

Вплив переохолодження на вміст проміжних продуктів ПОЛ та активність СОД у личинок великого борошняного хрущака *Tenebrio molitor*

UDC 612.592:595.797.29-134.25

A.K. GULEVSKIY, E.A. GRISCHENKOVA, L.I. RELINA*, L.V. KAREVA

Overcooling Effect on Content of LPO Transit Products and SOD Activity in Yellow Mealworm *Tenebrio molitor*

Досліджено вплив переохолодження на вміст проміжних продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) та активність супероксиддисмутази (СОД) у личинок великого борошняного хрущака *Tenebrio molitor*. Показано, що холодостійкі та холодоустойчиві стадії онтогенезу відрізняються за показниками інтенсивності ПОЛ та активністю СОД. Попередня холодова аклімация при помірно низьких температурах впливає на накопичення дієнових кон'югатів і кетодієнів та на ферментативну активність. Отримані результати свідчать про те, що холодостійкі личинки 8-10 віків здатні підтримувати постійний рівень окислювальних і відновлювальних процесів після переохолодження на відміну від чутливих до низьких температур личинок 3-5 віків. При цьому вірогідно, що під час холодової аклімации "вмикається" метаболічна програма захисту, яка запобігає порушенням прооксидантно-антиоксидантної рівноваги та розвиненню окислювального стресу, що може відігравати значну роль в біохімічних механізмах холодостійкості комах.

Ключові слова: переохолодження, онтогенез, *Tenebrio molitor*, перекисне окислення ліпідів, супероксиддисмутаза.

Исследовано влияние переохлаждения на содержание промежуточных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активность супероксиддисмутазы (СОД) у личинок большого мучного хрущака *Tenebrio molitor*. Показано, что холодоустойчивая и холодоустойчивая стадии онтогенеза отличаются по показателям интенсивности ПОЛ и активности СОД. Предварительная холодовая акклимация при умеренно низких температурах влияет на накопление диеновых конъюгатов и кетодиенов и на ферментативную активность. Полученные результаты свидетельствуют о том, что холодоустойчивые личинки 8-10 возрастов способны поддерживать постоянный уровень окислительных и восстановительных процессов после переохлаждения в отличие от чувствительных к низким температурам личинок 3-5 возрастов. При этом вероятно, что во время холодовой акклимации "включается" метаболическая программа защиты, которая предотвращает нарушения прооксидантно-антиоксидантного равновесия и развитие окислительного стресса, что может играть существенную роль в биохимических механизмах холодоустойчивости насекомых.

Ключевые слова: переохлаждение, онтогенез, *Tenebrio molitor*, перекисное окисление липидов, супероксиддисмутаза.

Overcooling influence on transit products of lipid peroxidation (LPO) and superoxide dismutase (SOD) activity in yellow mealworm *Tenebrio molitor* has been investigated. It has been shown that cold-tolerant and cold resistant ontogenetic stages differ by LPO intensity and SOD activity parameters. Preliminary cold acclimation at moderately low temperatures affects diene conjugate and ketodiene accumulation and enzyme activity. The obtained results testify to the fact that cold-tolerant 8-10 instar larvae are able of maintaining a constant level of redox processes after overcooling unlike sensitive to low temperatures 3-5 instar larvae. Metabolic protective program preventing disorders of pro-oxidant and anti-oxidant balance and progress of oxidative stress is likely to "switch on" during cold acclimation which may play a significant role in biochemical mechanisms of cold tolerance in insects.

Key-words: overcooling, ontogenesis, *Tenebrio molitor*, lipid peroxidation, superoxide dismutase.

