


Адаптация сульфосфосфованилинового метода анализа общих липидов для различных биологических объектов на примере *Drosophila melanogaster*

М.А. Еремина , Н.Е. Грунтенко

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
 e-mail: eremina@bionet.nsc.ru


Аннотация. Липидный обмен имеет решающее значение в физиологии. В последние десятилетия модельный объект *Drosophila melanogaster* активно используется в изучении фундаментальных вопросов метаболизма липидов и его нарушений, включая ожирение, а также в поиске терапевтических целей для лечения метаболических нарушений у человека. Быстрое и точное количественное определение содержания липидов – важный шаг в решении этих задач. Впервые метод количественного измерения общих липидов с использованием сульфосфосфованилинового (СФВ) метода был описан Цольнером с коллегами в 1962 г., а адаптирован для насекомых Ван Генделем на самках желтолихорадочного комара *Aedes aegypti*. Преимущество этого метода по сравнению с традиционными гравиметрическим и хроматографическим методами анализа заключается в том, что он позволяет обходиться минимальным количеством биологического материала, не требует сложных манипуляций с образцом, является высокочувствительным, воспроизводимым и простым в реализации с минимальным набором оборудования. В настоящей работе описана модификация протокола Ван Генделя, позволяющая осуществлять адаптацию метода количественного определения общих липидов для различных организмов, на примере классической биологической модели *D. melanogaster*. В представленном протоколе адаптированы время реакции, объемы химических растворов и реагентов для проведения анализа образцов индивидуальных дрозофил. Данная работа является актуальной, так как описывает универсальную схему, согласно которой СФВ метод может быть адаптирован для количественного анализа содержания общих липидов у широкого спектра биологических объектов. Для проверки результативности модифицированного метода мы измерили содержание общих липидов у самок *D. melanogaster*, несущих гипоморфные мутации генов инсулинового сигнального каскада *dilp6* и *dfoxo*, по сравнению с линией дикого типа Canton-S и показали участие *dilp6*, но не *dfoxo* в регуляции жирового обмена. Полученные результаты подчеркивают эффективность колориметрического метода с использованием СФВ реакции и спектрофотометрии для количественного анализа содержания общих липидов.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*; сульфосфосфованилиновый метод; колориметрия; спектрофотометрия; общие липиды; жировой обмен; мутации *dilp6⁴¹* и *dfoxo^{BG01018}*.

Для цитирования: Еремина М.А., Грунтенко Н.Е. Адаптация сульфосфосфованилинового метода анализа общих липидов для различных биологических объектов на примере *Drosophila melanogaster*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(4):441-445. DOI 10.18699/VJ20.636

Adaptation of the sulfophosphovanillin method of analysis of total lipids for various biological objects as exemplified by *Drosophila melanogaster*

М.А. Eremina , N.E. Gruntenko

Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
 e-mail: eremina@bionet.nsc.ru

Abstract. Lipid metabolism is crucial in physiology. In recent decades the model object *Drosophila melanogaster* has been actively used in the study of the fundamental issues of lipid metabolism and its disorders, including obesity, as well as in the search for therapeutic goals for the treatment of metabolic disorders in humans. Quick and accurate quantification of lipid content is an important step in solving these problems. For the first time the method of quantitative measurement of total lipids with the use of the sulfophosphovanillin (SPV) method was described by Zöllner and colleagues in 1962, and adapted for insects by Van Handel on females of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. The advantages of this method compared to traditional gravimetric and chromatographic methods of analysis are the use of a small amount of biological material, lack of need for complex manipulations with the sample, its high sensitivity, reproducibility and simplicity of implementation with a minimum set of equipment. Here, a modification of the Van Handel protocol is described, which allows the method to be adapted for quantitative determination of total lipids for various organisms as exemplified a widely used model, *D. melanogaster*. To test the effectiveness of the modified

