

Количество продуктов перекисного окисления липидов и активность каталазы у чернотелки *Tenebrio molitor* при длительном холодовом воздействии

А.К. ГУЛЕВСКИЙ, Л.И. РЕЛИНА, Е.А. ГРИШЕНКОВА, В.В. РЯЗАНЦЕВ,
Е.С. ФЕДУЛОВА, О.Н. КАЛЬНИЦКАЯ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Amount of Lipid Peroxidation Products and Catalase Activity in *Tenebrio molitor* During Prolonged Cold Effect

A.K. GULEVSKY, L.I. RELINA, E.A. GRISCHENKOVA, V.V. RYAZANTSEV, E.S. FEDULOVA, O.N. KALNITSKAYA
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy
of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Исследовано содержание промежуточных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ): диеновых конъюгатов и диенокетонов, а также активность каталазы у личинок 8-10-го возрастов большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* в процессе длительной холодовой акклимации. Показано, что в 1-й час холодовой акклимации интенсивность ПОЛ и активность каталазы снижаются, далее наблюдается некоторое увеличение содержания продуктов ПОЛ, сопровождающееся ростом каталазной активности, после чего исследуемые показатели возвращаются к их уровню до акклимации и остаются на этом уровне в течение 5 мес.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, каталаза, *Tenebrio molitor*, холодовое воздействие.

Досліджено вміст проміжних продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ): дієнових кон'югатів і дієнокетонів, а також активність каталази у личинок 8-10-го віків великого борошняного хрущака *Tenebrio molitor* у процесі тривалої холодової аклімації. Показано, що у 1-у годину холодової аклімації інтенсивність ПОЛ і активність каталази знижуються, далі спостерігається деяке збільшення вмісту продуктів ПОЛ, яке супроводжується зростанням каталазної активності, після чого показники, що досліджувались, вертаються їх рівня до аклімації і залишаються на цьому рівні протягом 5 міс.

Ключові слова: перекисне окислення ліпідів, каталаза, *Tenebrio molitor*, холодівий вплив.

The content of lipid peroxidation (LPO) intermediates such as: conjugated dienes and ketodienes, as well as catalase activity in 8-10 instar larvae of the yellow mealworm *Tenebrio molitor* was investigated during prolonged cold acclimation. It has been shown that LPO intensity and catalase activity decreased after 1-hour cold acclimation, then a certain increase in the LPO product content and in catalase activity was observed. Afterwards the indices investigated returned to their pre-acclimation level and remained on that level for 5 months.

Key-words: lipid peroxidation, catalase, *Tenebrio molitor*, cold effect.

Насекомые – одна из самых крупных таксонометрических групп многоклеточных животных, способных выдерживать длительное глубокое охлаждение. Биологические исследования холодоустойчивости насекомых направлены на выяснение механизмов их адаптации к неблагоприятным факторам окружающей среды. Большой мучной хрущак *T. molitor* из семейства чернотелок (*Tenebrionidae*, *Coleoptera*) является классическим объектом исследования холодоустойчивости. У большинства насекомых, обитающих в пищевых запасах, отсутствуют специальные приспособления к зимовке. В отличие от других амбарных вредителей, имеющих южное или тропическое происхождение, жуки рода *T. molitor* перешли к синантропному образу жизни из природных ареалов северной и центральной Европы [6]

Адрес для корреспонденции: Релина Л.И., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-01-35, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

The insects are one of the largest taxonomic groups of multicellular animals, which are capable to endure a prolonged deep cooling. Biological investigations of the insects' cold resistance are targeted to elucidate the mechanisms of their adaptation to the unfavourable environmental factors. The yellow mealworm *Tenebrio molitor* of the *Tenebrionidae* (*Tenebrionidae*, *Coleoptera*) is a classic object for studying the cold resistance. Special adaptive mechanisms to overwintering are absent in the majority of insects, living in food stocks. In contrast to other granary pests of south or tropic origin, the *T. molitor* bugs transited to a synantropic way of life from natural areas of North and Central Europe [6] and kept the specific mechanisms of cold adaptation, developed during evolution. One of the damaging cooling factors may be the activation of LPO processes. We can

Address for correspondence: Relina L.I., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7720135, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

и сохранили развившиеся в процессе эволюции специфические механизмы холодовой адаптации. Одним из повреждающих факторов охлаждения может быть активизация процессов ПОЛ. Можно предположить, что для адаптации к низкотемпературному режиму необходимо участие всех звеньев метаболизма, в том числе и антиоксидантной (АО) системы. Данный аспект представляется весьма существенным, поскольку понижение температуры не предотвращает продукцию свободных радикалов и свободно-радикальные окислительные процессы.

