ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«Воронежский государственный университет»

На правах рукописи

Сыромятников Михаил Юрьевич

БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИТОХОНДРИЙ ЛЕТАТЕЛЬНЫХ МЫШЦ ШМЕЛЕЙ (BOMBUS TERRESTRIS L.)

Специальность 03.01.04 – биохимия

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор биологических наук,
профессор Попов В. Н.

Воронеж 2014

ВВЕДЕНИЕ 6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 13
1.1. Общая характеристика митохондрий 13
1.1.1. Общий план строения, происхождения и функций митохондрий .. 13
1.1.2. Комплекс I ЭТЦ 14
1.1.3. Комплекс II ЭТЦ 16
1.1.4. Комплекс III ЭТЦ 18
1.1.5. Комплекс IV ЭТЦ 19
1.1.6. Комплекс V ЭТЦ. АТФаза 22
1.1.7. Механизмы разобщения митохондриальной мембраны 23
1.1.8. Механизмы образования АФК в митохондриях 26
1.2. Катаболические процессы в летательных мышцах насекомых 29
1.2.1. Общая характеристика окислительного метаболизма насекомых .. 29
1.2.2. Гликолитический путь в летательных мышцах насекомых 31
1.2.3. Особенности функционирования цикла Кребса в летательных мышцах насекомых 34
1.2.4. Электрон-транспортная цепь митохондрий насекомых 35
1.2.5. Липиды как источник энергии для полёта насекомых 40
1.2.6. Образование АФК в клетках насекомых 42
1.3. Общая характеристика антиоксидантной системы 45
1.3.1. Активные формы кислорода и механизмы защиты клеток от его повреждающего действия 45
1.3.2. Характеристика основных антиоксидантных ферментов 49
Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ 55
2.1. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 55
2.1.1. Объект исследования 55
2.1.2. Методы исследования 55

2.1.2.1 Определение уровня потребления кислорода и выделения углекислого газа в процессе дыхания 55
2.1.2.2. Выделение митохондрий из летательных мышц шмелей 55
2.1.2.3. Определение концентрации белка 56
2.1.2.4. Измерение скорости дыхания митохондрий 56
2.1.2.5. Оценка целостности внутренней мембраны митохондрий 57
2.1.2.6. Измерение мембранного потенциала митохондрий 57
2.1.2.7. Определение скорости продукции пероксида водорода митохондриями 58
2.1.2.8. Измерение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) 58
2.1.2.9. Измерение активности аконитатгидратазы (АГ) 58
2.1.2.10. Измерение поглощения кальция митохондриями 59
2.1.2.11. Иммунодетекция белков (Вестерн-блот) 59
2.1.2.12. Выделение тотальной РНК 59
2.1.2.13. Проведение обратной транскрипции 60
2.1.2.14. Проведение полимеразной цепной реакции 61
2.1.2.15. Проведение аналитического электрофореза нуклеиновых кислот в агарозном геле 62
2.1.2.16. Проведение RT-PCR 62
2.1.2.17. Статистическая обработка данных 63
2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ 64
2.2.1. Окислительный метаболизм митохондрий летательных мышц шмелей 64
2.2.1.1. Интенсивность потребления кислорода и выделения углекислого газа шмелями 64
2.2.1.2. Характеристика катаболический активности митохондрий летательных мышц шмелей 68
2.2.1.3. Продукция активных форм кислорода митохондриями летательных мышц шмелей 78

2.2.1.4. Транспорт кальция через внутреннюю мембрану митохондрий летательных мышц шмелей 85
2.2.2. Влияние фунгицидов на биоэнергетические процессы в митохондриях летательных мышц шмелей 93
2.2.3. Идентификация генов основных антиоксидантных ферментов в ДНК шмеля, выявление уровня их экспрессии в покое и после продолжительного полёта 99
2.2.3.1. Разработка праймеров для генов шмелей 99
2.2.3.2. Выделение тотальной РНК из грудок шмелей и обратная транскрипция 100
2.2.3.3. Оптимизация условия отжига праймеров 102
2.2.3.4. Идентификация генов ключевых антиоксидантных ферментов летательных мышц шмелей с помощью PCR-реакций 104
2.2.3.5. Влияние продолжительного полёта на экспрессию генов ключевых антиоксидантных ферментов шмелей 105
2.2.4. Влияние направленного митохондриального антиоксиданта SKQ на продолжительность жизни шмеля 108
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 112
ВЫВОДЫ 118
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 120

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – аконитатгидратаза

АДФ – аденозиндифосфат

АМФ – аденозинмонофосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

СОД – супероксиддисмутаза

БСА – бычий сывороточный альбумин

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДНФ – 2,4-динитрофенол

кАтр – карбоксиатрактилазил

кДНК – комплементарная ДНК

НАД$^+$ – никотинамидадениндинуклеотид

НАДФ$^+$ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

ПДГ – пируватдегидрогеназа

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

CoA – коэнзим А

СФ – спектрофотометр

ФАД – флавинадениндинуклеотид

ЦТК – цикл трикарбоновых кислот

ЭГТА – этиленгликольтетраацетат

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

ЭТЦ – электрон-транспортная цепь

dNTP – дезоксинуклеотидтрифосфат

GSH – восстановленный глутатион

PCR – полимеразная цепная реакция

Q – убихинон

RT-PCR – полимеразная цепная реакция в реальном времени

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Глобальные изменения климата и более чем двукратное возрастание количества населения Земли в последние 20 лет сопровождались значительной интенсификацией сельского хозяйства со всё возрастающей долей продукции, выращиваемой в контролируемых условиях тепличных хозяйств. Это стало возможным в значительной степени благодаря принципиальному изменению в технологии опыления растений в теплицах – использованию специально выращиваемых насекомых-опылителей. Так, например, шмели используются для опыления томатов, болгарского перца и многих других культур [42, 161, 245]. Суммарная стоимость рынка шмелей в развитых странах составляет около 55 миллионов евро в год, а суммарная стоимость опыляемой ими тепличной продукции около 12 миллиардов евро в год [238]. Экономическая важность насекомых-опылителей обусловила особое внимание к исследованиям по оптимизации их разведения и содержания. Эти исследования приобретают все большую значимость на фоне общемирового кризиса численности насекомых-опылителей в природе. Так, только в Северной Америке за последние 20 лет количество нескольких подвидов шмелей уменьшилось на 96%, а ареал их обитания сократился на 23-87% [171]. Главными причинами снижения количества опылителей считаются распространение паразитарных инфекций и использование новых пестицидов, не тестированных на насекомых [190].

Большая часть биохимических исследований основных коммерчески важных опылителей (пчел и шмелей) была выполнена в 60-70е годы, и носила выборочный и ограниченный характер. Биохимия митохондрий насекомых-опылителей практически не изучена. Для шмелей вообще отсутствуют какие-либо данные о свойствах митохондрий их летательных мышц.

Скорость катаболических процессов в летательных мышцах насекомых гораздо выше, чем в других исследованных организмах. Известно, что

уровень метаболической активности на грамм массы в летательных мышцах насекомых во время полёта – самый высокий среди всех известных животных [214]. Важнейшую роль в этих процессах играют митохондрии. Интересно отметить, что насекомые способны резко переключать окислительные процессы от низких скоростей (в состоянии покоя) до сверхвысоких (в состоянии полёта) в течение нескольких секунд. При этом столь высокие нормы метаболизма непременно будут сопровождаться повышенной выработкой активных форм кислорода, для ликвидации которых необходима надежная антиоксидантная защита. Поэтому изучение биоэнергетических процессов в митохондриях летательных мышц насекомых является важнейшей фундаментальной задачей.

Сегодня содержание шмелей в теплицах не оптимизировано. В частности, не изучены механизмы снижения полетной активности шмеля при контакте их с пестицидами, которые потенциально могут являться ингибиторами комплексов ЭТЦ и разобщителями митохондриального дыхания, что, в свою очередь, повлечет снижение биоэнергетических показателей насекомых и соответственно опылительной активности.

Стоит отметить, что в настоящее время в научном мире при исследовании физико-химических и молекулярных процессов наблюдается тенденция перехода от макрообъектов к микрообъектам, в частности от позвоночных к беспозвоночным. Лабораторные колонии шмелей являются подходящим материалом для исследования по ряду причин: во-первых, шмели являются доступным (в России и в мире существует множество фирм по выращиванию шмелей для опыления в теплицах, где самцы шмелей в большинстве случаев являются побочным продуктом производства и к тому же они не имеют жалового аппарата) и недорогим объектом по сравнению с мышами, крысами и другими лабораторными животными; во-вторых, в отличие от других насекомых, шмели имеют крупный торакс, что повышает удобство в получении препарата митохондрий, т.к. на данный момент в большинстве случаев используют мышцы дрозофил, что в свою очередь

увеличивает трудоемкость процесса; в-третьих, шмели содержатся в автономном контейнере и не требуют ухода за ними, немаловажен и этический аспект, поскольку в западной Европе и Северной Америке необходима строгая документация для использования лабораторных животных, при этом насекомые практически не попадают в строгие рамки биоэтических законов.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы явилось изучение основных биоэнергетических характеристик митохондрий летательных мышц шмелей (*Bombus terrestris* L.).

Для выполнения цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявить уровень потребления кислорода и выделения углекислого газа шмелями на разных этапах онтогенеза и во время полёта шмеля.

2. Оценить скорость дыхания митохондрий, а также мембранный потенциал в зависимости от субстратов и добавок АДФ, кАтр и ДНФ.

3. Определить процент кислорода, идущий на выработку АФК при дыхании митохондрий в различных метаболических состояниях и при действии ингибиторов ЭТЦ.

4. Оценить процессы транспортировки кальция внутрь митохондрий летательных мышц шмелей, идентифицировать гены переносчиков, а также наличие кальциевого унипортера.

5. Выявить влияние пестицидов на биоэнергетические характеристики митохондрий летательных мышц *B. terrestris*.

6. Методом PCR идентифицировать гены антиоксидантных ферментов в клетках шмеля и выявить уровень экспрессии этих генов в покое и после продолжительного полёта.

8. Выявить влияние митохондриально направленного антиоксиданта SkQ на продолжительность жизни *B. terrestris*.

Научная новизна. Показано, что процессы дыхания, происходящие в *B. terrestris* интенсивнее, чем у млекопитающих. Установлено, что полет

незначительно усиливает дыхательные процессы. Это можно объяснить явлением терморегуляции шмеля.

Выявлена зависимость процессов дыхания митохондрий от присутствия субстратов дыхания для комплекса 1 ЭТЦ, а также α-глицерофосфата и сукцината. Максимальное дыхание через комплекс 1 ЭТЦ наблюдалось в присутствии смеси субстратов пируват+глутамат. Наименьшие скорости дыхания были характерны для цитрата, глутамата, малата и смеси глутамат+малат. Наиболее интенсивное дыхание происходит при добавлении α-глицерофосфата (202,7 нмоль O_2/мин/мг). Митохондрии летательных мышц шмелей окисляют пролин, однако, с небольшой скоростью. Возможно, способность окислять пролин связана с питанием шмелей пыльцой. Было показано, что митохондрии летательных мышц шмелей практически не способны генерировать мембранный потенциал в присутствии сукцината, что, скорее всего, связано с очень низкой скоростью работы дикарбоксилатного переносчика во внутренней мембране митохондрий. Эта особенность обеспечивает высокий пул интермедиатов внутри митохондрий, что важно для протекания интенсивных катаболических процессов.

Определен процент потреблённого кислорода, идущий на продукцию АФК при дыхании митохондрий летательных мышц. Показано, что без добавления ингибиторов на продукцию активных форм кислорода в митохондриях летательных мышц шмелей идет всего 0,3-0,8% кислорода (в зависимости от метаболического состояния). Столь низкие значения процента выработки АФК могут иметь адаптивное значение к полёту.

Митохондрии летательных мышц шмелей не способны закачивать кальций. Однако, гены переносчиков (MCU, MICU1 и EMRE) и белок кальциевого унипортера (MCU) присутствуют в клетках мышц шмелей. Возможно, это связано с особенностями функционирования летательных мышц, митохондрии которых утратили функцию регуляции гомеостаза кальция в клетке из-за высокой частоты сокращения мускулатуры.

Показано, что фунгициды – дитианон и дифеноконазол – являются ингибиторами митохондриального дыхания, а диниконазол и флудиоксонил являются разобщителями митохондриального дыхания.

Методом PCR в ДНК шмелей были идентифицированы гены основных антиоксидантных ферментов: Mn-СОД, каталаза, глутатионпероксидаза, пероксиредоксин 6, пероксиредоксин 5, Cu/Zn-СОД, тиоредоксин-зависимой пероксид-редуктазы, UCP3. Установлено, что их экспрессия падает после продолжительного полёта. Скорее всего, это связано как со снижением мембранного потенциала, так и с общим снижением биосинтетических процессов в полёте.

Изучено влияние митохондриально направленного антиоксиданта SkQ на продолжительность жизни шмелей. Показано, что он снижает смертность шмелей в ранние этапы развития. Использование антибиотика в комбинации с SkQ повышает эффективность антиоксиданта за счет снижения смертности от инфекционных заболеваний.

Практическая значимость. Изучение биоэнергетических характеристик митохондрий летательных мышц шмелей приближает к созданию инновационного пестицида, не действующего на насекомых-опылителей. Например, таким пестицидом может быть вещество, способное блокировать кальциевые каналы в митохондриях, т.к. митохондрии шмелей не способны транспортировать кальций (см. ниже). Изучение механизма неспособности митохондрий летательных мышц шмелей закачивать кальций имеет прямое биомедицинское значение, поскольку большинство неврологических заболеваний опосредовано закачкой кальция внутрь митохондрий. Вследствие того, что насекомые имеют чрезвычайно сильную антиоксидантную защиту, идентификация этих антиоксидантов и процессов детоксикации радикалов кислорода в летательных мышцах шмелей имеет существенное биомедицинское значение.

Исследование влияния пестицидов на биоэнергетические характеристики митохондрий позволит составить рекомендации для

тепличных хозяйств. Немаловажен и экологический аспект в исследованиях влияния пестицидов на опылителей.

Также следует отметить, что изучение физико-химических процессов в митохондриях шмелей, оптимизация условий выращивания насекомых путем добавок в корм биологически активных препаратов принесет экономическую выгоду шмелеводческим предприятиям и теплицам и повысит конкурентоспособность российского шмелеводства.

Материалы данной работы используются в учебном процессе на биолого-почвенном факультете Воронежского госуниверситета при чтении лекций, спецкурсов и проведения лабораторных практикумов.

Положения, выносимые на защиту.

1. Дыхание *Bombus terrestris* L. на удельную массу тела существенно выше, чем у млекопитающих. При этом поглощение кислорода митохондриями при окислении субстратов комплекса I ЭТЦ наиболее высоко на смеси субстратов пируват+глутамат; сукцинат практически не окисляется митохондриями.
2. Процент кислорода, идущий на выработку АФК при дыхании митохондрий летательных мышц *B. terrestris* варьирует в зависимости от метаболического состояния (по Чансу) и присутствия ингибиторов ЭТЦ (ротенон, антимицин А) и составляет 0,3-0,8% поглощаемого кислорода.
3. Для тканей *B. terrestris* идентифицированы гены основных антиоксидантных ферментов: Mn-СОД, каталаза, глутатионпероксидаза, пероксиредоксин 6, пероксиредоксин 5, Cu/Zn-СОД, тиоредоксин-зависимая пероксид-редуктаза, UCP3. Уровень экспрессия этих генов снижается после продолжительного полёта (3-5 часов).
4. Митохондрии летательных мышц *B. terrestris* не способны транспортировать кальций, несмотря на то, что они имеют как гены

переносчиков и регуляторов (MCU, MICU1 и EMRE), так и белок кальциевого унипортера.

5. Фунгициды – дитианон и дифеноконазол – являются ингибиторами митохондриального дыхания; диниконазол и флудиоксонил являются разобщителями митохондриального дыхания.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались и обсуждались на международных, региональных и университетских конференциях. Они были представлены на 13, 14, 15 и 17 международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука 21-го века» (Пущино, 2009; 2010; 2011; 2013), на 49 международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2011), на 3-ей Международной конференции «Генетика старения и долголетия» (Сочи, 2014), на Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз России» (Воронеж, 2011), на Всероссийской конференции «Закономерности распространения, воспроизведения и адаптации растений и животных» (Махачкала, 2010).

Практическое внедрение результатов работы: получен патент на полезную модель «Устройство для стимуляции развития колоний шмелей» (Пат. 2485767), а также патент «Шкаф-инсектарий для выращивания шмелей, а также насекомых и клещей для защиты растений от вредителей» (Пат. 136683).

Публикации. Основные результаты настоящей диссертационной работы изложены в 20 публикациях – 14 статьях и 6 тезисах. Имеется 1 монография и 2 патента.

Структура и объём работы. Диссертация изложена на 144 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части и обсуждения результатов, заключения, выводов, списка литературы (251 источника). Иллюстрационный материал включает 32 рисунка, 6 таблиц.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика митохондрий

1.1.1. Общий план строения, происхождения и функций митохондрий

Митохондрии – клеточные органеллы, участвующие в образовании энергии путем синтеза молекул АТФ. Исследования митохондрий в основном выполняются на тканях бычьего сердца, печени и сердца крыс из-за легкости получения биоматериала [29]. Особую актуальность на данный момент приобретает изучение митохондрий из организмов различных таксономических групп.

Основная функция митохондрий – синтез молекул АТФ. Митохондрии – двумембранные органеллы, которые содержатся в большинстве эукариотических клеток. АТФ является универсальным энергетическим ресурсом для живых организмов. В синтезе молекул АТФ ведущую роль играют комплексы ЭТЦ митохондрий. Митохондрии накапливают электрохимический протонный градиент на внутренней мембране, эти процессы сопряжены с поглощением кислорода и образованием молекул воды. Сформировавшийся протонный потенциал затем используется для синтеза АТФ, который осуществляется с помощью фермента АТФазы [187], или рассеивается в виде тепла [157].

Согласно эндосимбиотической теории, митохондрии произошли в результате симбиоза альфа-протобактерии с клеткой [191]. В результате клетки пре-эукариот стали получать значительно больше энергии. В ходе эволюции генетический материал протобактерии перенесся в ядерную ДНК, также эукариоты приобрели дополнительные гены для полноценного функционировании митохондрий. ДНК митохондрий в клетках млекопитающих кодирует 22 транспортные РНК, 2 рибосомальные РНК, 13 протеинов, которые представлены в комплексах ЭТЦ митохондрий: 7 входят

в комплекс 1, 1 в комплекс 3 и 3 в комплекс 4. Также 2 протеина входят в комплекс 5 ЭТЦ (АТФаза). Более тысячи белков, кодируемых ядерной ДНК, транспортируются в митохондрии с помощью специальных транспортных белков. Из 850 белков, находящихся в митохондрии, только 15% задействованы непосредственно в образовании энергии. Другие белки используются для синтеза ДНК, процессов транскрипции, транспорта и фолдинга белков [203]. Митохондрии также содержат белки, необходимые для деления органелл и индукции апоптоза [57, 186]. Кроме того, имеются белки, участвующие в биосинтезе железо-серных белков [133]. Так, к примеру, 5,8% протеома митохондрий дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) участвует в транспорте метаболитов. Количество генов переносчиков может варьировать от 35 до 125 в зависимости от вида живых организмов [91].

Митохондрии в клетках существуют как динамические системы. Льюис впервые наиболее полно описал динамические характеристики митохондрий [132]. Деление митохондрий и их слияние оказывает существенное влияние на формирование внутриклеточной сети между отдельными единицами. Механизм регуляции динамики митохондрий важен для понимания участия органелл в ряде заболеваний. В частности, эти процессы могут играть существенную роль в заболевании Паркинсона.

Комплексы ЭТЦ митохондрий состоят из нескольких субъединиц. Так, комплекс 1 ЭТЦ содержит 45 субъединиц, комплекс II ЭТЦ (сукцинатдегидрогеназа) имеет 4 субъединицы, комплекс III включает 11 субъединиц, комплекс IV – 13 субъединиц, а комплекс V состоит из 17 субъединиц [145, 146].

1.1.2. Комплекс I ЭТЦ

Комплекс I ЭТЦ (НАДН-убихиноноксидоредуктаза, EC 1.6.5.3), является самым большим комплексом в митохондриях (около 1 мегадальтона), который катализирует окисление НАДН. Комплекс I ЭТЦ

состоит из 45 субъединиц [53]. Ядерным геномом кодируется 38 субъединиц, в то время как митохондриальной ДНК 7 субъединиц [143]. Структура комплекса I ЭТЦ имеет несколько модулей. Первым является N-модуль, он имеет в своём составе флавин-мононуклеотид (ФМН), который ответственен за окисление НАДН и содержит 8 железо-серных кластеров, второй Q-модуль содержит убихиноновый сайт. Третий модуль носит название P-модуль, содержит два домена одинакового размера (проксимальный и дистальный), он участвует в транслокации протонов [240]. Движущей силой для протонов является поток электронов от НАДН к убихинону.

На данный момент известно, что НАДН-убихиноноксидоредуктаза способна не только к переносу элеткронов и протонов, но и имеет некоторые другие функции. Так, в комплексе I N. Crassa была обнаружена субъединица (SDAP), сходная с ацил-переносящим белком, участвующим в системе биосинтеза жирных кислот. Роль этой субъединицы до конца не ясна, однако, при мутантной замене гена, ответственного за формирования этой субъеденицы, комплекс 1 у N. Crassa не способен формироваться [5].

Комплекс I ЭТЦ может участвовать в различных заболеваниях при его дисфункции. Первопричиной таких явлений являются дефекты в ядерной или митохондриальной ДНК. Можно выделить следующие заболевания: сидром Лея, лактозный ацидоз, лейкоинцефалопатия, миопатия, неонатальная кардиомиопатия с лактозным ацидозом [72, 120]. Дефекты в комплексе I ЭТЦ, а также мутации в мтхДНК служат причинами таких заболеваний как нейропатия Лебера, митохондриальная энцилофопатия [52]. Существует ещё ряд заболеваний, связанных с дисфункцией НАДН-убихиноноксидоредуктазы, среди них можно выделить офтальмопорез, оптическая атрофия, эпилепсия, атаксия и дистония, гепатопатия, протоинурия и др. [154].

Комплекс 1 ЭТЦ может быть ингибирован ротеноном, а также пьерецедином А. Однако, на данный момент точный сайт ингибирования этих веществ не известен. Большинство ингибиторов комплекса I ЭТЦ

являются сильными гидрофобными агентами или обладают амфипатией (Х-100, тезит). Однако, на данный момент сайты связывания хинона с ферментом и ингибиторами не совсем определены. Концентрации ингибиторов, действующих на прямой и обратный ток электронов, может существенно различаться. Так, к примеру, АДФ-рибоза, которая ингибирует НАДН-оксидазную активность путем конкурировании активного центра фермента с НАДН, не влияет на ингибирование при обратном переносе электронов. Добавка АДФ-рибозы к субмитохондриальным частицам приводила к повышению уровня восстеновления НАД$^+$. В ряде случаев при полном ингибировании прямого переноса электронов через комплекс I АДФ-рибозой фермент мог совершать обратный транспорт электронов [5].

1.1.3. Комплекс II ЭТЦ

Комплекс II ЭТЦ (сукцинатдегидрогеназа убихинон-убихинол редуктаза, Е.С. 1.3.5.1). Это единственный комплекс электрон-транспортной цепи, участвующий в цикле трикарбоновых кислот, где он, окисляя сукцинат в фумарат, функционирует как сукцинатденидрогеназа. Одновременно с этим фермент принимает участие в дыхательной цепи, катализируя реакцию перехода убихинона в убихинол. При этом осуществляется ток электронов от сукцината к убихинону и далее к помплексу III ЭТЦ [89]. Кристаллическая структура фермента состоит из двух основных доменов: первый (гидрофобный) связан с внутренней мембраной митохондрии, второй домен направлен в матрикс митохондрий, короткий участок фермента направлен в межмембранное пространство [39]. Имея массу около 123 кДа, сукцинатдегидрогеназа является самым маленьким комплексом в элеткрон-транспортной цепи митохондрий. Комплекс II ЭТЦ состоит из 4 субъединиц, кодируемыми 4 генами: sdha, sdhb, sdhc и sdhd. Все они локализованы в ядерной ДНК. Субъединица SDHA включает в себя флавинаденинмононуклеотид (ФАД). Субъединица SDHB содержит железо-

серные кластеры. Эти две субъединицы обращены в матрикс митохондрий. Субъединицы SDHC и SDHD являются гидрофильными, они намного меньше гидрофобных субъединиц и служат якорями фермента в мембране [75].

Комплекс 2 электрон-транспортной цепи из животных имеет высокую степень гомологии с бактериальными сукцинат-убихинон редуктазами, в особенности с альфа-протобактериями. Последовательность аминокислот в ферменте наиболее консервативна в субъединицах, содержащих флавинадениндинуклеотид и Fe-S кластеры. Мембран-связанные субъединицы менее консервативны. Однако, некоторые домены в них имеют высокую степень гомологии у организмов различных таксономических групп [224].

Существуют заболевания, опосредованные дисфункцией комплекса 2 ЭТЦ. Эти заболевания могут составлять до 8% от заболеваний, связанных с функционированием ферментов электрон-транспортной цепи [99]. Основными двумя группами заболеваний являются митохондриальные энцефалопатии и опухоли хромофинновых клеток. К первой группе заболеваний относятся общие клинические неврологические заболевания. Однако существуют сообщения о миопатиях, энцефалопатиях, лейкодистрфиях и кардиомиопатиях. В некоторых случаях причинами заболевания являлись мутации в генах, кодирующих субъединицы фермента. Патогенез этих заболеваний в большинстве случаев связан с проявлением нипоксии и перехода метаболизма от митохондриального дыхания к бескислородным процессам, таким как гликолиз. Во время течения этих заболеваний наблюдается накопление сукцината в тканях организма. В организме активируется программа гипоксии, которая сопровождается усилением транспорта глюкозы, ускорению ангиогенеза и активацией гликолиза [44].

1.1.4. Комплекс III ЭТЦ

Комплекс III ЭТЦ (убихинол-цитохром с редуктаза Е.С. 1.10.2.2) – фермент, транспортирующий электроны от убихинола к цитохрому с. Этот комплекс состоит из 8 субъединиц, 7 из которых кодируется ядерной ДНК (цитохром с, цитохром c_1, белок Риске), а 1 субъединица (цитохром b) кодируется митохондриальной ДНК [74].

Механизм перекачки протонов при работе цитохром b и с в комплексе 3 с помощью так называемого Q-цикла впервые был предложен Митчеллом [152]. Структура этих цитохромных комплексов, их конформационные изменения позволили достаточно точно определить местоположение кофакторов реакции, вовлеченных в перенос электронов. Митохондриальный комплекс цитохромов b и c_1 может включать ещё 8 вспомогательных субъединиц.

Формирование энзиматически активного комплекса обусловлено протеканием 3 отдельных процессов. Первый процесс обусловлен взаимодействие цитохрома b с субъединицей 7 и 8. Второй процесс обусловлен взаимодействием цитохрома c_1 с субъединицами 6 и 9. Одновременно с этим происходит взаимодействие двух больших доменных структур в белке. Эти три модуля затем объединяются, формируя так называемый пре-комплекс. На заключительных стадиях формирования фермента происходит присоединение белка Риске и субъединицы 10 [250].

Существуют факторы, ответственные за сборку комплекса в каталитически-активный центр. В митохондриях человека выделяют два таких фактора BCS1L и TTC19. Первый фактор ответственен за сборку белка Риске, а также десятой субъеденицы [45, 166]. Сначала этот фактор взаимодействует с димерным пре-комплексом, молекулярная масса которого составляет около 500 кДа. Фактор способствует взаимодействию и удержанию пре-комплекса с белком Риске. Мутанты по этому фактору отличались от контроля высоким содержанием пре-комплексов убихинол-

цитохром с-редуктазы, либо высоким содержанием белка Риске в клетках [250]. Некоторые мутанты по этому фактору были не способны к формированию комплекса III ЭТЦ, при этом могли проявляться различные клинические симптомы (гепатопатия, энцефалопатия и тубулопатия) [31].

В самом факторе выделяют несколько доменов: N-терминальный импортирующий домен, С-терминальный домен и АТФазный домен. Мутации в АТФазном домене наиболее сильно затрагивали физиологические черты в экспериментальных организмах [151].

Второй фактор ассоциации комплекса 3 ЭТЦ (TTC19) был открыт при изучении болезни, связанной с митохондриями – митохондриальной энцефалопатии [163]. Этот белок локализован во внутренней мембране митохондрий. Его масса составляет от 500 кДа до 1000 кДа. Интересно отметить, что мутации, затрагивающие этот белок, приводят к полному прекращению формирования комплекса III ЭТЦ. Дисфункция по этому фактору характеризуется неврологическими нарушениями в *D. Melanogaster*, связанными с отсутствием убихинонол-цитохром с-редуктазы.

Повреждения комплекса III и негативные последствия от этого довольно редкие по сравнению с другими комплексами. Наиболее часто встречаются мутации в цитохроме b, однако они носят стохастический характер и становятся причинами митохондриальной миопатии. На фоне этого заболевания возрастает уровень креатинкиназы. В клетках человека, кроме того, найден фактор (HCCS), ответственный за взаимодействие двух частей цитохромов с и c_1 [167]. Мутации, затрагивающие этот фактор, проявляются в некоторых заболеваниях (аплазия, микропталмия).

1.1.5. Комплекс IV ЭТЦ

Цитохром с оксидаза (КФ 1.9.3.1) – фермент дыхательный цепи митохондрий, который катализирует конечный этап переноса электронов на кислород в процессе окислительного фосфорилирования [29].

Цитохромоксидаза широко распространена как среди эукариот, так и среди прокариот. У эукариот фермент расположен во внутренней мембране митохондрий, у прокариот – в цитоплазматической мембране. У млекопитающих мембраносвязанная форма фермента представляет собой димер, который содержит 13 типов полипептидных цепей с общей молекулярной массой около 400000 [3].

Две субъединицы фермента относятся к цитохрому а и не взаимодействуют с кислородом. Они осуществляют одноэлектронный перенос от цитохрома с, который находится на цитоплазматической стороне комплекса. Остальные субъединицы относятся к цитохрому a_3 и взаимодействуют с кислородом [23].