method, we measured the content of total lipids in *D. melanogaster* females carrying hypomorphic mutations of the *dilp6* and *dfoxo* insulin signaling pathway genes compared to the wild-type Canton-S line, and showed that *dilp6* took part in the regulation of fat metabolism, while *dfoxo* did not. The results obtained emphasize the effectiveness of the colorimetric method with the use of SPV reaction and spectrophotometry for the quantitative analysis of total lipids.
Key words: *Drosophila melanogaster*; sulfophosphovanillin method; colorimetry; spectrophotometry; total lipids; lipid metabolism; mutations *dilp6⁴¹* and *dfoxo^{BG01018}*.

For citation: Eremina M.A., Gruntenko N.E. Adaptation of the sulfophosphovanillin method of analysis of total lipids for various biological objects as exemplified by *Drosophila melanogaster*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(4):441-445. DOI 10.18699/VJ20.636 (in Russian)

Введение

Липидный обмен имеет решающее значение для выживания и размножения организмов, поскольку липиды формируют энергетический резерв организма и являются важными структурными компонентами клеточных мембран и сигнальными молекулами (Trinh, Boulianne, 2013). Для изучения механизмов регуляции метаболического обмена и его нарушений, включая ожирение, а также в поиске терапевтических целей для лечения метаболических нарушений у человека часто проводят исследования на различных животных моделях, от нематоды и дрозофилы до грызунов и приматов (Kleinert et al., 2018). *Drosophila melanogaster* подходит для моделирования метаболических заболеваний человека, поскольку, во-первых, большая часть генов и семейств генов, связанных с регуляцией углеводно-жирового метаболического пути, эволюционно консервативны у дрозофилы и человека; а во-вторых, дрозофила имеет менее сложный геном и меньшую избыточность генов, чем позвоночные, что дает значительные преимущества в изучении функций генов *in vivo* и определении новых компонентов пути (Liu, Huang, 2013; Álvarez-Rendón et al., 2018).

Консервативность распространяется и на функциональный уровень: жировое тело насекомого (аналог печени и белой жировой ткани млекопитающих) участвует в поглощении, запасании и обмене питательных веществ (Liu, Huang, 2013; Musselman, Kuhnlein, 2018). Содержание жира в организме мух может варьировать в широких пределах и служить чувствительным диагностическим критерием, указывающим на дисбаланс в метаболизме липидов (Hildebrandt et al., 2011). Быстрое и точное количественное определение уровня липидов очень важно при проведении исследований в этой сфере. К традиционным методам количественного определения липидов, как правило, относят гравиметрический или хроматографический методы анализа, недостатками которых считают сложность проведения, трудоемкость, использование большого количества исходного материала, что затрудняет выполнение небольших по объему анализируемого материала экспериментов (Anschau et al., 2017; Patel et al., 2019).

Ряд исследований доказывает, что колориметрический метод на основе сульфосфосфованилиновой (СФВ) реакции является универсальным: применяется для определения содержания общих липидов и в спинномозговой жидкости, и в сыворотке и плазме крови человека, и в пищевых продуктах и экологических образцах (Park et al., 2016). Метод анализа общих липидов у насекомых впервые описан Ван Генделем (Van Handel, 1985) для самки желтолихорадочного комара *Aedes aegypti*. В настоящее время данный колориметрический метод используется

для ряда других видов насекомых, в число которых входят сверчки *Gryllus bimaculatus* (Fukumura et al., 2018) и 15 представителей семейства жесткокрылых (Bozdoğan et al., 2016), а также модифицирован для эндопаразитов *Venturia canescens* (Foray et al., 2012), клещей *Ixodes ricinus* (Abdullah et al., 2018), рыб (Lu et al., 2008), простейших (Park et al., 2016) и хемолитотрофных микроорганизмов (Anschau et al., 2017). Стоит подчеркнуть, что метод, предложенный еще в 1962 г. (Zöllner et al., 1962; цит. по: Ростовцев, Резник, 1982), и сегодня не потерял актуальности и приобрел ряд модификаций, отвечающих современным целям и разнообразию объектов исследований.

