

АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА БОЛЬШОГО МУЧНОГО ХРУЩАКА (*Tenebrio molitor*) В ОНТОГЕНЕЗЕ

А. К. ГУЛЕВСКИЙ, Е. А. ГРИЩЕНКОВА, Л. И. РЕЛИНА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков;
e-mail: lianaisaakovna@rambler.ru

В работе дана оценка уровня антиоксидантной защиты и интенсивности перексидного окисления липидов у большого мучного хрущака (*Tenebrio molitor*) на разных стадиях развития. Установлено, что каждая стадия имеет свои особенности прооксидантно-антиоксидантного равновесия. Так, максимальная интенсивность окислительных процессов, оцененная по уровню накопления промежуточных продуктов перексидного окисления липидов — диеновых конъюгатов и кетодиенов — свойственна куколкам, а минимальная — личинкам 3–5-го возраста. Активность супероксиддисмутазы постепенно возрастает на протяжении жизненного цикла. На стадии куколок происходит снижение каталазной и глутатионредуктазной активности. Активность каталазы у имаго равняется, а активность глутатионредуктазы превышает их значения у личинок. При этом глутатионредуктазная активность у *T. molitor* в условиях нашего эксперимента была зарегистрирована только при 37 °С. Статистически достоверных изменений уровня восстановленного глутатиона на протяжении жизненного цикла насекомых не наблюдается.

Ключевые слова: перексидное окисление липидов, антиоксидантные ферменты, большой мучной хрущак.

При восстановлении O₂ образуются активные формы кислорода (АФК), избыток которых может приводить к повреждению липидов, белков и нуклеиновых кислот и таким образом представлять угрозу практически для всех клеточных процессов.

Насекомые могут быть в большей степени подвержены риску развития оксидативного стресса по сравнению с другими беспозвоночными. Во-первых, их система дыхалец доставляет O₂ непосредственно к тканям посредством газовой диффузии. Во-вторых, у летающих насекомых потребность тканей в O₂ чрезвычайно высока [1]. В-третьих, пища насекомых-фитофагов обогащена прооксидантами [2]. Поэтому можно полагать, что у насекомых антиоксидантная система должна занимать одно из центральных мест в обмене веществ.

Насекомые на разных стадиях онтогенеза существенно отличаются по образу жизни, и, следовательно, необходимо учитывать особенности биологии живых организмов на каждой стадии онтогенеза, в частности для насекомых, которым свойственен метаморфоз.

Однако, как показал анализ данных литературы, для насекомых, у которых исследовались антиоксидантные ферменты и антиоксиданты, отсутствуют сведения об онтогенетических особенностях функционирования антиоксидантной системы (АОС). В связи

с этим целью настоящей работы является оценка интенсивности перексидного окисления липидов и уровня антиоксидантной защиты на разных стадиях онтогенеза большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* (сем. *Tenebrionidae*, *Coleoptera*), популяции которого уже многие годы служат объектами для лабораторных исследований [3].

Материалы и методы

В экспериментах использовали лабораторную популяцию большого мучного хрущака *Tenebrio molitor*. Уровень антиоксидантных процессов и ПОЛ исследовали на следующих стадиях онтогенеза: личинки 3–5-го и 8–10-го возраста, куколки и имаго. При приготовлении проб использовали 2 особи в случае личинок 8–10-го возраста, куколок и имаго, а при приготовлении проб из личинок 3–5-го возраста на каждую пробу отбирали 14–16 личинок.

При определении показателей АОС насекомых гомогенизировали в 0,025 М буфере трис-НСl (рН 7,4), содержащем 80 мкг/мл фенолметилсульфонилфторида (PMSF). После центрифугирования гомогената липидный слой удаляли. Определение общей активности СОД проводили согласно методу, основанному на способности СОД тормозить процесс аутоокисления адреналина [4] и выражали ее в %.

Активность каталазы (КАТ) определяли стандартным методом, оценивая расход пероксида водорода в модификации М. А. Королюк [5] и выражали в ммоль потребленной H_2O_2 на 1 мкг белка в минуту.

Активность глутатионредуктазы (ГР) определяли по методу [6]. Активность ГР рассчитывали по уменьшению количества NADPH-H при 22 °С и 37 °С в течение 30 мин. Для получения гомогената использовали 0,05 М К-фосфатный буфер (рН 7,4) в присутствии 0,5%-го дитиотреитола и PMSF в указанной выше концентрации.

Концентрацию белка при стандартных условиях определяли по классической биуретовой реакции.

