

## Спонтанное и индуцированное перекисное окисление липидов у личинок *Tenebrio molitor* после холодной акклимации

А.К. ГУЛЕВСКИЙ, В.В. РЯЗАНЦЕВ, Е.А. ГРИШЕНКОВА, Л.И. РЕЛИНА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Spontaneous and Induced Lipid Peroxidation in the Yellow Mealworm *Tenebrio Molitor* After Cold Acclimation

GULEVSKY A.K., RYAZANTSEV V.V., GRISCHENKOVA E.A., RELINA L.I.

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 (ДК) и кетодиенов у большого мучного хрущака *T. molitor* на холодочувствительной и холодоустойчивой стадиях онтогенеза. Оценена интенсивность спонтанного и индуцированного перекисью кумила ПОЛ. Показано, что для холодоустойчивых личинок 8-10 возрастов характерно пониженное содержание продуктов ПОЛ в результате холодной акклимации. Холодоустойчивые личинки обладают способностью “тормозить” процессы ПОЛ, не допуская накопления продуктов окисления кетонной природы.

Досліджено вміст проміжних продуктів перекисного окислення ліпідів: дієнових кон'югатів та кетодієнів у великого борошняного хрущака *T. molitor* на холодочутливій і холодостійкій стадіях онтогенезу. Оцінено інтенсивність спонтанного та індукованого перекисем кумілу ПОЛ. Показано, що для холодостійких личинок 8-10 віків характерним є знижений вміст продуктів ПОЛ у результаті холодової аклімації. Холодостійкі личинки мають здатність “гальмувати” процеси ПОЛ, не допускаючи накопичення продуктів окислення кетонної природи.

The content of lipid peroxidation (LPO) intermediates: conjugated dienes and ketodienes, at cold-sensitive and cold-tolerant developmental stages in the yellow mealworm *T. molitor* was investigated. Intensity of spontaneous and cumil peroxide-induced LPO was estimated. It has been shown that cold-tolerant 8-10 instar larvae are characterised by the reduced LPO product level as a result of cold acclimation. Cold-tolerant larvae are able to “hinder” LPO processes preventing accumulation of ketone products.

Возможность существования причинно-следственной связи между ПОЛ и изменением физиологического состояния [1] делает обоснованным и необходимым изучение связи между ПОЛ и адаптационными процессами в организме. Существование такой связи основывается на очевидном предположении, что эволюционные усовершенствования биохимических и физиологических систем, в частности систем защиты от свободных радикалов, должны отразиться на интегральных показателях надёжности организма – устойчивости организма к действию неблагоприятных факторов окружающей среды, в том числе и низких температур. Уровню ПОЛ и активности антиоксидантной системы при длительном холодовом воздействии посвящены работы, проведенные как на приспособленных к низким температурам животных [4], так и на объектах, не имеющих специальных механизмов холодной адаптации [2, 8]. Однако, что касается холодоустойчивых беспозвоночных, то пока отсутствует целостная картина, указывающая место процессов ПОЛ в общей схеме адаптационных механизмов. Для изучения связи холодоустойчивости с отдельными биохимическими

The probability of cause-effect relationship existence between LPO and a change in physiological state [1] makes valid and necessary the study of the bond between LPO and adaptation processes in an organism. The existence of such a relationship is based on an evident supposition, that evolutionary improvements of biochemical and physiological systems, in particular protective systems against free radicals, should be reflected on integral indices of an organism reliability such as: the resistance of an organism to the effect of unfavorable environmental factors, low temperatures including. The works, performed both in the low temperature-adapted animals [4], and in the objects without special mechanisms of cold adaptation [2, 8], are dedicated to the LPO level and antioxidant system activity under long-term cold effect. However as for cold-tolerant invertebrates, there is no complete picture, indicating the place of LPO processes in a total scheme of adaptational mechanisms. In order to study the relation of cold-tolerance with some biochemical systems in the whole and LPO, in particular, one of the most perspective models is the yellow mealworm *T. molitor* (*Tenebrionidae*).