Преимущество этого простейшего метода заключается в возможности анализа образцов малых объемов и в быстром количественном измерении содержания общих липидов (Park et al., 2016) с использованием минимального набора оборудования. Принцип метода основан на том, что СФВ реакция требует двойной связи углерод-углерод или свободных гидроксильных групп в липидных компонентах; концентрированная серная кислота вступает в реакцию с ненасыщенными липидами с образованием карбониевого аниона; фосфорная кислота вступает в реакцию с ванилином с образованием фосфатного эфира, приводя к увеличению реакционной способности карбонильной группы; карбониевый анион вступает в реакцию с карбонильной группой фосфованилина с образованием стабильного окрашенного комплекса (Knight et al., 1972). Интенсивность окрашивания может быть количественно определена путем измерения поглощения при 525–530 нм с использованием спектрофотометрических методов (Park et al., 2016).

Хотя колориметрический метод на примере количественного анализа содержания нейтральных липидов триглицеридов (90 % от всех липидов) был подвержен критике (Al-Anzi, Zinn, 2010), он показывает сходные результаты как с тонкослойной хроматографией, так и с колориметрическим анализом (Cheng et al., 2011; Tennesen et al., 2014; Byreddy et al., 2016).

Таким образом, возможность адаптировать этот простой и эффективный метод анализа для различных видов животных представляет несомненный интерес. В настоящей работе мы предлагаем протокол адаптации СФВ метода для количественной оценки содержания общих липидов у индивидуальных мух *D. melanogaster* и результаты применения этого метода при изучении содержания липидов у двух линий с мутациями генов инсулинового каскада. Для проверки эффективности метода мы исследовали содержание общих липидов у мух, несущих гипоморфные мутации генов инсулиноподобного пептида DILP6 (*dilp6⁴¹*) и транскрипционного фактора dFOXO (*foxo^{BG01018}*). Мы

полагаем, что проведенное исследование позволит оценить участие данных генов в липидном обмене.

Материалы и методы

Реагенты

- Хлороформ (99.1 %) ХЧ (АО «База № 1 Химреактивов», Россия);
- метанол (99.5 %) ХЧ (ЗАО «Вектон», Россия);
- серная кислота (93.5–95.6 %) ОСЧ (ЗАО «Союзхимпром», Россия);
- ортофосфорная кислота (85 %) ОСЧ (ЗАО «Союзхимпром», Россия);
- ванилин кристаллический (ГОСТ 16599-71);
- рафинированное подсолнечное масло (ГОСТ 1129-2013).

Экспериментальные животные. Мухи содержались на стандартной питательной среде (агар-агар, 7 г/л; кукурузная мука, 50 г/л; сухие дрожжи, 18 г/л; сахар, 40 г/л) в инкубаторе (Sanyo, Япония) при температуре 25 °С, относительной влажности 50 %, 12-часовом световом дне. Для экспериментов имаго синхронизировали по вылету (мухи собирались в течение 3–4 ч). В работе были использованы три линии *D. melanogaster*: линия *dilp6⁴¹* с делецией 3'-области гена *phl*, 5'-области гена *dilp6*, захватывающей первый экзон и часть первого интрона (Rauschenbach et al., 2016); линия *foxo^{BG01018}*, несущая вставку Р-элемента [GT1] в 5'-области гена *dfoxo*, приводящую к частичной потере функции гена (Dionne et al., 2006); и линия дикого типа Canton-S. Все линии получены из Bloomington Drosophila Stock Center.