Температура – один з найголовніших факторів навколишнього середовища, що впливають на життєдіяльність організмів. Коливання температури здатні викликати стресову реакцію, яка може виявлятися в порушенні ділянок метаболізму. Утримання прооксидантно-антиоксидантної рівноваги – необхідна умова нормального функціонування організму. Зниження температури і наступний відігрів з поновленням оксигенації тканин та органів супроводжуються підвищенням продукції активних форм кисню, які часто призводять до зростання інтенсивності окислювальних

Temperature is one of the main environmental factors affecting organism vital activity. Temperature alterations are capable of causing stress reaction which may be manifested as a disorder in metabolic sites. Keeping pro-oxidant and anti-oxidant balance is one of essential conditions for normal functioning of an organism. Temperature decrease and following thawing with renewed oxygenation of tissues and organs are accompanied with a rise in the production of oxygen active forms, which frequently result in the increase in intensity of oxidative processes [15]. There is logical assuming that organisms which within

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, м. Харків

* Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.: +38 (057)
373-41-35, факс: +38 (057) 373-30-84, електронна пошта:
cryo@online.kharkov.ua

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 4135, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

процесів [15]. Логічно припустити, що організми, які в процесі еволюції набули здатності виживати в умовах низьких температур, мають досить потужну антиоксидантну систему, яка спроможна запобігти розвиненню окислювального стресу. Одним із різновидів окислювальних процесів при змінах фізіологічного стану організму є перекисне окислення ліпідів (ПОЛ). Процеси ПОЛ досліджуються як у пристосованих до зимівлі організмів [4], так і у видів, що не мають спеціальних механізмів виживання на холоді [2, 12]. З нашої точки зору, інформативним може виявитися порівняльний аналіз, наприклад, порівняння близьких видів, які відрізняються холодостійкістю, або різних онтогенетичних стадій холодостійких тварин. Так, у багатьох комах холодостійкою є одна із стадій розвитку, стадія, на якій запрограмована зимова діапауза [9]. Хоча комахи вже давно стали поширеною моделлю при вивченні холодостійкості безхребетних [11], в тому числі і при дослідженні процесів ПОЛ та рівня антиоксидантного захисту [15], в літературі дуже мало даних порівняльного характеру. Мета дослідження – оцінити інтенсивність ПОЛ і рівень антиоксидантного захисту у личинок великого борошняного хрущака *Tenebrio molitor* (Coleoptera, род. *Tenebrionidae*) різних віків, котрі відрізняються здатністю виживати при низьких температурах.

Матеріали і методи

Досліди проводились на великому борошняному хрущаку *T. molitor* з лабораторної популяції, який здатний утримувати рідини свого тіла в переохолодженому стані при температурах нижче 0°C. Відомо, що холодостійкими є личинки 8-10 віків, а молодші личинки більш чутливі до охолодження [8, 10, 13]. Комахи були поділені на 2 групи: контрольні, що перебували при кімнатній температурі, а особин з 2-ї групи аклімували при температурі 4-6°C протягом 2-х тижнів. Аклімованих та неаклімованих комах охолоджували до -15°C зі швидкістю 0,5°C/хв, після чого їх утримували при цій температурі не менш 10 хв.

Інтенсивність ПОЛ оцінювали за накопиченням проміжних продуктів ПОЛ – дієнових кон'югатів (ДК) та кетодієнів. Комах гомогенізували у скляному гомогенізаторі у 0,025 М буфері трис-НСІ, рН 7,4. Кожний зразок зроблено з 1 личинки 8-10 віків, або з 7-8 личинок 3-5 віків. Продукти ПОЛ екстрагували сумішшю гептан-ізопропанол (1:1) за стандартною методикою [7]. Оцінювали вміст продуктів ПОЛ в спиртовій фазі екстракту, в якій за даними [3] накопичуються продукти окислення фосфоліпідів. В УФ області ДК та кетодієни мають піки поглинання при 233 і 270 нм відповідно [17]. Кількість ДК і кетодієнів розраховували

evolution have gained the capability to survive under conditions of low temperatures, have quite powerful antioxidant system able of preventing the development of oxidative stress. One of the varieties of oxidative processes under change in physiological state of an organism is lipid peroxidation (LPO). LPO processes are studied both in adapted to wintering organisms [4] and in the species with no special mechanisms of survival in cold [2, 12]. From our point of view, a comparative analysis, e.g. either comparing of close species with different cold resistance or various ontogenetic stages of cold-resistant animals may be informative. In such a way for many insects a cold resistance is one of the developmental stages, the one at which a winter diapause is programmed [9]. Though insects have been used as a model long ago during studying cold resistance of invertebrates [11], including the investigations of LPO processes and the level of antioxidant protection [15], in the literature there are poor data of a comparative character. The research aim was to assess the LPO intensity and level of antioxidant protection in larvae of the yellow mealworm *T. molitor* (Coleoptera, *Tenebrionidae* genus) of different ages with various abilities of surviving under low temperatures.