Ионы меди типа I обладают высоким редокс-потенциалом и специфическим спектром в электронном парамагнитном резонансе [26]. Вильямс высказал предположение о том, что симметрия вокруг иона Cu^{2+} является приближенно тетраэдрической [15]. Впоследствии было доказано, что центр связывания Cu^{2+} I типа имеет форму неправильного тетраэдра, что, вероятно, является компромиссом между формой полноценного тетраэдра, характерной для Cu^{2+}, и квадратно-плоскостной координацией Cu^{2+} в составе низкомолекулярных комплексов меди.

В активном центре цитохрома а координационные положения атома 5 и 6 железа гема заняты атомами азота двух остатков гистидинов. Атомы меди удалены от железа гема на расстояние 20 Å и связаны с атомами азота His и атомами серы Cys белковой цепи. Активный центр цитохрома a_3 также представлен гемом, где в пятом координационном положении железа находится азот His, а шестое свободно для связывания кислорода. Дистально относительно гема, на расстоянии 4,7 Å от атома железа, размещен атом меди, который связан с тремя атомами азота имидазольных колец His белковой цепи [23].

Работа цитохромоксидазы сопровождается появлением мембранного протонного потенциала $\Delta\mu H^+$, который используется клеткой для

обеспечения всех видов работ, выполняемых биомембранами, и в первую очередь для синтеза АТФ. Такой механизм позволяет отнести фермент к мембранным протонным насосам [29].

Цитохромоксидаза – это последний компонент электрон-транспортной цепи. Этот комплекс катализирует четырехэлектронное восстановление кислорода до воды и осуществляет перенос протонов в наружное пространство, окружающее митохондриальную мембрану. Такой механизм позволяет отнести этот фермент к мембранным протонным насосам [19].

Электроны передаются к кислороду по следующей схеме: цитохром *c* → Cu_A → Гем *a* → Гем a_3 → Cu_B → O_2. В нормальных физиологических условиях цикл цитохромоксидазы начинается с полностью окисленного фермента. Восстановление биядерного центра двумя электронами, поступающими от цитохрома *c* по одному за раз через Cu_A /гем *a* к a_3 /Cu_B, вызывает захват двух протонов с матричной стороны мембраны. При этом один протон удерживается A_2 кластером, кажущийся рК которого возрастает при восстановлении a_3 /Cu_B, а другой перекачивается на наружную сторону мембраны [18]. Затем кислород связывается с ферментом в восстановленном состоянии. Предполагается, что молекула кислорода, связываясь с цитохромоксидазой и восстанавливаясь, образует перекисный интермедиат, где группа –O–O– играет роль лиганда, который связывает железо гемов a_3 и Cu_B. В ходе каталитической реакции восстановление молекулы кислорода до воды ферментом проходит через два высокоокисленных состояния: соединение P ($Fe^{5+}a_3$=O) и соединение F ($Fe^{4+}a_3$=O, оксоферрил) [16, 18].

Существенным моментом в функционировании фермента является то, что восстановление гема *a* приводит к его протонированию ионом H^+ матрикса, а окисление – к освобождению этого иона H^+ снаружи митохондрии. Окисление и восстановление гема а и Cu_A связано со сдвигами рК двух и более протеолитических групп, что в конечном итоге вызывает высвобождение H^+, наблюдаемое при окислении двух центров и захват протона при их восстановлении [27].

Активность цитохромоксидазы может изменяться под действием различных факторов. Она сильно зависит от количества липидов в препарате. При тщательном удалении липидов ферментативная активность резко снижается, но после добавления липидов частично восстанавливается [3]

1.1.6. Комплекс V ЭТЦ. АТФаза

Комплекс 5 (АТФ-синтетаза Е.С. 3.6.3.14). Фермент закреплен в мембране и участвует в процессе использования электро-химического протонного градиента в синтезе молекул АТФ. АТФ-синтетаза имеет цилиндрическую структуру в виде ротора. Фермент состоит из двух больших доменов (F_0 и F_1). Домен F_0 закрепляет фермент во внутренней мембране митохондрий, F_1 участвует непосредственно в синтезе молекул АТФ [54]. Эти два домены соединены между собой дополнительными субъединицами. В доменах выделяют несколько субъединиц. Так, к примеру, домен F_1 состоит из 5 субъединиц: α, ß, γ, δ и ε. Изолированный домен F_1 это белок с молекулярной массой порядка 360 кДа. Для субъединиц, входящих в домен F_1, также были определены массы. Масса α-субъединицы равна 56 кДа, ß-субъединицы – 53 кДа, γ-субъединицы – 33 кДа, δ и ε-субъединицы по 16 и 11 кДа соответственно. Фермент работает как стартер и ротор, управляемый потоком протонов. Полное вращение домена F_1 приводит к взаимодействию АДФ и неорганического фосфата с образованием молекулы АТФ [80]. При отделении доменов друг от друга то домен F_1 не способен к синтезу молекул АТФ. Субъединица F_0 обеспечивает протонную проводимость между средой и непосредственно активным центром. При отделении комплекса F_1 от фермента возникает неконтролируемая протонная проводимость, которая не связана с синтезом молекул АТФ. Так было доказано, что частично очищенный домен F_0 из митохондрий сердца быка при встраивании в искусственную мембрану приводил к возможности этой мембраны пропускать протоны [29].

Известно, что митохонриальной ДНК кодируется только два белка в молекуле фермента: MTATP6 и протеин 8 [55]. Однако, для некоторых белков гены, отвечающие за кодирование, до сих пор не выявлены (субъединицы b c, d, e, f, g, белок OSCP и F6) [223].

Причины заболеваний, обусловленных дисфункцией АТФ-синтетазы, чаще всего связаны с мутациями в генах. В основном это мутации в генах MTATP6 и MTATP8, а также два гена митохондриальной ДНК (АТФ 6 и полипептид 8). Мутация в гене MTATP6 приводит к различным заболеваниям таким, как атаксия, нейропатия, синдром Лея [170, 220]. Выделено несколько генов ответственных за некоторые заболевания (факторы сборки TMEM70, ATPAF2, эпсилон субъединица ATP5E F1-домена) [153].

В 2000 году была проведена дитионин-солюбилизация митохондрий дрожжей и млекопитающих в нативном полиакриламидном гель электрофорезе. Была отмечена ассоциация дыхательных комплексов в зависимости от физиологического состояния, эти комплексы были названы «респирасомы» [202, 203]. Дыхательные суперкомплексы были определены и охарактеризованы в различных организмах и тканях. Например, они были идентифицированы в печены крыс [160], в мозге крыс [30, 180], в скелетной мускулатуре [79, 140] и т.д. Также суперкомплексы были идентифицированы в грибах [219], растениях [189] и бактериях [127].

1.1.7. Механизмы разобщения митохондриальной мембраны

Разобщающие белки представляют собой целое семейство 5 белков, именуемых UCP (1-5) [113, 128, 192]. Разобщающий белок UCP 1, или термогенин, имеет молекулярную массу порядка 33000 и локализован во внутренней мембране митохондрий коричневых адипоцитов в млекопитающих [64]. Этот фермент играют ключевую роль в адаптации к холоду по механизму увеличения внутриклеточного содержания свободных

жирных кислот, которые снимают ингибирующий эффект пуриновых нуклеотидов на UCP 1, который в свою очередь рассеивает электрохимический потенциал внутренней мембраны митохондрий в тепло. Также UCP 1 был идентифицирован в тимусе [66].

Белок UCP 2 имеет сходство по аминокислотному составу с UCP 1. Предполагают, что это белок участвует в регуляции норм метаболизма [236] вследствие протонной утечки через внутреннюю мембрану митохондрий, что затрагивает непосредственный энергетический выход клетки. Выявление функций UCP 2 на данный момент осуществляется путем изучения экспрессии гена, кодирующего этот белок, а также путем реакции с антителами, это единственные методы, способные отличить этот белок от других белков семейства UCP. UCP 2 – нешироко распространенный белок в тканях различных видов организмов. Также, характерной чертой UCP 2 по сравнению с белком UCP 1 является его короткий срок жизни, который оценивается в 30 минут [233].

Белок UCP 3 впервые был открыт Боссом [235]. UCP 3 чаще всего локализован в скелетной мускулатуре и, как предполагается, участвует в выработке тепла [66]. Также как и белок UCP 2 он имеет короткий жизненный цикл, около 1 часа [41]. UCP 3 был выявлен в тимусе, как предполагается он может участвовать в развитии и детерминации тимоцитов [122] и коже [92]. Экспрессия белков UCP 4 и UCP 5 в большинстве случаев наблюдается в нервной системе [113]. Они имеют 30% гомологии с белком UCP 1. Функция этих белков до конца не ясно. Также как и другие белки семейства UCP, они принимают участие в разобщении внутренней мембраны митохондрий.

Первые сообщения, что UCP 4 принимает участие в усилении протонной проводимости, проведены Мао [234]. В частности, было показано, что сверхэкспрессия этого гена снижает мембранный потенциал HEK293T клеток. Подобный эффект наблюдался и при сверхэкспрессии белка UCP 5 в клетках нейробластомы. При этом снижался выход молекул АТФ с

одновременным увеличением потребления молекул кислорода [159]. Интересные данные были получены по ингибированию сукцинатного дыхания белком UCP 4 при сверхэкспрессии этого белка, что может говорить о том, что UCP 4 принимает участие в транспорте сукцината в матрикс митохондрий.

Функции и механизм работы белка UCP 1 исследованы достаточно хорошо на клеточном и субклеточном уровне. Известно, что пуриновые нуклеотиды являются достаточно сильными ингибиторами UCP 1 [64]. Также выявлена зависимость работы этого белка от свободных жирных кислот, который имеют противоположный эффект с пуриновыми нуклеотидами [165]. Механизмы действия жирных кислот и пуриновых нуклеотидов до сих пор являются спорными вопросом. Жирные кислоты смягчают эффект действия пуриновых нуклеотидов, а также приводят к усилению потребления кислорода митохондриями. «Нокаутированные» мыши по белку UCP 1 не реагировали усилением потребления кислорода на добавку норадреналина в отличие от контрольных групп [64]. Существуют две основные модели действия свободных жирных кислот на UCP 1. Согласно первой модели, получившей название «протонофорная модель», протонированная жирная кислота свободно проходит через внутреннюю мембрану митохондрий и уже внутри митохондрий депротонируется, снижая таким образом мембранный потенциал. Роль UCP 1 в этом процессе заключается в обратном переносе депротонированной формы жирной кислоты [114]. Буферная модель предполагает роль UCP 1, как непосредственного переносчика протонов через мембрану, а жирные кислоты здесь рассматриваются, как кофакторы [125]. Эта модель имеет некоторые противоречия. В частности, до сих пор не понятно, почему жирные кислоты с длинной цепью способны активировать разобщающую функцию белка, а жирные кислоты с короткой цепью практически к этому не способны. Противоречивым также остается механизм взаимодействия свободных жирных кислот и пуриновых нуклеотидов. Возможно, между сайтами связывания белка с пуриновыми

нуклеотидами и жирными кислотами существует аллостерическое взаимодействие [93].

UCP 2 также принимает участие в разобщении внутренней мембраны митохондрий. Однако, «нокаутированные» по этому гену организмы не имели значительных физиологических отличий от природных форм [82]. Тот же самый эффект был отмечен и для UCP 3 [87]. В то же время сверхэкспрессия этого белка приводила к усилению протонной проводимости внутренней мембраны митохондрий, сопровождаемой физиологическими последствиями, такими как потеря веса [150]. Однако, ни UCP 2, ни UCP 3 не способны компенсировать недостающую активность UCP 1 [149].

1.1.8. Механизмы образования АФК в митохондриях

Активные формы кислорода (АФК) продуцируются в виде супероксид-анион радикала путем неспецифических реакций с молекулами кислорода. Известно множество неврологических заболеваний, ассоциированных с продукцией АФК [134]. В то же время, активные формы кислорода могут выступать как вторичные мессенджеры в клеточных процессах [237]. Продукция АФК была исследована на всех комплексах ЭТЦ, субмитохондриальных частицах и самих митохондрий из различных биологических объектов. Были установлены субстрат специфические особенности продукции АФК [228]. Большую роль в продукции АФК может играть загрязнения ими микросомальной фракцией клетки, т.к. они содержат большое количество антиоксидантных ферментов (каталаза, пероксидаза). Другая проблема при измерении АФК, продуцируемых митохондриями, это невозможность определить локализацию источника продукции супероксид-анион радикала на внутренней мембране митохондрий, т.е. в какую сторону осуществляется выброс АФК - в матрикс или в межмембранное пространство. Главным образом, АФК измеряется с помощью

флуоресцентного реактива Amplex Red и фермента пероксидаза, которые по цепи реакций реагируют с перекисью водорода [32].

Главными источниками АФК в клетках являются комплекс I и III ЭТЦ митохондрий. АФК могут генерироваться комплексом I ЭТЦ в двух различных состояниях. В первом случае генерация происходит при прямом транспорте электронов. Продукция АФК резко возрастает при добавлении к митохондриям ротенона, который связывается в Q-сайте [98]. Во втором случае генерация АФК происходит во время обратного переноса электронов от комплекса II ЭТЦ [241]. Для этого процесса необходим высокий мембранный потенциал. Продукция активных форм кислорода комплексом I ЭТЦ была исследована как на выделенном ферменте (НАДН-убихиноноксидоредуктаза) [175], так и на интактных митохондриях [139, 229]. Также продукция АФК была исследована на субмитохондриальных частицах [5]. При выработке АФК комплексом I ЭТЦ реактивные формы кислорода поступают в матрикс митохондрий. В защите митохондриального матрикса от негативного действия активных форм кислорода принимает участие пероксиредоксин 3 и пероксиредоксин 5, а также глутатионпероксидаза и восстановленный глутатион [246].

Ключевую роль при продукции активных форм кислорода, продуцируемых комплексом I ЭТЦ во время прямого переноса электронов, играет флавинмононуклеотид (ФМН) [231]. Флавиновый радикал и железо-серные кластеры могут являться донорами для одноэлектронного восстановления кислорода [81]. Мембранный потенциал оказывает небольшое стимулирующее действие при прямом переносе электронов через комплекс I ЭТЦ [84]. Однако, существуют сообщения о высоком стимулирующем эффекте мембранного потенциала ($\Delta\psi$) на продукию АФК в митохондриях мозга мышей [211].

Ещё в 1977 было показано, что супероксид формируется в убихиноноловом центре цитохромов b и c_1 [176]. Было отмечено, что супероксиданинон радикалы продуцируются на обе стороны внутренней

мембраны митохондрий [162]. Также было показано, что высокий мембранный потенциал может существенно усилить продукцию активных форм кислорода в комплексе 3 [138]. Это было объяснено замедлением переноса электронов от высокопотенциального цитохрома b к N-сайту Q-цикла. В общем виде механизм образования АФК в комплексе III представлен по следующей схеме: ингибирование убихинона в P-сайте убихинонового цикла антимицином, либо высоким мембранным потенциалом приводит к тому, что электроны направляются в обратную сторону к высокопотенциальному цитохрому $b_н$, тем самым увеличивая время жизни и накопление убесемихинона, который способен напрямую реагировать с молекулами кислорода, приводя их к одноэлектронному восстановлению и образованию супероксиданионрадикала [40, 216].

Цитохром с на данный момент также рассматривается, как возможный генератор АФК в митохондриях. В особенности в патофизиологических условиях [226]. АТФ-синтетаза может принимать участие в продукции активных форм кислорода путем повышения мембранного потенциала, который стимулирует продукцию как на комплексе I, так и на комплексе III ЭТЦ. Олигомицин усиливает продукцию АФК [83].

Недавно появились сообщения о возможности продукции активных форм кислорода комплексом II ЭТЦ митохондрий [118]. Это единственный комплекс в электрон-транспортной цепи, который принимает участие в цикле Кребса и не способен перекачивать протоны. При воздействии ингибитора на комплекс II ЭТЦ продукция АФК увеличивается в Q_o-сайте [83]. Убихиноновый пул имеет самое существенное значение в генерации активных форм кислорода.

1.2. Катаболические процессы в летательных мышцах насекомых

1.2.1. Общая характеристика окислительного метаболизма насекомых

Полёт – высокочувствительный к энергии процесс, требующий быстрой мобилизации энергетических ресурсов, транспортировку и трансформацию энергии потребляемой пищи в энергию АТФ. В метаболизм входят все биохимические реакции, происходящие в организме. В летательных мышцах насекомых большинство из этих реакций направлено на мобилизацию запасенной энергии в энергию полёта.

У некоторых насекомых, таких как мясная муха (Diptera) и в некоторых насекомых отряда Hymenoptera полёт – самый энергетически интенсивный процесс на единицу массы. Пчёлы во время продолжительного полёта сжигают до 2400 калорий на грамм летательных мышц в час [244]. В то время как в мышцах колибри такой показатель составляет 125 калорий на грамм летательных мышц в час [103]. Уровень метаболизма в летательных мышцах пчёл в 30 раз выше, чем в мышцах натренированного легкоатлета [214]. Также отличительной чертой насекомых является резкое наращивание метаболических норм в первые секунды полёта. Контроль насекомыми быстрого переключения высоких метаболических норм вызывает большой научный интерес. Касательно прыгающих насекомых примечательно, что уровень метаболизма во время прыжка возрастает более чем в 100 раз по сравнению с состоянием покоя. Мясная муха *Lucilia sericata* потребляет в среднем 30-50 мкл O_2/мин/грамм массы в состоянии покоя, в то время как во время полёта этот показатель составляет 1600-3000 мкл O_2/мин/грамм массы [78]. Таким образом, скорость дыхания во время полёта может увеличиваться в 100 раз по сравнению с покоем. Скорость потребления кислорода в состоянии покоя у моли варьирует от 7 до 12 мкл O_2/мин/грамм массы, во время полёта этот же показатель составляет 700-1600 мкл O_2/мин/грамм массы.

Насекомые способны использовать различные источники энергии во время полёта. Все они в конечном итоге трансформируются в молекулы АТФ. При этом интересным является тот факт, что, возможно, молекула АТФ не существует больше 1 секуны в мышцах насекомого [63].

В насекомых существует два крупных метаболических резерва: трегалоза и гликоген. Трегалоза – дисахарид, в котором две молекулы глюкозы связаны α-1,1 связью (рис. 1.). Трегалоза быстро синтезируется из 2-х молекул глюкозы сразу после переваривания пищи.

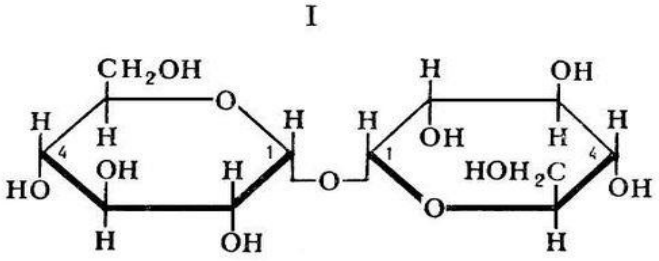

Рис. 1. Молекула трегалозы.

Гемолимфа и жировое тело составляют основной источник углеводов для насекомых. Однако, небольшие количества трегалозы и гликогена представлены в мускулах насекомых. Трегалоза может быстро метаболизироваться в 2 молекулы глюкозы. Углеводы, как источник энергии, в основном используются представителями отряда двукрылых и перепончатокрылых, чтобы поддержать полёт от 30 минут до 2 часов в зависимости от вида и размера насекомого. Содержание гликогена в тораксах мясной мухи составляет в среднем 10-15 мг/грамм массы торакса [121]. Глюкоза может быть образована из молекулы гликогена с помощью фермента гликогенфосфорилазы. Этот фермент представлен в мышцах в неактивной форме – гликогенфосфорилаза b, но может активизироваться, превращаясь в гликогенфосфорилазу a.

1.2.2. Гликолитический путь в летательных мышцах насекомых

Гликолиз – процесс, при котором насекомые начинают метаболизировать глюкозу. Он сходен с процессами, происходящими в других организмах, с одним различием - гликолиз в летательных мышцах насекомых всегда аэробный процесс. Поскольку трахеольная система дыхания насекомых позволяет избежать кислородного голодания. Другой отличительной особенностью насекомых является механизм регенерации НАДН. Количество цитоплазматического НАД$^+$ в летательных мышцах насекомых ограниченно. НАД$^+$ в этом случае регенерируется через глицерол-3фосфатный шаттл, а не через образование лактата, как это имеет место у млекопитающих и других организмов.

Превращение фруктозо-6-фосфат во фруктозо-1,6-дифосфат одна из самых больших точек контроля углеводного метаболизма в насекомых. АТФ ингибирует фосфофруктокиназу, выделенную из летательных мышц мясной мухи. Снижение АТФ активизирует фермент. Также фосфофруктокиназа активизируется АМФ, неорганическим фосфатом и циклическим АМФ [242]

Фруктозо-1,6-дифосфат превращается в глицеральдегид-3-фосфат и диоксиацетонфосфат. Эти два компонента могут взаимно превращаться друг в друга с помощью фермента триозофосфатизомеразы. Окисление глицеральдегид-3-фосфата в 1,3-дифосфоглицерат очень важный этап, поскольку он требует присутствие неорганического фосфата и НАД$^+$. Неорганический фосфат может лимитировать эту реакцию. В этой реакции 2 электрона и 2 протона возвращаются с глицеральдегид-3-фосфата, чтобы окислиться до 1,3-дифосфоглицерата. Молекула НАД$^+$ принимает восстановительные эквиваленты. Если далее НАДН не окисляется в митохондрии, она должна быть реокислина в НАД$^+$. Но, внутренняя мембрана митохондрий практически не проницаема для НАД$^+$, НАДФ, НАДН и НАДФН [196, 199]. Таким образом, цитоплазматический механизм необходим для регенерации НАД$^+$. В клетках большинства организмов

таковым механизмом является перенос восстановительных эквивалентов на пируват с окислением последнего в лактат. В летательных мышцах насекомых высокоактивен другой фермент – цитоплазматическая α-глицерофосфатдегидрогеназа, которая катализирует регенерацию НАД$^+$ намного быстрее, чем это делает лактатдегидрогеназа.

Глицерол-3-фосфат не аккумулируется в цитоплазме летательных мышц насекомых. В мышцах мух концентрация глицерол-3-фосфата составляет 2 мМ как в состоянии покоя, так и во время полёта [198]. С максимально возможной скоростью глицерол-3-фосфат проникает через внешнюю мембрану митохондрий к внешней стороне внутренней мембраны и окисляется в дигидроксиацетонфосфат ФАД-связанным ферментом митохондриальной глицерол-3-фосфатдегидрогеназой. Флавопротеид принимает 2 электрона и 2 протона, которые затем поступают в электрон-транспортную цепь митохондрий. Высокую скорость всех перечисленных процессов обеспечивает ряд эволюционных биохимических адаптаций таких как, высокая активность цитоплазматической глицерол-3-фосфатдегидрогеназы, локализация активного центра митохондриальной глицерол-3-фосфатдегидрогеназы на внешней стороне внутренней мембраны митохондрий, а также высокая доступность кислорода, концентрация которого не лимитирует скорость переноса электронов в ЭТЦ. Дигидроксиацетонфосфат быстро диффундирует через внешнюю мембрану митохондрий в цитоплазму. Чрезвычайная важность данного механизма было доказана на *Drosophila melanogaster*, мутанты которых не имели цитоплазматическую глицерол-3-фосфатдегидрогеназу и были не способны к полёту из-за того, что не могли обеспечить регенерацию АТФ в цитоплазме [50, 73]. Реакции окисления и восстановления глицерол-3-фосфата в цитоплазме и в митохондрии носит циклический характер (рис. 2).

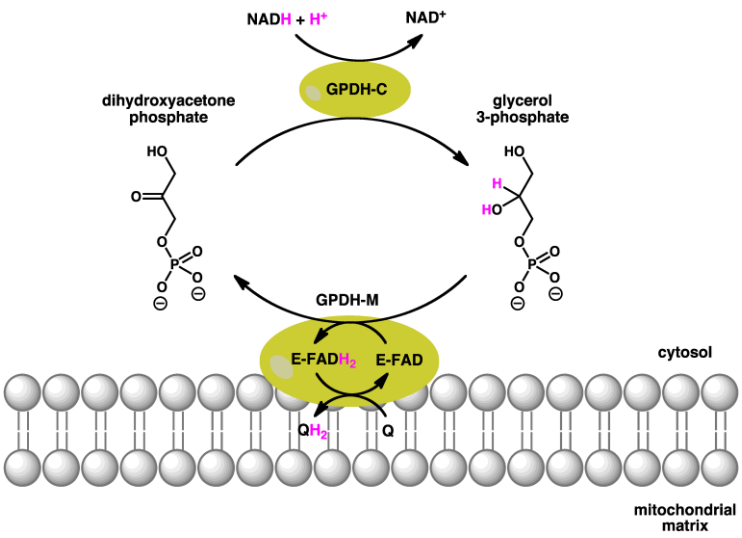

Рис. 2. Реакции окисления и восстановление глицерол-3-фосфата в цитоплазме и в митохондриях.

Окисление дигидроксиацетонфосфата из гликолиза с помощью глцерол-3-фосфатного шаттла и окисление глицеральдегид-3-фосфата на втором этапе гликолиза приводит к максимизации цикла Кребса. Сам по себе глицерол-3-фосфатный шаттл приводит к образованию 4 молей АТФ на 1 моль глюкозы. При этом во второй стадии гликолиза образуется 4 молекулы АТФ в результате субстратного фосфорилирования. Таким образом, 8 молей АТФ может быть образовано из 1 моля глюкозы в результате гликолиза, происходящего в летательных мышцах насекомых. При этом, если молекула глюкозы была получена из молекулы трегалозы, то дополнительно затрачивается 2 молекулы АТФ на гидролиз трегалозы и суммарный выход гликолиза составляет 6 молекул АТФ, если же молекула глюкозы была получена из гликогена, то затрачивается только одна молекула АТФ и суммарный выход гликолиза в этом случае оставляет 7 молекул АТФ.

Важность глицерол-3-фосфатного шаттла предполагает наличие регуляторов его активности. Свободные ионы кальция и, возможно, магния важны в стимуляции метаболизма глицерол-3-фосфата. ЭТДА ингибировал активность глицерол-3-фосфатдегидрогеназы, но этот ингибирующий эффект снимался дополнительным добавками Ca^{2+} и Mg^{2+} [90].

В летательных мышцах шмелей обнаруживается высокая активность фруктозобифосфотазы, примерно в 30 раз выше, чем в других тканях. Одновременно с этим наблюдается довольно высокая активность фосфофруктокиназы. Фруктозобифосфотаза в летательных мышцах не ингибируется AMP в отличие от других тканей. Эти два фермента вовлечены в так называемый футильный цикл, включающий в себя взаимопревращения фруктозобифосфотазы в фосфофруктокиназу и, наоборот, при одном обороте этого цикла затрачивается одна молекула АТФ [209]. Предположительно – это механизм выработки тепла шмелями в покое, когда летательные мышцы не сокращаются. Выключение этого цикла во время полета осуществляется ионами Ca^{2+}, который высвобождается в цитоплазму и ингибирует активность фруктозобифосфотазы [222].

1.2.3. Особенности функционирования цикла Кребса в летательных мышцах насекомых

Два продукта гликолиза в насекомых (пируват и глицерол-3-фосфат) быстро попадают в митохондрии [197]. Цитоплазматический пируват аккумулируется сразу после начала полёта из-за резкого начала функционирования цикла Кребса. Большинство субстратов цикла Кребса не сразу метаболизируются митохондриями насекомых, возможно из-за отсутствия переносчиков во внутренней мембране митохондрий. Сукцинат в некоторых видах насекомых метаболизируется сразу после переноса его через внутреннюю мембрану митохондрий. Однако in vivo интермедиаты образуются внутри митохондрий и их перенос через внутреннюю мембрану не требуется. Потеря переносчиков во внутренней мембране митохондрий – адаптивная черта, которая позволяет поддерживать высокую концентрацию интермедиатов внутри митохондрий, не позволяя им покинуть матрикс органелл. Фермент пируватдегидрогеназа существует в летательных мышцах насекомых в неактивной фосфорилированной форме и в активной

дефосфорилированной форме. Активирующий переход ПДГ из фосфорилированной формы в дефосфорилированную осуществляется ферментом фосфатазой, который в свою очередь активируется Ca^{2+}. Вход пирувата в митохондрию опосредован его превращением в ацетил-коэнзим А, в насекомых данный процесс происходит аналогично, как и в других организмах. Этапы превращения интермедиатов в цикле Кребса подробно исследованы на различных типах митохондрий [131].

Существуют несколько контрольных точек в цикле Кребса в летательных мышцах насекомых. Изоцитратдегидрогеназа ($НАД^+$-опосредованный фермент) – наиболее значимый регуляторный участок [105, 249]. Фермент ингибируется высокими концентрациями АТФ и активируется изоцитратом, АДФ и неорганическим фосфатом. Концентрации и относительные уровни АТФ, АДФ и АМФ играют важнейшую роль в регуляции метаболизма в насекомых, также как и в других организмах. Летательные мышцы *P. regina* содержит 6,9, 1,5 и 0,13 мкмоль/грамм сырой массы АТФ, АДФ и АМФ соответственно [198]. После начала полёта концентрация АТФ быстро падает, в то время как концентрации АДФ, АМФ и неорганического фосфата растут.

1.2.4. Электрон-транспортная цепь митохондрий насекомых

Электрон-транспортная цепь митохондрий насекомых сходна с организмами других систематических групп [195]. Митохондрии летательных мышц насекомых не проницаемы для $НАД^+$ и НАДН, поэтому цитоплазматические нуклеотиды не проходят через внутреннюю мембрану митохондрий. Дегидрогеназный $НАД^+$-связанный комплекс часто связан с внутренней мембраной митохондрий. Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа связана с внешней стороной внутренней мембраны митохондрий. Как и другие цитохромы, коэнзим Q принимает один электрон. Цитохромы – белки, содержащие в активном центре атомы железа. Железо в гемолимфе

насекомых доступно с помощью Fe-переносящего белка – трансферина, а в других тканях с помощью запасного белка – ферритина [164]. Одна молекула любого цитохрома может принимать только один электрон. Атомы железа, содержащиеся в цитохроме, непосредственно принимают и отдают электроны. Fe^{2+} превращается в Fe^{3+} при передаче электронов по дальнейшей цепи переносчиков. Эти процессы опосредованы перекачкой протонов через внутреннюю мембрану митохондрий. Все цитохромы имеют идентичные поглощающие характеристики в редуцированном состоянии. Цитохром C^{551} в насекомых поглощает при 551 нм. В позвоночных цитохром в этой позиции именуется как цитохром c_1, и его максимум поглощения состаявлет 554 нм, это говорит о том, что имеются лишь незначительные различия в цитохромах между насекомыми и позвоночными.