Подготовка и хранение образцов. Для предотвращения ферментативной деградации липидов Ван Гендель рекомендует хранить насекомых при температуре –20 °С или ниже либо высушивать их при 90 °С для остановки ферментативной активности (Van Handel, 1985). Описана также возможность хранить насекомых в 70–95 % этаноле; при этом для предотвращения ферментативной деградации при хранении выше –20 °С рекомендуется измельчать насекомое (Lee, 2019). В настоящей работе мух замораживали в жидком азоте (–195.75 °С) и хранили при –80 °С. Во избежание влияния глазного пигмента на результаты измерений перед анализом мух декапитуировали. В оригинальном методе (Van Handel, 1985) у самок рекомендуется удалять яичники либо не использовать в опытах оплодотворенных самок, так как липиды в яичниках запасаются для последующего развития потомства и не имеют установленной питательной ценности для мух. Но поскольку у дрозофил не представляется возможным извлечь яичники, не повредив при этом саму муху, в нашей работе мы постарались решить этот вопрос использованием для анализа неоплодотворенных самок. Также следует отметить, что количественное измерение общих липидов СФВ методом у мух с яичниками не препятствует обнаружению различий между линиями.

Колориметрический метод количественной оценки содержания общих липидов с использованием сульфосфосованилиновой реакции. Для получения фосфованилинового реагента к 120 мг ванилина добавляли 20 мл горячей воды и размешивали до полного растворения ванилина. Далее добавляли 80 мл H_3PO_4 до конечной концентрации 1.2 мг/мл.

Липидные стандарты, например триолеин (92860; Sigma), можно приобрести у поставщика химических веществ и разводить до нужной концентрации (Fogay et al., 2012), однако в работе (Byreddy et al., 2016) указано, что триолеин дает слишком сильное окрашивание и не подходит в качестве стандарта. В качестве липидного стандарта исследователи в основном используют растительные масла (Van Handel, 1985; Park et al., 2016; Anschau et al., 2017). Известное количество стандарта вступает в реакцию с реагентами для получения калибровочной линии, линейные регрессии часто имеют значение R^2 0.95 или выше. В настоящей работе в качестве липидного стандарта использовали 0.1 % раствор рафинированного подсолнечного масла (ГОСТ 1129-2013) (0.919 кг/м³). Для приготовления стандарта 10 мг масла растворяли в хлороформе до конечной концентрации 1 мг/мл.

Измерение концентрации общих липидов проводили посредством модифицированного для дрозофилы метода Ван Генделя (Van Handel, 1985). В связи с отличиями дрозофилы от комара *Ae. aegypti*, для которого разрабатывал свой метод Ван Гендель, в нашем протоколе были модифицированы время реакции, объемы химических растворов и реагентов для проведения анализа образцов индивидуальных дрозофил. Индивидуальную муху гомогенизировали в 100 мкл охлажденной смеси хлороформ-метанола (V/V), после чего образцы интенсивно встряхивали в течение 10 мин, далее 50 мкл супернантанта переносили в чистые пробирки и нагревали в микротермостате М-208 («Бис-Н», Россия) при 90 °С до полного испарения растворителя, добавляли 10 мкл H_2SO_4 и нагревали образцы при той же температуре 2 мин. Затем образцы охлаждали на льду и добавляли фосфованилиновый реагент до общего объема 1 мл. Инкубировали 15 мин при комнатной температуре в темноте до проявления розового окрашивания, стабильно сохранявшегося в течение 1 ч. Анализировали образцы в спектрофотометре Smart Spec Plus (Bio-Rad, США) при длине волны 525 нм против «холостого» образца, содержащего только фосфованилиновый реагент.

Для построения калибровочной линии Форей с коллагами (Fogay et al., 2012) рекомендуют начинать с концентрации ниже ожидаемой в образце насекомого и заканчивать концентрацией выше ожидаемой. Калибровочную линию получали с использованием девяти разведений: 0, 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80 и 100 мкг липидного стандарта в трех повторах. Далее процедуру выполняли согласно вышеописанному протоколу.