Materials and methods

The studies were performed in laboratory population of yellow mealworm *T. molitor*, capable of keeping the fluids of its body in an overcooled state at the temperatures below 0°C. It is known that cold resistant ones are the 8-10 instar larvae and younger ones are more sensitive to cooling [8, 10, 13]. The insects were divided into 2 groups: control ones were kept at room temperature and the individuals of the 2nd group were acclimated at 4-6°C for 2 weeks. Acclimated and non-acclimated insects were cooled down to -15°C with the rate of 0.5°C/min, afterwards they were maintained at this temperature not less than 10 min.

LPO intensity was assessed on accumulation of transit products: diene conjugates (DC) and ketodienes. The insects were homogenized in glass homogenizer with 0.025 M buffer tris-HCl, pH 7.4. Each sample was made of either one 8-10 instar larva or seven-eight 3-5 instar larvae. LPO products were extracted with the mixture of heptane-isopropanol (1:1) according to standard methods [7]. The content of LPO products was estimated in alcohol fraction of the extract, where as it was previously reported [3] phospholipid oxidation products accumulated. In UV range the DC and ketodienes have the absorption spectra at 233 and 270 nm, correspondingly [17]. Amount of DC and ketodienes was calculated per 1g of living mass using the coefficient of molar extinction 28,000 and 43,400 M⁻¹cm⁻¹, correspondingly [14, 18].

на 1 мг живої ваги, використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції 28000 і 43400 М⁻¹см⁻¹ відповідно [14, 18].

Для визначення загальної активності СОД використана методика, яка базується на здатності СОД гальмувати процес аутоокислення адреналіну в лужному середовищі, котрий призводить до утворення адренохрому [5]. Комах гомогенізували у скляному гомогенізаторі в 0,025 М буфері Трис-НСІ, рН 7,4, який містив 80 мкг/мл інгібітора протеаз – фенілметилсульфонілфториду і 0,5% дезоксихолату натрію. Кожний зразок зроблено з 2-х личинок 8-10 віків, або з 14-16 личинок 3-5 віків. Гомогенат центрифугували при 3000 об/хв (1800 g) протягом 5 хв. Верхній ліпідний шар усували за допомогою водоструминного насосу. Водний розчин адреналіну готували *ex tempore* в концентрації 30 мг/мл: 50 мкл розчину адреналіну вносили в 2,5 мл 0,2 М карбонатного буферу, рН 10,1, який містив 200 мкл освітленого гомогенату. Зміну забарвлення реєстрували на спектрофотометрі “ЛОМО-46” при довжині хвилі 480 нм. У контрольну пробу замість гомогенату вносили еквівалентний обсяг буферу для гомогенізації.

Активність СОД розраховували за формулою:

$$A = \frac{\epsilon_c - \epsilon_o}{\epsilon_o \times T \times P}$$

де ϵ_c – екстинкція контролю; ϵ_o – екстинкція дослід; Т – час, протягом якого реєстрували посилення забарвлення (2 хв); Р – вміст білку у пробі, мг.

Результати та обговорення

У чутливих до дії низьких температур неаклімованих личинок 3-5 віків переохолодження збільшує кількість ДК в 2,6 рази, а кетодієнів – у 2 рази (рис. 1 і 2). Попередня холодова аклімація призводить до зростання вмісту як ДК, так і кетодієнів у личинок 3-5 віків на 66 і 52% відповідно. Це вказує на те, що навіть помірні низькі температури порушують окислювально-відновлювальну рівновагу. У той же час холодова аклімація здатна у деякій мірі запобігти подальшому накопиченню продуктів ПОЛ при наступному переохолодженні, оскільки кількість ДК у аклімованих личинок 3-5 віків після переохолодження зростає лише в 1,3 рази, до того ж вміст кетодієнів, які є продуктом наступної стадії окислення ненасичених жирних кислот, не змінюється. Це дає можливість припустити, що аклімація „вмикає” механізми антиоксидантного захисту, які зупиняють ланцюгові реакції вільно радикального окислення. Тобто навіть на чутливий до охолодження стадії розвитку, завдяки холодовій аклімації, діють певні захисні механізми.

