



## Изменение активности каталазы при увеличении возраста после линьки на имаго у самцов *Aedes (Ochlerotatus) communis* и *A. (O.) cantans* (Diptera: Culicidae)

А.В. Разыграев

Зоологический институт Российской академии наук, Университетская наб. 1, 199034 Санкт-Петербург, Россия; e-mails: Alexey.Razygraev@zin.ru, a.v.razygraev@gmail.com

Представлена 21 октября 2024; после доработки 10 мая 2025; принята 17 мая 2025.

### РЕЗЮМЕ

Усиление биосинтеза каталазы, антиоксидантного фермента, рассматривается в литературе как часть физиологического механизма, поддерживающего жизнеспособность комаров в стрессовых условиях. Недавно при определении активности каталазы в гомогенатах самцов комаров *Aedes (Aedes) geminus* Peus и *Culex territans* Walker автором показано, что у неокрепших и незрелых имаго активность фермента повышена; далее в онтогенезе уровень активности фермента снижается и выходит на плато. В настоящей работе проведена проверка этой закономерности у самцов комаров двух видов из подрода *Ochlerotatus* рода *Aedes*. Активность каталазы измерена в гомогенатах недавно слинявших и зрелых самцов *A. (O.) communis* (de Geer) и *A. (O.) cantans* (Meigen), выявлены различия в удельной активности фермента между возрастными группами, аналогичные обнаруженным ранее у других видов комаров: в возрасте менее 1 суток от вышлота активность фермента значимо выше, чем в период от 3–4 до 8–10 суток. Повышенная активность каталазы, выявленная у самцов возраста менее 1 суток, вероятно, связана со стрессовым состоянием насекомого во время и/или сразу после метаморфоза. Возможно, повышенная активность каталазы в период после линьки необходима в связи с продукцией пероксида водорода при биосинтезе меланина. Выявленная динамика каталазной активности может индуктивно рассматриваться как общая закономерность среди комаров семейства Culicidae.

**Ключевые слова:** количественный анализ, кровососущие комары, пероксид водорода, развитие, фермент

---

## Changes in the activity of catalase with post-emergence age in male *Aedes (Ochlerotatus) communis* and *A. (O.) cantans* (Diptera: Culicidae)

A.V. Razygraev

Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences, Universitetskaya emb. 1, 199034 Saint Petersburg, Russia; e-mails: Alexey.Razygraev@zin.ru, a.v.razygraev@gmail.com

Submitted October 21, 2024; revised May 10, 2025; accepted May 17, 2025.

### ABSTRACT

Increased biosynthesis of catalase, an antioxidant enzyme, is considered in literature as a component of physiological mechanism that enhances survival of mosquitoes under stressful conditions. Recently, using extracts of male mosquitoes *Aedes (Aedes) geminus* Peus and *Culex territans* Walker, it was shown that, in teneral and less than 1-day old adults, there is an elevated activity of catalase; in further days, the catalase activity is decreased to plateau. In present study, the hypothesis of the same pattern was tested in two species of subgenus *Ochlerotatus* of genus *Aedes*. Activity of catalase was measured in homogenates of immature and mature males of *A. (O.) communis* (de Geer) and *A. (O.) cantans* (Meigen) and the age-related differences in the specific activity of the enzyme,

analogous to those observed earlier, were revealed: in teneral and less than 1-day old adults, the activity of catalase is significantly higher than in adults of 3–4 to 8–10 days of age. Elevated activity of catalase in teneral and less than 1-day old males suggests an important role of this enzyme during and/or immediately after metamorphosis. Increased catalase activity may reflect an activated antioxidant capacity in stressful period of development, in which the insect is highly vulnerable. It is also suggested that there is a link between the elevation of the activity of this enzyme and the increased biosynthesis of melanin which is accompanied by hydrogen peroxide production. Subsequent decrease of catalase activity possibly reflects low stress, the completion of many developmental steps and the maturation of the insect. Revealed changes in catalase activity associated with post-emergence age may be inductively considered a common physiological trait of mosquitoes.