Цитохром с, следующий шаг в последовательности переносчиков, был изолирован из множества организмов, включая насекомых. Два последних цитохрома в ЭТЦ входят в цитохромоксидазу. Электроны переносятся от цитохрома а к цитохрому a_3 и затем на атомы кислорода. Необходимые протоны для формирования молекул воды берутся из митохондриального матрикса. Метаболическая вода является важнейшим ресурсом для насекомых, особенно живущих в засушливых природных зонах.

Имеется несколько точек в цепи переноса электронов, сопровождающимся синтезом АТФ. Первый синтез АТФ происходит при передаче электронов от НАДН к ФАД. Это происходит, когда ФАД берет на себя электроны во время функционирования глицерол-3-фосфатного шаттла. Второй этап синтеза АТФ происходит, когда 2 молекулы цитохрома b переносят электроны на две молекулы цитохрома с. Финальный этап формирования АТФ происходит при передаче электронов от цитохрома a_3 к кислороду с образованием воды (с переносом двух протонов из митохондриального матрикса). Насекомые, как и другие организмы, способны усваивать только 40% энергии глюкозы в процессе окисления. Хотя детали синтеза АТФ в митохондриях насекомых не достаточно

описаны, можно с уверенностью говорить, что хемиосмотическая теория Митчелла имеет место в митохондриях насекомых.

Физиологические процессы, происходящие в митохондриях, изучены на ряде насекомых, в частности в дрозофилах [158], мясной мухе [77], комарах [148], пчелах [156] и др. Методики по выделению митохондрий из насекомых могут варьировать как по составу среды выделения и промывки митохондрий, так и по методикам инкубации митохондрий при измерении интенсивности дыхания, продукции АФК, мембранного потенциала, накопления Ca^{2+} и др. Кроме того, митохондрии из организмов различных таксономических групп имеют разные предпочтения в субстратах для комплекса I ЭТЦ.

В настоящее время исследованы характеристики дыхания и продукции АФК митохондрий из *Drosophila melanogaster*. Максимальные нормы дыхания наблюдались на субстрате пируват+пролин (дыхательный контроль при этом варьировал от 9 до 17), что было существенно выше чем на субстрате α-глицерофсфат (дыхательный контроль при этом варьировал от 1,9 до 3), в то время как продукция АФК при дыхании на α-глицерофосфате многократно превышала продукцию АФК на субстрате пируват+пролин [158]. В исследованиях Бранда [218] оценивалось влияние ингибиторов ЭТЦ на скорость продукции пероксида водорода, а также влияние экзогенно добавленной СОД на продукцию перекиси. Ротенон усиливал продукцию пероксида водорода без добавления СОД в 4,04 раза при дыхании на субстрате пируват+пролин, а при добавлении СОД в 18 раз. Продукция H_2O_2 снижалась при добавлении ротенона при дыхании на α-глицерофосфате. Наибольшее стимулирующее действие на продукцию пероксида водорода в присутствии α-глицерофосфата оказывал антимицин А.

Дыхание митохондрий на сукцинате у *Drosophila melanogaster* практически отсутствует, что объяснятся ранее полученными данными по слабому проникновению сукцината через внутреннюю мембрану митохондрий, а дыхание на субстратах пируват+пролин и привут+малат

имеют сходные скорости дыхания и соответствующего дыхательного контроля [33].

Были исследованы предпочтения в субстратах митохондрий мухи *Sarcophaga barbata*. Наибольшие скорости дыхания через комплекс 1 ЭТЦ наблюдались на субстратах пируват+пролин и пируват+малат. При этом скорости дыхания митохондрий на пирувате, пролине и малате по отдельности были в несколько раз ниже, чем при сочетании этих субстратов. Максимальные скорости дыхания наблюдались в присутствии α-глицерофосфата [208].

Рядом авторов было выявлено влияние субстратов на дыхание митохондрий летательных мышц саранчи [215]. В отличие от других насекомых, их органеллы хорошо окисляют пальмитоил-карнитин, что свидетельствует о том, что в летательных мышцах саранчи происходит окисление липидов. Самые высокие скорости дыхания у саранчи характерны для пирувата. Окисление глицерофосфата происходит с меньшими скоростями, а дыхание на субстрате пируват+малат и пируват имеют одинаковые скорости дыхания. Стоит отметить, что митохондрии саранчи окисляют сукцинат и пролин, однако с меньшими скоростями.

Исследовано предпочтение в субстратах митохондрий клеточной линии комара. Наибольшие скорости дыхания наблюдались на цитрате и изоцитрате, меньше на пролине и α-глицерофосфате и ещё меньше на пирувате, малате, глутамате и глутамат+малат. Также митохондрии клеточной линии комара способны окислять сукцинат [148].

Установлено, что дыхание митохондрий летательных мышц колорадского жука наиболее сильное в присутствии пролина, при этом дыхательный контроль составил 26,9. В то же время митохондрии колорадского жука окисляли α-глицерофосфат с меньшими скоростями, чем пролин и приуват+малат [126].

Аминокислота пролин – важнейшее метаболическое топливо для мух [59, 60], колорадского жука [126, 243], некоторых жуков из семейства

Scarabaeidae [172] и некоторых жуков семейства Cerambycidae [97] и др. Полное окисление пролина сопровождается синтезом 14 молей АТФ/1 моль пролина. Возможность окисления пролина в митохондриях насекомых связана с практически безлимитным запасом кислорода. Метаболический путь окисления пролина предложен Бурселом [62]. Согласно предложенной схеме, пролин входит в митохондрию и окисляется до глутамата с помощью высокоактивного фермента – пролиндегидрогеназы, локализованной в митохондриях летательных мышц некоторых насекомых. Флавопротеин принимает два электрона и два протона. Глутамат подвергается трансаминированию с пируватом с образованием α-кетоглутарата и аланина. При этом α-кетоглутарат – нормальный компонент цикла Кребса. Сформировавшийся аланин быстро переносится из летательных мышц в жировое тело, где присоединяя 2 атома углерода в результате окисления жирных кислот, вновь превращается в пируват. Образовавшийся пируват вновь может быть направлен в летательные мышцы. Таким образом, пролин может быть вовлечен в окисление жирных кислот [63]. До сих пор не ясно, почему насекомые избрали окисление пролина, как источника энергии для полёта, т.к. окисление глюкозы и липидов дают больший выход молекул АТФ. Возможно, окисление пролина является пусковым механизмом для начала функционирования цикла Кребса.

Окисление пролина контролируется клеточным уровнем АДФ. Увеличивающийся уровень АДФ, стимулирует окисление пролина. В то время как глутамат тормозит процесс окисления пролина по принципу обратной связи, ингибируя пролиндегидрогеназу. Стимуляция окисления пролина АДФ, возможно, является контрольной точкой в катаболизме насекомых во время осуществления полёта.

1.2.5. Липиды как источник энергии для полёта насекомых

Взрослые Lepidoptera и некоторые Orthoptera способны использовать жирные кислота в качестве источника энергии во время полёта. Эти организмы имеют значительный запас липидов и могут осуществлять полёт значительно дольше, чем организмы, использующие углеводы в качестве источника энергии для полёта. Все жирные кислоты находятся в форме триацилглицеролов в жировом теле и, таким образом, перед окислением жирных кислот они должны быть извлечены из жирового тела и транспортированы в мышцы насекомых. Высвобождение липидов контролируется пептидным гормоном (адипокинетический гормон). Он активирует липазу, которая высвобождает диацилглицеролы из жирового тела. Диацилглицеролы транспортируются через гемолимфу в летательные мышцы насекомых. Другая липаза, локализованная в мышцах насекомых, расщепляет диацилглицеролы с образованием 2 жирных кислот. Катаболизм жирных кислот проходит в митохондриях.

Адипокинетический гормон – декапептид, синтезируемый в нейросекреторных клетках. Механизм стимуляции синтеза гормона до конца не ясен, но возможно этот процесс связан с активацией мускулатуры. Адипокинетический гормон был изолирован из насекомых. Пептид имеет от 8 до 10 аминокислот, в зависимости от вида насекомого. Типичной структурой гормона у саранчи является следующая последовательность аминокислот: трионин-глицин-триптофан-аспарагин-пролин-трионин-фенилаланин-аспарагин лейцин.

Насекомые транспортируют липиды в гемолимфе с помощью липопротеиновго комплекса – липофорина. Множество липидов было обнаружено в липофориновых комплексах, включая фосфолипиды, три- и диглицеролы. Хотя структура липофоринов может варьировать, они имеют общие черты: гидрофобное ядро, содержащее атомы углероды, средний слой, состоящий из диацилглицеролов, внешний слой фосфолипидов и

аполипротеидов. Липофорин может переносить липиды как из пищеварительной системы, так и из жирового тела насекомых [69, 70. 136, 193].

Мембрано-связанная липаза в тканях летательных мышц имеет высокое сродство к диацилглицеролам. Она высвобождает жирные кислоты и глицерол [135]. Глицерол, полученный в результате гидролиза, может быть фосфорилирован и метаболизирован в энергию (как глицерол-3-фосфат) или транспортироваться в жировое тело, где он вновь превращается в триацилглицерол. Свободные жирные кислоты связываются с внутриклеточным белком в клетках саранчи *S. gregaria* [107], который помогает им двигаться сквозь водную среду в цитоплазме клетки к месту их метаболизма в митохондриях. Окисление жирных кислот в митохондриях насекомых состоит из нескольких этапов:

1. Активация жирных кислот в цитоплазме мышечных клеток и их вход в митохондрию. Жирные кислоты в цитоплазме образуют комплекс с карнитином для того, чтобы проникнуть в митохондрию. Реакция активации жирных кислот энергетически эквивалента гидролизу 2 молекул АТФ, при этом формируется АМФ и дифосфат. С внутренней стороны внутренней мембраны митохондрий карнитин отсоединяется и жирная кислота формирует комплекс с коэнзимом А. Далее жирная кислота подвергается так называемому β-окислению;

2. Дегидрогенация жирных кислот, опосредованная ФАД. В этой реакции образуется двойная связь с одновременным превращением ФАД в $ФАДН_2$, который переносит электроны по цепи переносчиков ЭТЦ;

3. Гидратация жирных кислот. Вода взаимодействует с жирными кислотами без выделения энергии;

4. Дегидрогенация жирных кислот с участием $НАД^+$. В переносе электронов принимает участие $НАД^+$, образуется НАДН, который затем окисляется в ЭТЦ. Образуется β-кетоформа жирной кислоты;

5. Непосредственно β-кетоформа. Ацетил-СоА, связанный с жирной кислотой, взаимодействует с коэнзимом А, при этом образуется полноценный свободный ацетил-СоА. Далее, укороченная на 2 атома углерода жирная кислота проходит вышеперечисленные этапы. Ацетил-СоА окисляется в цикле Кребса.

Метаболизм жирных кислот дает выход энергии выше, чем при окислении глюкозы. Каждый $ФАДН_2$ приводит к образованию 2 молекул АТФ, каждая молекула НАДН приводит к образованию 3 молекул АТФ. Ацетил-СоА приводит к образованию 12 молекул АТФ при окислении в цикле Кребса. Так, к примеру, окисление пальмитиновой жирной кислоты приводит к образованию 131 молекулы АТФ. Но реальный выход составит 129 молекул АТФ, т.к. 2 АТФ потребуются для активации жирной кислоты. Продуцируемый АТФ используется насекомыми в процессе полёта. Метаболическая вода (образуется 108 молекул H_2O при окислении пальмитиновой кислоты) также используется насекомыми.

1.2.6. Образование АФК в клетках насекомых

Митохондрии – важнейшие клеточные органеллы, которые интенсивно дышат и принимают активное участие в энергетическом метаболизме клеток. В среднем в клетках митохондриями усваивается до 85-90% всего потребленного кислорода [124]. Это неизбежно приводит к продукции активных форм кислорода (АФК). Самым главным источником активных форм кислорода является ЭТЦ митохондрий [35]. Также, продукция АФК может осуществляться ферментами микросом и пероксисом [205]. Избыток активных форм кислорода вызывает окислительный стресс в клетках живых организмов [38]. Общепринятым является мнение, что в нормальном состоянии клетки на продукцию АФК идет порядка 2% от всего потребленного кислорода [67].

Среди насекомых продукцию активных форм кислорода митохондриями изучали только на одном объекте – *Drosophila melanogaster*. Так, было выявлено, что наибольший вклад в продукцию активных форм кислорода у дрозофил вносит комплекс I ЭТЦ, как при прямом переносе электронов, так и при обратном транспорте [201]. Авторами было показано, что ротенон прекращал продукцию активных форм кислорода при обратном транспорте электронов. В другой работе [218] было отмечено, что α-глицерофосватдегидрогеназа обеспечивает самую интенсивную продукцию активных форм кислорода на комплексе 3 в присутствии антимицина, при этом сайт продукции располагается на цитозольной стороне внутренней мембраны митохондрий, в то время как комплекс I ЭТЦ продуцирует активные формы кислорода на матричной стороне внутренней мембраны митохондрий. Авторы отмечают, что продукция H_2O_2 при дыхании на α-глицерофосфате без добавления ингибиторов также выше, чем на других субстратах. В ряде работ рассматривалась зависимость продукции АФК от продолжительности жизни. Мутанты дрозофил со сверхэкспрессией адениннуклеотидтранслоказы имели меньшие нормы продукции активных форм кислорода (поскольку имели пониженный мембранный потенциал митохондрий), однако продолжительность жизни этих организмов не увеличилась [130]. Отсутствие корреляции продукции активных форм кислорода с продолжительностью жизни *D. melanogaster* также было отмечено в другой работе [158].

Необходимо отметить, что нет данных по продукции активных форм кислорода митохондриями такого важнейшего для хозяйственной деятельности человека класса насекомых, как Hymenoptera (пчелы, шмели и т.д.). Интересным является рассмотрение ситуации в эволюционном аспекте.

Дыхание насекомых очень интенсивное. Трахеи пронизывают всё их тело и поставляют кислород клеткам со скоростью большей, чем это могла бы сделать кровь. Потребление кислорода летательными мышцами насекомых является самым интенсивным из всех известных животных,

причем во время полета потребление кислорода может возрастать более чем в 100 раз [78].

У насекомых известен так называемый прерывистый тип дыхания, когда клапаны то закрывают, то открывают трахеолы. Это процесс характерен только во время покоя. Как оказалось, этот механизм создан для избегания клетками насекомых токсического эффекта кислорода, который может повредить клеточные компоненты во время покоя [110], а не для экономии воды, как предполагали ранее.

Старение комнатных мух выражено оксидативным повреждением белков в клетке и в частности белков мембраны митохондрий. Ассоциированное с возрастом окислительное повреждение носит не случайный, а направленный характер. Это выражается в карбонильной модификации белков. Адениннуклеотидтранслоказа – белок в митохондриальной мембране, который показал четкую зависимость содержания карбонилов в белке от возраста, причем это коррелировало с потерей функциональной активности. Экспозиция насекомых в 100% O_2, а также обработка митохондрий АФК in vitro вызвала более интенсивное окисление белков [247].

Митохондриальная аконитатгидратаза также является мишенью для АФК у комнатных мух. Содержание карбонильных группировок (признаков окислительного повреждения) в молекуле АГ было на 50% выше у 15-дневных мух, чем у 5- и 10-дневных, при этом активность фермента 15-дневных мух уменьшилась на 62% по сравнению с 7-дневными, причем существенное падение активности наблюдалось с 10 дня. [248].

Активно летающие *D. melanogaster* имеют меньшую продолжительность жизни (на 31%), чем не летающие особи, а также повышенную продукцию активных форм кислорода и увеличенное по сравнению с контролем окислительное повреждение как белков, так и липидов, что говорит о высокой продукции АФК во время полёта [94].

1.3. Общая характеристика антиоксидантной системы

1.3.1. Активные формы кислорода и механизмы защиты клеток от его повреждающего действия

В ходе процесса эволюции сформировалась выраженная зависимость метаболических систем человека и большинства наземных животных от достаточного поступления кислорода в клетки. Пределы колебаний между уровнями максимального и минимального поступления кислорода в клетки являются динамическими показателями и определяются как спецификой структуры и функции клеток или тканей, так и метаболической активностью внутри клеток в данный момент [7].

Значительная часть кислорода подвергается в клетках 2-х – и 3-х электронному восстановлению в митохондриях на её внутренней мембране с участием цитохромов и фермента цитохромоксидазы. Источником АФК также могут быть реакции, катализируемые цитохромом Р-450, который чаще всего локализован в микросомальной фракции клеток, у животных он сосредоточен в гепатоцитах печени. В цитозоле клеток супероксид анион–радикал генерирует в результате работы ксантиноксидазы [22].

Возрастание радикальных форм кислорода наблюдается при интенсивном поступлении O_2 в клетку, а также при нарушении функционирования работы митохондриальной ЭТЦ [225].

В настоящее время известно более 8000 реактивных соединений, принимающих участие в процессах переноса электронов в организме. Реактивность этих соединений обусловлена наличием на внешней орбите молекулы неспаренного электрона. Принято выделять реактивные радикальные и реактивные нерадикальные соединения, из которых наиболее активными являются соединения азота, кислорода, и хлора [104]. Супероксиды образуются с участием клеточных оксидазных систем, таких как ксантиноксидазы и НАДФН-оксидазы. Далее супероксиды принимают

участие в реакциях с образованием различных реактивных соединений: пероксинитрит, пероксид водорода, гипохлорная кислота и т.д. [144].

Ранее было показано, что продукция свободных радикалов увеличивается с увеличением трансмембранного потенциала внутренней мембраны митохондрий [137]. Активный вклад в продукцию АФК вносит обратный перенос электронов [155].

На данный момент выделяют несколько уровней защиты клеток эукариот от активных форм кислорода, которые могут быть представлены следующим образом: во-первых, это системная защита клеток за счет снижения напряжения O_2 в тканях по сравнению с его содержанием в воздухе; во-вторых, обеспечение в процессе 4-х электронного восстановления основной массы внутриклеточного O_2 с участием фермента цитохромоксидазы без освобождения свободных радикалов; в-третьих – ферментативное удаление образовавшихся супероксидного анион-радикала и пероксида водорода; в-четвертых - наличие так называемых антиоксидантов, которые улавливают активные формы кислорода; в-пятых – ферментативное восстановление гидроперекисей полиненасыщенных жирных кислот [17].

Число соединений, которые относятся к антиоксидантам, растет. В то же время, нет общей универсальной классификации антиоксидантов.

Некоторыми авторами предпринята попытка классификации антиоксидантов в зависимости от их молекулярных масс:

1 группа. Высокомолекулярные соединения или ферментативная система защиты клеток от АФК. К этой группе относятся ферменты антиоксидантной защиты. К антиоксидантным ферментам относят СОД (супероксиддисмутаза), каталазу, глутатионзависимые ферменты (глутатион пероксидаза, глутатион редуктаза, глутатион трансфераза). Также, к этой группе относят белки, которые способны связывать ионы Fe^{2+} и Cu^{2+}, которые в свою очередь являются катализаторами свободнорадикальных процессов.

Для ферментов антиоксидантной защиты характерны некоторые общие свойства, такие как высокая специфичность, определенная клеточная и тканевая локализация, а также использование в качестве кофакторов металлов Fe, Cu, Zn, Mn, Se [10]. К белкам, которые обладают способностью связывать металлы с переменной валентностью, и, соответственно, обладающими антиоксидантными свойствами, относят трансферрин, альбумины крови, лактоферрин, ферритин. Среди них имеются эффективные ингибиторы свободнорадикальных процессов [21].

2 группа. Низкомолекулярные антиоксиданты. Эти соединения могут различаться по структуре и химическим свойствам. Среди этой группы широко известны такие антиоксиданты, как альфа-токоферол, витамины группы А, К, Р, полиамины, мочевая кислота, глутатион, аскорбиновая кислота, билирубин, некоторые аминоксилоты. Они способны взаимодействовать с кислородными и другими радикалами. Механизм действия низкомолекулярных антиоксидантов заключается в непосредственном взаимодействии их со свободными радикалами. В ходе этих реакций прерывается цепь свободнорадикальных процессов [13].

В настоящее время имеется и другая классификация уровней защиты биологических систем от воздействия свободных радикалов [6]:

1. Антиоксидантные ферменты. Они непосредственно ингибируют первые этапы ПОЛ (перекисное окисление липидов), а также предотвращают окисление нелипидных компонентов клетки;

2. Низкомолекулярными антиоксидантами (альфа-токоферол, глутатион, аскорбиновая кислота и др.). Они напрямую взаимодействуют с АФК;

3. Ферменты, метаболизирующие конечные продукты ПОЛ (эпоксиды, альдегиды и др.). К ним могут быть отнесены цитохром Р-450, эпоксидгидролазы, альдегидредуктазы [1];

4. Биологические молекулы, обеспечивающие репарацию поврежденных биомолекул. Например, восстановление дисульфидных связей белков или регенерацию антиоксидантов;

5. Систему ингибирования ПОЛ и свободнорадикальных процессов, основанную на взаимодействии АФК с такими молекулами, как циклические нуклеотиды, простагландины, лейкотриены.

Дополнительно в качестве линии антиоксидантной защиты могут выделять и так называемый пространственный фактор. Он определяет пространственную координацию кислородных и транспортных процессов, происходящих внутри клетки [4]. В митохондриях эти процессы также имеют место. Электрон-транспортная цепь локализована в гидрофильных зонах, а ненасыщенные жирные кислоты – в гидрофобных участках мембран, что затрудняет взаимодействие АФК с важнейшими биологическими молекулами в митохондриях. Так называемую «упаковку» фосфолипидов обеспечивают холестерин, альфатокоферол, а также липид–белковое взаимодействие. В клетке пространственный фактор обеспечивается за счет сближения прооксидантных и антиоксидантных систем. В качестве примера реализации структурного и пространственного принципов можно привести существование органелл – пероксисом, которые участвуют в защите клеток от АФК, и содержат в себе антиоксидантные ферменты [129].

Организм располагает ферментативными системами, ингибирующими различные продукты свободнорадикальных процессов. Так, СОД инактивирует супероксиданионрадикал, который является одним из первейших продуктов в цепи образования продуктов АФК, глутатионпероксидазы и каталазы разлагают непосредственно перекись водорода, а также гидроперекиси липидов [8].

Антиоксидантное действие проявляют витамины группы Е, убихинон, стероидные гормоны, серосодержащие аминокислоты, некоторые пептиды, производные гамма-аминомасляной кислоты, фосфолипиды, тиолы [2]. Важную роль в антиоксидантной защите играют карнозин и его

производные. Карнозин – природный дипептид. Он способен взаимодействовать с супероксиданионрадикалом и $OH^{\cdot}$ радикалом, таким образом, их инактивируя [25].

1.3.2. Характеристика основных антиоксидантных ферментов

Супероксиддисмутаза (СОД, КФ 1.15.1.1) играет одну из ключевых ролей в антиоксидантной защите. Существует несколько форм СОД. Они отличаются строением активного центра. У эукариотов Cu/Zn-содержащая СОД локализуется в основном в цитоплазме, а также в межмембранном пространстве митохондрий, ядре нервных клеток. Фермент чувствителен к цианиду, состоит из двух субъединиц, каждая из которых связывает 1 атом Cu и 1 атом Zn [20]. Mn-СОД локализована в матриксе митохондрий, пероксисомах, она обнаруживается также и у бактерий. Кроме того, выделяют Fe-содержащую супероксиддисмутазу. Она присутствует в микроорганизмах, но также была найдена в пероксисомах и митохондриях [10]. СОД, удаляя супероксидные радикалы, препятствует образованию более опасных свободных радикалов, таких как гидроксильный радикал и синглетный кислород [24].

Каталаза (КФ 1.11.1.6) – важнейший элемент в антиоксидантной защиты клеток от свободных радикалов. Каталаза является гемосодержащим ферментом. Её молекулярная масса составляет около 240 кДа, состоит из 4 субъединиц. Фермент участвует в разложении пероксида водорода, который является вторичным токсическим продуктом свободнорадикальных процессов. Каталаза расщепляет молекулу H_2O_2 до воды и кислорода [12]. Активный центр фермента состоит из двух остатков наиболее существенных для каталитической активности остатков (проксимальный – Tyr и дистальный – His). Их конфигурация регулируется с помощью негативно заряженных атомов железа [68]. Маленькая субъединица каталазы содержит протопорфирин или гем b. В то время как большая субъединица содержит

так называемый гем d [34]. Реакция нейтрализации пероксида водорода проходит в 2 стадии. На первой стадии одна молекула пероксида водорода окисляется в гем-содержащей части каталазы в оксиферильные формы, в которых один окислительный эквивалент берется от атома железа, а второй от порфиринового кольца с образованием порфиринового катионного радикала. На втором этапе другая молекула пероксида водорода утилизируется как редуктант компонента 1 фермента с образованием молекулы воды и кислорода. При этом фермент восстанавливается до своего первоначального состояния. Несмотря на общий принцип функционирования фермента каталазы, существуют различные типы и комбинации этих реакций в зависимости от организма.

Глутатионпероксидаза (КФ 1.11.1.9) – антиоксидантный фермент, включающий в себя атомы селена. Существует 4 типа глутатионпероксидаз, которые содержат селено-цистеин в своём активном центре. И также имеется как минимум 2 типа глутатион пероксидаз, которые не имеют в своём составе селено-цистеин. Белки, схожие с этим ферментом, обнаружены в микроорганизмах и паразитических червях. В малярийном паразите активность глутатионпероксидазы регулируется содержанием селена [117]. Некоторые типы селен-независимых глутатионпероксидаз содержатся и в тканях млекопитающих, активности этих ферментов связаны с активностью глутатионтрансферазы [108].

Глутатионпероксидаза-1 может метаболизировать молекулы пероксида водорода и некоторые другие органические пероксиды. Однако, глутатионпероксидаза не может метаболизировать пероксидные радикалы жирных кислот в фосфолипидах [102]. Этот тип пероксидазы чрезвычайно чувствителен к глутатиону как редуцирующему компоненту. Исходя из этого факта, активность глутатионпероксидазы-1 обычно рассматривают вместе с активностью глутатионредуктазы, которая поддерживает высокую концентрацию глутатиона в клетке. Глутатионредуктаза была секвенирована через комплементарную кДНК, клонированную из различных видов

организмов, включая человека, мышей, крыс и т.д. [217]. В большинстве своём этот тетрамерный белок с 4 идентичными субъединицами, каждая из которых содержит селено-цистеин на поверхности молекул [88].

Глутатионпероксидаза-2 содержится в цитозоле и имеет тетрамерную структуру. На 65% она сходна с глутатионпероксидазой-1 по аминокислотному составу [71]. У крыс матричная РНК глутатионпероксидазы-2 обнаруживали в печени и кишечнике, в других органах она не была идентифицирована. Глутатионпероксидаза-3 – гликопротеид, который функционирует во внеклеточном пространстве [181]. Сиквенс кДНК глутатион пероксидазы-3 показал, что она имеет различный аминокислотный состав. Этот фермент был секвенирован в крысах, мышах и человеке. Глутатионпероксидазы-3 на 50% гомологична аминокислотному составу глутатионпероксидазы-1 и молекулярный вес субъединицы составляет около 25 кДа [173]. В основном фермент был идентифицирован в сердце, плаценте, лёгких, кишечнике. Глутатионпероксидаза-3 требует миллимолярных концнтраций глутатиона для активности.

Глутатионпероксидаза-4 или фосфолипидная глутатионпероксидаза. Это селен-содержащий фермент. Его молекулярный вес составляет от 20 до 22 кДа, и он является мономером в отличие от глутатионпероксидазы-1. Фермент реагирует с фосфолипидными пероксидами в качестве субстрата. Также глутатионпероксидаза-4 способна реагировать с пероксидом водорода, также как и с другими липидными пероксидами. Таким образом, этот фермент способен реагировать с большим количеством субстратов, чем глутатионпероксидаза-1 [185].

При дефиците активности глутатионпероксидазы могут наблюдаться различные патологические процессы за счет пероксидного повреждения мембран [112]. Сверхэкспрессия генов глутатионпероксидазы в свою очередь может защищать клетки от активных форм кислорода [100]. В то же время это может привести к ингибированию процесса апоптоза в клеточных линиях. Сверхэкспрессия глутатионпероксидазы-1 в клетках мышей может

предотвращать токсическое действие нейротоксина 6-гидроксидопамина. Повреждение клеток вследствие ишемии в сердце также уменьшалась в мышах с сверхэкспрессией глутатионпероксидазы-1. Четырехкратное увеличение активности фермента привело к протекторному эффекту от 30 минутной ишемии и 20 минутной реперфузии [230]. Исследования по сверхэкспрессии глутатионпероксидазы 1 подчеркнули особую важность этого фермента от негативного действия АФК.

Глутатионредуктаза (КФ 1.8.1.7.) – фермент, который восстанавливает дисульфидный глутатион (GSSG) к его восстановленной форме (GSH). Глутатион является пептидом, состоящим из 3 аминокислот: глутамат, цистеин, глицин. GSH является донором водорода из-за присутствия тиоловой (-SH) группы, которая легко окисляется. Синтез глутатиона разделяется на две части. На первом этапе из аминокислот (глутамат, цистеин, глицин) синтезируется пептид с помощью фермента глутатионсинтетазы. На втором этапе происходит обратимая редокс реакция восстановленного глутатиона [101].

Глутатионредуктаза – субстрат-специфичный фермент, входит в семейство флавин (ФАД) содержащих ферментов и играет существенную роль в восстановлении окисленной формы глутатиона с использованием молекул НАДФН, которые синтезируются в ходе гексозного монофосфатного пути [142]. Фермент охарактеризован как гомодимер с молекулярной массой около 120 кДа, имеющий 2 субъединицы с ФАД в качестве простетической группы [182].