Цель нашей работы – оценка характера действия низких температур на интенсивность свободнорадикальных процессов и уровень АО защиты большого мучного хрущака *T. molitor*.

Материалы и методы

Исследования были проведены на большом мучном хрущаке из лабораторной популяции. Личинок 8-10-го возрастов (холодоустойчивая стадия онтогенеза [4]) акклимировали при температуре 4-6°C в различные периоды времени.

Интенсивность ПОЛ оценивали по накоплению промежуточных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов и диенокетонов. Насекомых гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в 0,025 М буфере трис-НСl, pH 7,4. Продукты ПОЛ экстрагировали смесью гептан-изопропанол (1:1) по стандартной методике [3]. В УФ-области диеновые конъюгаты и диенокетоны имеют пики поглощения при 233 и 270 нм соответственно [9], их количество рассчитывали на 1 мг живого веса, используя коэффициент молярной экстинкции, равный 28 000 и 43 400 М⁻¹ см⁻¹ соответственно [7, 10].

Уровень АО защиты оценивали по активности одного из ключевых АО ферментов – каталазы. Для определения ее активности использован стандартный метод оценки расхода перекиси водорода [5] в модификации М.А.Королюк [1]. Принцип метода основан на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс.

Насекомых гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в 0,025 М буфере трис-НСl, pH 7,4, содержащем 80 мкг/мл ингибитора протеаз – фенилметилсульфонилфторида. Гомогенат центрифугировали при 3000 об/мин (1800 g) в течение 5 мин. Верхний липидный слой удаляли с помощью водоструйного насоса.

Реакцию запускали добавлением 2 мл 8,8 мМ раствора перекиси водорода, приготовленного на 0,05 М буфере трис-НСl, pH 7,8, к 20 мкл осветленного гомогената насекомых. Реакцию останавливали через 1 мин добавлением 1 мл 4%-го

assume, that the participation of all metabolism links, including an antioxidant (AO) system, is necessary for adaptation to low temperature regimen. This aspect seems to be quite significant, as the temperature decrease does not prevent the free radical production and free radical oxidative processes.

The aim of the work was to estimate the character of low temperature effect on the intensity of free radical processes and the level of AO protection of yellow mealworm *T. molitor*.

Materials and methods

The investigations were carried-out in yellow mealworm *T. molitor* of laboratory population. The 8-10 instar larvae (cold resistant stage of ontogenesis [4]) were acclimated under 4-6°C in different time periods.

The LPO intensity was estimated by the accumulation of intermediate LPO products: diene conjugates and ketodienes. The insects were homogenized in a glass homogenizer in 0.025 M tris-HCl buffer, pH 7.4. The LPO products were extracted with the heptane-isopropanol (1:1) mixture according to the standard technique [3]. In the UV area the diene conjugates and ketodienes have the sorption peaks at 233 and 270 nm, correspondingly [9], their number was calculated for 1 mg of alive weight, using the coefficient of molar extinction, equal to 28000 and 43400 M⁻¹ cm⁻¹, correspondingly [7, 10].

The level of AO protection was estimated by the activity of one of the key AO enzymes: catalase. The standard method for estimating the hydrogen peroxide expenditure [5], modified by Korolyuk M.A. [1], was used to determine its activity. The method principle is based on the capability of hydrogen peroxide to form a resistant stained complex with molybdenum salts.

The insects were homogenized in a glass homogenizer in 0.025 M tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 80 mkg/ml of protease inhibitor: phenylmethylsulfonyl fluoride. The homogenate was centrifuged at 3000 rpm (1800 g) for 5 min. The upper lipid layer was removed by means of water-jet pump.

The reaction was triggered by adding 2 ml of 8.8 mM of hydrogen peroxide solution, prepared in 0.05 M tris-HCl buffer, pH 7.8 to 20 ml of the insects' clarified homogenate. The reaction was stopped in 1 min with adding 1 ml of 4% ammonium molybdate. It was introduced into the control samples directly after homogenate addition. The intensity of the developed staining was measured by means of spectrophotometer at 410 nm wave length.