The aim of this work was to study the accumulation of LPO intermediates at cold-tolerant and cold-

системами в целом и ПОЛ, в частности, одной из наиболее перспективных моделей является большой мучной хрущак *T. molitor* (сем. *Tenebrionidae*).

Цель данной работы – изучить накопление промежуточных продуктов ПОЛ на холодоустойчивой и холодочувствительной стадиях онтогенеза, а также оценить влияние холодной акклимации на интенсивность процессов ПОЛ.

В работе использованы личинки *T. molitor* из лабораторной популяции. Для экспериментов отбирали личинок 3-4 и 8-10 возрастов. Насекомых акклимировали при 4-6°C в течение 2-х недель. Личинки гомогенизировали в ручном гомогенизаторе в 0,025 М буфере трис-НСl, рН 7,4. Продукты ПОЛ экстрагировали смесью гептан-изопропанол (1:1) [5]. В УФ области исследованные продукты ПОЛ (ДК и кетодиены) имеют пики поглощения при 233 и 270 нм соответственно [1, 5]. Мы оценивали содержание продуктов ПОЛ в спиртовой фазе экстракта, в которую по данным [3] уходят продукты окисления фосфолипидов. Данные выражены в относительных оптических единицах на 1 мг сырого веса. В качестве индуктора ПОЛ был взят водный раствор перекиси кумила в концентрации 0,2 мг/мл. Первичная статистическая обработка данных и сравнение выборок по критерию Стьюдента проведены с помощью программы StatgraphicWin.

ПОЛ – сложный процесс, в ходе которого образуются разнообразные продукты [1]. В настоящей работе изучался только один из путей ПОЛ по схеме: полиненасыщенные жирные кислоты ⇒ ДК ⇒ кетодиены.

Добавление перекиси кумила к гомогенату, полученному из личинок 3-4 возрастов, вызывало увеличение содержания ДК на 31,7 и на 28,3% у неакклимированных и акклимированных особей соответственно (рис. 1) и кетодиенов на 25,4 и на 22,2% у неакклимированных и акклимированных особей соответственно (рис. 2).

Однако, как следует из полученных результатов, к 8-10 возрастам личинок характер индуцированного ПОЛ несколько изменяется. Применение перекиси кумила приводит к возрастанию уровня ДК на 25,6% у неакклимированных личинок и на 25,0% - у акклимированных (рис. 3), но не кетодиенов (рис. 4). Как известно [6], личинки *T. molitor* приобретают способность выживать при понижении температуры после 7-8-й линьки. Возможно, наблюдаемые закономерности объясняются тем, что у личинок 8-10 возрастов антиоксидантная система способна препятствовать накоплению продуктов более поздних этапов окисления, в то время как несформировавшаяся антиоксидантная система личинок ранних возрастов не в состоянии противостоять действию свободных радикалов, и процессы окисления развиваются дальше. Это подразумевает важность

sensitive developmental stages, as well as to estimate the effect of cold acclimation on the LPO processes intensity.

In the work we used *T. molitor* larvae from laboratory population. The 3-4 and 8-10 instar larvae were selected for the experiment. Insects were acclimated at 4-6°C during 2 weeks. Larvae were homogenised in a manual homogenizer in 0.025 M Tris-HCl buffer, pH 7,4. LPO products were extracted by heptane-isopropanol mixture (1:1) [5]. In UV zone the investigated LPO products (CD and ketodienes) have the absorption peaks at 233 and 260 nm, correspondingly [1, 5]. We estimated the

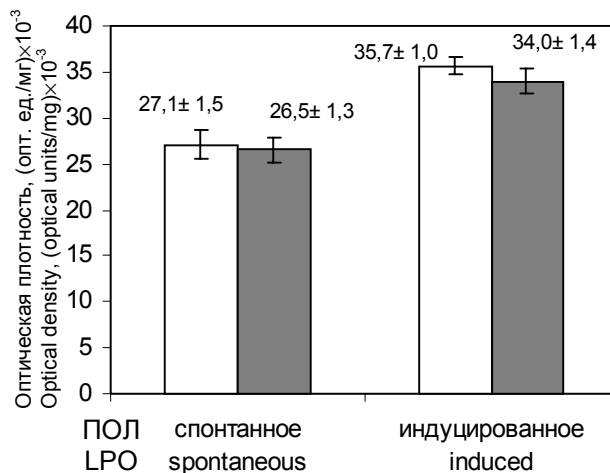


Рис. 1. Уровень ДК в спиртовой фазе экстракта тканей личинок 3-4 возрастов *T. molitor*, n=6, p<0,05 (сравнение акклимированных и контрольных особей)

□ - неакклимированные, ■ - акклимированные.