Переохолодження не позначається на холодостійких личинках 8-10 віків (рис. 1, 2). Хоча у них спостерігається тенденція до змін вмісту ДК та

To determine total SOD activity there were applied the methods based on SOD ability to inhibit the process of auto-oxidation of adrenalin in acid environment, resulting in adrenochrome formation [5]. The insects were homogenized in glass homogenizer with 0.025 M buffer tris-HCl, pH 7.4, comprised 80 mg/ml protease inhibitor, phenyl methyl sulphonyl fluoride and 0.5% sodium desoxycholate. Each sample was made of either two 8-10 instar larvae or fourteen-sixteen 3-5 instar larvae. Homogenate was centrifuged at 3.000 rot/min (1.800 g) for 5 min. Upper lipid layer was removed with water-jet pump. Adrenalin aqueous solution was prepared *ex tempore* under 30 mg/ml concentration; 50 ml adrenalin solution was introduced into 2.5 ml 0.2 M carbonate buffer, pH 10.1, which comprised 200 ml of enlightened homogenate. Change of staining was recorded with “LOMO-46” spectrophotometer at 480 nm wave length. Into control sample instead of homogenate an equivalent volume of buffer was introduced for homogenization.

SOD activity was calculated on the formula:

$$A = \frac{\epsilon_c - \epsilon_o}{\epsilon_o \times T \times P}$$

where ϵ_c – control extinction; ϵ_o – extinction under study; Т – time during which the staining strengthening was recorded (2 min); Р – content of protein in a sample, mg.

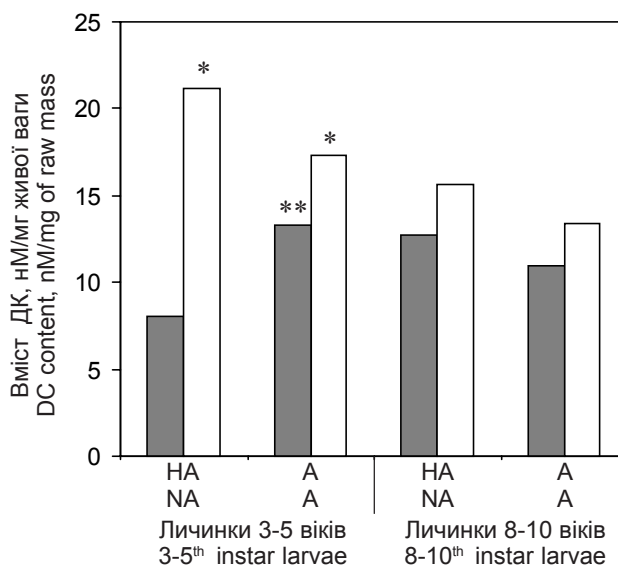


Рис. 1. Вміст дієнових кон’югатів у *T. molitor*: НА – неаклімованих; А – аклімованих; ■ – до переохолодження; □ – після переохолодження; * – статистично достовірні відмінності у порівнянні з комахами, яких не переохолоджували, P<0,05; ** – статистично достовірні відмінності у порівнянні з неаклімованими комахами, P<0,05, n=6-12.

Fig. 1. Content of diene conjugates in *T. molitor*: NA – non-acclimated; A – acclimated; ■ – prior to overcooling; □ – after overcooling; * – statistically significant differences if compared with non-overcooled insects, P<0.05; ** – statistically significant differences if compared with non-acclimated insects, P<0.05, n=6-12.