Каталитический цикл фермента может быть разделен на 2 части. В начале происходит двухэлектронное восстановление окисленного фермента E_{ox} до формы EH_2. Существенную роль в этой реакции играет Tyr 197, который играет регуляторную роль в связывании НАДФН с ферментом. Во второй части каталитического цикла происходит непосредственное восстановление дисульфидного окисленного глутатиона до глутатиона с использованием ФАД как кофактора. НАДФ используется как донор

электронов. Связывание НАДФН и ФАД происходит на противоположных сторонах субъединиц фермента [85]. Глутатионредуктаза играет важнейшую роль в клеточном метаболизме. Увеличение в клетке синтеза (GSH) и усиление активности глутатионредуктазы поддерживает высокий уровень тиолового гомеостаза и улучшает функциональность иммунных клеток, связанных с макрофагами и нейтрофилами, предотвращая окислительное повреждения и воспалительные процессы [168].

Клеточный дефицит глутатиона индуцирует апоптозный сигнальный механизм в раковых клетках. Нарушение гомеостаза окисленного и восстановленного глутатиона может быть следствием цитотоксического эффекта при терапевтическом лечении раковых заболеваний [213]. Оптимальная концентрация восстановленного глутатиона может нарушаться в ходе различных патологических процессов. Глутатионредуктаза – ключевой антиоксидантный фермент в растениях и бактериях, вовлеченный в детоксикацию ксенобиотиков. Усиление активности глутатионредуктазы увеличивает адаптивные способности организмов к свету, действиям солей, температуре, и других экстремальных факторов [183].

Также существенную роль играет в глутатионовом цикле играет глутатион-S-трансфераза (КФ 2.5.1.18) – антиоксидантный фермент, найденный в различных организмах. Фермент может катализировать различные типы реакций, большинство из которых связанно опосредованно участием восстановленного глутатиона (GSH) [56]. Семейство глутатионтрансфераз включает в себя различные группы ферментов, которые вовлечены в трансферазную активность. Первая группа ферментов характеризуется, как цитозольные или растворимые ферменты. Насчитывается, по крайней мере, 16 членов данного семейства в клетках человека. В свою очередь это семейство ферментов разделяется на 8 подсемейств. Вторая группа ферментов представляет так называемое семейство микросомальных трансфераз. Это мембран-связанные белки, вовлеченные в глутатионовый метаболизм [147]. Члены этого семейства

чаще всего вовлечены в детоксикацию чужеродных компонентов. Растворимая глутатионтрансфераза вовлечена в метаболизм чужеродных элементов, такие как канцерогены и полютанты. Многие эндогенные глутатионовые субстраты формируются как следствие модификации макромолекул из-за воздействия активных форм кислорода. Таким образом, этот фермент может рассматриваться как полноценный элемент антиоксидантной защиты [108].

Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1.1. Объект исследования

Объектом исследования служили самцы шмеля *Bombus terrestris* (L.) в возрасте 10-15 суток, а также личинки и куколки *B. terrestris* (L.). В ряде опытов использовалась лабораторная популяция домовой мыши *Mus Musculus*.

2.1.2. Методы исследования

2.1.2.1 Определение уровня потребления кислорода и выделения углекислого газа в процессе дыхания

Определение кислорода и углекислого газа осуществляли с помощью измерителя «Vernier» (Labquest, США) и соответствующего программного обеспечения. В герметичную емкость 2 л помещали животных и регистрировали дыхания с помощью кислородного и углекислотного электрода, подсоединенных к прибору, в течение 3-5 мин. Значения прибора выражены в ppm $O_2(CO_2)$/мин. Далее значения переводили в нмоль $O_2(CO_2)$/мин/грамм массы.

2.1.2.2. Выделение митохондрий из летательных мышц шмелей

В процессе выделения митохондрий использовали 9-10 самцов *Bombus terrestris* (L.). Насекомые охлаждались при -20 °С в течение 15 минут. Тораксы отделяли от головы и брюшка и помещали в охлажденный до ~0 °С раствор 12-14 мл среды выделения (100 мМ сахароза, 220 мМ маннитол, 1 мМ ЭГТА, 2 мг/мл свободного от жирных кислот БСА, 20 мМ HEPES pH 7,3). Все операции проводили при 0–4 ^{o}С. Тораксы тщательно измельчали

ножницами и гомогенизировали в гомогенизаторе типа Dounce (стеклянный стакан–стеклянный пестик, “Dounce Tissue Grinder With Glass Pestle”, Kimble, USA) объемом 15 мл со свободно перемещающимся пестиком (“loose pestle A”, величина зазора пестик-стакан порядка 0.1-0.17 мм) в течение 2 мин, 3-5 ходов пестика. После фильтрования через 4 слоя марли объем гомогената доводили средой выделения до 35 мл. После первого центрифугирования (5 мин x 600 g) супернатант повторно центрифугировали 10 мин x 10000 g. Супернатант отбрасывали, а осадок ресуспендировали в 1 мл среды промывания (среда выделения без БСА). Суспензию доводили до 35 мл средой промывания и центрифугировали 10 мин при 10000 g. Осадок суспендировали в 100-120 мкл среды промывания и хранили на льду. Митохондрии использовались для исследований в течение 2 часов после выделения.

2.1.2.3. Определение концентрации белка

Содержание митохондриального белка определяли с помощью коммерческого набора BCA assay (“Pierce Biotechnology”/“Thermo Scientific,” США).

2.1.2.4. Измерение скорости дыхания митохондрий

Скорость поглощения кислорода митохондриями регистрировали амперометрически кислородным электродом типа Кларка (Hansatech Instruments, США). Все измерения проводили при 24 °C в 1 мл среды инкубации, содержащей 220 мМ маннитол, 100 мМ сахарозу, 1 мМ ЭГТА, 4 мМ фосфат калия, 20 мМ HEPES pH 7.3, и субстраты дыхания. Митохондрии (100-200 мкг белка) добавляли в среду регистрации дыхания с последующей добавкой субстратов дыхания, АДФ (200 мМ), карбоксиатрактилата (1 мкМ), и разобщителя 2,4-ДНФ (40 мкМ). Дыхательный контроль рассчитывался как отношение скорости дыхания в присутствии АДФ к скорости

нефосфорилирующего дыхания после добавки карбоксиатрактилазида. Все измерения выполняли в течение 2 часов после выделения митохондрий.

2.1.2.5. Оценка целостности внутренней мембраны митохондрий

Целостность внутренней мембраны митохондрий оценивали посредством измерения активности митохондриальной малатдегидрогеназы. В 2 мл среды выделения митохондрий добавляли 50 мкг свежевыделенных митохондрий и 2 мкМ ротенона, инкубировали 5 минут. Затем добавляли 200 мкМ НАДН и 400 мкМ оксалоацетата. Измеряли скорость падения оптической плотности при 340 нм. Процедуру повторяли в присутствии 0,01% детергента нонидент. Метод основан на факте непроницаемости внутренней мембраны митохондрий для НАДН и оксалоацетата. Фермент матрикса митохондрий малатдегидрогеназа катализирует окисление НАДН оксалоацетатом; в препарате изолированных митохондрий окисление экзогенного НАДН оксалоацетатом возможно только в случае достаточно серьезных повреждений внутренней мембраны органелл.

2.1.2.6. Измерение мембранного потенциала митохондрий

Мембранный потенциал регистрировали по изменению флуоресценции проникающего катиона сафранина О (20 нмоль/мг белка митохондрий) [200] при длине волны возбуждения 495 нм и эмиссии 586 нм (спектрофлуориметра Hitachi F-7000). Среда регистрации (1 мл) состояла из 220 мМ маннитола, 100 мМ сахарозы, 1 мМ ЭГТА, 4 мМ фосфата калия, 200 мкг/мл БСА, 20 мМ HEPES pH 7.4, 100-120 мкг митохондриального белка , 2-4 нмоль Сафранина О и субстратов окисления, как указано в тексте.

2.1.2.7. Определение скорости продукции пероксида водорода митохондриями

Регистрацию H_2O_2 осуществляли с помощью флуоресцентного красителя Amplex Red Ultra (Sigma, USA) как описано ранее [210]. Amplex Red Ultra – бесцветное вещество, активно вступающее в реакцию с пероксидом водорода в соотношении 1:1 с образованием флуоресцентного комплекса резоруфина в интервале pH от 7 до 8. Измерения проводили на спектрофлуориметре Hitachi F-7000 в среде выделения того же состава, объемом 1 мл в присутствии 2 мкМ Amplex Red, 100-200 мкг митохондриальной фракции, 1 мг/мл пероксидаза хрена. Люминисценцию возбуждали при длине волны 568 нм, эмиссию регестрировали при 581 нм.

2.1.2.8. Измерение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ)

Активность СДГ (EC 1.3.99.1) измеряли спектрофотометрически, как описано ранее [106]. Среда измерения состояла из 50 мМ KCl, 10 мМ HEPES, pH 7,4, 40 мМ сукцината, 2 мМ KCN, 1 мкМ ротенона, 50 мкМ 2,3-диметокси-5-метил-6-децил-1,4-бензохинона, 50 мкМ 2,6-дихлорфенолиндофенола и 20 мкМ EDTA. Активность фермента измеряли по падению оптической плотности при 600 нм. Активность фермента рассчитывали исходя из коэффициента экстинкции 2,6-дихлорфенолиндофенола E (600 нм) = 21 $см^{-1}$х $мМ^{-1}$.

2.1.2.9. Измерение активности аконитатгидратазы (АГ)

Активность аконитатгидратазы определяли спектрофотометрически на СФ-102 (НПО Интерфотофизика, Россия) при λ=260 нм [9]. Среда определения активности содержала 20 мМ HEPES (pH 7,8) и 4 мМ цитрата. В кювету вносили 100 мкг белка. Измерение проводили в течение 5 минут.

2.1.2.10. Измерение поглощения кальция митохондриями

Регистрацию поглощения Ca^{2+} осуществляли с помощью флуоресцентного зонда Calcium Green 5N (CaGr). CaGr добавляли в кювету (1 мл) спектрофлуориметра в концентрации 1 мкМ. В кювете была среда следующего состава: 100 мМ сахароза, 220 мМ маннитол, 1 mM $MgCl_2$, 4 mM KH_2PO_4, 2 мг/мл свободного от жирных кислот БСА, 20 мМ HEPES pH 7,3. В качестве субстрата дыхания использовали 10 мМ α-глицерофосфат. Интенсивность флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре Hitachi F-7000 при 25 °С. Волна облучения – 517 нм, волна эмиссии – 535 нм.

2.1.2.11. Иммунодетекция белков (Вестерн-блот)

Белки разделяли с помощью SDS-электрофореза, как описано ранее [141]. Гель помещали на мембрану с порами 0,45 мкм. После двух промывок TTBS-буфером (10 мМ Tris-HCl , 0,9% NaCl, 0,1% Тритон X -100, pH 7,6) мембрану инкубировали 30 мин при 15 °С. Затем вносили моноклональные антитела *Mus Musculus* (anti-MCU и anti-CS), с разбавление 1:5000 в TTBS-буфере с 5% БСА. После пятикратной промывки в TTBS мембрана была проинкубирована с пероксидазо-связанными антителами. Окрашивание происходило с помощью диаминобензидина (5 мг в растворе 10 мМ Tris-HCl, 0,9% NaCl, 400 мкл 3% H_2O_2 pH 7,6). Реакция оркашивания останавливалась с помощью добавки воды.

2.1.2.12. Выделение тотальной РНК

Выделение РНК из тораксов шмелей осуществляли с помощью «тризольного» метода. Для этого наводили «тризольный» реагент (38% фенол, 0,8 М гуанидин тиоционат, 0,4 М аммония тиоционат, 0,1 М ацетат натрия, pH 5).

Гомогенизация и разделение фаз.

Инкубировали навеску тораксов шмелей (0,3 г) в 5 мл тризольного реагента в течение 5 минут при 60 °С. Производили гомогенизацию ткани в гомогенизаторе Поттера в течение 1 минуты. Центрифугировали образец при 12000 g 10 мин при температуре 4 °С. Полученный супернатант переливали в другую пробирку, осадок отбрасывали. Добавляли 1 мл хлороформа в пробирку и перемешивали на вортексе в течение 15 сек. Центрифугировали образец 10000 g 15 мин при температуре 4 °С.

Осаждение РНК.

Тщательно отбирали водную фазу, удаляли интерфазу и нижнюю фазу. Добавляли изопропанол и 0,8 М цитрат натрия/1,2 М NaCl ½ объема водной фазы. Пробирки тщательно перемешивали. Центрифугировали образец при 10000 g 15 мин при температуре 4 °С.

Промывка РНК.

Полученный осадок промывали 7 мл 74% этанола. Центрифугировали образец 10000 g 15 мин при температуре 4 °С. Полученный осадок высушивали 5-10 мин. Добавляли 80 мкл деионизированной H_2O. Осадок ресуспендировали. Полученную РНК хранили при - 20 °С.

Концентрацию РНК определяли с помощью спектрофотометра СФ-102 при длине волны 260 нм. О степени чистоты полученных препаратов судили по соотношению A_{260}/A_{280}.

2.1.2.13. Проведение обратной транскрипции

Обратная транскрипция РНК осуществлялась на приборе Mastercycler personal (Eppendorf, Германия) с использованием обратной транскриптазы вируса Moloney лейкоза мышей M-MULVRT (Fermentas, Литва) для синтеза первой цепи кДНК.

Смешивали в стерильной пробирке 0,5 мл 0,1-5 мкг тотальной РНК и 0,5 мкг oligodT праймеры (1 мкл). Доводили объём смеси до 12,5 мкл

деионизованной водой, обработанной DEPC. Аккуратно перемешивали и осаждали на вортексе. Инкубировали смесь 5 мин при 65 °C, после чего охлаждали на льду.

Добавляли следующие компоненты:

- 4 мкл 5X реакционного буфера для обратной транскриптазы;
- 2 мкл 10 mM dNTP;
- 20 ед. ингибитора рибонуклеаз IPNasine;
- 200 ед. ревертазы RevertAid.

Доводили объём смеси до 20 мкл деионизованной водой, обработанной DEPC. Аккуратно перемешивали, осаждали на вортексе.

Инкубировали реакционную смесь 60 мин при 42 °C. Затем 10 мин при 70 °C.

2.1.2.14. Проведение полимеразной цепной реакции

Полимеразная цепная реакция проводилась с использованием Taq-полимеразы на приборе Mastercycler personal (Eppendorf, Германия).

Смешивали в пробирке на 0,5 мл следующие компоненты:

- 10X реакционный буфер – 5 мкл;
- 10 мМ dNTP – 1 мкл;
- 50 пмоль прямой праймер – 1 мкл;
- 50 пмоль обратный праймер – 1 мкл;
- 25 мМ Mg^{2+} - 1-5 мкл;
- матрица – 0.5-5 мкл;
- термостабильная Taq-полимераза – 2.5 ед. (0.5 мкл);
- деионизованная вода – до 50 мкл.

Помещали пробирки в амплификатор. Запускали программу:

- первоначальный прогрев при 95 °C – 2 минуты;
- 30 циклов вида:
    - денатурация при 95 °C в течение 30 секунд;

- отжиг праймеров при 59-65 °С в течение 30 секунд;
- элонгация цепи при 72 °С в течение 1мин 30 сек.

- инкубирование смеси при 72 °С в течение 5 мин.

2.1.2.15. Проведение аналитического электрофореза нуклеиновых кислот в агарозном геле

В колбу наливали 98 мл дистиллированной воды и добавляли 2 мл 50Х буфера (400мМ трис-ацетатный буфер, pH 8,5, с 50 мМ ЭДТА). Взвешивали 2 г агарозы и помещали в колбу. Доводили смесь до кипения на газовой горелке. После того, как смесь остывала до 70-60 °С, вносили в расплавленный гель 5 мкл бромида этидия (0,1% спиртовой раствор). Заливали гель в заранее приготовленный столик. После застывания геля переносили его в электрофоретическую камеру. Наносили в ячейки геля пробы, смешанные с краской для нанесения (2 мкл краски: 3 мкл проб). Проводили электрофорез при напряжении 7 В/см.

Визуализацию результатов провели на трансиллюминаторе TCP-20LM при длине волны 312 нм. Результаты фиксировали цифровой фотокамерой Casio.

2.1.2.16. Проведение RT-PCR

Количественную полимеразную цепную реакцию проводили на приборе Bio-Rad CFX 96 (Bio-rad, США) с готовой коммерчески доступной смесью для PCR qPCRmix-HS SYBR+LowROX (Евроген, Россия) согласно следующему протоколу:

- Первоначальный прогрев при 95 °С – 2 минуты;
- 30 циклов вида:
  - денатурация при 95 °С в течение 30 секунд;
  - отжиг праймеров при 52 °С в течение 30 секунд;

- элонгация цепи при 72 °С в течение 1мин 30 сек.
- инкубирование смеси при 72 °С в течение 5 мин.

Качество PCR продуктов оценивали по кривым плавления и электрофоретически в 2,5% агарозном геле.

2.1.2.17. Статистическая обработка данных

Опыты проводились в 3-х повторностях. Аналитическое определение для каждой из проб осуществляли в трёх повторностях. В таблицах отражены данные опытов, где каждое из значений является средним арифметическим. Для определения достоверности результатов применяли метод вариационной статистики. При математической обработке использовали статистический критерий Стьюдента [28].

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.2.1. Окислительный метаболизм митохондрий летательных мышц шмелей

2.2.1.1. Интенсивность потребления кислорода и выделения углекислого газа шмелями

Свойством организма, которое может характеризовать интенсивность катаболических процессов, происходящих в клетках и тканях, является потребление кислорода и выделение углекислого газа в процессе дыхания. Несмотря на то, что холоднокровные животные не тратят энергию на поддержание температуры тела, их дыхание также может иметь высокие значения, которые зачастую зависят от температуры окружающей среды [239]. *B. terrestris* распространен в северных регионах и имеет адаптивные черты к холодному климату. Так, в отличие от большинства других насекомых температура тела шмелей сохраняется около 30 °C и выше. Они могут сохранять способность к полёту при температурах ниже 10 °C [109].

Средний уровень дыхания для взрослого шмеля составил 37,9 мкмоль O_2/мин/грамм массы. При этом коэффициент RQ, который характеризует источник энергии для дыхания (углеводы и жиры) организма, у *B. terrestris* был равен 0,92. Это говорит о том, что основным источником энергии для катаболических процессов насекомого является окисление углеводов.

Для сравнительного анализа скорости дыхания шмеля по сравнению с теплокровными организмами нами был использован такой лабораторный объект, как *Mus musculus*. Животное помещали в изолированную камеру и измеряли уровень дыхания в течение 3 минут. Измерение дыхания *B. terrestris* проводили в аналогичной камере. Скорости дыхания организмов изображены на рисунке 3.

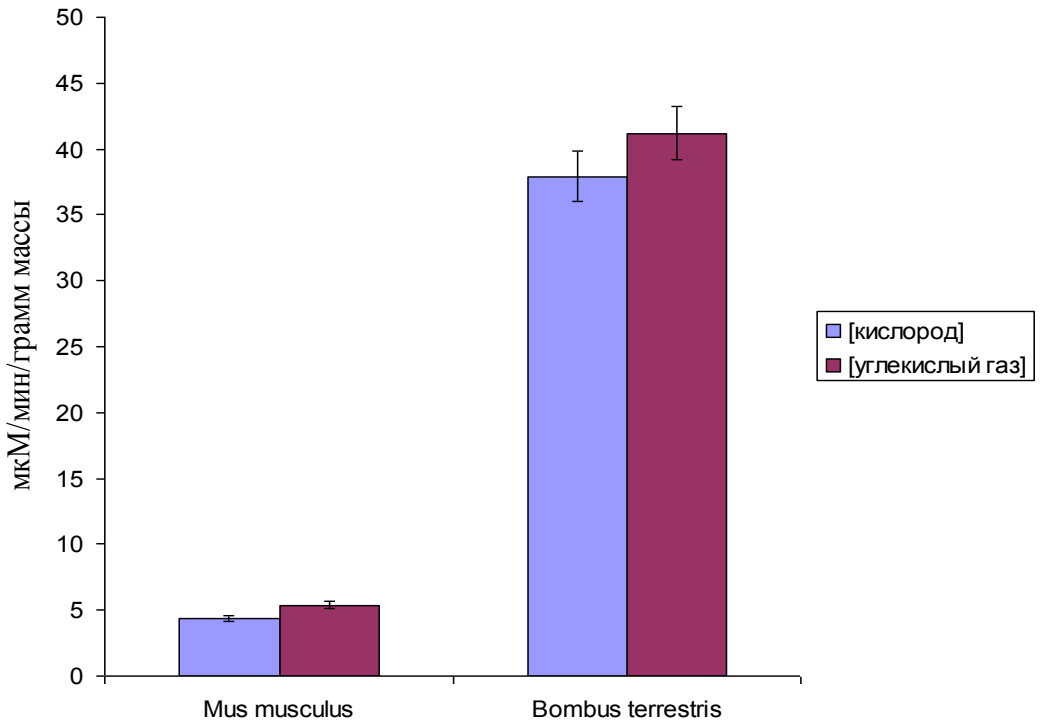

Рис. 3. Сравнение дыхания земляного шмеля (*Bombus terrestris*) и домовой мыши (*Mus musculus*) в состоянии покоя.

Дыхание земляного шмеля в 7,75 раза превышало дыхание домовой мыши. Это говорит о том, что, несмотря на то, что шмели являются холоднокровными организмами, они имеют высокие уровни дыхания в пересчете на грамм массы. Таким образом, в тканях шмелей проходят высокоскоростные аэробные катаболические процессы, которые, скорее всего, связаны с наличием летательных мышц.

Скорость дыхания насекомых может сильно зависеть от стадии развития организма ввиду того, что эти животные имеют полный цикл развития с существованием фазы личинки, куколки и взрослого насекомого. Учитывая тот факт, что шмели способны осуществлять полёт только во взрослой стадии развития, наиболее высокие уровни потребления кислорода будут характерны для стадии взрослого насекомого. Для выявления скорости потребления кислорода и выделения углекилого газа эти показатели были измерены на разных стадиях развития *B. terrestris*. Личинки были извлечены из крупной колонии шмелей, после чего сразу был определен уровень

дыхания. Для более полной картины дыхания при исследовании стадии куколки было произведено деление на 2 подстадии: «ранняя куколка» и «поздняя куколка» ввиду того, что процессы метаморфоза на этой стадии являются динамическими показателями. Скорости поглощения кислорода и выделения углекислого газа представлены на рис. 4.

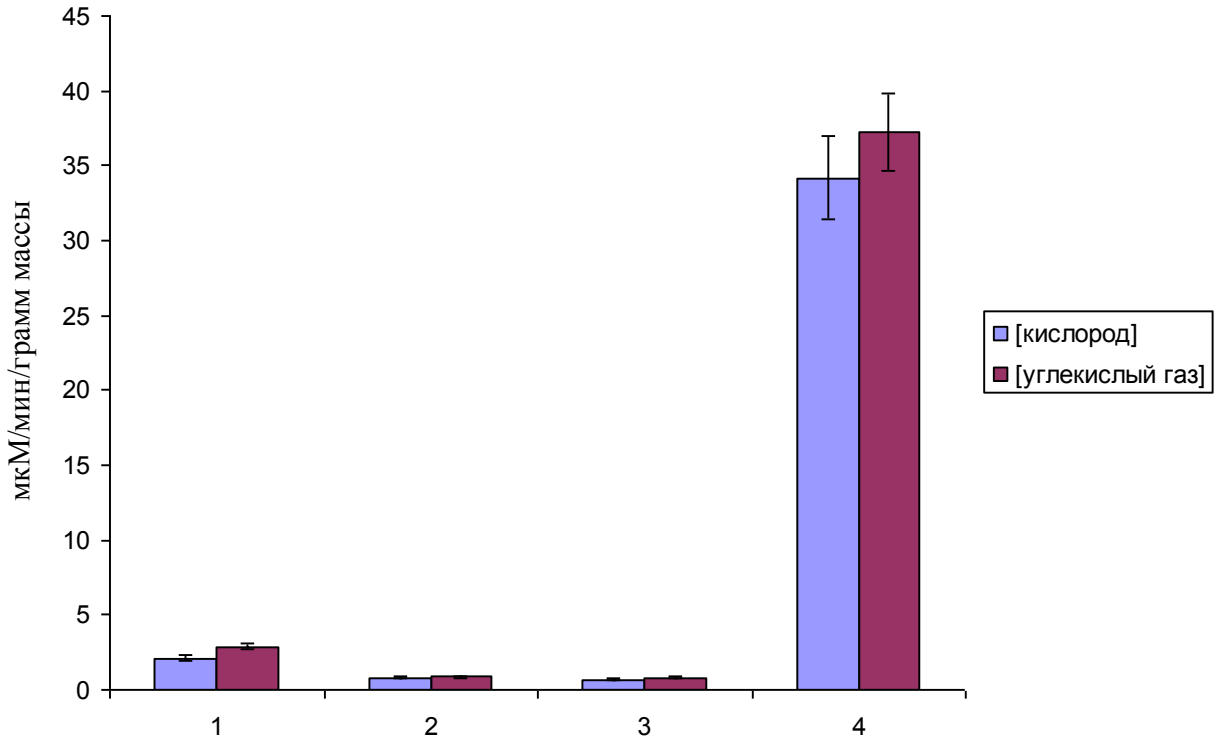

Рис. 4. Дыхание *B. terrestris* на разных стадиях развития. 1 – личинка, 2 – ранняя куколка, 3 – поздняя куколка, 4 – взрослое насекомое.

Скорость дыхания на стадии личинки составила 2,1 мкмоль O_2/мин/грамм массы (2,9 мкмоль CO_2/мин/грамм массы). Для ранней куколки этот показатель составил 0,8 мкмоль O_2/мин/грамм массы (0,9 мкмоль CO_2/мин/грамм массы), для поздней куколки – 0,7 мкмоль O_2/мин/грамм (0,8 мкмоль CO_2/мин/грамм массы). В то время как дыхание у взрослого насекомого составило 34,2 мкмоль O_2/мин/грамм массы (37,2 мкмоль CO_2/мин/грамм массы). Столь высокая интенсификация дыхания во взрослой стадии, скорее всего, обусловлено формированием летательных мышц, которые содержат в себе огромное количество митохондрий [207]. Таким

образом, в митохондриях летательных мышц шмеля происходят высокоинтенсивные катаболические реакции, сопровождаемые поглощением кислорода.

Полёт насекомого является высокоинтенсивным метаболическим процессом ввиду высоких потребностей в молекулах АТФ для сокращения летательной мускулатуры. При этом у некоторых насекомых скорость потребления кислорода в процессе полёта возрастала более чем в 100 раз [43].

Для выявления уровня дыхания шмелей во время полёта и состояния покоя делили животных на 2 группы. Нелетающие насекомые изолировались от света, что приводило к полной остановке летательной активности. Летающие насекомые находились под лампой дневного света. При этом учитывалось количество шмелей, не осуществляющих полёт во время проведения эксперимента. Результаты эксперимента изображены на рис. 5.

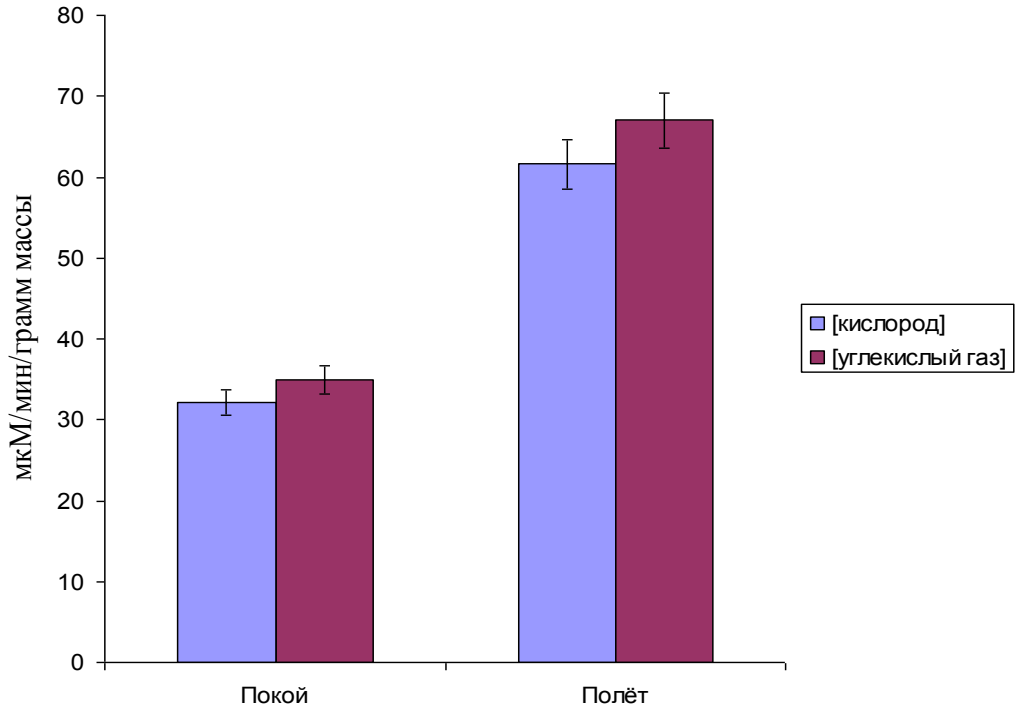

Рис. 5. Дыхание *B. terrestris* в покое и полёте.

Дыхание во время полёта шмеля увеличилось в 1,92 раза, что говорит о высоком уровне дыхания во время покоя *B. terrestris*. Это может быть

связано с необходимостью данного вида насекомого поддерживать необходимую температуру тела во время покоя, что требует дополнительной выработки молекул АТФ митохондриями, которые являются основными потребителями кислорода у *B. terrestris*.

Все вышеперечисленные физиологические показатели приводят к выводу о важности исследования биоэнергетических процессов, происходящих в летательных мышцах шмеля, выявлению уровня дыхания митохондрий, продукции АФК и механизмы защиты от повреждающего действия свободных радикалов, которые являются следствием высоких норм потребления кислорода митохондриями.