The catalase activity was calculated by the formula:

$$A = \frac{8.8 \times 100 \times (E' - E)}{E' \times P \times T},$$

where 8.8 is the H₂O₂ concentration in the control sample, mM; 100 is the coefficient of sample dilution;

молибдата аммония. В контрольные пробы его вносили непосредственно после добавления гомогената. Интенсивность развившейся окраски измеряли спектрофотометрически при длине волны 410 нм.

Активность каталазы рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{8,8 \times 100 \times (E' - E)}{E' \times P \times T},$$

где 8,8 – концентрация H_2O_2 в контрольной пробе, мМ; 100 – коэффициент разведения пробы; E' – экстинкция контрольной пробы; E – экстинкция опытной пробы; P – количество белка в пробе, мкг; T – время, в течение которого шла реакция (1 мин).

Активность фермента выражали в мМолях потреблённой H_2O_2 на мкг белка в минуту. Концентрацию белка при стандартных условиях определяли по классической биуретовой реакции.

Полученные данные были статистически обработаны методом Фишера по программе StatgraphicWin.

Результаты и обсуждение

В 1-й час холодовой акклимации личинок 8-10-го возрастов наблюдается достоверное снижение количества диеновых конъюгатов на 17,7% (рис.1), а диенокетонов – на 17,5% (рис.2). Начиная с 3-х часов, интенсивность ПОЛ несколько повышается, но не достигает первоначального уровня. До 5 мес холодового воздействия количество диеновых конъюгатов и диенокетонов претерпевает незначительные колебания, оставаясь тем не менее на постоянном уровне, не превышающем контрольного, причем наблюдается выраженная тенденция к снижению интенсивности ПОЛ при акклимации.

Одной из причин снижения интенсивности окислительных процессов, возможно, является снижение общей метаболической активности. Кроме того, можно было предположить, что снижение интенсивности ПОЛ обуславливается ростом активности АО ферментов, а, увеличение содержания диеновых конъюгатов и диенокетонов происходит из-за снижения активности ферментов. Однако это предположение не подтвердилось, по крайней мере, для каталазы. Возможно, в этих изменениях принимают участие другие ферменты АО системы, либо антиоксиданты неферментативной природы (токоферолы, глутатион и др.).

Необходимо помнить, что для насекомых каталаза имеет особое значение, так как у некоторых не обнаруживается активность глутатионпероксидазы [8]. При этом у насекомых каталаза присутствует во всех клеточных органеллах, в отличие от млекопитающих, у которых она обнаружена в основном в пероксисомах и митохондриях [8].

E' is the control sample extinction; E is the experimental sample extinction; P is protein amount in a sample, mg; T is time of reaction proceeding (1 min).

The enzyme activity was shown in mM of consumed H_2O_2 per mg of protein for 1 min. Protein concentration under standard conditions was determined according to the classic biuret reaction.

The data obtained were statistically processed using the Fishers' method by Statgraphic Win Software.

Results and discussion

Within the 1st hr of cold acclimation of 8-10 instar larvae there is observed a statistically significant decrease in diene conjugate amount by 17.7% (Fig. 1), and by 17.5% for ketodienes (Fig. 2). Starting from 3 hrs the LPO intensity slightly increases, but does not achieve the initial level. Up to 5 months of cold effect a number of diene conjugates and ketodienes undergoes a slight change, however remaining at a constant level, not exceeding the control one.

One of the causes of the intensity decrease of oxidative processes is likely the reduction of total metabolic activity. In addition, a decrease in LPO intensity could be assumed as stipulated by the growth of AO enzyme activity, and an increase in diene conjugate and ketodiene content as occurred due to a decrease in the enzyme activity. However this supposition has not been confirmed, at least for catalase. Other enzymes of AO systems or non-