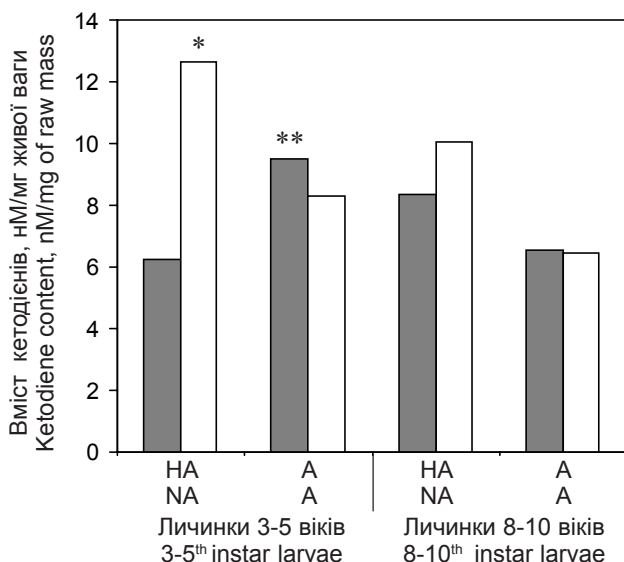


Рис. 2. Вміст кетодієнів у *T. molitor*: НА – неаклімованих; А – аклімованих; ■ – до переохолодження; □ – після переохолодження; * – статистично достовірні відмінності у порівнянні з комахами, яких не переохолоджували, $P < 0,05$; ** – статистично достовірні відмінності у порівнянні з неаклімованими комахами, $P < 0,05$, $n = 6-12$.

Fig 2. Content of ketodienes in *T. molitor*: NA – non-acclimated; A – acclimated; ■ – prior to overcooling; □ – after overcooling; * – statistically significant differences if compared with non-overcooled insects, $P < 0.05$; ** – statistically significant differences if compared with non-acclimated insects, $P < 0.05$, $n = 6-12$.

кетодієнів, схожа на зміни вмісту цих сполук у молодших личинок, проте статистично значущих сплесків інтенсивності ПОЛ не виявлено. Навіть неаклімовані личинки 8-10 віків зберігають після переохолодження рівень ПОЛ, що статистично не відрізняється від контрольного.

У цілому зміни активності СОД внаслідок переохолодження відбуваються паралельно зі змінами вмісту проміжних продуктів ПОЛ. У личинок 3-5 віків спостерігається сплеск активності СОД після переохолодження (рис. 3). У неаклімованих личинок активність ферменту зростає в 5,5, а у аклімованих – тільки в 2,5 рази. При цьому аклімація призводить до гострого підвищення активності СОД на 244%. Можна припустити, що у личинок *T. molitor* відбувається регуляція активності СОД за принципом зворотного зв'язку: накопичення продуктів ПОЛ, яке перевищує нормальний рівень, викликає зріст активності СОД. Це можна розглядати як позитивний момент пристосування організму до несприятливих умов: організм намагається зберегти проокисантно-антиоксидантну рівновагу, але при зниженні температури ця рівновага переходить на інший рівень як окислювальних, так і відновлювальних процесів. Хоча підвищений рівень активності антиоксидантних ферментів часто вважають

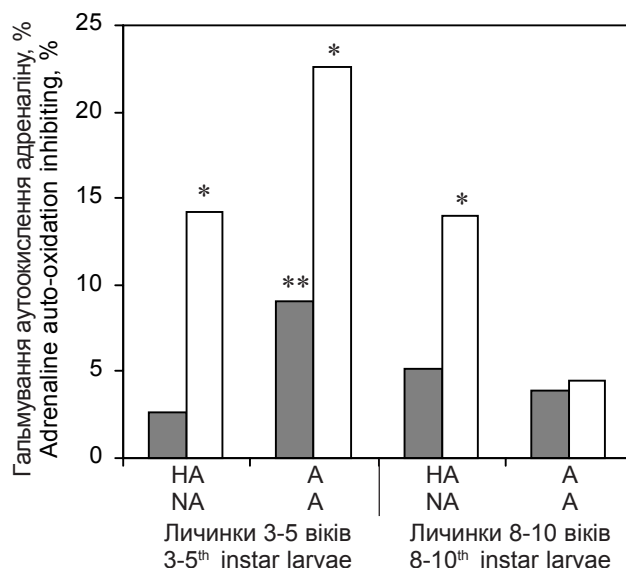


Рис. 3. Активність СОД у *T. molitor*: НА – неаклімованих; А – аклімованих; ■ – до переохолодження; □ – після переохолодження; * – достовірні відмінності у порівнянні з личинками, яких не переохолоджували; ** – достовірні відмінності у порівнянні з неаклімованими личинками; $n = 8-18$.