Содержание восстановленного глутатиона (GSH) определяли по методу [7]. Белки в 1,5 мл гомогената осаждали охлажденной 50%-й ТХУ. Количество GSH выражали в нмоль/мг массы тела.

Интенсивность ПОЛ оценивали по накоплению промежуточных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов (ДК) и кетодиенов. Насекомых гомогенизировали в 0,025 М буфере трис-HCl (рН 7,4). Продукты ПОЛ экстрагировали смесью гептан-изопропанол (1 : 1) согласно стандартной методике [8]. Количество ДК и кетодиенов рассчитывали на 1 мг живой массы тела, используя коэффициент молярной экстинкции $\varepsilon = 28\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ и $\varepsilon = 43\,400\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ соответственно [9].

Полученные цифровые данные статистически обработаны методом Фишера по программе StatgraphicWin.

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что активность СОД у *T. molitor* постепенно повышается на

протяжении жизненного цикла и достигает максимальной на стадии имаго (табл. 1). Это может свидетельствовать об активизации метаболизма, в частности потребления O_2 , и следовательно об усилении генерации АФК, что в ответ вызывает увеличение активности СОД.

Изменение активности СОД в онтогенезе имеет, очевидно, видоспецифичный характер. Так, например, у домашней мухи *Musca domestica* (сем. *Muscidae*, *Diptera*) активность СОД в онтогенезе остается практически неизменной [10], а у плодовой мушки *Drosophila melanogaster* (сем. *Drosophilidae*, *Diptera*) онтогенетические изменения активности СОД от стадии яйца до имаго имеют U-образный характер [11].

Для насекомых КАТ очевидно играет особую роль, поскольку у ряда насекомых не обнаружено активности Se-зависимых глутатионпероксидаз (ГП), т.к. в их пище практически отсутствует Se [12]. Вероятно КАТ в этом случае берет на себя функции ГП. Это подтверждается тем, что в отличие от тканей млекопитающих у насекомых КАТ найдена не только в пероксисомах, но и в других органеллах, включая ядро. КАТ – единственный из ферментов АОС, который у насекомых обнаруживается даже в полости пищеварительной системы [13]. Динамика активности КАТ в онтогенезе *T. molitor* отличается от динамики активности СОД, что предполагает неравнозначную роль отдельных компонентов АОС на разных стадиях развития. Самая низкая активность КАТ наблюдается у куколок, а после метаморфоза на стадии имаго она возвращается к значениям, свойственным личинкам.

Интересно, что у насекомых вместо глутатионзависимого окислительно-восстанови-

Таблица 1. Уровень антиоксидантной защиты *T. molitor* на разных стадиях онтогенеза

Показатели	Личинки 3–5-го возраста	Личинки 8–10-го возраста	Куколки	Имаго
Активность СОД, % торможения аутоокисления адреналина / мин на 1 мг белка ($n = 8-19$)	$2,62 \pm 0,72$	$5,20 \pm 0,90^a$	$6,30 \pm 0,70^a$	$9,40 \pm 0,30^{ab}$
Активность каталазы, ммоль H_2O_2 / мин на 1 мкг белка ($n = 8$)	$1,83 \pm 0,01$	$1,81 \pm 0,09$	$1,21 \pm 0,15^c$	$1,55 \pm 0,13$
Активность глутатионредуктазы, мкмоль NADPH / мин на 1 мг белка ($n = 8$)	$6,40 \pm 0,65$	$7,30 \pm 1,23$	$3,03 \pm 0,21^c$	$14,08 \pm 2,29^d$
Содержание восстановленного глутатиона, нмоль на 1 мг массы тела ($n = 10$)	$1,09 \pm 0,03$	$1,29 \pm 0,08$	$1,18 \pm 0,09$	$1,36 \pm 0,04$

Примечание: ^a различия по сравнению с личинками 3–5-го возраста достоверны; ^b различия по сравнению с личинками 8–10-го возраста и куколками достоверны ($p < 0,05$; $n = 8$); ^c различия по сравнению с личинками 3–5-го и 8–10-го возраста и имаго достоверны ($p < 0,05$; $n = 8$); ^d различия по сравнению с личинками 3–5-го и 8–10-го возраста и куколками достоверны ($p < 0,05$; $n = 8$).

тельного цикла может существовать аналогичный цикл на основе аскорбиновой кислоты [13]. Один из ферментов данного цикла — дегидроаскорбатредуктаза — использует восстановленный глутатион в качестве кофермента для восстановления аскорбиновой кислоты.