2.2.1.2. Характеристика катаболический активности митохондрий летательных мышц шмелей

Использование «классической» процедуры выделения митохондрий из летательных мышц насекомых [47] не привело к положительному результату. Причины этого неясны: возможно, проблема в большей толщине хитиновой оболочки торакса шмеля и для её разрушения необходимо большее механическое усилие, чем для мелких насекомых, что приводит к разрушению довольно больших по размеру митохондрий летательных мышц шмелей. Примененный нами способ (см. раздел Методы исследования) позволил получить препарат с высоким дыхательным контролем (Рис. 6.).

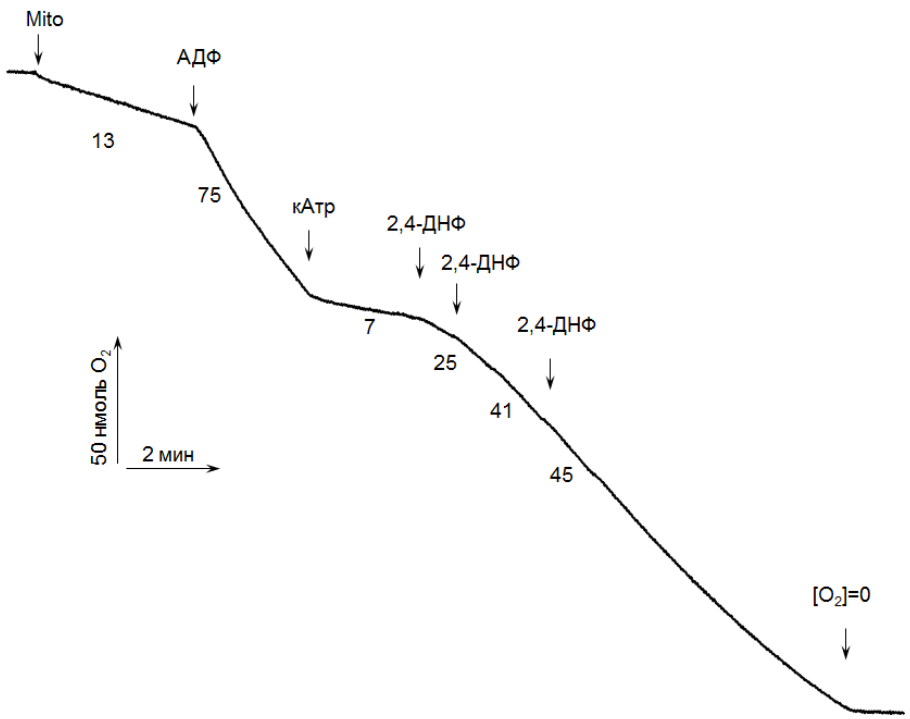

Рис. 6. Схема эксперимента по регистрации скорости поглощения кислорода и величины дыхательного контроля изолированных митохондрий *B. terrestris*. Состав среды инкубации указан в «Материалах и Методах»; концентрация каждого из субстратов 10 мМ. Значения под кривой – величина дыхания нмоль O_2/мин/мг белка. Сокращения: Мито, митохондрии; кАтр, карбоксиатрактилат.

В качестве среды инкубации были опробованы два широко используемых состава: с низкой ионной силой («сахарозная среда», см. методы исследования) и с высокой ионной силой («калиевая среда», 150 мМ KCl, 20 мМ HEPES pH 7.4, 0,2 мг/мл БСА, очищенного от жирных кислот, 1 мМ ЭГТА). Скорость дыхания и степень сопряжения препаратов были значительно ниже при использовании калиевой среды, поэтому все представленные в данной работе данные были получены с использованием сахарозной среды.

В большинстве опубликованных работ с изолированными митохондриями млекопитающих и насекомых в качестве критерия качества препарата служит коэффициент дыхательного контроля для НАД$^+$-зависимых субстратов окисления. Между тем, в отсутствие информации об

особенностях окисления используемых субстратов, интерпретация значений дыхательного контроля затруднена и чаще всего не отражает степень интактности препарата митохондрий. В связи с этим, мы использовали энзиматический метод оценки проницаемости внутренней мембраны митохондрий. Примененный нами метод основан на надежно установленном факте (для большинства исследованных организмов) непроницаемости внутренней мембраны митохондрий для НАДН и оксалоацетата. Фермент матрикса митохондрий малатдегидрогеназа катализирует окисление НАДН оксалоацетатом; в препарате изолированных митохондрий окисление экзогенного НАДН оксалоацетатом возможно только в случае достаточно серьезных повреждений внутренней мембраны органелл. В дальнейших опытах мы использовали только те митохондрии, для которых степень стимуляции малатдегидрогеназной активности детергентом было не менее 7 раз.

Эффективность окисления экзогенных интермедиатов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) митохондриями млекопитающих в значительной степени обусловлена наличием и активностью белков-переносчиков этих веществ во внутренней мембране митохондрий, кодируемых 46 известными генами семейства SLC25 [95, 169]. Наиболее часто используемыми комбинациями субстратов в исследованиях митохондрий млекопитающих являются комбинации пирувата или глутамата с малатом, и сукцинат. В то же время, наличие таких переносчиков, по-видимому, не является необходимым для обеспечения высокой активности окислительного фосфорилирования в митохондриях летательных мышц насекомых. Считается, что митохондрии летательных мышц насекомых неспособны окислять малат, глутамат, и сукцинат в силу отсутствия необходимых переносчиков [47, 48]. Тем не менее, приложение таких выводов к митохондриям шмелей не представляется оправданным ввиду значительных различий в биохимии различных таксономических групп летающих насекомых. В связи с этим, было целесообразно выяснить

эффективность окисления различных НАД$^+$- и ФАД-зависимых субстратов митохондриями шмелей.

Окисление субстратов оценивали, регистрируя максимальные скорости фосфорилирующего дыхания. Оценивались как максимальные скорости дыхания, так и величина дыхательного контроля изолированных митохондрий (табл. 1).

Таблица 1.

Скорости поглощения кислорода и величины дыхательного контроля изолированных митохондрий *B. terrestris* окисляющих НАД$^+$ и ФАД-зависимые субстраты.

Субстрат окисления	Фосфорилирующее дыхание (+АДФ)	Нефосфорилирующее дыхание (+кАтр)	Коэффициент дыхательного контроля
Пируват	92,80±5.74	3,70 ±0,43	25,1
Малат	2,40 ±0,19	1,80 ±0,20	1,3
Глутамат	12,80 ±1,29	3,80 ±0,44	3,4
Цитрат	2,10 ±0,15	1,60 ±0,15	1,3
Пролин	17,60 ±0,87	80 ±1,13	2,2
Пируват + Малат	121,60 ±7,02	15,60 ±2,65	7,8
Пируват + Пролин	121,60 ±7,96	12,20 ±2,32	10
Пируват + Глутамат	131,20 ±9,88	19,60 ±2,94	6,7
Глутамат + Малат	11,20 ±0,94	3,70 ±0,44	3
Сукцинат	54,00 ±1,72	49,10 ±4,35	1,1
Альфа-Глицерофосфат	202,70±12,4	135,10 ±17,60	1,5

Как оказалось, митохондрии шмелей почти неспособны окислять экзогенные малат, глутамат и цитрат. В то же время, окисление экзогенного пирувата было весьма эффективно; при этом добавление малата, пролина или глутамата значительно увеличивало скорость фосфорилирующего дыхания. Максимальная величина дыхательного контроля наблюдалась при использовании пирувата при отсутствии других добавок; при окислении пирувата в комбинации с малатом, глутаматом и пролином также наблюдался достаточно высокий дыхательный контроль. Окисление пролина представляет особый случай, так как пролин окисляется в митохондриях в две стадии, первая – скорость-лимитирующая – является ФАД-зависимой, с убихиноном дыхательной цепи в качестве финального акцептора электронов, тогда как вторая стадия НАД$^+$-зависимая [177]. Принято считать, что эффективное окисление пролина характерно для митохондрий летательных мышц кровососущих насекомых [61] и является адаптацией к специфическому, богатому пролином, виду основной пищи этих насекомых. Однако, пыльца растений, также достаточно богатая пролином [178], составляет значительную часть питания шмелей. Тем не менее, окисление пролина митохондриями шмелей происходит медленно и с низким коэффициентом дыхательного контроля (табл. 1). В связи с этим, представляется маловероятным, что этот субстрат имеет большое значение в обеспечении биоэнергетики полета шмелей.

Окисление ФАД-зависимых субстратов сукцината и α-глицерофосфата представляло особый интерес ввиду крайне противоречивых данных в опубликованной литературе для митохондрий других видов летающих насекомых. С одной стороны, авторитетные источники указывают на отсутствие сколь-нибудь значительного окисления сукцината [194]. Приводимые скорости окисления сукцината обычно в 8-10 раз ниже скорости окисления пирувата при отсутствии (или очень низком) дыхательном контроле. Общепринятым объяснением низкой дыхательной активности с сукцинатом являются данные классической работы, указывающие на

отсутствие переносчика для этого субстрата [48]. С другой стороны, ни в одной из известных нам работах не оценивалась интактность внутренней мембраны митохондрий, что может значительно повлиять на величину дыхательного контроля, особенно с субстратами типа сукцината и α-глицерофосфата; не оценивалась общая активность сукцинатдегидрогеназы, что может повлиять на скорость окисления данного субстрата, и наконец, в этой и других работах изучались насекомые отряда Diptera (различные виды мух), не являющиеся близкородственными шмелям (отряд Hymenoptera). В связи с этим, мы измерили окисление сукцината и α-глицерофосфата митохондриями шмелей. Как показано в Таблице 1, митохондрии шмелей окисляют сукцинат со значительной скоростью, равной, примерно, половине скорости дыхания с пируватом (см. табл. 1). При этом максимальный дыхательный контроль не превышал 1.2-1.4, а активность сукцинатдегидрогеназы была сопоставима со скоростью дыхания (278 ± 20 нмоль ДХФИФ/мин/мг белка). Механическое разрушение внутренней мембраны митохондрий увеличивало скорость дыхания на сукцинате, примерно, в два раза. Эти результаты указывают, что оба фактора – низкая активность сукцинатдегидрогеназы и недостаточная активность (но не отсутствие) переносчика дикарбоксилатов – ответственны за низкую скорость окисления сукцината. С другой стороны, окисление α-глицерофосфата (также являющегося ФАД-зависимым субстратом, но не требующего специального переносчика, так как альфа-глицерофосфатдегидрогеназа, располагается на внешней стороне внутренней мембраны митохондрий) оказалось весьма эффективным (табл. 1). Скорости дыхания при окисления этого субстрата были примерно вдвое выше, чем при окислении пирувата (202±12 нмоль O_2/мин/мг белка), хотя величина дыхательного контроля ни в одном из экспериментов не превышала 2. При исследовании митохондрий с неопределёнными ранее характеристиками величина дыхательного контроля зависит от большого числа факторов, и необязательно отражает качество – «интактность» – препарата митохондрий.

Одним из важных факторов, определяющим величину дыхательного контроля, является природа субстрата окисления. Например, высокий дыхательный контроль с пируватом необязательно означает высокую степень интактности препарата, так как минимум два из участвующих в окислении пирувата ферментов – пируватдегидрогеназа и НАД$^+$-зависимая изоцитратдегидрогеназа – могут значительно активироваться АДФ [188]. В таком случае высокий дыхательный контроль может достигаться не за счет высокого качества препарата, а за счет заниженной (в отсутствии АДФ) скорости нефосфорилирующего дыхания.

Нужно отметить, что ни в одном из известных нам исследований не проводилась оценка мембранного потенциала митохондрий насекомых. Измерения мембранного потенциала значительно дополняют данные о свойствах митохондрий, полученных при регистрации поглощения кислорода. Как показано на рис. 7, митохондрии шмелей генерировали стабильный мембранный потенциал при окислении пирувата.

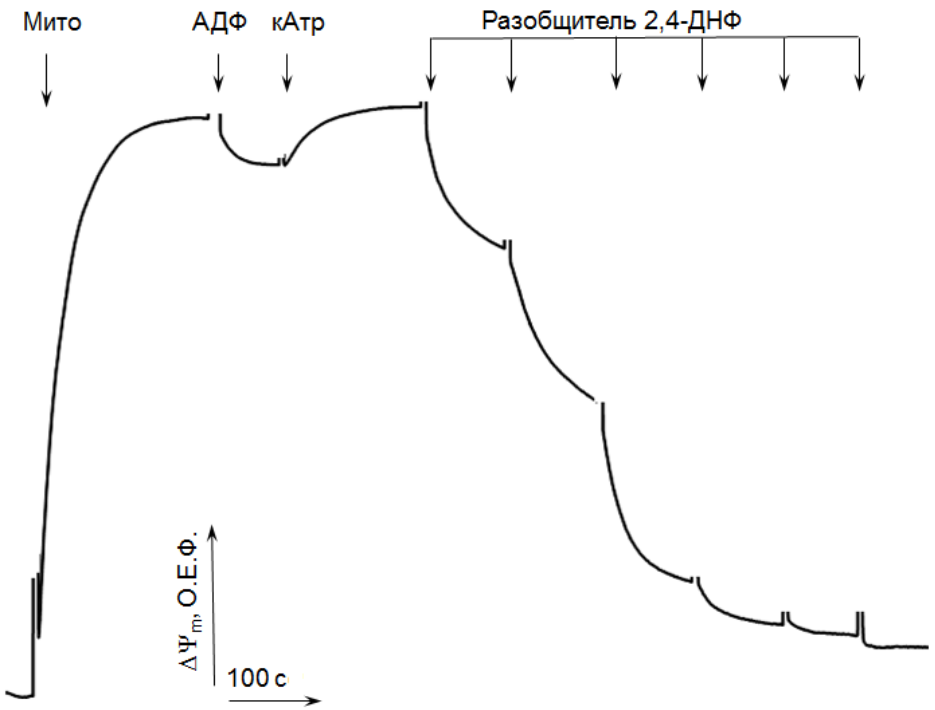

Рис. 7. Мембранный потенциал митохондрий B. terrestris. Эффекты АДФ, кАтр и разобщителя на мембранный потенциал митохондрий, окисляющих пируват. О.Е.Ф. – относительные единицы флуоресценции.

Среда инкубации содержала 220 мМ маннитола, 100 мМ сахарозы, 1 мМ ЭГТА, 4 мМ KH2PO4, 0.2 мг/мл БСА, 20 мМ HEPES pH 7.4, 10 мМ α-глицерофосфат, 100-200 мкг митохондриального белка, и 2-4 нмоль сафранина О.

Инициация окислительного фосфорилирования добавлением АДФ снижала мембранный потенциал. Блокирование окислительного фосфорилирования при помощи ингибитора АТФ/АДФ-транслокатора карбоксиатрактилозида восстанавливала мембранный потенциал, при этом последующие добавки разобщителя (ДНФ) вызывали снижение мембранного потенциала пропорционально его концентрации. Таким образом, мембранный потенциал митохондрий шмелей изменяется в ответ на эти добавки точно таким же образом, как и мембранный потенциал митохондрий млекопитающих, что подтверждает значительное сходство дыхательной цепи и системы фосфорилирования насекомых и млекопитающих [47]. Митохондрии шмелей имеют особенность, заключающуюся в способности поддерживать значительный мембранный потенциал в отсутствие экзогенных субстратов (рис. 8).

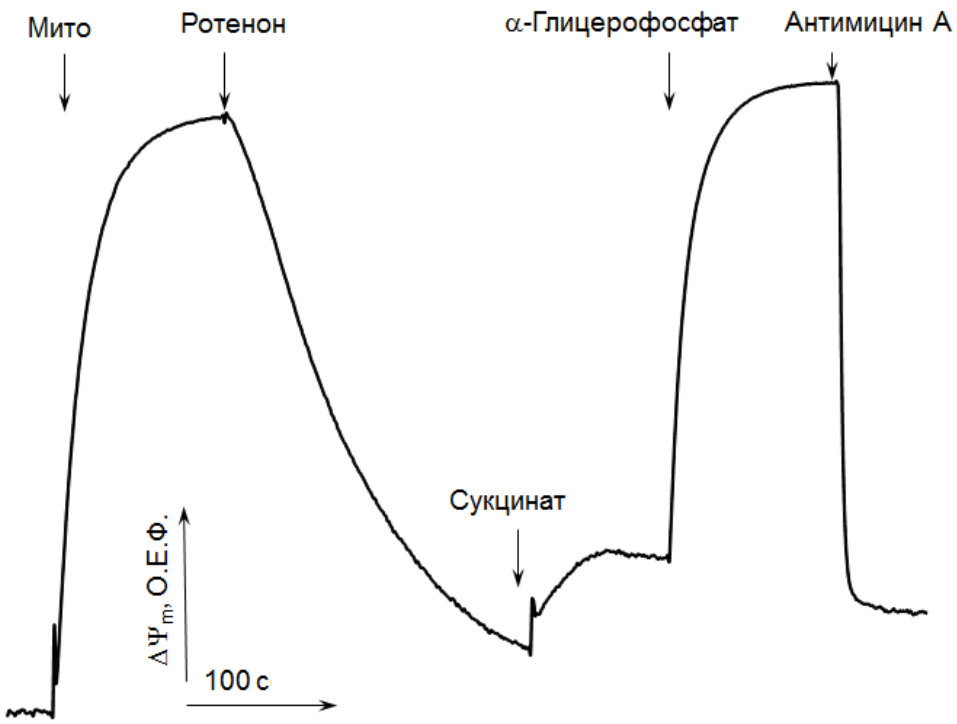

Рис. 8. Мембранный потенциал митохондрий *B. terrestris*. Влияние ФАД- зависимых субстратов на мембранный потенциал митохондрий. Состав среды инкубации, см. рис. 7. Сукцинат и α-глицерофосфат добавляли в концентрации 10 мМ, антимицин и ротенон добавляли в концентрации 5 мкМ.

По-видимому, митохондрии шмелей содержат значительные количества окисляемых субстратов в матриксе, что нетипично для митохондрий млекопитающих. Возможно, что эти субстраты являются интермедиатами НАД$^+$-зависимых ферментов цикла трикарбоновых кислот, удерживаемых в матриксе из-за низкой активности соответствующих переносчиков. НАД$^+$-зависимость эндогенных субстратов следует из подавления мембранного потенциала ротеноном, ингибитором комплекса 1 дыхательной цепи (рис. 8). Следует отметить, что в этих условиях добавление сукцината практически не увеличивает мембранный потенциал, тогда как последующее добавление α-глицерофосфата приводит к значительному увеличению мембранного потенциала. Эти данные

указывают, что особенности окисления сукцината, описанные выше (относительно высокая скорость дыхания при отсутствующем дыхательном контроле и достаточно высокой активностью сукцинатдегидрогеназы), наиболее вероятно объясняются низкой активностью переносчика дикарбоксилатов, а не другими факторами, к примеру, изменениями в терминальной части дыхательной цепи или большим количеством поврежденных митохондрий в препарате. Последние не дают никакого вклада в измеряемый мембранный потенциал, тогда как окисление α-глицерофосфата протекает с участием тех же самых комплексов дыхательной цепи и переносчиков электронов, что и окисление сукцината, за исключением факта, что альфа-глицерофосфатоксидаза находится снаружи барьера внутренней мембраны и не нуждается в переносчике для получения доступа к своему субстрату.

Таким образом, разработан и стандартизирован метод выделения митохондрий летательных мышц шмелей, позволяющего получать хорошо сопряженный препарат, и получены дыхательные характеристики митохондрий. Хотя представленные в работе данные о дыхании митохондрий носят ограниченный характер, они позволяют утверждать, что свойства митохондрий шмелей похожи на установленные ранее для большинства летающих насекомых [47], и особенно близки к типу, наблюдаемому у представителей класса Diptera: мясная (Blowfly, *Phormia regina*) и домашняя мухи (Housefly, *Musca domestica*). Однако, в отличие от мух, митохондрии шмелей неспособны эффективно окислять пролин. Тем не менее, как и у мух, митохондрии шмелей имеют ограниченную способность окислять экзогенные интермедиаты цикла трикарбоновых кислот, при максимальных скоростях дыхания с субстратами гликолиза пируватом и альфа-глицерофосфатом в качестве субстратов окисления. Дыхательный коэффициент (respiratory quotient, RQ) летающих шмелей близок к единице (см. выше), что строго указывает на углеводы в качестве основного топлива, обеспечивающего работу летательных мышц. Шмели не запасают

питательные субстраты в виде гликогена или липидов: основными расходуемыми веществами в полете являются неполимеризованные углеводы (глюкоза, фруктоза) гемолимфы и трегалоза мышц тораксов [96]. Основные продукты окисления сахаров – α-глицерофосфат (промежуточный продукт) и пируват (конечный продукт). Именно эти субстраты являются оптимальными для поддержания высокой скорости окислительного метаболизма митохондрий шмелей, как следует из представленных в данной работе результатов. Цикл трикарбоновых кислот является основным катаболическим путем окисления в митохондриях. Можно предполагать, что в случае летающих насекомых специализация по отношению к источникам питания наряду со значительными энергозатратами для обеспечения полета, привела к эволюционным модификациям митохондрий в сторону оптимизации окислительного метаболизма продуктов гликолиза. Это, в свою очередь, потребовало снижения оттока интермедиатов цикла трикарбоновых кислот из митохондрий, обеспечивающейся низкой активностью трансмембранных переносчиков этих интермедиатов.

2.2.1.3. Продукция активных форм кислорода митохондриями летательных мышц шмелей

Митохондрии являются главнейшим ресурсом в продукции активных форм кислорода. В среднем в клетках митохондриями усваивается до 85-90% всего потребленного кислорода [124], что неизбежно приводит к продукции активных форм кислорода. Самым главным источником АФК является ЭТЦ митохондрий [35]. Выделяют несколько источников активных форм кислорода в ЭТЦ митохондрий. Особую роль в этом играет комплекс I [111] и комплекс 3 электрон-транспортной цепи [175]. Активный вклад в продукцию АФК вносит обратный перенос электронов [155]. Избыток активных форм кислорода вызывает окислительный стресс в клетках живых организмов [38] и может повреждать клеточные органеллы [46].

Для исследования уровня продукции АФК митохондриями летательных мышц шмеля были выделены хорошо сопряженные митохондрии с дыхательным контролем на субстрате пируват+глутамат не менее 5. Выбор НАД$^+$-зависимых субстратов для дыхании митохондрий был основан на предыдущих исследованиях (см. выше). Дыхательный контроль в присутствии α-глицерофосфата составлял не менее 1,8.

Продукция АФК митохондриями может сильно различаться в зависимости от метаболического состояния органеллы вследствие изменения мембранного потенциала. Зависимость продукции пероксида водорода от метаболического состояния показаны на рис. 9.

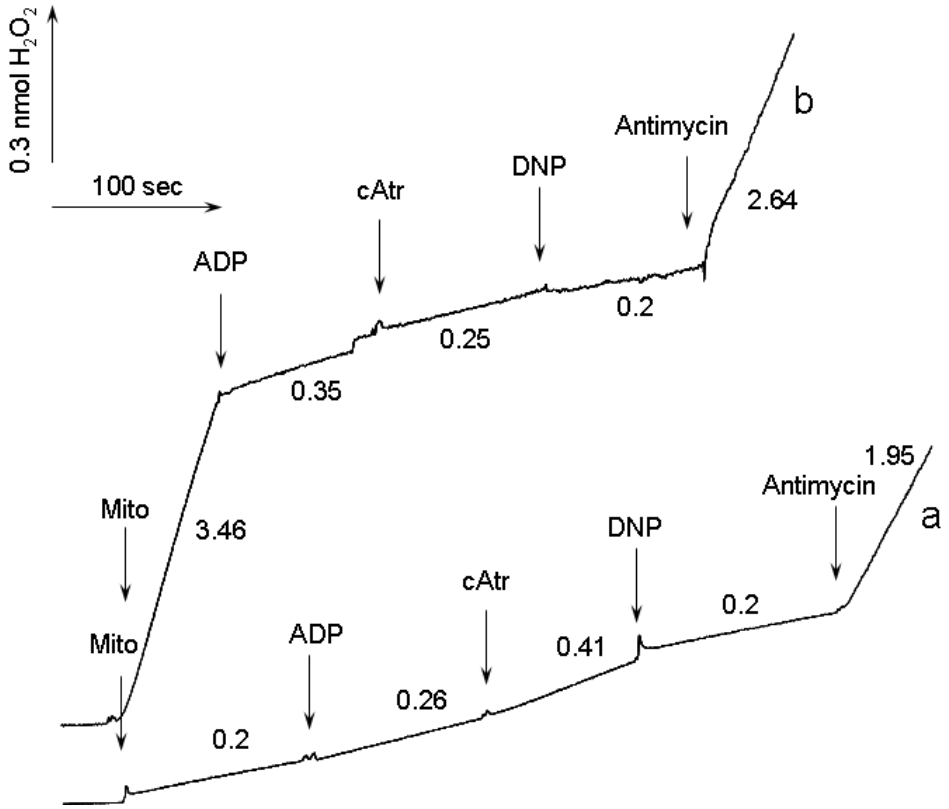

Рис. 9. Продукция H_2O_2 митохондриями летательных мышц *B. terrestris* в зависимости от метаболического состояния (состояние 3 и 4 по Чансу). Числовое значение над кривыми выражено в нмоль H_2O_2 /мин/мг белка.

a – субстрат дыхания пируват+глутамат;

b – субстрат дыхания α-глицерофосфат.

Кроме того, была выявлена зависимость продукции АФК в зависимости от ингибиторов комплекса I ЭТЦ (ротенон) и комплекса III ЭТЦ (антимицин А). Измерения проводили на 4 видах субстратов дыхания митохондрий: сукцинат, пируват, пируват+глутамат, α-глицерофосфат. Результаты представлены на рис. 10.

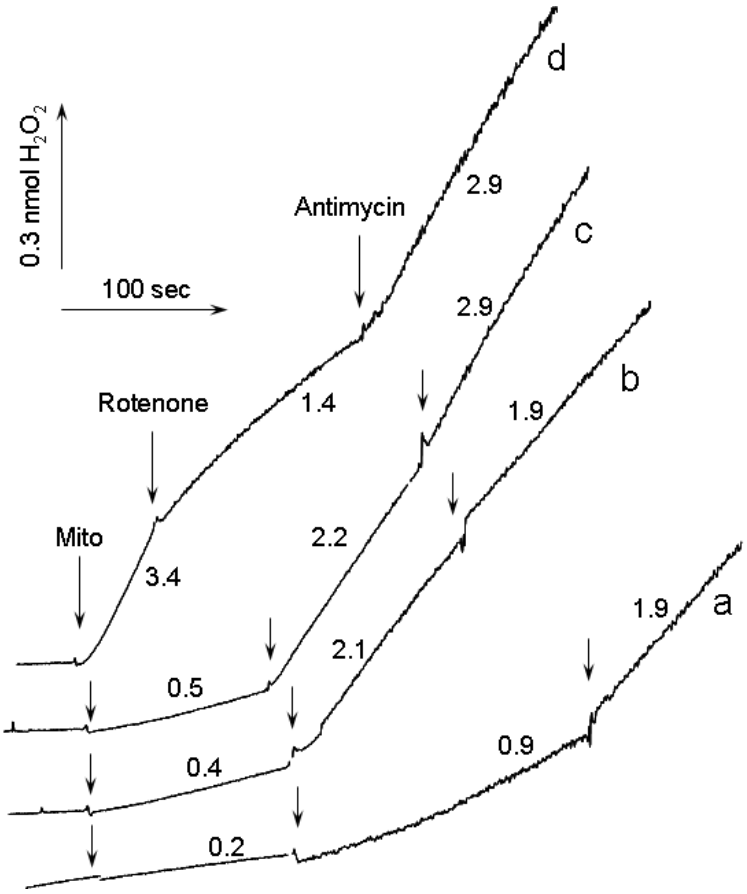

Рис. 10. Эффект ингибиторов ЭТЦ на продукцию активных форм кислорода митохондриями летательных мышц *B. terrestris*, окисляющих различные субстраты. Числовое значение над кривой выражено в нмоль H_2O_2 /мин/мг белка.

Среда инкубации: 10 мМ сукцинат (кривая a), 10 мМ пируват (кривая b), 10 мМ пируват + 10 мМ пролин (кривая c), 10 мМ α-глицерофосфат (кривая d). Митохондрии добавлялись в количестве 0,2 мг белка на мл.

Наибольший уровень продукции H_2O_2 наблюдался на α-глицерофосфате – 3,4 нмоль H_2O_2/мин/мг белка. Таким образом, интенсивность продукции активных форм кислорода на данном субстрате

минимум в 6,8 раза выше, чем на НАД$^+$-зависимых субстратах. Наименьший уровень продукции H_2O_2 наблюдался в присутствии сукцината. Примечательно, что ранее не был исследован уровень продукции активных форм кислорода митохондриями насекомых на сукцинате. Добавление ротенона к суспензии митохондрий в присутствии α-глицерофосфата снижало продукцию пероксида водорода в 2,4 раза, добавление антимицина А при этом усиливало продукцию АФК. Стимулирующее действие антимицина А на продукцию пероксида водорода обусловлена блокированием убихинонового цикла между цитохромами b_l и b_h, что приводит к увеличению «продолжительности жизни» убисемихинона, который напрямую реагирует с кислородом с образованием супероксид-анион радикала. Снижение продукции АФК ротеноном при дыхании на α-глицерофосфате связан с блокировкой ингибитором обратного транспорта электронов через комплекс I ЭТЦ, который вносит существенный вклад в продукцию свободных радикалов Добавление ротенона к митохондриям в присутствии пирувата и пируват+пролин усиливало продукцию пероксида водорода. Ранее было показано, что ротенон может усиливать продукцию активных форм кислорода на комплексе I ЭТЦ [232]. Однако, сайт продукции перекиси водорода на комплексе I ЭТЦ до сих пор останется не ясным. Предположительно, он может находиться между флавином и ротенон-связывющим сайтом [227]. Примечательно, что добавления ротенона к митохондриям в присутствии сукцината усиливало продукцию активных форм кислорода. Этот эффект связан с тем, что сукцинат практически не проникает через внутреннюю мембрану митохондрий шмелей из-за отсутствия соответствующего переносчика, а усиление продукции происходит вследствие окисления эндогенных субстратов митохондрий через комплекс 1 ЭТЦ, который и блокирует ротенон. Также необходимо отметить, что добавление антимицина к митохондриям, осуществляющим дыхание на пирувате и пируват+пролин, после добавления ротенона имеет противоположный эффект. Это объясняется тем, что сайт блокирования

антимицином находится дальше сайта блокирования ротеноном по цепи переносчиков ЭТЦ. На субстратах пируват+пролин антимицин А усиливал производство АФК, что можно объяснить тем, что пролин может окисляться отдельным ферментом – пролиндегидрогеназой, поток электронов от которой не связан с НАДН-дегидрогеназой в отличие от окисления пирувата, который окисляется только через комплекс I ЭТЦ.