**Key words:** quantitative analysis, mosquitoes, hydrogen peroxide, development, enzyme

## ВВЕДЕНИЕ

Согласно литературным данным, повышенный биосинтез каталазы – антиоксидантного фермента, восстанавливающего пероксид водорода, вовлечен в механизм увеличения продолжительности жизни у зимующего поколения кровососущих комаров *Culex pipiens* Linnaeus, а также способствует сохранению их репродуктивной функции (Sim and Denlinger 2011). Помимо этого, однако, существуют данные, полученные на других видах, указывающие на ее возможную важную роль у неокрепших, недавно выплывших имаго. Было показано, что у самцов *Aedes (Aedes) geminus* Peus и *Cx. territans* Walker возраста менее 1 суток активность каталазы повышена по сравнению с самцами возраста от 3 до 11 суток; у зрелых самцов уровень активности фермента снижается и выходит на плато. Предполагается, что повышенная активность каталазы связана со стрессовым состоянием насекомого в период метаморфоза и/или с биосинтезом меланина, сопровождающим склеротизацию покровов (Razygraev 2023). Если гипотеза верна, то и у других насекомых (и вообще членистоногих) тоже должна наблюдаться повышенная активность каталазы сразу после линьки. К настоящему времени неизвестно, насколько распространено даже среди комаров явление повышенной активности каталазы у свежеслинявших имаго с последующим ее снижением и выходом на плато. В данной работе была поставлена цель оценить изменения активности каталазы у самцов двух других, наиболее обычных видов комаров рода *Aedes* (из подрода *Ochlerotatus*) – *A. (O.) communis* (de Geer) и *A. (O.) cantans* (Meigen).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Сбор и подготовка материала

Преимагинальные стадии *A. communis* и *A. cantans* (личинки последнего возраста и куколки) собраны во временных водоемах, образовавшихся за счет таяния снежного покрова. Место сбора – Невский лесопарк (Всеволожский р-н, Ленинградская обл., северо-запад России). Время сбора – апрель–июнь 2020 и 2021 гг. Выплывших имаго содержали в лабораторных условиях, как описано в ранее (Razygraev 2023), при средней температуре воздуха +23°C, относительной влажности выше 50%, естественном фотопериоде и свободном доступе к воде и сахарозе. Самцов по истечении разного времени от вылода (от свежеслинявших и возраста менее 1 суток до возраста 8–10 суток) замораживали при -10–12°C и переносили на хранение при -80°C до приготовления гомогенатов. Размороженных комаров гомогенизировали в охлажденном 0.05 М К-Na-фосфатном буфере (pH 7.8) в стеклянном гомогенизаторе Поттера в течение 60 с. Это отличается от аналогичной работы, выполненной на самцах *A. geminus* и *Cx. territans* (Razygraev 2023) с применением гомогенизации на шлифованных стеклах (frosted glass slides), после которой определяется более низкая удельная активность каталазы. Непосредственно перед гомогенизацией у каждого комара отделяли крылья, ноги, головной отдел и конец брюшка с VII сегмента, включая терминалии, по морфологии которых проверяли видовую принадлежность (Becker et al. 2010). Полученный гомогенат грудного и большей части брюшного отделов центрифугировали при 1000g (4°C, 6 мин), супернатант использовали для определения каталазной активности.