Fig. 3. SOD activity in *T. molitor*: NA – non-acclimated; A – acclimated; ■ – prior to overcooling; □ – after overcooling; * – statistically significant differences if compared with non-overcooled insects; ** – statistically significant differences if compared with non-acclimated insects, $n = 8-18$.

Results and discussion

In sensitive to the effect of low temperatures non-acclimated 3-5 instar larvae the overcooling enhances the amount of DC in 2.6 times and twice the one for ketodienes (Fig. 1 and 2). Preliminary cold acclimation results in an increase of the content of both DC and ketodienes in 3-5 instar larvae by 66 and 52%, correspondingly. It points to the fact that even moderate low temperatures impair a redox balance. At the same time cold acclimation is capable in some extent to prevent further accumulation of LPO products at following overcooling, because the content of DC in acclimated 3-5 instar larvae after overcooling enhances only in 1.3 times meanwhile the one for ketodienes, which are the next stage of oxidation of non-saturated fatty acids does not change. This fact enables the supposing that acclimation “switches-on” the mechanism of anti-oxidant protection, stopping the chain-reactions of free radical oxidation. That is, certain protective mechanisms act even at sensitive to cooling developmental stage due to cold acclimation.

Overcooling does not affect cold-resistant 8-10 instar larvae (Fig. 1 and 2). Though in them there is observed a tendency for the alteration of the amount of DC and ketodienes, which is similar to the change in the number of these compounds in younger larvae, however no statistically significant splashes of LPO

однією з ознак окислювального стресу, потрібно розглядати окислювально-відновлювальний метаболізм у комплексі. З цієї точки зору відсутність змін у активності антиоксидантних ферментів за умов зростання вмісту продуктів ПОЛ може свідчити про вичерпані можливості організму боротися з розвитком окислювального стресу.

У личинок 8-10 віків реакція СОД на переохолодження залежить від попередньої аклімації. У неаклімованих личинок теж спостерігається підвищення активності СОД в 2,7 рази (рис. 3), але аклімовані личинки утримують активність СОД після переохолодження на попередньому рівні. Слід зауважити, що сама холодова аклімація не впливає на значення активності СОД у личинок 8-10 віків. Тобто пристосована до виживання при низьких температурах онтогенетична стадія реагує на переохолодження менш різким підвищенням активності СОД, а при наявності попередньої аклімації активність СОД після переохолодження взагалі не змінюється.

Оскільки було показано, що виживаність аклімованих комах при переохолодженні вища, ніж неаклімованих [1, 6], можна припустити, що попередня холодова аклімація допомагає зберігати прооксидантно-антиоксидантну рівновагу, причому захисні механізми, що починають функціонувати при аклімації, діють навіть на тих онтогенетичних стадіях, які не мають таких специфічних адаптацій до холоду, як синтез та накопичення антифризних білків [13].

Висновки

Отримані дані свідчать про те, що найбільш холодостійкі личинки 8-10 віків великого борошняного хрущака *T. molitor* здатні зберігати окислювально-відновлювальний баланс після переохолодження краще, ніж молодші личинки. При цьому останні мають досить лабільну та потужну антиоксидантну систему, яка, враховуючи значення активності СОД, здатна відповідати на розвинення окислювального стресу. Попередня холодова аклімація „вмикає” неспецифічні механізми біохімічного захисту, до яких можна віднести утримання цієї рівноваги, навіть на тих онтогенетичних стадіях, які позбавлені специфічних адаптацій до низьких температур.