Fig. 1. CD level in alcohol phase of tissue extract of *T. Molitor* 3-4 instar larvae, n=6, p<0.05 (comparison of acclimated and non-acclimated species)

□ - non-acclimated, ■ - acclimated.

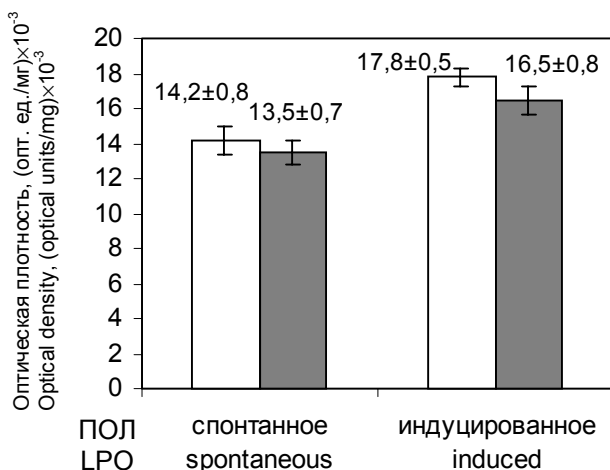
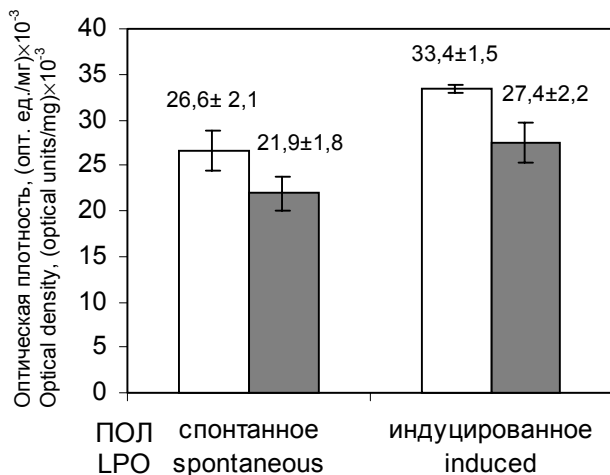


Рис. 2. Уровень кетодиенов в спиртовой фазе экстракта тканей личинок 3-4 возрастов *T. molitor*, n=6, p<0,05 (сравнение акклимированных и контрольных особей)

□ - неакклимированные, ■ - акклимированные.

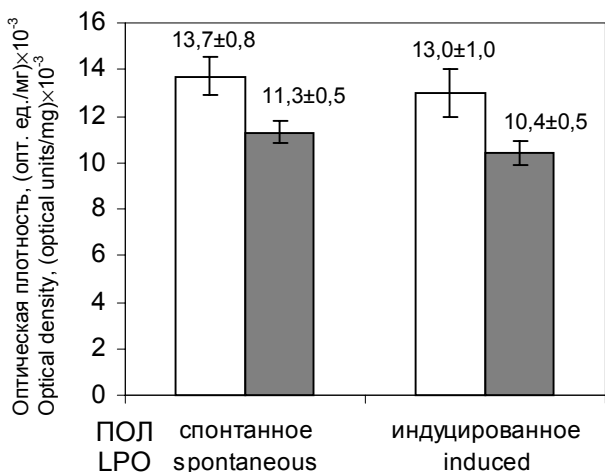
Fig. 2. Ketodiene level in alcohol phase of tissue extract of *T. molitor* 3-4 instar larvae, n=6, p<0.05 (comparison of acclimated and non-acclimated species)

□ - non-acclimated, ■ - acclimated.