Статистический анализ. Расчет результатов проводили на основании данных калибровочной линии. Достоверность результатов оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Построение градуировочной кривой для определения содержания общих липидов у *D. melanogaster*

Посредством спектрофотометрического поглощения известных концентраций рафинированного подсолнечного масла при 525 нм получена градуировочная кривая (рис. 1). Установлена линейная регрессия: $y = 0.0023x + 0.0369$; $R^2 = 0.9971$.

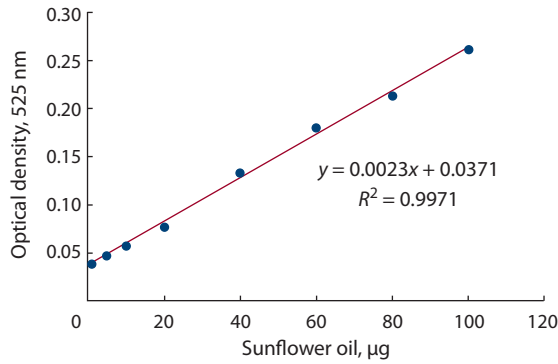


Fig. 1. Calibration line of the product of the sulfophosphovanillin reaction with sunflower oil dissolved in chloroform to the concentration 1 mg/ml.

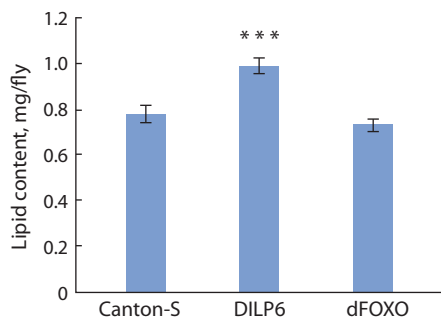


Fig. 2. The level of total lipids in 3-day-old *D. melanogaster* females of the wild-type line Canton-S and lines carrying hypomorphic mutations in the genes for insulin-like peptide DILP6 and transcription factor dFOXO.

Each value is an average of 16–20 measurements. Means ± SE are indicated. *** $p < 0.001$ – the significance of differences between mutant females with the mutation in the insulin-like peptide DILP6 gene (*dilp6*⁴¹) and females of the Canton-S line.

Анализ образцов с известной концентрацией липидного стандарта показал, что метод является чувствительным и способен точно определять уровень общих липидов в диапазоне от 0 до 100 мкг.

Определение содержания общих липидов у самок *D. melanogaster* с гипоморфными мутациями генов инсулинового каскада *dilp6* и *dfoxo*

Известно, что инсулиновый сигнальный каскад дрозофилы включает шесть гомологов инсулина и инсулиноподобных факторов роста млекопитающих (DILPs1–6), которые связываются с единственным инсулиноподобным рецептором дрозофилы (dInR), активирующим инсулиновый каскад (Gruntenko, Rauschenbach, 2018), и два гомолога релаксина (DILPs7, 8) (Gontijo, Garelli, 2018). Стимуляция dInR через субстрат инсулиноподобного рецептора (CHICO, гомолог IRS1–4 млекопитающих) приводит к активации dAkt/PKB (гомолог протеинкиназы B), которая модулирует активность ряда белков, в частности транскрипционного фактора семейства Forkhead box class O, dFOXO (гомолог FOXO1, 3a и 4 у млекопитающих) (Álvarez-Rendón et al., 2018).