Добавление АДФ к митохондриям при дыхании на α-глицерофосфате значительно снижало уровень продукции H_2O_2 (в 9,9 раза), данный эффект опосредован снижением мембранного потенциала внутренней мембраны митохондрий. Ранее было показано, что продукция свободных радикалов увеличивается с увеличением трансмембранного потенциала внутренней мембраны митохондрий [137]. Для подтверждения гипотезы о том, что мембранный потенциал является ключевым фактором снижения или повышения продукции АФК было произведено измерения мембранного потенциала митохондрий летательных мышц шмелей с аналогичными добавками и одинаковыми интервалами между добавками (рис. 11).

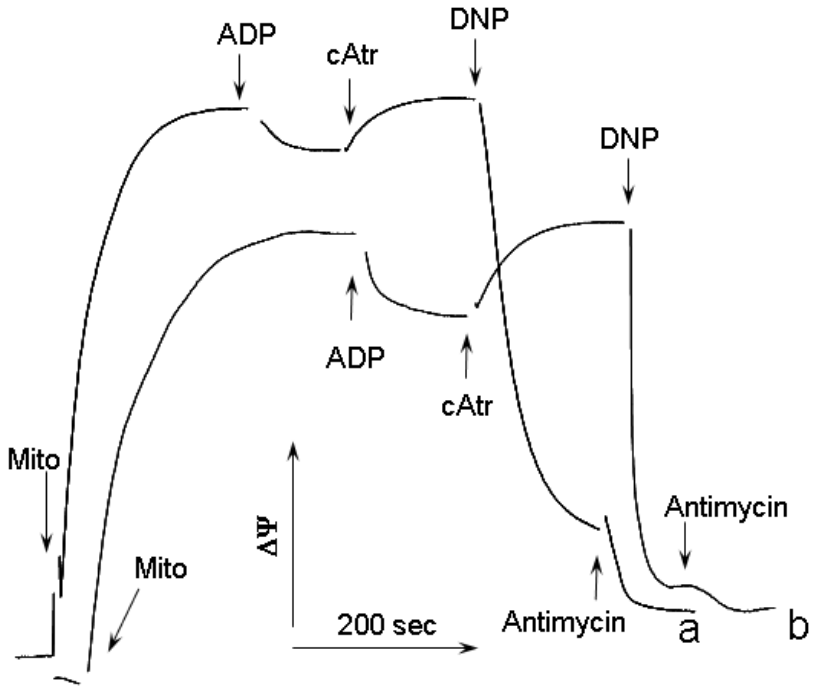

Рис. 11. Изменение мембранного потенциала митохондрий *B. terrestris* в зависимости от метаболического состояния (состояние 3 и 4 по Чансу).

Исходя из представленной диаграммы и ранее полученных данных (см. выше) следует вывод, что продукции АФК митохондриями летательных мышц шмелей напрямую коррелирует с величиной мембранного потенциала.

Особо следует отметить, что добавление АДФ к суспензии митохондрий в присутствии пирувата усиливало продукцию активных форм кислорода, что также является нетипичным эффектом. Скорее всего, это связано со стимулирующем эффектом АДФ на активность пируватдегидрогеназы, а не с изменением мембранного потенциала, при этом продукция АФК усиливалась засчет усиления потока электронов через комплексы ЭТЦ. Карбоксиатрактилозид незначительно повышал продукцию АФК, в то время как добавление 2,4-динитрофенола снижало продукцию H_2O_2.

На данный момент установлено, что в нормальном состоянии в клетках млекопитающих на продукцию АФК идет около 2% от всего потребленного кислорода [67]. Для выявления процента кислорода, идущего на продукцию АФК при дыхании митохондрий летательных мышц шмелей in vitro, параллельно проводили измерение дыхания и продукцию пероксида водорода, при этом добавки вносили в одинаковом количестве через одинаковые промежутки времени. Параллельные измерения проводились на одном и том же препарате митохондрий (n=3). Результаты эксперимента представлены в табл. 2.

Таблица 2.

Продукция H_2O_2 в различных метаболических состояниях.

Состояние	Дыхание, нмоль O_2/мин/мг белка	Продукция H_2O_2, нмоль/мин/мг белка	Проудкция H_2O_2 в % от дыхания
Состояние 4	29.7 ± 2.0	0.24 ± 0.05	0.8 ± 0.2
Состояние 3	151.8 ± 4.1	0.53 ± 0.09	0.3 ± 0.1
+cAtr	45.7 ± 7.1	0.60 ± 0.11	1.3 ± 0.1
+2,4-DNP	76.2 ± 6.8	0.31 ± 0.03	0.4 ± 0.0
+Antimycin	33.1 ± 3.0	2.52 ± 0.17	7.8 ± 1.1
R.C.I.	5.2 ± 0.5	-	-

Наибольшая скорость дыхания митохондрий была в состоянии 3 (+АДФ) – 151,8 нмоль O_2/мин/мг белка, в состоянии 4 скорость дыхания составляла 29,7 нмоль O_2/мин/мг белка. Продукция H_2O_2 возрастала (относительно состояния 4 по Чансу). Однако, процент кислорода, идущий на продукцию АФК в присутствии АДФ, был меньше, чем без АДФ и меньше, чем в других состояниях, он составлял 0,3%. В состоянии 4 по Чансу процент кислорода, идущий на продукцию пероксида водорода, был равен 0,8%. Таким образом, не наблюдается прямой корреляции скорости дыхания митохондрий с интенсивностью продукции пероксида водорода. Карбоксиатрактилозид повысил продукцию активных форм кислорода на 13%, при этом процент кислорода, идущий на АФК, повысился более чем в 4 раза и составил 1,3%. Последующая добавка ДНФ привела к увеличению скорости дыхания (в 1,67 раза) с одновременным снижением уровня продукции АФК (в 1,9 раза). Процент кислорода, идущий на АФК, соответственно, также снизился до 0,4%. Антимицин А резко усиливал как общую продукцию H_2O_2, которая составляла 2,52 нмоль H_2O_2/мин/мг белка, так и процент кислорода трансформирующий в активные формы кислорода – 7,8%.

Таким образом, без добавления ингибиторов на продукцию активных форм кислорода в митохондриях летательных мышц шмелей идет всего 0,3-0,8% кислорода (в зависимости от метаболического состояния). Столь низкие значения процента выработки АФК могут иметь адаптивное значение, поскольку в полёте насекомого достигаются высокие нормы метаболизма, и если процент продукции АФК будет возрастать, то это может привести к серьёзным последствиям окислительного стресса.

2.2.1.4. Транспорт кальция через внутреннюю мембрану митохондрий летательных мышц шмелей

В 1971 году группа Ленинджера пришла к выводу, что митохондрии из всех исследованных видов позвоночных животных из всех органов обладают способностью к энергозависимой аккумуляции добавленного кальция [65]. При этом процесс закачки кальция сопровождается стимуляцией дыхания. Эта же группа опубликовала данные, что митохондрии мясной мухи существенно отличаются в том, что, хотя они могут аккумулировать экзогенный кальций, но очень медленно. Сам процесс не сопровождается стимуляцией дыхания и требует проникающего иона (фосфата или ацетата) [119]. В то же время в работе упоминается, что эта особенность специфична для мясной мухи, так как митохондрии цикад на предмет закачки кальция напоминают митохондрии из других животных. Данных по способности закачивать кальций по митохондриям из других насекомых, и тем более по митохондриям летательных мышц, носят ограниченный характер. К примеру, у *D. melanogaster* митохондрии летательных мышц имеют очень низкую активность кальциевого унипортера. В то же время митохондрии из эмбриональных клеток дрозофил закачивают кальций без каких-либо значительных отличий от митохондрий других организмов [179].

Для определения возможности закачки кальция митохондриями летательных мышц шмелей с помощью зонда Ca-green был исследован этот процесс в митохондриях печени домовой мыши (*Mus musculus*), как модельного объекта закачки кальция внутрь митохондрий, и тораксов земляного шмеля (*B. terrestris*) для сравнительного анализа в одних и тех же условиях. На рис. 12 и рис. 13. изображены кривые закачки кальция митохондриями мыши и шмеля соответственно.

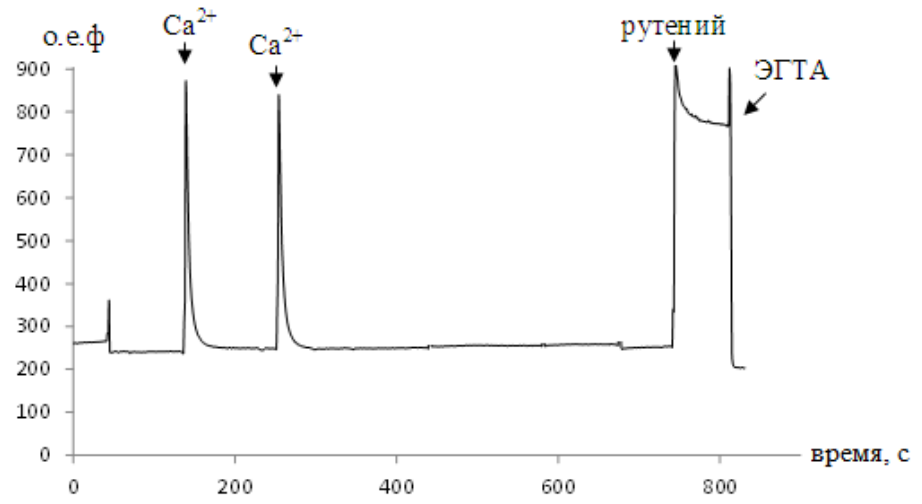

Рис. 12. Диаграмма закачки кальция митохондриями печени домовой мыши (*Mus musculus*). Добавка Ca^{2+} – 50 нмоль, рутения – 2 мкМ, ЭГТА 1 мМ.

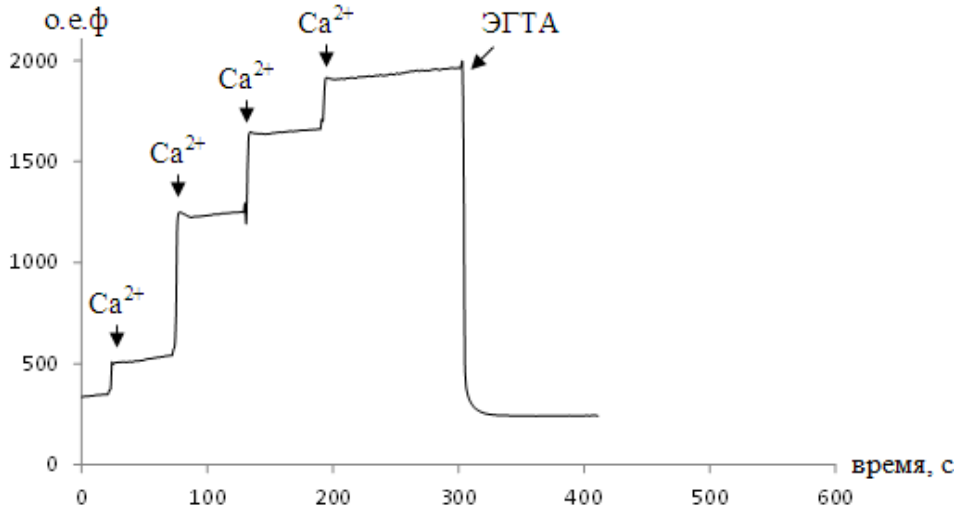

Рис. 13. Диаграмма закачки кальция митохондриями летательных мышц *B. terrestris*. Добавка Ca^{2+} – 50 нмоль, ЭГТА 1 мМ.

Как видно из представленных диаграмм, митохондрии летательных мышц шмелей не способны закачивать кальций внутрь в отличие от митохондрий печени домовой мыши. Концентрация кальция также не влияет на данные процессы.

Для более убедительного доказательства неспособности закачивать кальций митохондриями летательных мышц было оценено влияние ионов

кальция на мембранный потенциал внутренней мембраны митохондрий летательных мышц шмелей и печени мыши. Влияния Ca^{2+} на мембранный потенциал мыши и шмеля изображены на рис. 14 и рис. 15 соответственно.

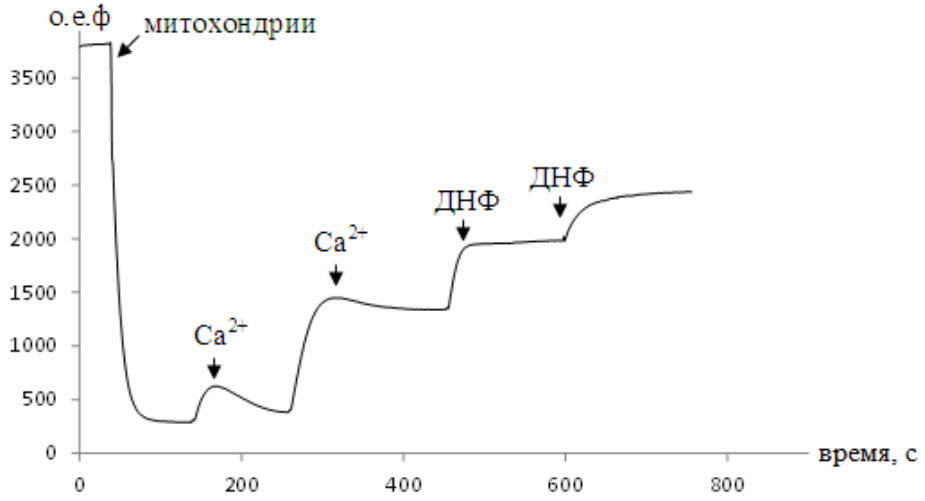

Рис. 14. Влияние ионов кальция на мембранный потенциал митохондрий печени домовой мыши (*Mus musculus*). Добавка Ca^{2+} – 50 нмоль.

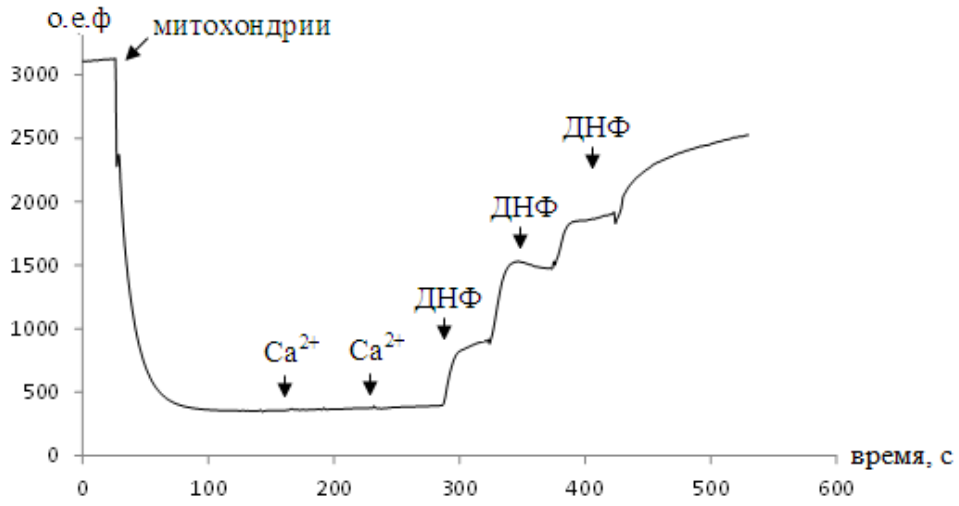

Рис. 15. Влияние ионов кальция на мембранный потенциал митохондрий летательных мышц *B. terrestris*. Добавка Ca^{2+} – 50 нмоль.

Мембранный потенциал митохондрий летательных мышц шмеля не чувствителен к действию кальция в отличие от митохондрий печени домовой

мыши. В то же время мембранный потенциал митохондрий *Bombus terrestris* высокочувствителен к действию разобщителя митохондриального дыхания – 2,4-динитрофенола.

Из всего вышеперечисленного следует вывод, что митохондрии летательных мышц шмеля не способны закачивать кальций. Причинами этого явления может являться как отсутствие специфического переносчика ионов Ca^{2+} на внутренней мембране митохондрий, так и действие дополнительных регуляторов на белок-переносчик.

В настоящее время выделяют так называемый унипортер кальция (MCU – “mitochondrial calcium uniporter”). Было показано, что работа этого унипортера не связана напрямую с гидролизом молекул АТФ или транспортом других ионов. Особенно хорошо MCU работает с высокоэнергезированными мембранами митохондрий [123]. Кроме того, выделяют ещё один белок, так называемый MICU1 – «mitochondrial calcium uptake». Его характеризуют как регулятор белка MCU, механизм регуляции до сих пор неизвестен [212]. В 2013 году появилось сообщение об ещё одном факторе регуляции белка MCU, так называемом EMRE – «essential MCU regulator». Этот фактор является необходимым для полноценного функционирования кальциевого унипортера и, как предполагается, он служит для взаимодействия белка MCU с MICU1 и MICU2 [86].

Нами были идентифицированы гомологичные последовательностям генов домовой мыши кодирующие белки MCU, MICU1 и EMRE в ДНК земляного шмеля. К этим последовательностям были подобраны следующие праймеры:

MCU: прямой – 5’- TTGGTGGGAATACTCCTGG, обратный - 5’- CCTGTCTCGTTAAGACGAAG;

MICU1: прямой – 5’- TAAATAATATCAATGACGTGGAT, обратный - 5’- GCCACTGTTTTTGCTACATG;

EMRE: прямой – 5’- TCAAGAACAACAACACCTTCAG, обратный - 5’- GCTCCTATGACTAGACCTGTCA;

В качестве референсного гена использовался ген actin B (прямой – 5’-TGCCGTATTCCCCTCGATCG, обратный - 5’-CCAGTTGGTGATGATGCCGTGC).

Для полноценного анализа и сравнения с модельным объектом, митохондрии которого способны закачивать кальций, нами были подобраны праймеры к генам белков MCU, MICU1 и EMRE для ДНК домовой мыши:

MCU: прямой – 5’- CTGGTGGGAGTACTCGTGG, обратный - 5’-CCTGGCGCGTCATTACAAAA;

MICU1: прямой – 5’- TGAAGAACATTAATGACGTGGAC, обратный - 5’- GCCACTGTCCTGGCCACTT;

EMRE: прямой – 5’- ACCGTCGAGGTCAGTCATC, обратный - 5’-AGTGTCCCGACATAGAGAAAGG;

В качестве референсного гена использовался ген actin B (прямой – 5’-GGCTGTATTCCCCTCCATCG, обратный - 5-CCAGTTGGTGATGATGCCGTGC

На рис. 16. изображена фореграмма ПЦР-продукта ключевого гена, ответственного за перекачку кальция – MCU из домовой мыши и земляного шмеля.

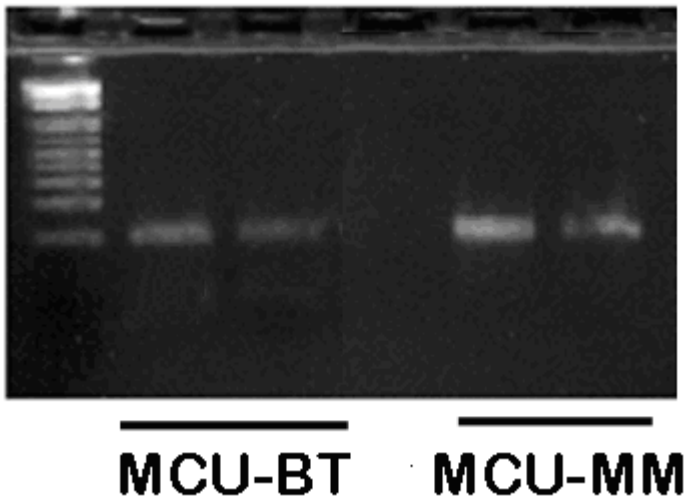

Рис. 16. Фореграмма продуктов ПЦР-реакции гена MCU из домовой мыши (MCU-MM) и земляного шмеля (MCU-BT).

Уровень экспрессии генов из Bombus terrestris был сравнен с соответствующим уровнем экспрессии этих генов в *Mus musculus*. Результаты экспрессии генов изображены в табл. 3.

Таблица 3.

Уровень экспрессии генов кальцевого гомеостаза митохондрий в летательных мышцах *B. terrestris*. Значения показывают во сколько раз экспрессия генов в летательных мышцах шмеля выше, чем в мозге домовой мыши при нормализации на ген actin B.

Ген	Относительная экспрессия
MCU	2,12
MICU1	0,011
EMRE	0,23

Уровень экспрессии ключевого гена MCU в *B. Terrestris* в 2,12 раза выше, чем экспрессия соответствующего гена в *M. musculus*. Экспрессия генов белков-регуляторов кальциевого унипортера MICU1 и EMRE была в 90,9 и 4,3 раза ниже соответственно. Т.е. в геноме земляного шмеля имеются гены MCU, MICU1 и EMRE, которые активно экспрессируются, в особенности ген кальциевого унипортера – MCU. В то же время наблюдается чрезвычайно низкая экспрессия гена белка-регулятора кальциевого унипортета MICU1.

Также, с помощью вестерн-блота с антителами на MCU нами был идентифицирован этот белок в летательных мышцах *B. terrestris* (рис. 17.). В качестве маркера митохондрий использовалась цитратсинтетаза (рис. 18.). Величины R_f белков совпали из различных организмов.

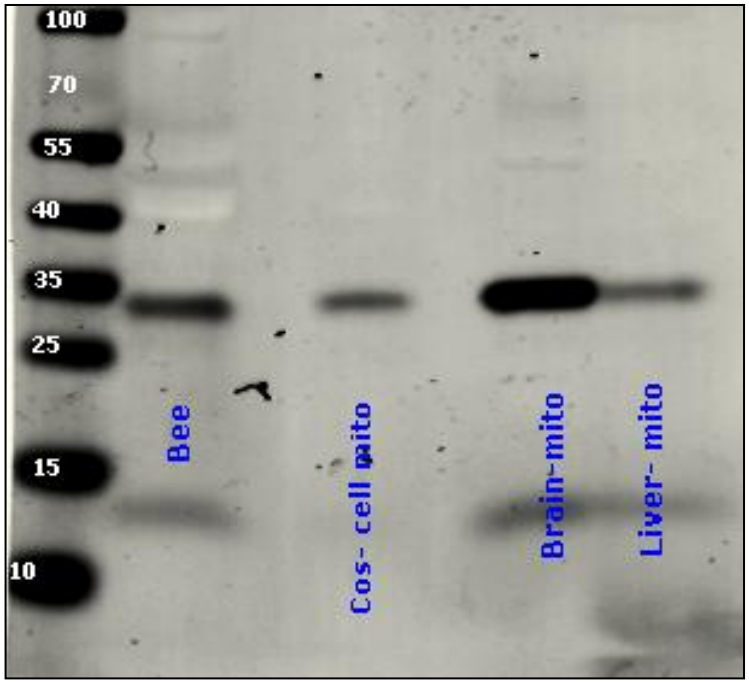

Рис. 17. Иммунодетекция белка MCU.

«Bee», экстракт летательных мышц *B. terrestris*;

«Cos-cell mito», культура клеток остеосаркомы человека;

«Brain-mito», митохондрии мозга мыши;

«Liver-mito», митохондрии печени мыши.

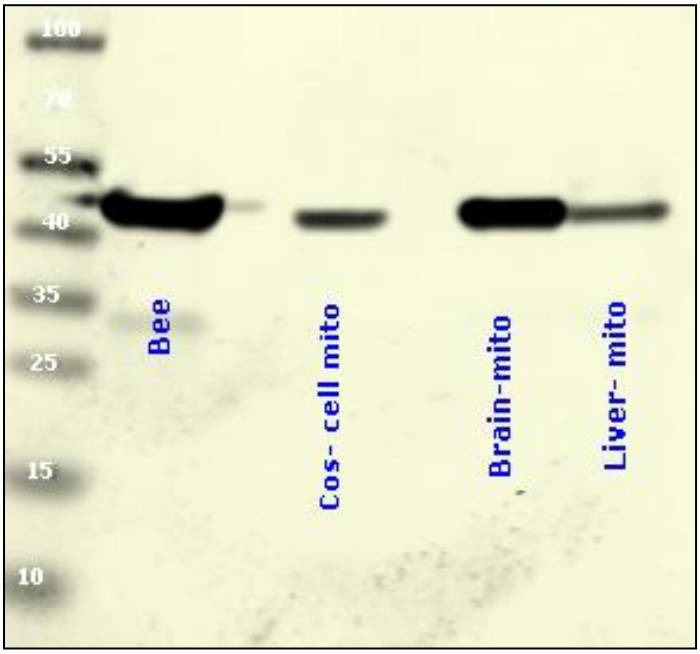

Рис. 18. Иммунодетекция фермента цитратсинтетазы.

«Bee», экстракт летательных мышц *B. terrestris*;

«Cos-cell mito», культура клеток остеосаркомы человека;

«Brain-mito», митохондрии мозга мыши;

«Liver-mito», митохондрии печени мыши.

Таким образом, на фоне того, что в *B. terrestris* имеются как гены, так и соответствующие белки переносчиков, их митохондрии не способны закачивать кальций. Среди возможных причин имеются 2 основные: во-первых, могут существовать дополнительные регуляторы кальциевого гомеостаза в митохондриях, которые ещё не идентифицированы, либо экспрессия регуляторов MICU1 и EMRE является чрезвычайно низкой, что косвенно подтверждают наши данные, во-вторых, возможно, белки MCU, MICU1 и EMRE не обязательно участвуют в транспорте кальция внутрь митохондрий.

Отсутствие возможности закачивать кальций внутрь митохондрий летательных мышц шмеля может иметь адаптивное значение. В митохондриях мускулатуры животных кальций (его закачка – выброс митохондриями и эндоплазматическим ретикулумом) нужен для контроля процесса сокращения-расслабления актин-миозиновых волокон вследствие взаимодействия Ca^{2+} с тропонином. Однако, логично предположить, что у насекомых мышцы сокращаются настолько быстро (200-240 герц), что маловероятно участие митохондрий и/или эндоплазматического ретикулума в процессе контроля кальциевых потоков. Кроме того, имеются данные, что регуляция мышечного сокращения не зависит от кальция в мышцах насекомых [58] и структура тропонина также может отличаться [51].

Отсутствие переносчика кальция в митохондриях шмелей может иметь существенное прикладное значение, т.к. другие отряды насекомых (двукрылые, чешуекрылые), являющиеся вредителями, способны закачивать кальций в митохондрии. И потенциально возможна разработка пестицида, блокирующая кальциевые каналы, он будет безвреден для шмелей при опылении в теплицах и в открытом грунте. Также это может иметь существенное биомедицинское значение, т.к. нарушения кальциевого

гомеостаза на уровне митохондрий является основой патологических изменений и смерти клеток во множестве болезней, в особенности нейродегенеративных [116, 251].

2.2.2. Влияние фунгицидов на биоэнергетические процессы в митохондриях летательных мышц шмелей

В настоящее время в теплицах остро стоит проблема оптимизации работы с пестицидами, снижения риска их влияния на опылительную активность шмелей и пчел [115]. Одним из возможных факторов снижения фуражировочной активности шмелей является общее снижение биоэнергетических показателей вследствие взаимодействия действующих компонентов пестицидов с электрон-транспортной цепью митохондрий.

Некоторые пестициды работают по принципу ингибирования электрон-транспортной цепи митохондрий. В результате блокирования переноса электронов митохондриями уменьшается поглощение ими кислорода и резко снижается образование АТФ. Ротенон, пиридобен, толфенпирад ингибируют НАДН-дегидрогеназу митохондрий (комплекс I ЭТЦ). Гидрометилнон — ингибитор цитохрома bc 1 (комплекс III ЭТЦ). Цианиды и фосфины ингибиторы цитохромоксидазы (комплекс IV ЭТЦ) [206]. Рядом исследователей проводилось тестирование действия пестицидов на изолированных митохондриях крыс [221].

Гербициды не применяются в теплицах, т.к. там не существует проблем с сорными растениями. Исследование влияния инсектицидов на биоэнергетические процессы в митохондриях летательных мышц шмеля не представляется целесообразным, поскольку они изначально оказывает сильное токсическое действие на насекомых. В теплицах часто применяют фунгициды из-за большого количества разнообразных грибковых заболеваний. В то же время исследование влияние фунгицидов на токсичность для шмелей носит ограниченный характер и тем более

практически отсутствуют данные по их влиянию на функционирование митохондрий. Между тем, ингибирование дыхания митохондрий фунгицидами или их разобщающее действие на внутреннюю мембрану органелл может привести к снижению летательной активности шмелей. Исходя из этого, задачей являлось исследование влияния фунгицидов на дыхание митохондрий, а также сопряжение их внутренней мембраны.

Действующие вещества фунгицидов добавляли в ячейку оксиграфа с митохондриями и регстрировали скорость потребления кислорода. При этом измерения проводились на двух субстратах: α-глицерофосфат (табл. 4) и пирвут+глутамат (табл. 5).

Таблица 4.

Влияние фунгицидов на скорость дыхания митохондрий летательных мышц *B. terrestris* в присутствии α-глицерофосфата.

Название фунгицида	Ингибирование 50%	Ингибирование 100%
гимексазол	-	-
диниконазол	Стимуляция дыхания митохондрий на 23%*	
дитианон	13±1,4 мкМ	35±2,4 мкМ
дифеноконазол	40±3 мкМ	свыше 100 мкМ
ипродион	-	-
карбендазим	-	-
пенконазол	-	-
процимидон	-	-
тиабендазол	-	-
тирам	-	-
триадимефон	-	-
флуатриафол	-	-
флудиоксонил	Стимуляция дыхания митохондрий на 22%*	
хлороталонил	-	-
ципроконазол	-	-

эпоксиконазол	-	-

* - концентрация фунгицидов 100 мкМ.