Хотя ранее нами не выявлена у *T. molitor* активность ни Se-зависимой, ни Se-независимой ГП [14], сам глутатион, по всей вероятности, является немаловажным компонентом АОС. Содержание GSH поддерживается на постоянном уровне на протяжении всех исследованных стадий жизненного цикла *T. molitor*, не претерпевая существенных изменений.

В то же время при отсутствии глутатионпероксидазной активности, у *T. molitor* обнаружена ГР, но активность ее при указанных условиях эксперимента удалось определить только при температуре 37 °С, но не при 20–22 °С. Возможно ГР активируется именно при повышении температуры, что предполагает ее решающее значение как раз в условиях гипертермии и развития теплового шока. Личинки разного возраста не различаются между собой по глутатионредуктазной активности, однако на стадии куколки активность ГР у них значительно уменьшается, а затем резко возрастает на стадии имаго (табл. 1). Поскольку уровень GSH остается постоянным на протяжении жизненного цикла, можно предположить, что расход этого соединения на стадии куколки понижается, а после метаморфоза, наоборот, сильно увеличивается. Необходимо подчеркнуть факт обнаружения глутатионредуктазной активности только при температуре 37 °С, которая не является физиологичной для насекомых.

При исследовании метаболических процессов имеет смысл вести речь не об уровне отдельных показателей АОС, а о поддержании окислительно-восстановительного баланса. Поэтому мы исследовали уровень окислитель-

ных процессов по накоплению промежуточных продуктов ПОЛ. Самое низкое содержание ДК свойственно личинкам 3–5-го возраста (табл. 2), а у личинок 8–10-го возраста их количество повышается на 59%. Следует отметить, что содержание кетодиенов у личинок в раннем и позднем возрасте отличается не столь существенно (на 33%). Поскольку кетодиены являются следующим после ДК этапом окисления ненасыщенных жирных кислот, можно предположить, что, хотя у личинок более позднего возраста интенсифицируются начальные стадии ПОЛ, далее интенсивность свободнорадикальных процессов возрастает гораздо слабее. Максимальная интенсивность ПОЛ, судя по содержанию ДК и кетодиенов, характерна для куколок. При этом, как уже было отмечено, у куколок не наблюдается увеличения активности антиоксидантных ферментов и снижен расход GSH. Поскольку уровень ПОЛ измерялся нами в отсутствие каких-либо неблагоприятных воздействий, то можно предположить, что высокая интенсивность окислительных процессов является нормальной для этой стадии онтогенеза. Данный факт выглядит вполне логично, если учесть, что на стадии куколки происходят активные процессы деструкции личиночных тканей и органов. После метаморфоза у имаго интенсивность ПОЛ вновь снижается, хотя и не достигает показателей содержания ДК и кетодиенов, характерных для личинок.

Таким образом, можно сделать вывод, что каждая стадия онтогенеза *T. molitor* характеризуется присущими ей показателями активности ферментов АОС, уровнем GSH и накопления промежуточных продуктов ПОЛ. Процесс метаморфоза сопровождается сдвигом прооксидантно-антиоксидантного равновесия в сторону окислительных процессов. Поскольку данный вид служит общепринятой

Таблица 2. Интенсивность пероксидного окисления липидов *T. molitor* на разных стадиях онтогенеза

Показатели	Личинки 3–5-го возраста	Личинки 8–10-го возраста	Куколки	Имаго
Содержание диеновых конъюгатов, нмоль на 1 мг массы тела ($n = 10$)	8,02 ± 0,51 ^a	12,75 ± 0,70	27,50 ± 1,36 ^b	18,89 ± 1,29 ^c
Содержание кетодиенов, нмоль на 1 мг массы тела ($n = 10$)	6,27 ± 0,32 ^a	8,34 ± 0,66	25,05 ± 0,89 ^b	10,48 ± 0,60 ^d

Примечание: ^a различия по сравнению с личинками 8–10-го возраста, куколками и имаго достоверны ($p < 0,05$; $n = 10$); ^b различия по сравнению с личинками 3–5-го и 8–10-го возраста и имаго достоверны ($p < 0,05$; $n = 10$); ^c различия по сравнению с личинками 3–5-го и 8–10-го возраста и куколками достоверны ($p < 0,05$; $n = 10$); ^d различия по сравнению с личинками 3-5 возраста и куколками достоверны ($p < 0,05$; $n = 10$).

моделью при изучении молекулярных механизмов адаптации к низким температурам, в будущем представляется целесообразным оценить значение каждого из компонентов АОС и интенсивность ПОЛ на каждой стадии онтогенеза при низкотемпературной акклимации.