Ранее методом ПЦР в реальном времени было установлено двукратное снижение уровня экспрессии гена *dfoxo*

(Gruntenko et al., 2016) и снижение в 13 раз уровня экспрессии гена *dilp6* (Еремина и др., 2019) в жировом теле (основном месте синтеза dFOXO и DILP6) у самок линий с мутацией *dilp6*⁴¹ и *foxo*^{BG01018} соответственно, по сравнению с уровнем экспрессии этих генов в жировом теле у самок линии дикого типа Canton-S. Кроме того, мы обнаружили, что уровень глюкозы и трегалозы – основного сахара насекомых, у самок обеих мутантных линий повышен по сравнению с контрольной линией Canton-S (Еремина и др., 2019). На основании этих данных мы предположили возможность участия генов *dilp6* и *dfoxo* в регуляции уровня жиров у дрозофилы. Для проверки этой гипотезы мы сравнили содержание общих липидов у самок *D. melanogaster* с мутациями *dilp6*⁴¹ и *foxo*^{BG01018}, а также у самок контрольной линии Canton-S с помощью СФВ метода. Результаты проведенных измерений представлены на рис. 2. Очевидно, что у мутантных самок линии *dilp6*⁴¹ уровень общих липидов повышен по сравнению с самками дикого типа (различия достоверны при $p < 0.001$), однако уровень общих липидов у самок линии *foxo*^{BG01018} не отличается от такового у самок дикого типа Canton-S.

В статье (Murillo-Maldonado et al., 2011) говорится об увеличении содержания общих липидов у линий с частичной потерей функции генов инсулинового каскада *PKB*, *dInR* и *chico*. Кроме того, авторы определили содержание углеводов у этих линий и продемонстрировали, что лишь у небольшого числа линий наблюдались значительные изменения. Так, гетероаллельная комбинация *InR*^{3T5/E19} приводила к значительному увеличению содержания углеводов, тогда как для *PKB*^{1/3} и *chico*^{1/1} существенных изменений не наблюдалось. Ранее нами было выявлено участие генов *dilp6* и *dfoxo* в регуляции углеводного обмена, сопровождающееся повышением уровня глюкозы и трегалозы у гипоморфных мутантов *dilp6*⁴¹ и *foxo*^{BG01018} (Еремина и др., 2019). Однако оставалось невыясненным, участвуют ли эти гены в регуляции липидного обмена. В настоящей работе с помощью быстрого метода с использованием сульфосфосванилиновой реакции мы показали, что в регуляции липидного обмена принимает участие *dilp6*, но не *dfoxo*. Наши результаты согласуются с результатами Мурилло-Мальдонадо с коллегами (Murillo-Maldonado et al., 2011) и свидетельствуют о том, что гены инсулинового сигнального каскада могут влиять либо только на углеводный обмен, как в случае *dfoxo*, либо только на липидный обмен, как в случае *PKB* и *chico*, либо и на углеводный, и на липидный, как в случае *dilp6* и *dInR*. Возможные механизмы этого влияния требуют дальнейшего изучения.

Заключение

Полученные данные демонстрируют высокую эффективность и чувствительность колориметрического метода с использованием сульфосфосванилиновой реакции для определения уровня общих липидов, в том числе в низких концентрациях. Проведенный анализ содержания общих липидов у самок *D. melanogaster* с гипоморфными мутациями генов инсулинового каскада это подтверждает, демонстрируя участие гена *dilp6*, но не *dfoxo* в регуляции жирового обмена. Таким образом, предложенный нами

протокол модификации колориметрического метода анализа содержания общих липидов с использованием спектрофотометрии может быть успешно применен при изучении механизмов жирового обмена у широкого спектра биологических объектов.