Таблица 5.

Влияние фунгицидов на скорость дыхания митохондрий летательных мышц *B. terrestris* в присутствии субстрата пируват + глутамат.

Название фунгицида	Концентрация 50%	Концентрация 100%
гимексазол	-	-
диниконазол	Стимуляция дыхания митохондрий на 24%*	
дитианон	2±0,2 мкМ	10±1,5 мкМ
дифеноконазол	12±2,1 мкМ	50±4 мкМ
ипродион	-	-
карбендазим	-	-
пенконазол	-	-
процимидон	-	-
тиабендазол	-	-
тирам	-	-
триадимефон	-	-
флуатриафол	-	-
флудиоксонил	Стимуляция дыхания митохондрий на 95%*	
хлороталонил	-	-
ципроконазол	-	-
эпоксиконазол	-	-

- концентрация фунгицидов 100 мкМ.

Два фунгицида оказались ингибиторами дыхания митохондрий, как в случае с добавкой пируват+глутамат, так и с α-глицерофосфатом. Дитианон ингибировал 50% дыхания на субстрате пируват+глутамат в концентрации 2 мкМ, а на α-глицерофосфате 13 мкМ. При этом полное ингибирование наблюдалось при 10 мкМ и 35 мкМ соответственно. Дифеноконазол

оказывал менее выраженное ингибирующее действие. Концентрации, при которых происходило 50% ингибирование для пируват+глутамат и α-глицерофосфат, составили 12 мкМ и 40 мкМ соответственно.

Два фунгицида диниконазол и флудиоксонил простимулировали митохондриальное дыхание. Возможным механизмов такого явления могло явиться их разобщающее действие на внутреннюю мембрану митохондрий. Для выявления возможного разобщающего действия фунгицидов было оценено влияние добавок фунгицидов на мембранный потенциал митохондрий летательных мышц шмеля.

Из всех фунгицидов разобщающим эффектом обладали только 2 из них - диниконазол и флудиоксонил. Это подтверждает, что данные пестициды простимулировали митохондриальное дыхание вследствие своего разобщающего действия. Диниконазол уменьшил 50% мембранного потенциала митохондрий при концентрации 72 мкМ, в то время как флудиоксонил проявил аналогичное действие в концентрации 40 мкМ. Флудиоксонил обладает большим разобщающим действием, чем диниконазол. На рис. 1. изображена кривая флуоресценции, отражающая разобщающее действие этого фунгицида на митохондрии летательных мышц шмеля. Влияние диниконазол на мембранный потенциал митохондрий изображен на рис. 19.

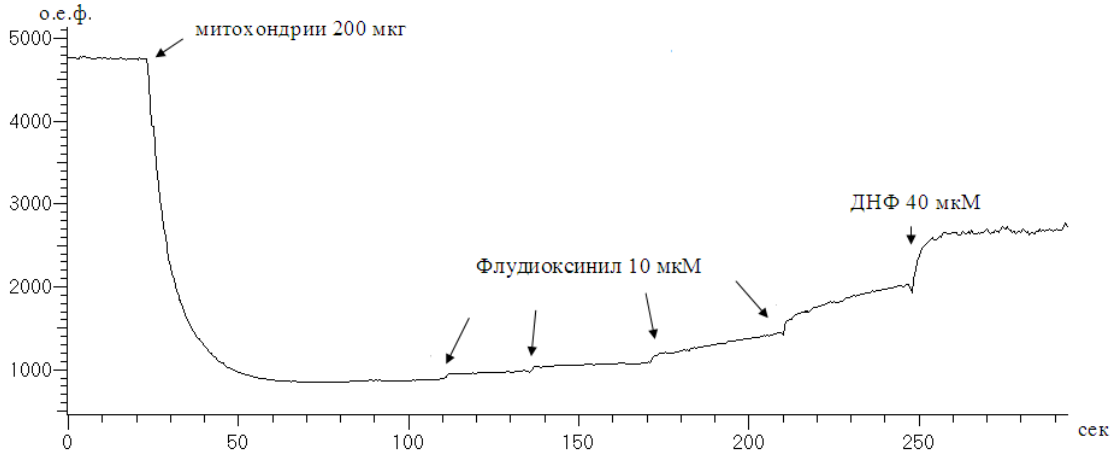

Рис. 19. Влияние флудиоксонила на мембранный потенциал митохондрий *B. terrestris*. Субстрат для дыхания митохондрий – α-глицерофосфат. Митохондрии – 200 мкг.

Пестициды, которые блокируют дыхание митохондрий, могут потенциально приводить к сверхпродукции активных форм кислорода при работе ЭТЦ. Для идентификации этого фактора была оценена продукция АФК митохондриями летательных мышц шмеля, осуществляющих дыхание через комплекс I ЭТЦ и через митохондриальную α-глицерофосфатдегидрогеназу, при воздействии пестицидов и ингибиторов комплекса I и III ЭТЦ. На рис. 20. изображена диаграмма влияния добавок на продукцию пероксида водорода митохондриями, дышащими на субстрате α-глицерофосфат.

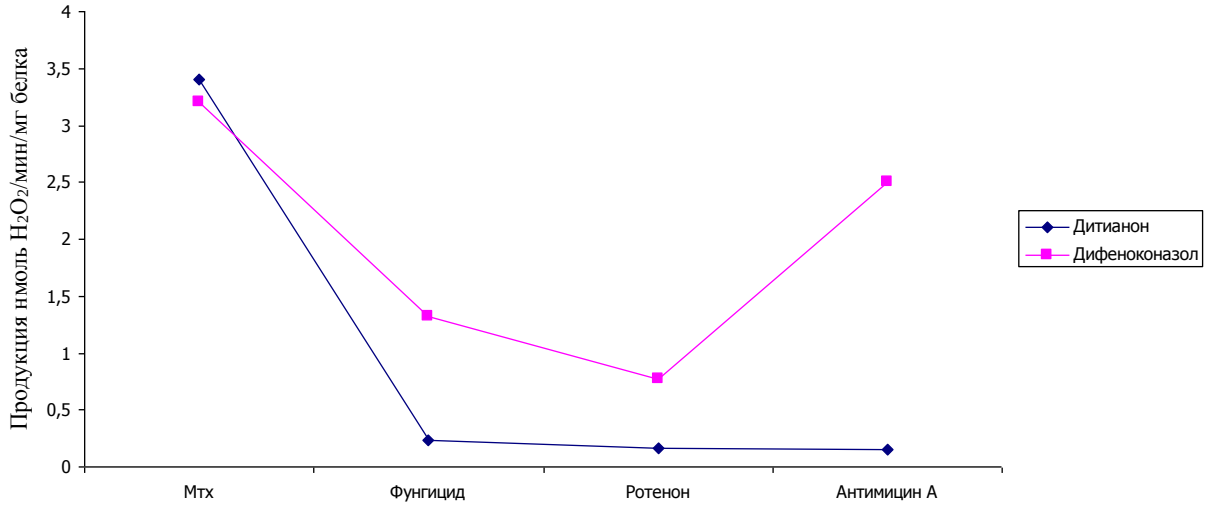

Рис. 20. Влияние фунгицидов и ингибиторов ЭТЦ на скорость продукции АФК митохондриями *B. terrestris* при дыхании на субстрате – α-глицерофосфат. На оси X отображено последовательное добавление веществ к митохондриям, порядок добавок строго слева направо поочередно на одном препарате.

Дитианон оказывал более выраженный ингибирующий эффект на продукцию АФК митохондриями, дышащими на α-глицерофосфате, однако антимицин А после добавки фунгицида не простимулировал продукцию пероксида водорода. Это говорит о том, что сайт ингибирования фунгицида находится до Q-цикла в комплексе III ЭТЦ. Таким образом, снижение продукции АФК фунгицидом, скорее всего, не обусловлено блокированием

комплекса I ЭТЦ и соответственно обратного транспорта электронов. Ингибирующее действие на выработку АФК дифеноконазолом, напротив, скорее всего, обусловлено блокированием комплекса I ЭТЦ, т.к. последующая добавка антимицина А (после фунгицида и ротенона) резко усилила продукцию H_2O_2 (в 3,3 раза). Добавление фунгицидов и ингибиторов при дыхании через комплекс I ЭТЦ носит противоположный характер рис. 21.

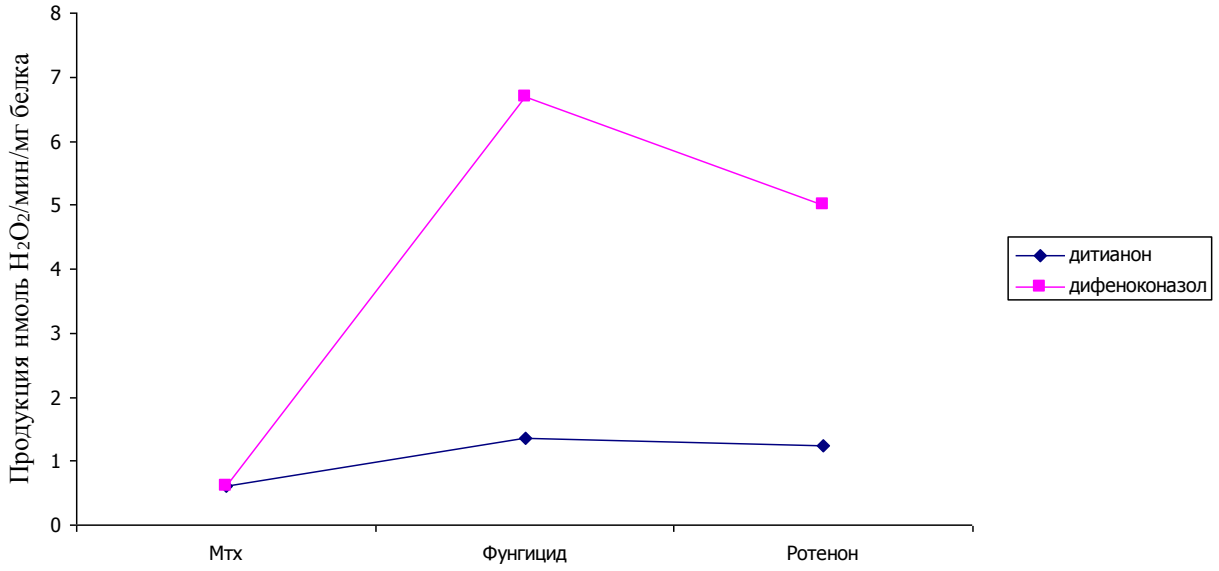

Рис. 21. Влияние фунгицидов и ингибиторов ЭТЦ на скорость продукции АФК митохондриями *B. terrestris* при дыхании на субстрате – пируват. На оси X отображено последовательное добавление веществ к митохондриям, порядок добавок строго слева направо поочередно на одном препарате.

Дифеноконазол резко усиливает продукцию АФК (в 11,2 раза) при дыхании через первый комплекс. Это говорит о том, что сайт ингибирования фунгицида в комплексе I ЭТЦ близок к сайту ингибирования ротеноном, т.к. ротенон оказывает похожий эффект на продукцию H_2O_2. Дифеноконазол не оказал существенного стимулирующего влияния на продукцию АФК, при этом ротенон после добавки фунгицида не вызвал усиления выработки H_2O_2. Учитывая предыдущие данные по продукции перекиси на α-глицерофосфате

(см. выше) можно предположить, что дифеноконазол разрушает убихиноновый пул, а дитианон ингибирует как комплекс I ЭТЦ, так и комплекс III (либо комплекс IV) ЭТЦ.

Таким образом, фунгициды дитианон и дифеноконазол являются ингибиторами митохондриального дыхания, в то время как фунгициды диниконазол и флудиоксонил являются разобщителями митохондриального дыхания. Блокирование дыхания митохондрий летательных мышц шмелей действующими веществами фунгицидов может иметь значительные негативные последствия. Поскольку при этом снижается мембранный потенциал митохондрий и, соответственно, уменьшается продукция АТФ. Мышечные клетки имеют повышенные потребности в молекулах АТФ. Даже малые концентрации веществ, блокирующих ЭТЦ митохондрий, могут негативно повлиять на биоэнергетические показатели летательных мышц, и привести к снижению интенсивности опылительной деятельности насекомых.

2.2.3. Идентификация генов основных антиоксидантных ферментов в ДНК шмеля, выявление уровня их экспрессии в покое и после продолжительного полёта

2.2.3.1. Разработка праймеров для генов шмелей

С помощью программы «Vector NTI» были разработаны праймеры к следующим генам *Bombus terrestris* L.:

<u>Каталаза:</u>

прямой TATGTCCTTCTATAATCAAAATGGTGCGCC,

обратный GGTTGCCTGTTCGAAATTATCTTCTTTGTC;

<u>UCP 3:</u>

прямой TCGCTGATTTAGCGACGTTTCCTTT,

обратный TGGCGAAACACATCTGTCTCTGGAG;

<u>пероксиредоксин 5:</u>

прямой CGCAATTTCCGTCAATGAACGAC,

обратный GTGAAAGCTCCTGGCACTCCAAAA;

пероксиредоксин 6:

прямой CTTGCATGAATGGCTTGATGATTGG,

обратный ATCGGTCATTTCAGCATAGGCCTTT;

тиоредоксин-зависимая пероксид-редуктаза:

прямой AGTTGTCACAAGAAACCGCAAACCA,

обратный TCCTGATCCACCGCCAATAACAA;

глутатион пероксидаза:

прямой GCATTCCCATCAAATCAATTTGGTG,

обратный CTGCCTGTTTCTTCAACCATTTCCA;

Cu/Zn-супероксиддисмутаза:

прямой CCGGTTTAAAACAAGGATTGCATGG,

обратный TGGTCCTTGGAGTTGGATGACTTTG;

Mn- супероксиддисмутаза (вырожденный):

прямой AGGYTCTGGWTGGGGTTG,

обратный TATGCATGYTCCCAAACATC;

Актин B:

прямой TGCCGTATTCCCCTCGATCG,

обратный CCAGTTGGTGATGATGCCGTGC.

2.2.3.2. Выделение тотальной РНК из грудок шмелей и обратная транскрипция

Экстракцию тотальной РНК из тораксов *Bombus terrestris* осуществляли «тризольным» методом. Качества препарата полученной РНК проверяли с помощью элкетрофореза (рис. 22).

Рис. 22. Электрофореграмма тотальной РНК из тораксов *B. terrestris*.

На данной электрофореграмме видно, что количество 28S рРНК выше, чем 18S рРНК, это говорит о том, что не произошла деградация РНК под действием РНКаз. Также отсутствует примесь ДНК. Таким образом, данный образец РНК подходит для дальнейших операций (обратная транскрипция и затем PCR-реакция).

Для синтеза кДНК использовалась обратная транскриптаза вируса Molony лейкоза мышей M-MuLv. Фермент проявляет 5’→3’ полимеразную активность, эффективную только в отношении матриц РНК. В качестве затравочного праймера использовался олиго-$(dT)_{20}$ праймер. Использование праймеров данного типа позволяет синтезировать молеулы кДНК исключительно из мРНК. В ходе обратной транскрипции образуется широкий набор продуктов ДНК различной длины (рис. 23.). Полученную кДНК использовали для PCR-реакций.

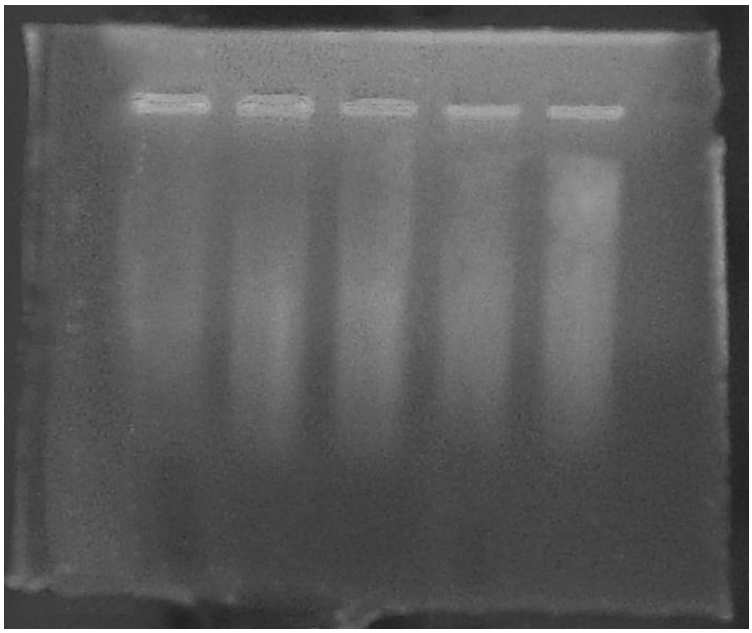

Рис. 23. Электрофореграмма кДНК из тораксов *B. terrestris*.

2.2.3.3. Оптимизация условия отжига праймеров

С целью определения оптимальной температуры отжига праймеров была проведена RT-PCR с градиентом температур 55; 55,7; 57; 59; 61,4; 63,3; 64,5; 65 ° С. На рисунке 24 представлены типичные кривые амплификации фрагментов генов.

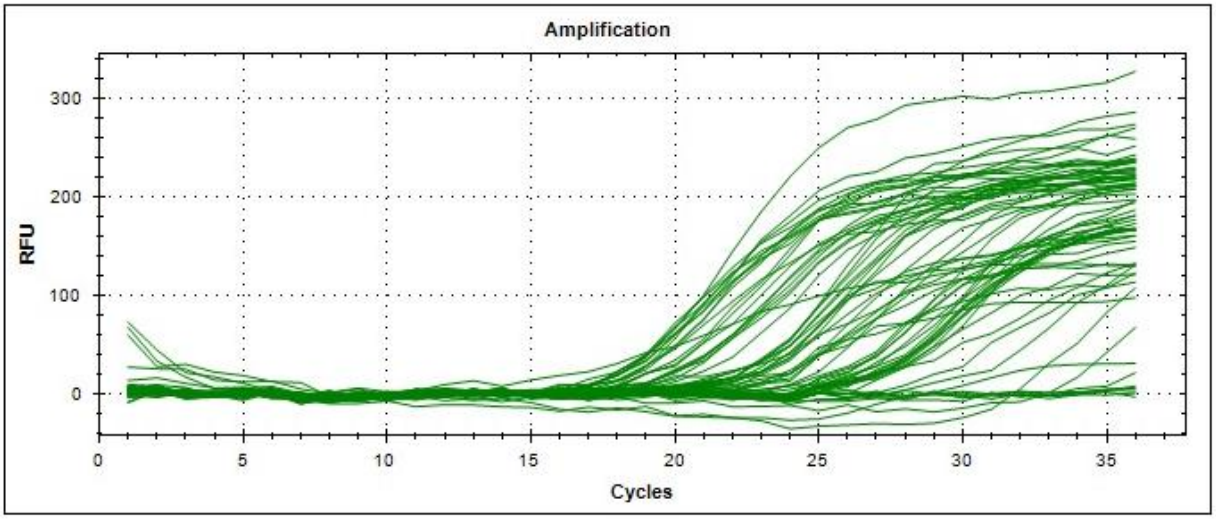

Рис. 24. Кривые амплификации ДНК при разных температурах.

Для оценки чистоты полученных продуктов PCR был проведен анализ температур плавления нуклеиновых кислот рис. 25.

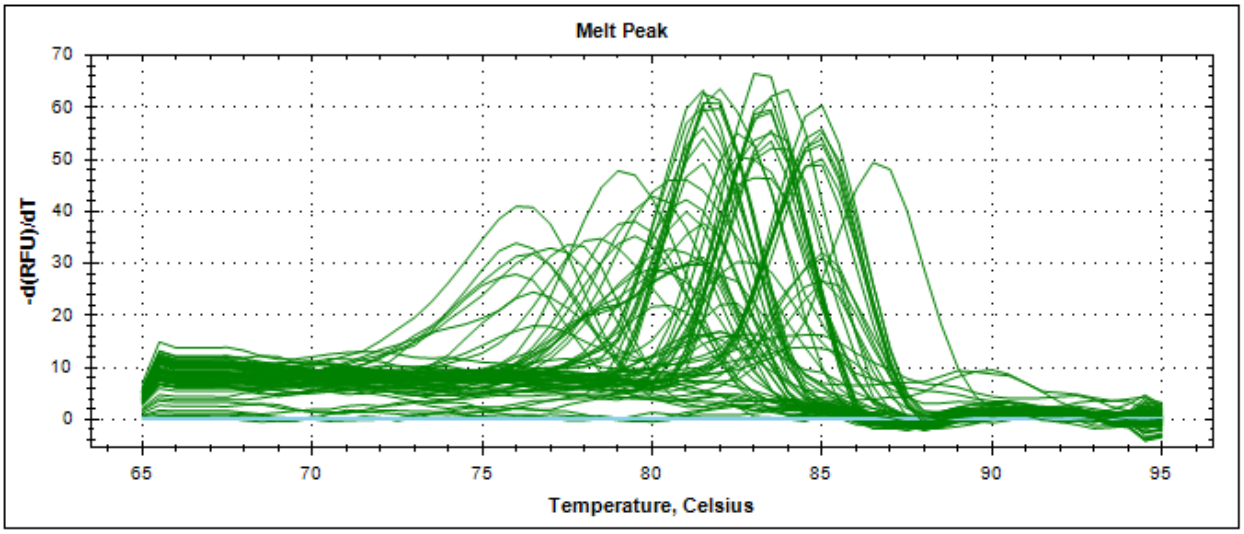

Рис. 25. Кривые плавления полученных продуктов RT-PCR.

Результаты подбора оптимальной температуры отжига праймеров представлены в таблице 6. Полученные значения температур отжига совпали с теоретически ожидаемыми.

Таблица 6.

Оптимальная температура отжига праймеров.

Праймер	Оптимальная температура отжига, ºС
Каталаза	60-61
UCP3	60-61
Пероксиредоксин 5 (митохондриальный)	56-57
Пероксиредоксин 6	61
Глутатионпероксидаза	60-61
Тиоредоксин-зависимая пероксид-редуктаза	61
Cu/Zn-супероксиддисмутаза	61

Mn-супероксиддисмутаза	60
Актин B	61

2.2.3.4. Идентификация генов ключевых антиоксидантных ферментов летательных мышц шмелей с помощью PCR-реакций

Для идентификации генов шмеля *B. terrestris* была проведена PCR-реакция с одновременным наличием нуклеотидных последовательностей известной длины. Электрофореграмма полученных ампликонов представлена на рисунке 26.

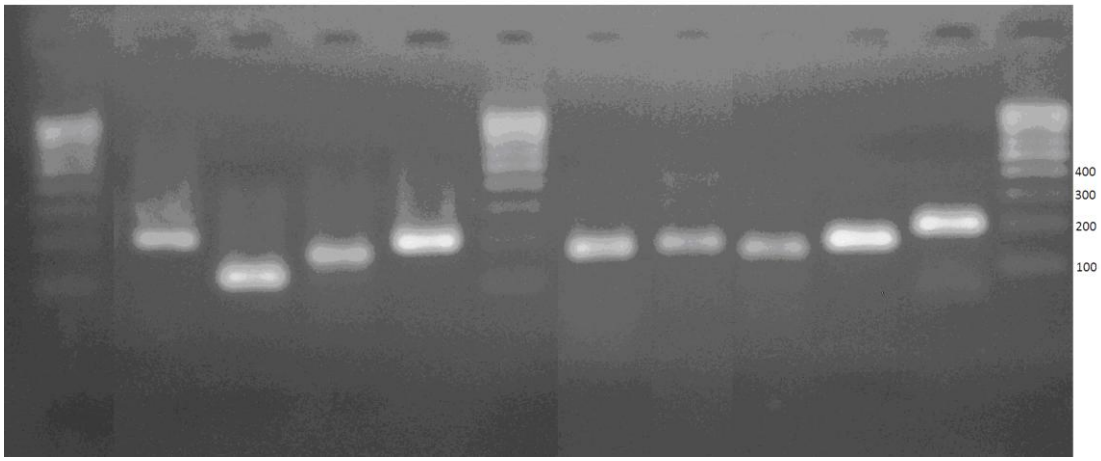

Рис. 26. Электрофореграмма продуктов PCR в присутствии маркеров известной длины. Последовательность проб слева направо: UCP3, Mn-СОД, глутатионпероксидаза, пероксиредоксин 6, пероксиредоксин 5, каталаза, актин B, Cu/Zn-СОД, тиоредоксин-зависимая пероксид-редуктаза.

Длины полученных PCR-фрагментов совпали с теоретически ожидаемыми. Результаты экспериментов позволяют сделать предположение о том, что были амплифицированы гены каталазы, UCP3, Mn-СОД, глутатионпероксидазы, пероксиредоксина 6, пероксиредоксина 5, каталазы, актина B, Cu/Zn-СОД, тиоредоксин-зависимая пероксид-редуктаза. Это в свою очередь говорит о наличии данных генов в геноме шмеля *B. terrestris*.

2.2.3.5. Влияние продолжительного полёта на экспрессию генов ключевых антиоксидантных ферментов шмелей

Для оценки экспрессии генов антиоксидантных ферментов в летательных мышцах шмеля в покое и после продолжительного полёта использовался метод RT-PCR с интеркалирующим красителем Sybr Green. Диаграмма изменения экспрессии генов представлена на рис. 27.

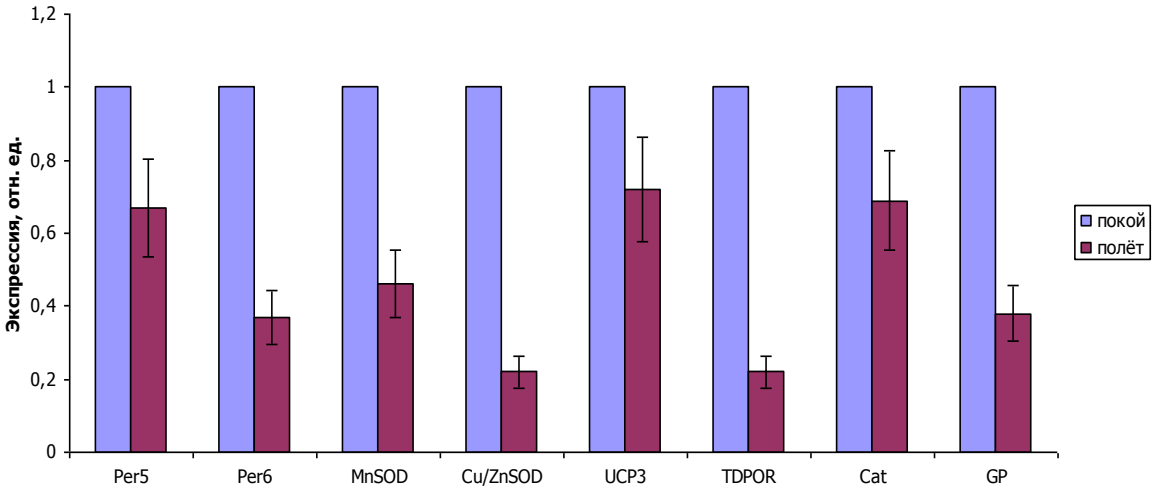

Рис. 27. Относительный нормализованный уровень экспрессии генов антиоксидантных ферментов в летательных мышцах *B. terrestris* в покое и после продолжительного полёта. Экспрессия генов в состоянии покоя принята за 1. Нормализацию осуществляли к гену актина B.

Per5 – Пероксиредоксин 5 (митохондриальный);

Per6 – Пероксиредоксин 6;

MnSOD – Mn-супероксиддисмутаза;

Cu/ZnSOD – Cu/Zn-супероксиддисмутаза;

UCP3 – Белок UCP3;

TDPOR – Тиоредоксин-зависимая пероксид-редуктаза;

Cat – Каталаза;

GP – Глутатионпероксидаза.

Выявлено, что экспрессия всех выбранных генов снижается после продолжительного полёта. Наибольший уровень падения экспрессии

наблюдался для Cu/Zn-СОД и тиоредоксин-зависимой пероксид-редуктаза, относительный уровень экспрессии для них снизился в 4,6 и 4,5 раза. Экспрессия Mn-супероксиддисмутазы также снизилась в 2,2 раза. Наименьший уровень снижения экспрессии показал ген UCP3, его экспрессия снизилась всего на 28%. Экспрессия гена, кодирующего каталазу, снизилась на 31%. Также существенно снизилась экспрессия глутатионпероксидазы (в 2,6 раза). Экспрессии генов белков пероксиредоксина 5 и 6 также показали снижение.

Снижение экспрессии ключевых антиоксидантных генов после продолжительности полёта может быть связана с 2 факторами. Во-первых, в полёте энергетические потребности насекомого резко возрастают, и использовать энергетические эквиваленты для биосинтетических реакций не представляется логичным, во-вторых, в процессе полёта мембранный потенциал сразу же расходуется на синтез молекул АТФ и не происходит его чрезмерного накопление на внутренней мембране митохондрий. Вследствие этого, продукция АФК снижается, т.к. высокий мембранный потенциал резко повышает производство реактивных форм кислорода (см. выше). Также возможно, в полёте насекомые выбрасывают конечные продукты в цепи образования АФК непосредственно через дыхальца и не требуется их обезвреживания антиоксидантными ферментами.

Для выявления зависимости экспрессии антиоксидантных генов от мембранного потенциала был определен уровень их экспрессии после кормления шмелей сиропом с 2,4-динитрофенолом. Для этого экспериментально была подобрана концентрация ДНФ в сиропе, которая не вызывает токсического эффекта и в то же время проявляет разобщающее действие, она составила 20 мг/л сиропа. Самцов шмелей кормили в течение суток сиропом с ДНФ в темном боксе (для исключения возможности полёта насекомого), затем была получена кДНК из грудок этих экспериментальных групп и был проведен RT-PCR (рис. 28).