Література

1. Белоус А.М., Гулевский А.К., Зинченко А.В. и др. Способность к переохлаждению как критерий холодоустойчивости на различных стадиях онтогенеза большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* // Доп. НАНУ.– 1999.– №8.– С.145-148.
2. Колосова Н.Г., Колпаков А.Р., Добронравова А.В. Изменения содержания, структуры и заряда липопротеинов

intensity were found. Even non-acclimated 8-10 instar larvae preserve the LPO level after overcooling, that statistically and significantly does not differ from the control.

In general the changes in SOD activity as a result of overcooling proceed in parallel with those of the content of LPO transit products. In 3-5 instar larvae there is observed the splash of SOD activity after overcooling (Fig. 3). In non-acclimated larvae the enzyme activity increases in 5.5 times and only in 2.5 times in acclimated ones. In this case acclimation itself does not lead to a sharp rise in SOD activity by 244%. It may be supposed that in *T. molitor* larvae the regulation of SOD activity on the principle of reverse connection occurs: the accumulation of LPO products exceeding the normal level causes the growth of SOD activity. It can be considered as a positive moment of an organism adaptation to unfavourable conditions: an organism tries to keep pro-oxidant and anti-oxidant balance, but during temperature reduction this balance transits to other level of both oxidative and recovering processes. Even though an increased level of anti-oxidant enzymes is frequently considered as one of the signs of oxidative stress a redox metabolism should be examined in as a complex. From this point of view, no change in the activity of anti-oxidant enzymes under increase in LPO product content may testify to exhausted possibilities of an organism in fighting with oxidative stress development.

In 8-10 instar larvae the SOD response to overcooling depends on preliminary acclimation. In non-acclimated larvae the rise in SOD activity in 2.7 times is also observed (Fig. 3), but acclimated larvae keep SOD activity after overcooling at a previous level. It should be noted that cold acclimation itself does not affect the value of SOD activity in 8-10 instar larvae. It means, that adapted to surviving under low temperatures ontogenetic stages responds to overcooling with not so sharp increase in SOD activity and in the presence of preliminary acclimation SOD activity does not change at all after overcooling.

Since it has been shown [1, 6] that the survival of acclimated insects during overcooling is higher than in non-acclimated ones, it may be supposed that preliminary acclimation is helpful in preserving pro-oxidant and anti-oxidant balance, moreover protective mechanisms starting during acclimation are active even at those ontogenetic stages, having no specific adaptations to cold, such as synthesis and accumulation of anti-freeze proteins [13].

Conclusions

The obtained data testify to the fact that the most resistant 8-10 instar larvae of yellow mealworm *T. molitor* are capable of better keeping the redox balance after overcooling than younger larvae. In this

- сыворотки крови крыс при длительном холодовом воздействии // Биофизика.– 1995.– Т. 40, №2.– С. 422-427.
3. Костюк В.А. Использование системы гептан-изопропанол для экстракции первичных продуктов перекисного окисления липидов // Укр. биохим. журнал.– 1991.– Т. 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. – Т. 23, №6.– С. 711-716.
 5. Макаревич О.П., Голиков П.П. Активность супероксиддисмутазы крови в острый период различных заболеваний // Лаб. дело.– 1983.– №6.– С. 24-27.
 6. Реліна Л.І. Вплив низьких температур на фенотипічні ознаки і білок-синтезуючий апарат холодостійких жуків *Tenebrio molitor* на різних стадіях розвитку: Автореф. дис. ... канд. біол. наук.– Харків, 1999.– 16 с.
 7. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот // Современные методы в биохимии. Сб. науч. тр.– М.: Медицина, 1977.– С. 63-64.
 8. Тыщенко В.П., Амаду Ш. Фотопериодическая реакция большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae) // Зоологический журнал.– 1987.– Т. 66, Вып. 1.– С. 51-59.
 9. Ушатинская Р.С. Скрытая жизнь и анабиоз.– М.: Наука, 1990.– 180 с.
 10. Яхонтов В. В. Вредители сельскохозяйственных растений и продуктов Средней Азии и борьба с ними.– Ташкент, 1953.– 663 с.
 11. Bale J.S. Cold hardiness and overwintering of insects // Agr. Zool. Rev.– 1989. – Vol. 3.– P. 157-192.
 12. 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.– Vol. 277, Pt. 1.– P. 289-292.
 13. Graham L.A., Walker V.K., Davies P.L. Developmental and environmental regulation of antifreeze proteins in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* // Eur. J. Biochem.– 2000.– Vol. 267, N21.– P. 6452-6458.
 14. 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, N2.– P. 141-144.
 15. 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, Pt. 7.– P. 1483-1491.
 16. Johnston S.L., Lee R.E. Regulation of supercooling and nucleation in a freeze intolerant beetle (*Tenebrio molitor*) // Cryobiology.– 1990.– Vol. 27, N5.– P. 562-568.
 17. 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, N5.– P. 413-426.
 18. 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, N1.– P. 29-36.