Список литературы / References

- Еремина М.А., Карпова Е.К., Раушенбах И.Ю., Пирожкова Д.С., Андреевкова О.В., Грунтенко Н.Е. Влияние мутаций генов инсулинового сигнального каскада на изменение уровня углеводов у самок *Drosophila melanogaster* при тепловом стрессе. *Генетика*. 2019;55(4):485-488. DOI 10.1134/S0016675819030068. [Eremina M.A., Karpova E.K., Rauschenbach I.Yu., Pirozhkova D.S., Andreenkova O.V., Gruntenko N.E. Mutations in the insulin signaling pathway genes affect carbohydrate level under heat stress in *Drosophila melanogaster* females. *Russ. J. Genet.* 2019;55(4): 519-521. DOI 10.1134/S1022795419030050.]
- Ростовцев В.Р., Резник Г.Е. Количественное определение липидных фракций в крови. *Лаб. дело*. 1982;4:26-29. [Rostovtsev V.N., Reznik G.E. Quantification of lipid fractions in blood. *Laboratornoe Delo = Laboratory Science*. 1982;4:26-29. (in Russian)]
- Abdullah S., Davies S., Wall R. Spectrophotometric analysis of lipid used to examine the phenology of the tick *Ixodes ricinus*. *Parasit Vectors*. 2018;11:523. DOI 10.1186/s130-71-018-3102-3.
- Al-Anzi B., Zinn K. Colorimetric measurement of triglycerides cannot provide an accurate measure of stored fat content in *Drosophila*. *PLoS One*. 2010;5(8):e12353. DOI 10.1371/journal.pone.0012353.
- Álvarez-Rendón J.P., Salceda R., Riesgo-Escovar J.R. *Drosophila melanogaster* as a model for diabetes type 2 progression. *BioMed. Res. Int.* 2018;2018:1417528. DOI 10.1155/2018/1417528.
- Anschaу A., Caruso C.S., Kuhn R.C., Franco T.T. Validation of the sulfo-phospho-vanillin (spv) method for the determination of lipid content in oleaginous microorganisms. *Braz. J. Chem. Eng.* 2017; 34(1):19-27. DOI 10.1590/0104-6632.20170341s20140222.
- Bozdoğan H., Erbey M., Aksoy H.A. Total amount of protein, lipid and carbohydrate of some adult species belong to curculionidae family (Coleoptera: Curculionidae). *J. Entomol. Zool. Stud.* 2016;4(5):242-248.
- Byreddy A.R., Gupta A., Barrow C.J., Puri M. A quick colorimetric method for total lipid quantification in microalgae. *J. Microbiol. Meth.* 2016;125:28-32.
- Cheng Y.S., Zheng Y., VanderGheynst J.S. Rapid quantitative analysis of lipids using a colorimetric method in a microplate format. *Lipids*. 2011;46(1):95-103. DOI 10.1007/s11745-010-3494-0.
- Dionne M.S., Pham L.N., Shirasu-Hiza M., Schneider D.S. Akt and FOXO dysregulation contribute to infection-induced wasting in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 2006;16:1977-1985.
- Foray V., Pelisson P.-F., Venner M.C.B., Desouhant E., Venner S., Menu F., Giron D., Rey B. A handbook for uncovering the complete energetic budget in insects: the van Handel's method (1985) revisited. *Physiol. Entomol.* 2012;37:295-302. DOI 10.1111/j.1365-3032.2012.00831.x.
- Fukumura K., Konuma T., Tsukamoto Y., Nagata S. Adipokinetic hormone signaling determines dietary fatty acid preference through maintenance of hemolymph fatty acid composition in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Sci. Rep.* 2018;8:4737. DOI 10.1038/s41598-018-22987-2.
- Gontijo A.M., Garelli A. The biology and evolution of the Dilp8-Lgr3 pathway: a relaxin-like pathway coupling tissue growth and developmental timing control. *Mech. Dev.* 2018;154:44-50. DOI 10.1016/j.mod.2018.04.005.
- Gruntenko N.E., Adonyeva N.V., Burdina E.V., Karpova E.K., Andreenkova O.V., Gladkikh D.V., Ilinsky Y.Y., Rauschenbach I.Yu. The impact of FOXO on dopamine and octopamine metabolism in *Drosophila* under normal and heat stress conditions. *Biol. Open*. 2016;5:1706-1711. DOI 10.1242/bio.022038.