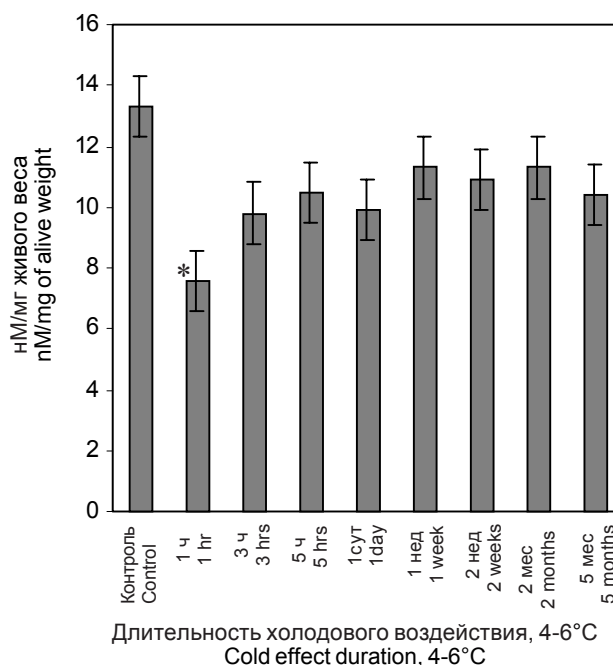


Рис. 1. Содержание диеновых конъюгатов в гомогенатах личинок *T. molitor* 8-10-го возрастов. * – достоверные различия по сравнению с контролем $P < 0,05$, $n = 12$.

Fig. 1. Diene conjugate content in homogenates of 8-10 instar *T. molitor* larvae. * – statistically significant differences in comparison with the control $P < 0.05$, $n = 12$.

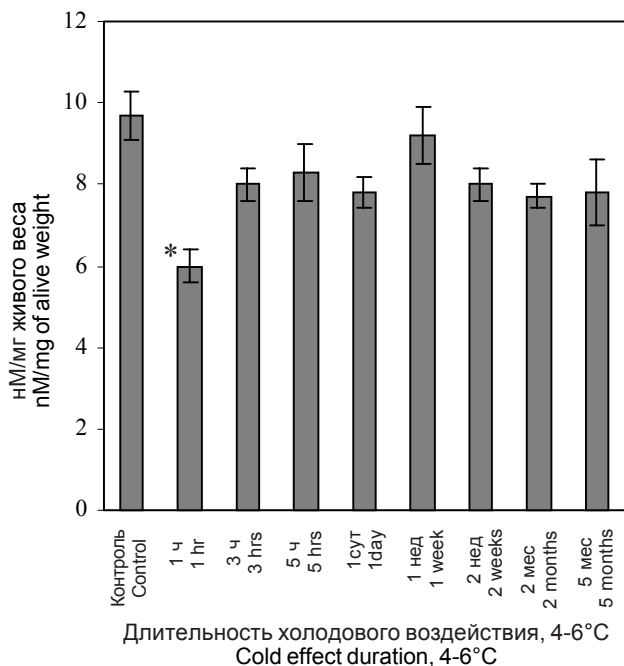


Рис. 2. Содержание диенокетонов в гомогенатах личинок *T. molitor* 8-10-го возрастов. * – достоверные различия по сравнению с контролем $P < 0,05$, $n = 12$.

Fig. 2. Ketodiene content in homogenates of 8-10 instar *T. molitor* larvae. * – statistically significant differences in comparison with the control $P < 0.05$, $n = 12$.

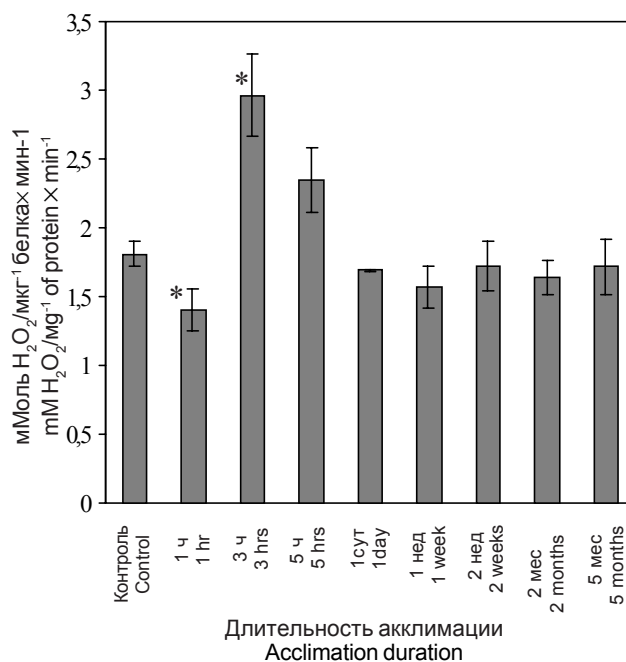


Рис. 3. Активность каталазы в процессе холодовой акклимации у личинок *T. molitor* 8-10-го возрастов. * – достоверные различия по сравнению с контролем $P < 0,05$, $n = 8$.

Fig. 3. Catalase activity during cold acclimation in 8-10 instar *T. molitor* larvae. * – statistically significant differences in comparison with the control $P < 0.05$, $n = 8$.