**Рис. 3.** Уровень ДК в спиртовой фазе экстракта тканей личинок 8-10 возрастов *T. molitor*, n=10, p<0,05 (сравнение акклимированных и контрольных особей) □ - неакклимированные, ■ - акклимированные.

**Fig. 3.** CD level in alcohol phase of tissue extract of *T. molitor* 8-10 instar larvae, n=10, p<0.05 (comparison of acclimated and non-acclimated species) □ - non-acclimated, ■ - acclimated.



**Рис. 4.** Уровень кетодиенов в спиртовой фазе экстракта тканей личинок 8-10 возрастов *T. molitor*, n=6, p<0,05 (сравнение акклимированных и контрольных особей) □ - неакклимированные, ■ - акклимированные.

**Fig. 4.** Ketodiene level in alcohol phase of tissue extract of *T. molitor* 8-10 instar larvae, n=6, p<0.05 (comparison of acclimated and non-acclimated species) □ - non-acclimated, ■ - acclimated.

прооксидантно-антиоксидантного баланса для обеспечения холодоустойчивости организма.

Кроме того, во время холодовой акклимации личинок 8-10 возрастов происходит снижение количества ДК на 17,7% при спонтанном ПОЛ и на 18,0% при индуцированном перекисью кумила (рис. 3), а также кетодиенов на 17,5 и на 20,0% для спонтанного и индуцированного ПОЛ соответственно (рис. 4). Причиной этого, вероятно, является либо активация ферментов антиоксидантной системы, либо накопление антиоксидантов типа токоферолов, глутатиона и т.п. В то же время содержание при положительных околонулевых

LPO products content in the extract alcohol phase, where, according to the data [3] the products of phospholipid oxidation release. The data are manifested in relative optical units per 1 mg of raw weight. An aqueous solution of cumil peroxide in 0.2 mg/ml concentration was taken as the LPO inductor. Primary statistical data processing and the samples comparison according to the Student's criterion were carried-out using StatgraphicWin Software.

LPO is a complicated process, in the course of which there is the formation of different products [1]. In this work only one of LPO ways was studied according to the following scheme: poly-unsaturated fatty acids  $\Rightarrow$  CD  $\Rightarrow$  ketodienes.

Cumil peroxide adding to the homogenate, obtained from the 3-4 instar larvae, caused an increase in CD content by 31.7 and 28.3% in non-acclimated and acclimated species, correspondingly (Fig. 1) and in ketodienes by 25.4 and 22.2% in non-acclimated and acclimated species, correspondingly (Fig. 2).

However, as it follows from the results obtained, to the 8-10 larvae instar the character of induced LPO slightly changes. Cumil peroxide application results in the augmentation of CD level by 25.6% in non-acclimated larvae and by 25.0% in acclimated ones (Fig. 3), but not of ketodienes (Fig. 4). As it is known [6], *T. Molitor* larvae gain the capability to survive at the temperature decrease after the 7<sup>th</sup>-8<sup>th</sup> molt. The observed regularities are likely explained by the fact, that in the 8-10 instar larvae an antioxidant system is capable to prevent the products accumulation of later oxidation stages, meanwhile a non-formed antioxidant system of earlier instar larvae is not able to resist the free radicals effect, and the oxidative processes continue their development. This fact means the importance of peroxidant-antioxidant balance for providing an organism's cold-resistance.

Besides, during the 8-10 instar larvae cold acclimation there is a decrease in CD content by 17.7% at a spontaneous LPO and by 18.0% at cumil peroxide-induced one (Fig. 3), as well as in ketodienes by 17.5% and by 20.0% for spontaneous and induced LPO, correspondingly (Fig. 4). This cause is probably either the antioxidant system enzyme activation or the antioxidant accumulation of tocopherol, glutathione, etc type. At the same time the maintenance under positive about zero temperatures does not cause an acclimating effect on the 3-4 instar larvae, that can also testify in favour of the antioxidant system participation in adaptation processes.