- Gruntenko N.E., Rauschenbach I.Y. The role of insulin signalling in the endocrine stress response in *Drosophila melanogaster*: a mini-review. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2018;258:134-139. DOI 10.1016/j.ygcen.2017.05.019.
- Hildebrandt A., Bickmeyer I., Kühnlein R.P. Reliable *Drosophila* body fat quantification by a coupled colorimetric assay. *PLoS One*. 2011; 6(9):e23796. DOI 10.1371/journal.pone.0023796.
- Kleinert M., Clemmensen C., Hofmann S.M., Moore M.C., Renner S., Woods S.C., Huypens P., Beckers J., de Angelis M.H., Schürmann A., Bakhti M., Klingenspor M., Heiman M., Cherrington A.D., Ristow M., Lickert H., Wolf E., Havel P.J., Müller T.D., Tschöp M.H. Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2018;14(3):140-162. DOI 10.1038/nrendo.2017.161.
- Knight J.A., Anderson S., Rawle J.M. Chemical basis of the sulfo-phospho-vanillin reaction for estimating total serum lipids. *Clin. Chem.* 1972;18(3):199-202.
- Lee C.L. What we can learn from the energetic levels of insects: a guide and review. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 2019;112(3):220-226. DOI 10.1093/aesa/say051.
- Liu Z., Huang X. Lipid metabolism in *Drosophila*: development and disease. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 2013;45(1):44-50. DOI 10.1093/abbs/gms105.
- Lu Y., Ludsin S.A., Fanslow D.L., Pothoven S.A. Comparison of three microquantity techniques for measuring total lipids in fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 2008;65:2233-2241. DOI 10.1139/F08-135.
- Murillo-Maldonado J.M., Sánchez-Chávez G., Salgado L.M., Salceda R., Riesgo-Escovar J.R. *Drosophila* insulin pathway mutants affect visual physiology and brain function besides growth, lipid, and carbohydrate metabolism. *Diabetes*. 2011;60(5):1632-1636. DOI 10.2337/db10-1288.
- Musselman L.P., Kühnlein R.P. *Drosophila* as a model to study obesity and metabolic disease. *J. Exp. Biol.* 2018;221(Suppl.1):jeb163881. DOI 10.1242/jeb.163881.
- Park J., Jeong H.J., Yoon E.Y., Moon S.J. Easy and rapid quantification of lipid contents of marine dinoflagellates using the sulpho-phospho-vanillin method. *Algae*. 2016;31(4):391-401. DOI 10.4490/algae.2016.31.12.7.
- Patel A., Antonopoulou I., Enman J., Rova U., Christakopoulos P., Matsakas L. Lipids detection and quantification in oleaginous microorganisms: an overview of the current state of the art. *BMC Chem. Eng.* 2019;1:13. DOI 10.1186/s42480-019-0013-9.
- Rauschenbach I.Yu., Karpova E.K., Burdina E.V., Adonyeva N.V., Bykov R.A., Ilinsky Y.Y., Menshanov P.N., Gruntenko N.E. Insulin-like peptide DILP6 regulates juvenile hormone and dopamine metabolism in *Drosophila* females. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2016;243: 1-9. DOI 10.1016/j.ygcen.2016.11.004 0016-6480.
- Tennessen J.M., Barry W.E., Cox J., Thummel C.S. Methods for studying metabolism in *Drosophila*. *Methods*. 2014;68(1):105-115. DOI 10.1016/j.ymeth.2014.02.034.
- Trinh I., Boulianne G.L. Modeling obesity and its associated disorders in *Drosophila*. *Physiology*. 2013;28:117-124. DOI 10.1152/physiol.00025.2012.
- Van Handel E. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1985;1:302-304.

ORCID ID

M.A. Eremina orcid.org/0000-0001-6136-6928
N.E. Gruntenko orcid.org/0000-0003-3272-1518

Acknowledgements. This work was supported by State Budgeted Project 0324-2019-0041 and the Russian Foundation for Basic Research, project 20-04-00579.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received April 08, 2020. Revised May 22, 2020. Accepted May 22, 2020.