АНТИОКСИДАНТНА СИСТЕМА ВЕЛИКОГО БОРОШНЯНОГО ХРУЩАКА (*Tenebrio molitor*)

О. К. Гулевський, О. О. Грищенкова,
Л. І. Реліна

Інститут проблем кріобіології і
кріомедицини НАН України, Харків;
e-mail: lianaisaakovna@rambler.ru

У роботі оцінено рівень антиоксидантного захисту та інтенсивність пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) у великого борошняного хрущака (*Tenebrio molitor*) на різних стадіях розвитку. Виявлено, що кожна стадія має свої особливості прооксидантно-антиоксидантної рівноваги. Так, максимальна інтенсивність окислювальних процесів, що оцінена за рівнем накопичення проміжних продуктів ПОЛ – дієнових кон'югатів та кетодієнів – властива лялечкам, а мінімальна – личинкам 3–5-го віку. Активність супероксиддисмутази поступово зростає протягом життєвого циклу. На стадії лялечок відбувається зниження каталазної та глутатіонредуктазної активності. Активність каталази в імаго дорівнює, а активність глутатіонредуктази перевищує її показники в личинок. При цьому глутатіонредуктазну активність у *T. molitor* в умовах нашого експерименту зареєстровано тільки при 37 °С. Статистично вірогідних змін рівня відновленого глутатіону протягом життєвого циклу комах не спостерігається.

Ключові слова: пероксидне окислення ліпідів, антиоксидантні ферменти, великий борошняний хрущак.

ANTIOXIDANT SYSTEM IN THE DARKLING BEETLE (*Tenebrio molitor*) IN ONTOGENY

A. K. Gulevsky, Ye. A. Grishchenkova,
L. I. Relina

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov;
e-mail: lianaisaakovna@rambler.ru

Summary

The level of antioxidant protection and lipid peroxidation (LP) intensity in the darkling beetle *Tenebrio molitor* on different developmental stages were assessed. Each stage was shown to be characterized by its own peculiarities of prooxidant-antioxidant balance. Thus, maximal intensity of oxidative processes estimated by LP intermediate product (diene conjugates and ketodiens) accumulation is attributable to pupae, and minimal intensity – to the 3rd–5th instar larvae. Superoxide dismutase activity increases gradually during the life cycle. A decline in catalase (CAT) and glutathione reductase (GR) activities occurred on the stage of pupae. CAT activity in imago was equal to the larva values, and GR activity in imago even exceeded the larva values. At the same time GR activity in *T. molitor* was detected only at 37 °C under our experimental conditions. No statistically significant changes in glutathione reduced content were observed in the insects during the life cycle.

Key words: lipid peroxidation, antioxidant enzymes, darkling beetle.

1. Harrison J. F., Suarez R. K. // J. Exp. Biol. – 2004. – 207 (Pt 19). – P. 3251–3252.
2. Barbehenn R. V. // J. Chem. Ecol. – 2003. – 29, N 3. – P. 683–702.
3. Marshall C. B., Daley M. E., Graham L. A. et al. // FEBS Lett. – 2002. – 529, N 2–3. – P. 261–267.

4. Макаревич О. П., Голиков П. П. // Лаб. дело. — 1983. — № 6. — С. 24–27.
5. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г. и др. // Там же. — 1988. — № 1. — С. 16–19.
6. Макаренко Е. В. // Там же. — 1988. — № 11. — С. 48–50.
7. Ellman G. L. // Arch. Biochem. Biophys. — 1959. — **82**, N 1. — P. 70–71.
8. Стальная И. Д. Современ. методы в биохим. — М.: Медицина, 1977. — С. 63–64.
9. Recknagel R. O., Ghoshal A. K. // Exp. Mol. Pathol. — 1966. — **5**, N 5. — P. 413–426.
10. Allen R. G., Oberley L. W., Elwell J. H. et al. // J. Cell. Physiol. — 1991. — **146**, N 2. — P. 270–276.
11. Nickla H., Anderson J., Palzkill T. // Experientia. — 1983. — **39**, N 6. — P. 610–612.
12. Joannis D. R., Storey K. B. // J. Exp. Biol. — 1996. — **199** (Pt 7). — P. 1483–1491.
13. Felton G. W., Summers C. B. // Arch. Insect Biochem. Physiol. — 1995. — **29**, N 2. — P. 187–197.
14. Релина Л. И., Федулова Е. С., Гулевский А. К. и др. / Материалы VII Пушкинской школы-конференции молодых ученых «Биология — наука XXI века» / Пушкино, апрель 2003 г. — С. 368–369.

Получено 10.10.2005