Поэтому для оценки уровня АО защиты в наших исследованиях выбрали именно каталазу. Активность каталазы как одного из компонентов АО системы косвенно может являться показателем уровня окислительного стресса.

У личинок 8-10-го возрастов активность каталазы в 1-й час холодового воздействия снижается на 23% по сравнению с контролем (неакклимированные особи) (рис.3), 3-й час сопровождается ее резким увеличением. К 5-му часу холодовой экспозиции она превышает контрольный уровень на 64%. В 1-е сутки активность каталазы снижается практически до контрольного уровня и в дальнейшем (вплоть до 5 мес) так и не превышает его.

Следовательно, мы наблюдали, что снижение интенсивности ПОЛ сопровождается уменьшением активности каталазы (в 1-й час холодового воздействия), а увеличение содержания диеновых конъюгатов и диенокетонов – ее повышением (в 3-й час холодовой экспозиции). Характер этих изменений позволяет предположить наличие механизма регуляции активности каталазы по принципу обратной связи: уменьшение количества продуктов окисления вызывает снижение активности АО ферментов.

Интересно отметить, что характер колебаний уровня ПОЛ и активности каталазы напоминает развитие адаптационного синдрома Г. Селье, описанного на млекопитающих [2]. Так, снижение

enzyme nature antioxidants (tocopherols, glutathione etc.) possibly participate in these changes.

It is necessary to keep in mind the fact, that catalase is of special value for the insects, because in some species the activity of glutathione peroxidase is not revealed [8]. At the same time in insects the catalase is present in all cellular organelles, in contrast of mammals, where it is revealed mainly in peroxisomes and mitochondria [8].

Therefore namely catalase was selected in order to estimate the level of AO protection in our investigations. Catalase activity as one of the components of AO system can be indirectly the index for an oxidative stress level.

In 8-10 instar larvae the catalase activity in the 1st hr of cold effect decreases by 23% in comparison with the control (non-acclimated species) (Fig. 3), the 3rd hr is accompanied with its sharp increase. To the 5th hr of cold exposure it exceeds the control level by 64%. In the 1st day the catalase activation decreases practically down to the control level, and afterwards up to 5 months it never exceeds it.

Thus, we have observed, that a decrease in LPO intensity is accompanied with a reduction of catalase activity during the 1st hr of cold effect, but an increase in diene conjugate and ketodiene content is done by its augmentation (during the 3rd hr of cold exposure). The character of these changes allows to suppose the presence of regulation mechanisms of catalase activity by feedback principle: the reduction of oxidation

содержания продуктов ПОЛ свойственно реакции срочной адаптации (1-й час холодовой экспозиции), а увеличение содержания диеновых конъюгатов и диенкетонов, сопровождающееся резким усилением активности каталазы, характерно для стадии тревоги (3-й час холодовой экспозиции). Стабильный уровень прооксидантно-антиоксидантного равновесия при длительных сроках холодового воздействия можно сопоставить с развитием долговременной адаптации. Следует отметить, что роста интенсивности окислительных процессов, сопровождающего стадию истощения по схеме Г. Селье, не наблюдается вплоть до 5 мес холодового воздействия. Возможно данные закономерности, реализуясь через разные механизмы, носят общебиологический характер.

Выводы

Начало холодовой акклимации личинок 8-10-го возрастов *T. molitor* характеризуется уменьшением количества промежуточных продуктов ПОЛ и снижением активности каталазы. Далее процессы ПОЛ интенсифицируются, хотя содержание диеновых конъюгатов и диенкетонов не превышает первоначального уровня. Усиление процессов свободнорадикального окисления липидов сопровождается резким возрастанием активности каталазы. В дальнейшем у личинок она сохраняется на уровне контроля вплоть до 5 мес холодовой акклимации наряду с общей тенденцией снижения интенсивности ПОЛ в процессе холодовой акклимации.