Надійшла 21.06.2005

case the latter have quite labile powerful antioxidant system which if taking into account the values of SOD activity is able to respond the development of oxidative stress. Primary cold acclimation “switch on” non-specific mechanisms of biochemical protection, where the maintaining of this balance even at ontogenetic states deprived of specific adaptations to low temperatures may be referred to.

References

1. Belous A.M., Gulevsky A.K., Zinchenko A.V. et al. Ability to overcooling as criterion of cold resistance at various ontogenesis stages of mealworm *Tenebrio molitor* // Dop. NANU.– 1999.– N8.– P. 145-148.
2. Kolosova N.G., Kolpakov A.R., Dobronravova A.V. Changes of maintaining, structure and charge of lipoproteins of rat's blood serum at long-term cold effect // Biofizika.– 1995.– Vol. 40, N2.– P. 422-427.
3. Kostyuk V.A. Use of heptane-isopropanol system for extraction of primary products of lipid peroxidation // Ukr. Biokhim. Zhurnal.– 1991.– Vol. 63, N1.– P. 98-101.
4. Lapinsky A.G., Nevretdinova Z.G. About the role of non-specific modification of lipids of erythrocyte membranes during hibernation in ground squirrel *Citellus parryi* // Zhur. Evolyutsionnoy Biokhimii i Fiziologii.– 1987.– Vol. 23, N6.– P. 711-716.
5. Makarevich O.P., Golikov P.P. Activity of superoxide dismutase of blood in acute period of different diseases // Lab. delo.– 1983.– N6.– P. 24-27.
6. Relina L.I. Effect of low temperatures on phenotypic signs and protein-synthesizing apparatus of cold-resistant bugs *Tenebrio molitor* at different developmental stages: Author abstract of Cand. Biol. Sci. thesis.– Kharkiv.– 1999.– 16 p.
7. Stalnaya I.D. Method of determining diene conjugation of non-saturated higher fatty acids: Contemporary methods in biochemistry // Coll. of Scient. Papers. – Moscow: Meditsyna, 1977. – P. 63-64.
8. Tyschenko V.P., Amady Sh. Photoperiodic reaction of yellow mealworm *Tenebrio molitor* (Coleoptera, tenebrionidae) // Zool. Zhurnal. – 1987. – V. 66, issue 1. – P. 51-59.
9. Ushatinskaya R.S. Hidden life and anabiosis.– Moscow: Nauka, 1990.– 180 p.
10. Yakhontov V.V. Agricultural pests of plants and products of the Middle Asia and fighting against them. Tashkent, 1953.– 663 p.
11. Bale J.S. Cold hardiness and overwintering of insects // Agr. Zool. Rev.– 1989. – Vol. 3.– P. 157-192.
12. 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.– Vol. 277, Pt. 1.– P. 289-292.
13. Graham L.A., Walker V.K., Davies P.L. Developmental and environmental regulation of antifreeze proteins in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* // Eur. J. Biochem.– 2000.– Vol. 267, N21.– P. 6452-6458.
14. 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, N2.– P. 141-144.
15. 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, Pt. 7.– P. 1483-1491.
16. Johnston S.L., Lee R.E. Regulation of supercooling and nucleation in a freeze intolerant beetle (*Tenebrio molitor*) // Cryobiology.– 1990.– Vol. 27, N5.– P. 562-568.
17. 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, N5.– P. 413-426.
18. 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, N1.– P. 29-36.

Accepted in 21.06.2005