Thus, the data of the investigations performed point to the fact that, in the insects at cold-tolerant developmental stages there is a change in the character of LPO processes proceeding in comparison with the cold-sensitive stages, judging by the accumulation of phospholipid oxidation

температурах не оказывает акклимирующего действия на личинок 3-4 возрастов, что ещё может служить дополнительным свидетельством в пользу участия антиоксидантной системы в адаптационных процессах.

Таким образом, данные проведенных нами исследований указывают, что у насекомых на холодоустойчивых стадиях онтогенеза изменяется характер протекания процессов ПОЛ по сравнению с холодочувствительными стадиями, судя по накоплению промежуточных продуктов окисления фосфолипидов. Это говорит о том, что механизмы адаптации к низким температурам затрагивают в числе прочих известных биохимических процессов [7] и процессы ПОЛ.

### Литература

1. Каган В.Е., Орлов О.Н., Прилипко Л.Л. Проблема анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов // Итоги науки и техники. Биофизика. – М.: ВИНТИ. – 1986. – 134 с.
2. Колосова Н.Г., Колпаков А.Р., Добронравова А.В. Изменения содержания, структуры и заряда липопротеинов сыворотки крови крыс при длительном холодом воздействии // Биофизика. – 1995. – 40, №2. – С. 422-427.
3. Костюк В.А. Использование системы гептан-изопропанол для экстракции первичных продуктов перекисного окисления липидов // Укр. биохим. журнал. – 1991. – 63, №1. – С. 98-101.
4. Лапинский А.Г., Невретдинова З.Г. О роли неспецифической модификации липидов мембран эритроцитов при гибернации у суслика *Citellus parryi* // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. – 1987. – 23, № 6. – С. 711-716.
5. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот: Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 63-64.
6. Яхонтов В.В. Вредители сельскохозяйственных растений и продуктов Средней Азии и борьба с ними. – Ташкент, 1953. – 663 с.
7. Bale J.S. Cold hardiness and overwintering of insects // Agr. Zool. Rev. – 1989. – N3. – P. 157-192.
8. Barja de Quiroga G., Lopez-Torrez M., Perez-Campo R. et al. Effect of cold acclimation on GSH, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in brown adipose tissue // Biochem. J. – 1991. – 277, N1. – P. 289-292.

Поступила 26.03.2002

intermediates. It testifies to the fact, that the adaptation mechanisms to low temperatures touch upon the LPO processes among the other known biochemical processes [7] as well.

### References

1. Kagan V.E., Orlov O.N., Prilipko L.L. Problem of analysis of endogenous products of lipid peroxidation // Itogi nauki i tekhniki. Biofizika. – M.: VINITI. – 1986. – 134 p.
2. Kolosova N.G., Kolpakov A.R., Dobronravova A.V. Change in content, structure and charge of lipoproteins of rat's blood serum at a long-term cold effect // Biofizika. – 1995. – 40, N2. – P.422-427.
3. Kostyuk V.A. Usage of heptane-isopropanol system for the extraction of lipid peroxidation primary products // Ukrainskiy biokhimicheskiy zhurnal. – 1991. – 63, N1. – P. 98-101.
4. Lapinsky A.G., Nevretdinova Z.G. On the role of non-specific modification of lipids of erythrocyte membranes at hibernation in ground squirrel *Citellus parryi* // Zhurnal Evol. Biokh. i Fiziol. – 1987. – 23, N6. – P. 711-716.
5. Stal'naya I.D. Method for determination of dien conjugations of non-saturated superior acids: Sovremennyye metody v biokhimii. M.: Meditsina, 1977. – P.63-64.
6. Yakhontov V.V. Pests of agricultural plants and products of the Central Asia and their control. – Tashkent, 1953. – 663p.
7. Bale J.S. Cold hardiness and overwintering of insects // Agr. Zool. Rev. – 1989. – N3. – P. 157-192.
8. Barja de Quiroga G., Lopez-Torrez M., Perez-Campo R. et al. Effect of cold acclimation on GSH, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in brown adipose tissue // Biochem. J. – 1991. – 277, N1. – P. 289-292.

Accepted in 26.03.2002