) мы убедились, что для образования из них фотолипофусцина не требуется присутствия липидной фракции, достаточно одного белка (рис. 4, табл. 1). Интересно, что при продувании аргоном образование фотолипофусцина заметно снижалось (табл. 1). Очевидно, что в процессе УФ-облучения триптофановые и тирозиновые остатки белков не только отдают энергию фотовозбуждения на пептидные колебания, на конформационные изменения, но и генерируют активные формы кислорода, сшивающие молекулу белка внутримолекулярно. В пользу сказанного говорит также то, что при термоинкубации индивидуальных белков (лизоцима, трипсина, альбумина) в течение трех часов при 49°C образования термолипофусцина не было.

Определение уровня перекисного окисления липидов в суспензии митохондрий с помощью теста на малоновый альдегид показало, что двухчасовая инкубация митохондрий при 37°C приводит к трехкратному усилению перекисного окисления липидов (табл. 2). Инкубация митохондрий в присутствии сукцината, активирующего их дыхание, или вытеснение кислорода с помощью углекислого газа, образующегося при спонтанном разложении гидрокарбоната натрия в водном растворе при 37°C, приводило к существенному снижению перекисного окисления липидов. Это коррелирует с уменьшением образования термолипофусцина.

Для образования термолипофусцина в митохондриях необходимы перекиси липидов. Именно поэтому термолипофусцин образуется в митохондриях, но не в индивидуальных белках. Для образования фотолипофусцина липиды, вообще говоря, не нужны.

Итак, липофусцин может образовываться в митохондриях спонтанно (без участия лизосом и каких-либо внутриклеточных веществ) за счет

реакций с участием собственных ионов железа (железосерных кластеров и цитохромов), эндогенных субстратов дыхательной цепи, липидов и белков. В живых клетках на этот процесс могут накладываться также другие факторы, ослабляющие или наоборот ускоряющие его (это будет темой отдельной статьи).

Авторы выражают признательность аспирантке Воронежского ГУ М.Н. Чижовой за участие в предварительных опытах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине, 2014», Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-34-50310/14) и фирмы BRL (Тайвань).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Höhn and T. Grune, *Redox Biol.* **1**, 140 (2013).
2. U. T. Brunk and A. Terman, *Eur. J. Biochem.* **269**, 1996 (2002).
3. B. Brahn and M. Schmidtman, *Virchows Arch. B*, **CCXXVII** (1920).
4. W. Hueck, in *Handbuch der allgemeine Pathologie*, Ed. by L. Krehl and F. Marchand (Hirzel, Leipzig, 1921), Bd. III. 2 Abt., Kap. 6, zz. 298–481.
5. F. Schutt, B. Ueberle, M. Schönölzer, et al., *FEBS Lett.* **528** (1–3), 217 (2002).
6. S. Warburton, K. Southwick, R. M. Hardman, et al., *Molec. Vision* **11**, 1122 (2005).
7. S. M. Azarian, I. McLeod, C. Lillo, et al., *J. Proteome Res.* **5**, 521 (2006).
8. N. E. Fishkin, J. R. Sparrow, R. Allikmets, and K. Nakanishi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** (20), 7091 (2005).
9. L. Tsai, P. A. Szweda, O. Vinogradova, and L. I. Szweda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (14), 7975 (1998).
10. T. Jung, N. Bader, and T. Grune, *Ann. N.-Y. Acad. Sci.* **1119**, 97 (2007).
11. A. Terman, and U. T. Brunk, *APMIS* **106** (2), 265 (1998).
12. A. Höhn, A. Sittig, T. Jung, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **53**, 1760 (2002).
13. A. Höhn, T. Jung, S. Grimm, and T. Grune, *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 1100 (2010).
14. Г. А. Попов и В. В. Конев, *Биофизика* **24**, 168 (1979).
15. T. von Zglinicki, E. Nillson, W. D. Docke, and U. T. Brunk, *Gerontology* **41** (2), 95 (1995).
16. И. И. Сапежинский, *Биофизика* **24**, 386–391 (1979).
17. Y. Watanabe, I. Horii, Y. Nakayama, and T. Osawa, *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 1796 (1991).
18. C. J. Dillard and A. L. Tappel, *Lipids* **6**, 715 (1971).
19. И. В. Шарова и Н. Л. Векшин, *Биофизика* **49** (5), 814 (2004).

20. K. S. Chio, U. Reiss, V. Fletcher, and A. L. Tappel, *Curr. Res.* **2**, 182 (1974).
21. Н. Л. Векшин, *Биол. науки* **4**, 107 (1988).
22. Н. Л. Векшин, *Флуоресцентная спектроскопия биополимеров* (Фотон-век, Пушкино, 2009).
23. Н. Л. Векшин, А. Ф. Ревин, и Н. В. Лазарева, *Мясные технологии* **3**, 44 (2007).
24. И. Б. Соколова и Н. Л. Векшин, *Биофизика* **53** (1), 73 (2008).
25. M. S. Frolova and N. L. Vekshin, *J. Fluorescence* **24** (4), 1061 (2014).
26. Н. Л. Векшин, М. С. Фролова, В. И. Ковалев и Е.А. Бегунова, *Биофизика* **60** (1), 129 (2015).
27. N. L. Vekshin, *Photonics of Biopolymers* (Springer-Verlag, Berlin, 2002).

Degradation of Mitochondria to Lipofuscin upon Heating and Illumination

M.S. Frolova*, A.M. Surin**, A.V. Braslavski***, and N.L. Vekshin*

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

***Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences,
ul. Baltiyskaya 8, Moscow, 125315 Russia*

****BRL Laboratory 2F-1, 65, Hsin Yi Rd., Sec. 3, Taipei, 10651 Taiwan*

In the present work, it has been shown that the isolated mitochondria can undergo transformation to lipofuscin granules without any additional factors (oxygen saturation, prooxidants). The process occurs spontaneously and slowly at low temperature, and rapidly – by heating (thermo-lipofuscin) or under UV irradiation (photo-lipofuscin). The main contribution to the formation of mitochondrial lipofuscin comes from denatured proteins. Thermo-formation of lipofuscin depends on lipid peroxidation, while the presence of lipids is not required for photo-lipofuscin formation. It is shown that the use of detergent able to degrade mitochondria is necessary to measure lipofuscin content properly.

Key words: mitochondria, lipofuscin, fluorescence, mitophagy, reactive oxygen species, mitochondrial diseases