### Определение удельной ферментативной активности каталазы

Активность каталазы определяли методом, основанным на регистрации убыли концентрации пероксида водорода в реакционной смеси: в реакционную смесь добавляют молибдат аммония, вследствие чего развивается желтое окрашивание, интенсивность которого зависит от концентрации пероксида водорода на момент добавления молибдата (Isaacs 1922; Peizer and Widelock 1955; Королюк и др. [Koroliuk et al.] 1988). Регистрацию проводили спектрофотометрически при длине волны 410 нм (Королюк и др. [Koroliuk et al.] 1988). В качестве основы для реакционной среды использовали MOPS-буфер (0.01 М, pH 7.4) (Разыграев [Razygraev] 2021). Рабочая (стартовая) концентрация пероксида водорода – 8.2 мМ. К 785 мкл MOPS-буфера, который преинкубировали несколько минут на водяной бане при 25°C, добавляли 15 мкл супернатанта гомогената, оставшегося охлажденным до момента добавления. Реакцию инициировали внесением 20 мкл водного раствора пероксида водорода (0.336 М). Проинкубировав реакционную смесь 240 с при 25°C от момента внесения пероксида, добавляли 400 мкл водного раствора молибдата аммония (32.4 мМ). Непосредственно после добавления каждого из реактивов образующуюся смесь тщательно перемешивали. Для каждого образца также готовили холостую пробу, в которую одновременно добавляли два последних реактива (пероксид водорода и молибдат), но не смешивая их предварительно перед добавлением в реакционную смесь. Для этого заранее наносили 20 мкл раствора пероксида водорода на стенку пробирки (держа пробирку под небольшим наклоном) выше уровня смеси MOPS-буфера и супернатанта гомогената, после этого вносили 400 мкл раствора молибдата аммония, быстро закрывали пробирку и перемешивали ее содержимое. Поглощение желтого комплекса пероксида водорода с молибдатом при 410 нм регистрировали после достижения его максимального значения (несколько минут при комнатной температуре). Убыль концентрации пероксида водорода высчитывали на основе разницы в поглощении при 410 нм между холостой и опытной пробами как описано в предыдущей работе (Разыграев [Razygraev] 2021).

Неферментативное разрушение пероксида водорода, уровень которого был незначителен и близок к нулю за 240 с, контролировали путем внесения в реакционную смесь буфера, на котором был приготовлен гомогенат, вместо супернатанта гомогената. Данная методика рассчитана на использование спектрофотометрической кюветы, в которой возможно измерить оптическую плотность раствора объемом 1220 мкл. В случае необходимости использования большего итогового объема см. методику, описанную в предыдущей работе (Razygraev 2023).

Выбор рабочей концентрации пероксида водорода, равной 8.2 мМ, обусловлен тем, что данная концентрация вместе с оптической плотностью, обусловленной присутствием супернатанта гомогената, обеспечивает приемлемую величину оптической плотности при 410 нм (около 0.700). Кроме того, зависимость поглощения комплекса пероксида водорода с молибдатом от концентрации пероксида практически линейна до значения 8.2 мМ (Разыграев [Razygraev] 2021). Использование более высоких концентраций пероксида предполагало бы дополнительное разведение реакционной смеси перед регистрацией оптической плотности. Невозможность насыщения фермента пероксидом при концентрациях, приемлемых для работы, – известное свойство каталазы (Aebi 1974, 1984). Это свойство было проверено в настоящей работе для гомогенатов самцов *A. communis*: при увеличении концентрации пероксида водорода в реакционных смесях вплоть до значения, равного 0.1 М, продолжает увеличиваться начальная скорость реакции (для этого поглощение пероксида водорода регистрировали при 260 нм, реакцию проводили в фосфатном буфере с pH 7.4). Поэтому ферментативная реакция проводится при любой удобной стартовой концентрации субстрата (пероксида водорода), но при этом необходимо соблюдать условие равенства стартовых концентраций субстрата во всех сравниваемых между собой образцах.

Концентрацию белка в супернатанте гомогенатов определяли турбидиметрическим методом (Чеснокова и др. [Chesnokova et al.] 1997) как описано ранее (Разыграев [Razygraev] 2022). Удельную активность каталазы выражали в микромольях пероксида водорода, израсходованного за 1 минуту, в пересчете на 1 мг белка.