Литература

1. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г.и др. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988.– №1.– С. 16-19.
2. Меерсон Ф.З. Основные закономерности индивидуальной адаптации // Сб. Физиология адаптационных процессов.– М.: Наука, 1986.– С. 10-76.
3. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина. – 1977. – С.63-64.
4. Тыщенко В.П., Амаду Ш. Фотопериодическая реакция большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae) // Зоол.журн. – 1987. – Т.66, Вып.1. – С.51-59.
5. Aebi H. Catalase in vitro // Meth. Enzymol.– 1984.– Vol. 105.– P. 121-126.
6. Buckland P.C. The early dispersal on insect pests of stored products as indicated by archaeological records // J. Stored Prod. Res.– 1981.– Vol. 17.– P. 1-12.
7. Hayashi S., Ishimoto S., Wu G.S., et al. Oxygen free radical damage in the cornea after excimer laser therapy// Br. J. Ophthalmol.– 1997.– Vol. 81.– P. 141-144.
8. Joannisse D.R., Storey K.B. Oxidative stress and antioxidants in overwintering larvae of cold-hardy goldenrod gall insects // J. Exp. Biol.– 1996.– Vol. 199.– P. 1483-1491.

product amount causes a decrease in AO enzyme activity.

Of note is that the character of changes in LPO level and catalase activity resembles the development of G. Selier' adaptation syndrome, described in mammals [2]. Thus, the reduction of LPO products is typical for the reaction of urgent adaptation (1st hr of cold exposure), but an increase in diene conjugate and ketodiene content, accompanying with a sharp strengthening of catalase activity, is characteristic for the anxiety stage (3rd hr of cold exposure). Stable level of prooxidant-antioxidant equilibrium during long terms of cold effect can be compared with the development of long-term adaptation. It should be noted, that the growth of oxidative process intensity, accompanying the exhaustion stage according to G. Selier's scheme, is not observed up to 5 months of cold effect. Possibly, these regularities, being realised via different mechanisms, are of general biological character.

Conclusions

The cold acclimation beginning of *T. molitor* 8-10 instar larvae is characterised by the reduction of LPO intermediate product amount and a decrease in catalase activity. Further there is the intensification of LPO processes, although the diene conjugate and ketodiene content does not exceed an initial level. The strengthening of free-radical lipid oxidation processes is accompanied with a sharp increase in catalase activity. Further it is kept in larvae at the control level up to 5 months of cold acclimation along with general tendency of LPO intensity decrease during cold acclimation.

References

1. Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Majorova I.G. et al. Method for catalase activity determination // Lab.– 1988.– N1.– P. 16-19.
2. Meerson F.Z. Main regularities of individual adaptation// Physiology of adaptation processes.– Moscow: Nauka, 1986.– P. 10-76.
3. Stalnaya I.D. Method to determine diene conjugation of non-saturated fatty acids // Current methods in biochemistry.– Moscow: Meditsina.– 1977.– P. 63-64.
4. Tyschenko V.P., Amadu Sh. Photoperiod reaction of yellow mealworm *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae) // Zool. zhurnal.– 1987.– Vol. 66, Issue 1.– P. 51-59.
5. Aebi H. Catalase in vitro // Meth. Enzymol.– 1984.– Vol. 105.– P. 121-126.
6. Buckland P.C. The early dispersal on insect pests of stored products as indicated by archaeological records // J. Stored Prod. Res.– 1981.– Vol. 17.– P. 1-12.
7. Hayashi S., Ishimoto S., Wu G.S., et al. Oxygen free radical damage in the cornea after excimer laser therapy// Br. J. Ophthalmol.– 1997.– Vol. 81.– P. 141-144.
8. Joannisse D.R., Storey K.B. Oxidative stress and antioxidants in overwintering larvae of cold-hardy goldenrod gall insects // J. Exp. Biol.– 1996.– Vol. 199.– P. 1483-1491.
9. Recknagel R.O., Ghoshal A.K. Quantitative estimation of peroxidative degeneration of rat liver microsomal and

9. *Recknagel R.O., Ghoshal A.K.* Quantitative estimation of peroxidative degeneration of rat liver microsomal and mitochondrial lipids after carbon tetrachloride poisoning // *Exp. Mol. Pathol.*– 1966.– Vol. 5.– P. 413-426.
10. *Yamamoto Y., Niki E., Eguchi J. et al.* Oxidation of biological membranes and its inhibition. Free radical chain oxidation of erythrocyte ghost membranes by oxygen // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1985.– Vol. 819.– P. 29-36.
- mitochondrial lipids after carbon tetrachloride poisoning // *Exp. Mol. Pathol.*– 1966.– Vol. 5.– P. 413-426.
10. *Yamamoto Y., Niki E., Eguchi J. et al.* Oxidation of biological membranes and its inhibition. Free radical chain oxidation of erythrocyte ghost membranes by oxygen // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1985.– Vol. 819.– P. 29-36.

Accepted in 23.09.2003

Поступила 23.09.2003