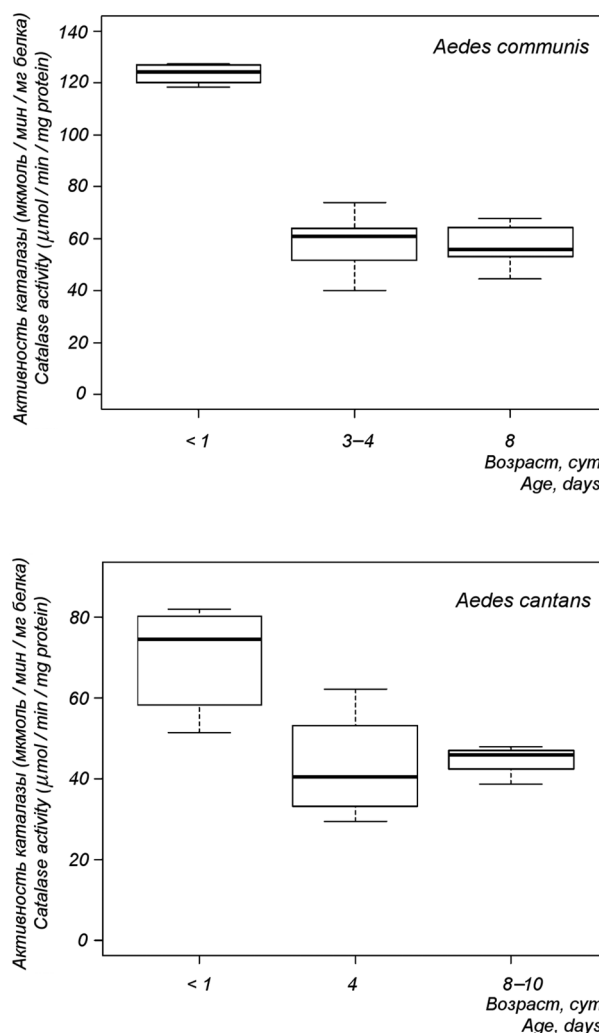
### Статистическая обработка

Критерием Краскела-Уоллиса сравнивали величины удельной ферментативной активности, полученные в разных возрастных группах, а также после логарифмирования этих величин с применением натурального логарифма использовали классический дисперсионный анализ. Сравнения *post hoc* проводили, соответственно, методами Коновера (с поправкой Холма на множественное тестирование) и Тьюки. Статистическая обработка выполнена в программной среде R версии 4.2.1 (R Core Team 2022). Критерий Коновера с поправкой Холма высчитывали с использованием соответствующего скрипта из программного пакета «PMCMR» (Pohlert 2021).

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Уровни удельной активности каталазы у имаго самцов *A. communis* и *A. cantans* трех возрастных групп представлены в графической форме на Рис. 1. Для *A. communis* выявлены статистически значимые изменения активности каталазы в первые несколько суток от вышлода – общее *p*-значение по критерию Краскела-Уоллиса составило 0.0145, а при использовании дисперсионного анализа с предварительным логарифмированием зависимой переменной –  $8.92 \cdot 10^{-6}$ . Медианы (в микромолях пероксида водорода, израсходованного в минуту на 1 мг белка) составили 124.05 для самцов возраста менее 1 суток ( $n = 4$ ) и 61.04 и 55.73 для самцов возраста 3–4 суток ( $n = 7$ ) и 8 суток ( $n = 5$ ) соответственно. Первая из трех групп значимо отличается от двух последующих ( $p = 0.0073$  по критерию Коновера в обоих сравнениях и  $1.52 \cdot 10^{-5}$  и  $2.67 \cdot 10^{-5}$  по критерию Тьюки с предварительным логарифмированием). Последние две группы образуют плато (при сравнении их между собой *post hoc p*-значения составили 0.9322 и 0.9933 при использовании тех же двух статистических методов соответственно).

Аналогично, для самцов *A. cantans* выявлены статистически значимые изменения активности каталазы в тот же период онтогенеза – общее *p*-значение по критерию Краскела-Уоллиса составило 0.0245; при использовании дисперсионного анализа с предварительным логарифмированием – 0.0107. Медианы величин каталазной активности составили 74.50 для самцов



**Рис. 1.** Активность каталазы у самцов *Aedes communis* и *A. cantans* разного возраста, считая от вышлода имаго. Линия внутри бокса обозначает медиану. Нижняя и верхняя границы бокса соответствуют интерквартильному размаху (q1–q3), «усы» обозначают размах min–max.

**Fig. 1.** Activity of catalase in male *Aedes communis* and *A. cantans* of three age groups.

The bold line inside the box indicates the median. The bottom and the top borders of the box are the 25th and 75th percentiles (1st and 3rd quartiles). The “whiskers” are the extreme values.

возраста менее 1 суток ( $n = 6$ ) и 40.46 и 45.97 для самцов возраста 4 суток ( $n = 4$ ) и 8–10 суток ( $n = 3$ ) соответственно. Первая из трех групп снова значимо отличается от двух последующих:  $p = 0.0140$  и  $0.0290$  по критерию Коновера и  $0.0151$  и  $0.0450$  по критерию Тьюки с предварительным логарифмированием. При сравнении последних двух групп между собой не выявля-

ются значимые различия; при использовании тех же критериев *post hoc p*-значения составили 0.7474 и 0.9393 соответственно.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В предыдущем исследовании (Razygraev 2023) были показаны изменения активности каталазы у самцов *A. geminus* и *Cx. territans*, у которых активность фермента высока в первые сутки, считая от вылода, и затем снижается и выходит на плато у зрелых комаров. В настоящем исследовании на еще двух видах семейства Culicidae показана та же закономерность. Индуктивно можно заключить, что выявленная динамика каталазной активности – общая закономерность среди комаров семейства Culicidae, помня, однако, об остающейся возможности обнаружения исключений из этого правила. Представляет интерес проверка выявленной закономерности среди самок комаров, насекомых других отрядов и среди других членистоногих. Поскольку концентрация белка в гомогенате используется при расчете удельной активности фермента, представляется важным, чтобы при такой проверке все особи, которые анализируются на различающихся этапах онтогенеза имаго, получали приблизительно одинаково обильное питание на личиночной стадии. Например, в настоящей работе были собраны насекомые, уже завершившие личиночное питание в естественных условиях (окуклившиеся особи), либо уже выросшие, напитавшиеся личинки последней стадии. Не рекомендуется смешивать в выборку комаров, выращенных в лаборатории и развивавшихся в естественных условиях, и тем более сравнивать разные возрастные группы имаго по удельной активности фермента, если они могут различаться по условиям питания на личиночной стадии.

Можно предположить, что каталаза является важным ферментом по крайней мере на некоторых этапах в раннем онтогенезе имаго. Повышенная активность фермента у неокрепших и незрелых имаго комаров, возможно, связана с недавно прошедшими линькой и метаморфозом и, должно быть, отражает повышенную антиоксидантную защиту в стрессовый период жизни насекомого. Активированное состояние антиоксидантного фермента согласуется с тем фак-

том, что многие процессы развития всё ещё происходят в организме неокрепшего и незрелого имаго (Wilkerson et al. 2021), включая биосинтез меланина, сопровождающийся продукцией пероксида водорода (Munoz-Munoz et al. 2009).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В литературе иногда появляются попытки сравнения разных видов внутри более крупных таксонов по активности антиоксидантных ферментов (Lance and Elsey 1983, Razygraev 2023). Результаты проведенного исследования имеют большое значение для решения вопроса о выборе периода развития комаров, в котором разные виды можно сравнивать между собой по каталазной активности. Использование половозрелых имаго может позволить выявить филогенетический тренд по каталазной активности среди комаров (Razygraev 2023), что едва ли возможно, если смешивать в одну выборку недавно перелинявших и половозрелых насекомых. Ранее на комарах *Cx. pipiens* и *Cx. torrentium* было показано, что каталазная активность значительно различается у зимующих самок этих двух видов, почти идентичных морфологически (Razygraev [Razygraev] 2022, Razygraev 2023). Это является определенным прецедентом: в дальнейшем, если у морфологически идентичных комаров, считающихся одним видом, будут обнаружены сильно различающиеся (или даже распадающиеся на две группы) уровни каталазной активности, то можно будет проверять гипотезу о существовании двух видов – морфологических двойников. Опять же, присутствие в одной выборке свежелинявших и половозрелых имаго усложнит картину и едва ли позволит успешно работать в этом направлении. При сравнении видов насекомых и по другим биохимическим параметрам, помимо каталазной активности, также может оказаться важным учитывать этап индивидуального развития, через который проходят имаго.

Хорошо известно, что при метаморфозе и сразу после него насекомые очень уязвимы и нередко погибают в эти периоды (Wilkerson et al. 2021). Автор регулярно сталкивается с тем, что не все особи комаров (особенно среди подрода *Ochlerotatus* рода *Aedes*) оказываются способны завершить метаморфоз: часто гибель происходит на стадии куколки, либо имаго не способно

полностью освободиться от кукольного экзuvia, что тоже приводит к гибели. Нередко бывает, что внешне нормально перелинявшие имаго гибнут в течение 1–2 суток после выплода. В дальнейшем можно проверить, снижается ли жизнеспособность у комаров (или увеличивается доля нежизнеспособных имаго) при обработке свежеслинявших имаго ингибиторами каталазы. Результаты могут оказаться значимыми для разработки методов регуляции численности кровососущих комаров.

## БЛАГОДАРНОСТИ

В работе использовалось оборудование Центра коллективного пользования «Таксон» Зоологического института РАН (Санкт-Петербург).

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа поддержана государственным заданием № 125013001089-0.

## ЛИТЕРАТУРА

- Aebi H. 1974.** Catalase *in vitro*. In: H.U. Bergmeyer and K. Gawehn (Eds). *Methods of enzymatic analysis*. Vol. 2. Academic Press, New York: 673–684.
- Aebi H. 1984.** Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, **105**: 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Becker N., Petrić D., Zgomba M., Boase C., Dahl C., Lane J. and Kaiser A. 2010.** *Mosquitoes and Their Control*, 2nd ed. Springer, Berlin, 577 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-92874-4>
- Chesnokova L.S., Voinova N.E., Komkova A.I. and Lyanguzov A.Y. 1997.** Quantitative protein analysis. In: V.G. Vladimirov and S.N. Lyzlova (Eds). *Enzymes and nucleic acids*. St-Petersburg University Press, Saint Petersburg: 5–25. [In Russian].
- Isaacs M.L. 1922.** A colorimetric determination of hydrogen peroxide. *Journal of the American Chemical Society*, **44**(8): 1662–1663. [https://doi.org/10.1016/S0016-0032\(22\)90949-4](https://doi.org/10.1016/S0016-0032(22)90949-4)
- Koroliuk M.A., Ivanova L.I., Maiorova I.G. and Tokarev V.E. 1988.** A method for measuring catalase activity. *Laboratornoe delo*, **1**: 16–19. [In Russian].
- Lance V. and Elsey R. 1983.** Selenium and glutathione peroxidase activity in blood of the nutria (*Myocastor coypus*): comparison with guinea pig, rat, rabbit and some non-mammalian vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, **75**(4): 563–566. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(83\)90096-2](https://doi.org/10.1016/0305-0491(83)90096-2)
- Munoz-Munoz J.L., García-Molina F., Varón R., Tudela J., García-Cánovas F. and Rodríguez-López J.N. 2009.** Generation of hydrogen peroxide in the melanin biosynthesis pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*, **1794**(7): 1017–1029. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.04.002>
- Peizer L.R. and Widelock D. 1955.** A colorimetric test for measuring catalase activity of cultures of *M. tuberculosis*. *American Review of Tuberculosis and Pulmonary Diseases*, **71**(2): 305–313.
- Pohlert T. 2021.** The pairwise multiple comparison of mean ranks package (PMCMR). R package. Version 4.4 (2021-10-02). Available from: <https://cran.r-project.org/web/packages/PMCMR/index.html>
- R Core Team. 2022.** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Razygraev A.V. 2021.** A method for measuring catalase activity in mosquitoes by using ammonium molybdate and reaction medium buffered with 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid. *Parazitologiya*, **55**(4): 318–336. [In Russian]. <https://doi.org/10.31857/S0031184721040049>
- Razygraev A.V. 2022.** Activity of catalase in overwintering females of mosquitoes *Culex pipiens*, *Culex torrentium*, and *Anopheles maculipennis* s.l. (Diptera: Culicidae). *Proceedings of the Zoological Institute RAS*, **326**(4): 294–302. [In Russian]. <https://doi.org/10.31610/trudyzin/2022.326.4.294>
- Razygraev A.V. 2023.** Catalase enzymatic activity in adult mosquitoes (Diptera, Culicidae): taxonomic distribution of the continuous trait suggests its relevance for phylogeny research. *Zootaxa*, **5339**(2): 159–176. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5339.2.3>
- Sim C. and Denlinger D.L. 2011.** Catalase and superoxide dismutase-2 enhance survival and protect ovaries during overwintering diapause in the mosquito *Culex pipiens*. *Journal of insect physiology*, **57**(5): 628–634. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.01.012>
- Wilkerson R.C., Linton Y.-M. and Strickman D. 2021.** *Mosquitoes of the World*. Vols. 1 and 2. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, 1332 p.