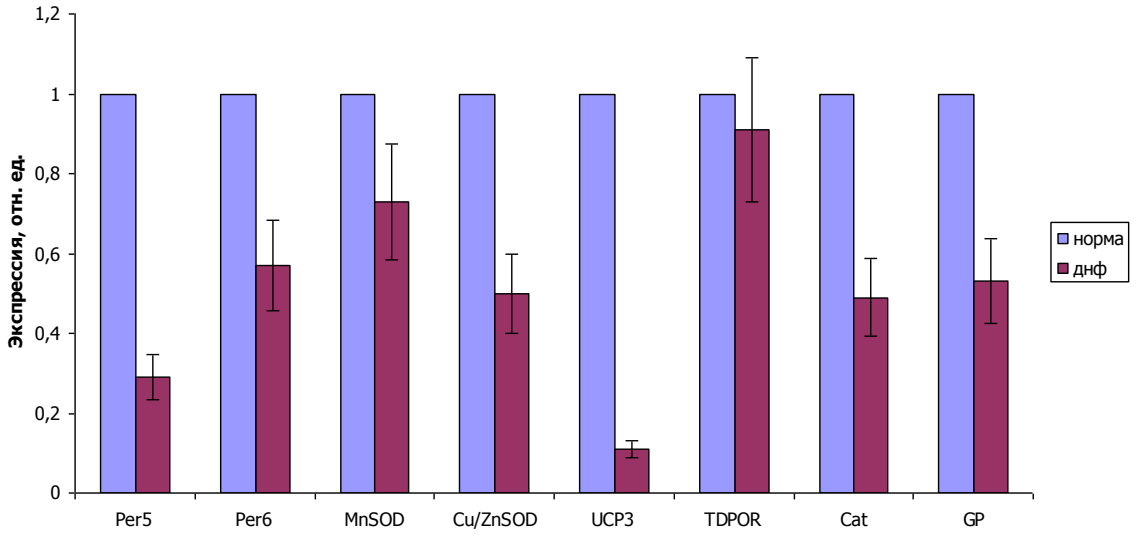

Рис. 28. Относительный нормализованный уровень экспрессии генов антиоксидантных ферментов в летательных мышцах *B. terrestris* в норме и после кормления 2,4-динитрофенолом. Экспрессия генов в состоянии покоя принята за 1. Нормализацию осуществляли к гену актина B.

Per5 – Пероксиредоксин 5 (митохондриальный);

Per6 – Пероксиредоксин 6;

MnSOD – Mn-супероксиддисмутаза;

Cu/ZnSOD – Cu/Zn-супероксиддисмутаза;

UCP3 – Белок UCP3;

TDPOR – Тиоредоксин-зависимая пероксид-редуктаза;

Cat – Каталаза;

GP – Глутатионпероксидаза.

Экспрессия антиоксиднтных генов после кормления ДНФ также падала. Как и ожидалось, наибольший уровень падения экспрессии был для гена UCP3 (в 9,1 раза). Падение экспрессии для генов каталазы, Cu/Zn-супероксиддисмутаза и глутатионпероксидазы было примерно одинаковым (приблизительно в 2 раза). Падение экспрессии Mn-супероксиддисмутаза было менее существенным (на 27%). Гены белков пероксиредоксина 5 и 6 также снизили экспрессию после кормления ДНФ. Единственным исключением оказался ген тиоредоксин-зависимой пероксид-редуктазы, для

него не было обнаружено достоверное изменение в экспрессии после кормления 2,4-динитрофенолом.

Таким образом, величина мембранного потенциала способна влиять на уровень экспрессии генов антиоксидантных ферментов. Скорее всего, этот процесс носит опосредованный характер: снижение мембранного потенциала уменьшает выработку АФК, уровень которых в свою очередь может регулировать экспрессию генов антикосидантных ферментов. Однако, наиболее вероятно падение экспрессии этих генов после полёта обусловлено как снижением мембранного потенциала, так и общим уменьшением интенсивности биосинтетических процессов во время полёта насекомого.

2.2.4. Влияние направленного митохондриального антиоксиданта SKQ на продолжительность жизни шмеля

SkQ (ионы Скулачева) – производное пластохинона, содержащее положительно заряженный фосфоний, способное адресно проникать в митохондрии и проявлять антиоксидантную активность [37]. SkQ искусственно синтезирован химиками под руководством В.И. Скулачева и его группой. В данное время это вещество проходит доклиничекие испытания в качестве эффективного геропротектора на разных классах объектов [36]. В связи с этим большой научный интерес представляет изучение влияния данного антиоксиданта на представителей класса насекомых, для которых характерен высокий уровень дыхания.

Для выявления действия антиоксиданта на продолжительность жизни насекомых, самцов *B. terrestris* разделили на 5 партий: 1 контроль и 4 опыта. В сироп для кормления опытных групп были добавлены различные концентрации SkQ: 1 группа – 5 нМ/л, 2 – 50 нМ/л, 3 — 250 нМ/л, 4 — 1000 нМ/л. Контрольная группа получала сироп без добавления SkQ1. Далее в течение 47 сут. с интервалом не более 3 сут производили подсчет погибших шмелей. Результаты эксперимента представлены на рис. 29.

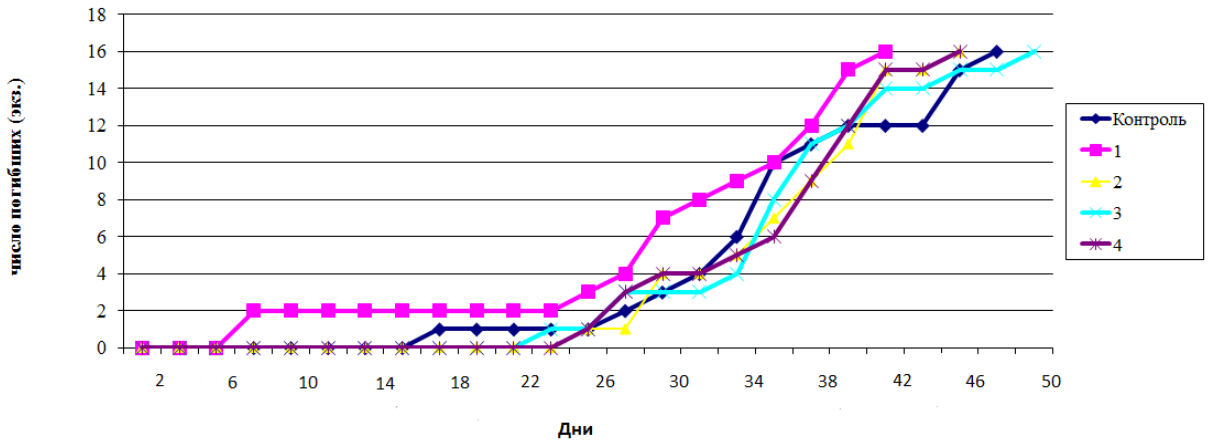

Рис. 29. Смертность самцов шмеля *B. terrestris*: контроль — сироп без SkQ, 1-концентрация SkQ 5 нМ/л, 2-концентрация SkQ 50 нМ/л, 3-концентрация SkQ 250 нМ/л, 4-концентрация SkQ 1000 нМ/л.

Достоверное увеличение продолжительность жизни *B. terrestris* при кормлении сиропом с добавлением антиоксиданта не было выявлено, но наблюдалась тенденция снижения смертности на ранних этапах жизни шмелей. Из данной диаграммы следует, что оптимальная концентрация антиоксиданта SkQ для шмелей составляет 5 нмоль/л, т.к. именно при этой концентрации SkQ наблюдалась наименьшая смертность в ранние периоды жизни самцов *B. terrestris* в опытных садках. Это подтверждает гипотезу Скулачева, что SkQ продлевает «не старость, а молодость». Концентрации SkQ выше оптимальной для данного организма вызывают прооксидантный эффект.

Также была измерена удельная активность аконитатгидратазы шмелей в гомогенате и митохондриях контроля и опытных образцов, как возможный маркер на присутствие активных форм кислорода. Митохондриальная АГ содержит в себе железо-серные кластеры и обычно рассматривается как основная мишень повреждающего действия АФК на митохондрии [76, 184]. Результаты представлены на рис. 30.

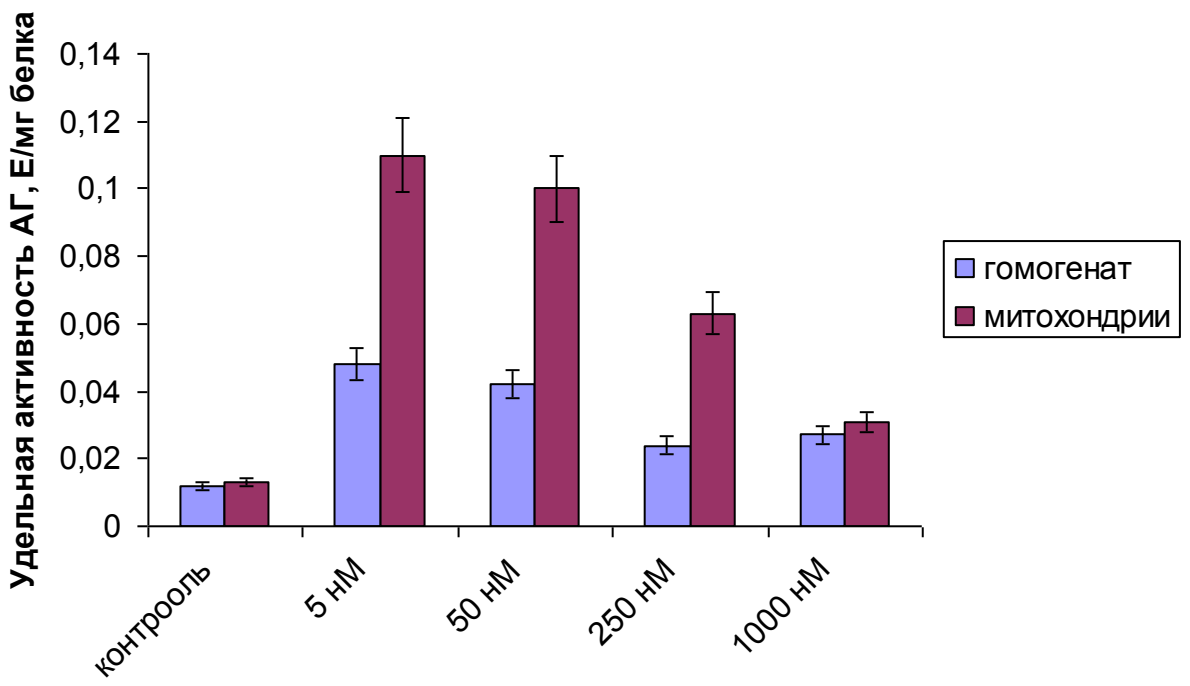

Рис. 30. Активность аконитатгидратазы в гомогенате и митохондриях *B. terrestris*. На оси X отмечены концентрации SkQ в сиропе, который поедали шмели.

Активность АГ увеличилась в опыте с концентрацией SkQ 5 нМ/л в 8,5 раза в митохондриях и в 4 раза в гомогенате по сравнению с контролем. Это говорит о значительном снижении АФК в клетке в присутствии этого антиоксиданта, причем наиболее выраженное увеличение активности наблюдалось именно в митохондриях, т.к. во-первых, митохондриальная аконитатгидратаза более чувствительна к АФК, а во-вторых, SkQ проявляет своё действие исключительно в митохондриях. SkQ в концентрациях 250 и 1000 нМ/л ингибировал активность АГ.

Незначительное снижение смертности SkQ может объясняться не только его слабым действием, но и другими причинами смерти шмелей. Одной из наиболее частых причин смерти шмелей являются инфекционные заболевания. С целью исключения этого фактора в смертности шмелей нами был проведен опыт по выживанию самцов шмелей в экспериментальных группах, включающий антибиотик и комбинацию антибиотика и SkQ. Для

этого экспериментально был подобран антибиотик, им оказался Амикацин-Виал, т.к. он наиболее выраженно проявлял свои протекторыне действия на шмелях, его оптимальная концентрация составила 0,01% в инвертированном сахарном сиропе. Далее регестрировали смертность *B. terrestris* раз в 3 дня (рис. 31).

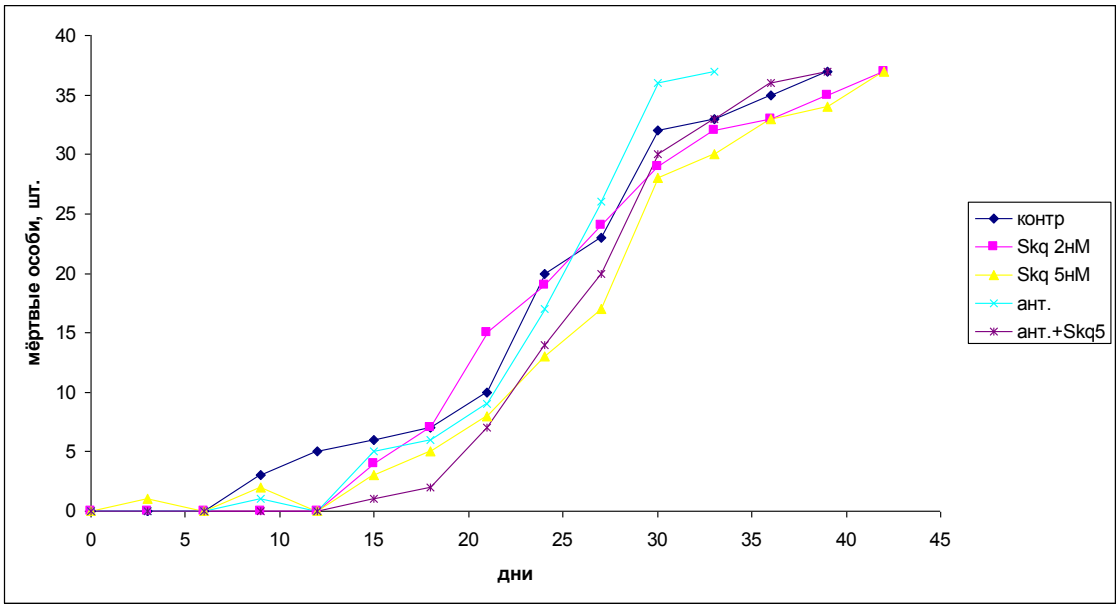

Рис. 31. Смертность самцов шмеля *B. terrestris*. Концентрация антибиотика (амикацин-виал) в сиропе 0,01%. «SkQ5» – антиоксидант SkQ в концентрации 5 нМ.

Как видно из представленной диаграммы, кормление шмелей сиропом с добавлением антибиотика (амикацин-виал 0,01%) и SkQ снижает смертность в первые 3 недели жизни насекомых. Поздние этапы жизни шмелей различия в уровне смертности не выявляются. Таким образом, SkQ снижает смертность в ранние периоды жизни земляного шмеля при условии лечения инфекционных болезней насекомых, что достигается добавлением антибиотика в сироп при кормлении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При исследовании процессов потребления кислорода и выделения углекислого газа у шмелей было показано, что процессы дыхания, происходящие в этих насекомых, интенсивнее (более чем в 7 раз), чем у домовой мыши. Было показано, что интенсивность дыхания в процессе онтогенеза шмеля различна. Во взрослом состоянии шмель дышит в 16,3 раза интенсивнее, чем личинка. В то же время установлено, что полет усиливает дыхание в 1,92 раза. Это говорит о высоком уровне дыхания *Bombus terrestris* в состоянии покоя. Отчасти это можно объяснить процессами терморегуляции шмеля, т.к. было показано, что температура его тела обычно не опускается ниже 30 ºС [109].

Выявлена зависимость процессов дыхания митохондрий от присутствия субстратов дыхания для комплекса 1 ЭТЦ. Максимальное дыхание через комплекс I ЭТЦ наблюдалось в присутствии смеси субстратов пируват+глутамат, значение составило 131,2 нмоль O_2/мин/мг белка. Наименьшие скорости дыхания были характерны для цитрата, глутамата, малата и смеси глутамат+малат (2,1, 12,8, 2,4 и 11,2 нмоль O_2/мин/мг белка соответвенно). Наиболее сильное дыхание происходит при добавлении α-глицерофосфата (202,7 нмоль O_2/мин/мг). В то же время митохондрии летательных мышц шмелей окисляют пролин, однако, с небольшой скоростью (17,6 нмоль O_2/мин/мг). Обычно эта черта характерна для плотоядных насекомых. Возможно, способность окислять пролин связана с потреблением пыльцы, которая содержит его в высоких концентрациях.

При исследовании мембранного потенциала было показано, что митохондрии летательных мышц шмеля практически не способны генерировать потенциал в присутствии сукцината, что, скорее всего, связано с чрезвычайно низкой скоростью работы дикарбоксилатного переносчика во внутренней мембране митохондрий. Был отмечен высокий уровень эндогенного потенциала митохондрий, который блокируется ротеноном.

Можно предполагать, что эволюционные изменения дыхания митохондрий шмелей двигались в сторону оптимизации окислительного метаболизма продуктов гликолиза. Это, в свою очередь, потребовало снижения оттока интермедиатов цикла трикарбоновых кислот из митохондрий, обеспечивающейся низкой активностью трансмембранных переносчиков этих интермедиатов.

При исследовании продукции АФК шмелей и идентификации процента кислорода, идущего на выработку свободных радикалов, было выявлено, что процент кислорода, идущий на продукцию АФК в присутствии АДФ, был меньше, чем без АДФ и меньше, чем в других состояниях (0,3%). В состоянии 4 по Чансу процент кислорода, идущий на продукцию пероксида водорода, был равен 0,8%, прямая корреляция скорости дыхания митохондрий с интенсивностью продукции пероксида водорода отсутствует. Наибольший уровень продукции H_2O_2 наблюдался на α-глицерофосфате – 3,4 нмоль H_2O_2/мин/мг белка. При дыхании на этом субстрате ротенон снижает (за счет блокирования обратного тока электронов), а антимицин А резко повышает как общую продукцию H_2O_2, так и процент кислорода, трансформирующийся в АФК.

Таким образом, без добавления ингибиторов на продукцию активных форм кислорода в митохондриях летательных мышц шмелей идет всего 0,3-0,8% кислорода (в зависимости от метаболического состояния). Столь низкие значения процента выработки АФК могут иметь адаптивное значение, поскольку в полёте насекомого достигаются высокие нормы метаболизма, и если процент продукции АФК будет возрастать, то это может привести к серьёзным последствиям окислительного стресса.

Митохондрии летательных мышц шмелей не способны закачивать кальций. Однако, гены переносчика кальция и его регуляторов (MCU, MICU1 и EMRE) были идентифицированы, а с помощью иммунодетекции было установлено наличие кальциевого унипортера (MCU). Это связано с особенностями функционирования летательных мышц, митохондрии

которых утратили функцию регуляции гомеостаза кальция в клетке из-за высокой частоты сокращения мускулатуры.

При исследовании влияния фунгицидов на биоэнергетические характеристики митохондрий летательных мышц шмеля было показано, что фунгициды дитианон и дифеноконазол являются ингибиторами митохондриального дыхания, они на 50% блокировали дыхание на смеси пируват+глутамат в концентрации 2 и 12 мкМ соответственно (для α-глицерофосфата эти значения 13 и 40 мкМ). Фунгициды диниконазол и флудиоксонил являются разобщителями митохондриального дыхания. Выявлено влияние фунгицидов на продукцию АФК, они стимулируют продукцию H_2O_2 при дыхании через комплекс 1 ЭТЦ. Ингибирование фунгицидами дыхания митохондрий летательных мышц шмелей может иметь значительные негативные последствия на опылительную активность насекомых.

Методом ПЦР в ДНК шмлей были идентифицированы гены основных антиоксидантных ферментов: Mn-СОД, каталаза, глутатионпероксидаза, пероксиредоксин 6, пероксиредоксин 5, Cu/Zn-СОД, тиоредоксин-зависимая пероксид-редуктаза UCP3. Определен уровень экспрессии генов в полёте и покое. Установлено, что экспрессия генов UCP3, Mn-СОД, глутатионпероксидаза, пероксиредоксин 6, пероксиредоксин 5, каталаза, актин B, Cu/Zn-СОД, тиоредоксин-зависимой пероксид-редуктазы падает после продолжительного полёта. Также было отмечено, что уровень экспрессии этих генов уменьшается (за исключением тиоредоксин-зависимой пероксид-редуктазы) и при кормлении их 2,4-динитрофенолом. Таким образом, снижение экспрессии генов антиоксидантных ферментов после продолжительного полёта может быть опосредована снижением мембранного потенциала митохондрий. Однако, скорее всего, это связано как со снижением мембранного потенциала, так и с общим снижением биосинтетических процессов в полёте.

Изучено влияние митохондриально направленного антиоксиданта SkQ на продолжительность жизни шмелей. Показано, что он снижает смертность шмелей в ранние этапы развития, при этом в 8,5 раза повышается активность аконитатгидратазы, которая, как известно, является маркером присутствия АФК. Использование антибиотика в комбинации с SkQ повышает эффективность антиоксиданта за счет снижения смертности от инфекционных заболеваний.

На основе полученных данных представлена гипотетическая схема организации и регуляции биоэнергетических процессов, происходящих в митохондриях летательных мышц шмеля (рис. 32).

Из приведенной гипотетической схемы следует, что основным энергоресурсом для катаболических процессов в летательных мышцах шмелей является глюкоза. Она окисляется до 2-х основных субстратов митохондрий летательных мышц шмеля – α-глицерофосфат и пируват. При этом наблюдается ярко выраженная активация пируватдегидрогеназы молекулами АДФ. Далее α-глицерофосфат окисляется через α-глицерофосфатдегидрогеназу, локализованную на внешней стороне внутренней мембраны митохондрий, а пируват далее окисляется в цикле трикарбоновых кислот.

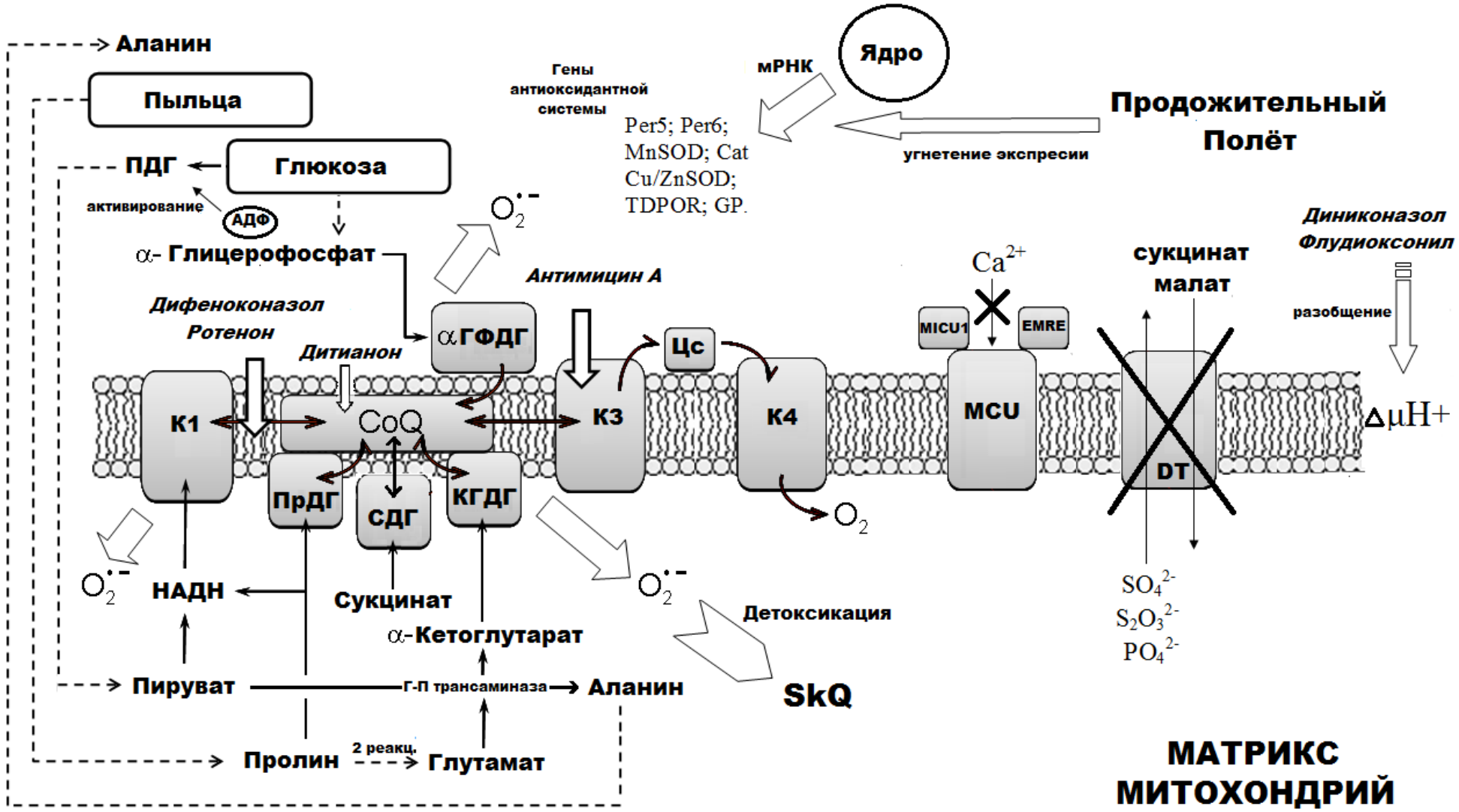

Рис. 32. Гипотетическая схема организации и регуляции биоэнергетических процессов, происходящих в митохондриях летательных мышц *Bombus terrestris* L.

Стоит отметить, что митохондрии летательных мышц *B. terrestris* способны окислять пролин. Исходя из наших данных, а также обзора литературы, наиболее вероятна следующая схема окисления аминокислоты: пролин окисляется с помощью пролиндегидрогеназы, которая способна «сбрасывать» электроны на ЭТЦ. При этом пролин через прохождение 2-х дополнительных реакций превращается в глутамат. Глутамат трансаминируется с пируватом с образованием α-кетоглутарата и аланина. Аланин покидает митохондрию и далее может идти на синтез жирового тела, а α-кетоглутарат окисляется кетоглутаратдегидрогеназой, способной переносить электроны на убихинон, а также стандартным способом через ЦТК.

Митохондрии летательных мышц шмеля имеют кальциевый унипортер (MCU) с белками регуляторами, однако кальций транспортировать не способны. Надо отметить, что активность дикарбоксилатного переносчика также является чрезвычайно низкой. Сукцинат и малат практически не проникают через внутреннюю мембрану митохондрий летательных мышц шмеля.

Наиболее существенными сайтами продукции АФК являются комплекс 3 и комплекс 1 ЭТЦ. При этом SkQ снижает количество АФК в клетке. Фунгициды дифеноконазол и дитианон блокируют работу ЭТЦ, в то время как диниконазол и флудиоксионил разобщают митохондриальное дыхание.

ВЫВОДЫ

1. Выявлен высокий уровень дыхания шмеля (*Bombus terrestris* L.) на грамм массы, этот показатель выше, чем у домовой мыши в 7,75 раза. В полёте дыхание увеличивается в 1,92 раза, что говорит о высокой интенсивности дыхательных процессов шмелей в состоянии покоя.
2. Наиболее интенсивное дыхание митохондрий *B. terrestris* происходит при использовании в качестве субстрата α-глицерофосфата (202,7 нмоль O_2/мин/мг). Из субстратов комплекса I ЭТЦ наиболее предпочтительной является смесь пируват+глутамат; митохондрии летательных мышц шмеля способны окислять пролин со скоростью 17,6 нмоль O_2/мин/мг.
3. Исследование мембранного потенциала митохондрий *B. terrestris* позволило выявить высокий уровень потенциала, генерируемого при окислении эндогенных субстратов. Целостные митохондрии практически не способны генерировать потенциал при использовании в качестве субстрата сукцината, что может быть связано с низкой скоростью работы дикарбоксилатного переносчика и высокими скоростями окисления гликолитических субстратов.
4. На продукцию активных форм кислорода в митохондриях летательных мышц *B. terrestris* идет всего 0,3-0,8% кислорода, что может иметь существенное значение для адаптации к полёту.
5. Митохондрии летательных мышц *B. terrestris* не способны транспортировать кальций. При этом они имеют как гены и переносчиков и регуляторов (MCU, MICU1 и EMRE), так и белок кальциевого унипортера.
6. Фунгициды – дитианон и дифеноконазол – являются ингибиторами митохондриального дыхания, а диниконазол и флудиоксонил являются разобщителями окислительного фосфорилирования.

7. Методом PCR в клетках *B. terrestris* были идентифицированы гены антиоксидантных ферментов шмеля: Mn-СОД, глутатионпероксидаза, пероксиредоксин 6, пероксиредоксин 5, каталаза, Cu/Zn-СОД, тиоредоксин-зависимая пероксид-редуктаза, UCP3.
8. Установлено, что экспрессия генов Mn-СОД, глутатионпероксидазы, пероксиредоксина 6, пероксиредоксина 5, каталазы, Cu/Zn-СОД, UCP3, тиоредоксин-зависимой пероксид-редуктазы падает после продолжительного полёта (3-5 часов).
9. Митохондриальный антиоксидант SkQ снижает смертность *B. terrestris* на ранних этапах развития, при этом резко повышается активность аконитатгидратазы (в 8,5 раза) вследствие того, что этот фермент является мишенью для АФК.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Активированные кислородные метаболиты в монооксидазных реакциях / В.В. Ляхович, В.А. Вавилин, Н.К. Зенков, Е.Б. Меньщикова // Бюллетень СО РАМН. – 2005. – Т. 118, №4. – С. 7-12.
2. Биоантиоксиданты при лучевом поражении и злокачественном росте / Е.В. Еурлакова, А.В. Алесенко, Е.М. Молочкина, Н.П. Пальмина, Н.Г. Хралова // М., Наука. – 1975. – 214 с.
3. Биохимия / Н.А. Жеребцов, Т.Н. Попова, В.Г. Артюхов. – Изд-во Воронеж. ун-та, 2002. – 696 с.
4. Герасимов А.М. Тиолзависимое образование супероксидного радикала менадионом и викасолом / А.М. Герасимов, А.С. Захаров // Биохимия. – 1985. – Т. 83, №2. – С. 147-150.
5. Гривенникова В.Г. Митохондриальный комплекс 1 / В.Г. Гривенникова, А.Д. Виноградов // Успехи современной биологии. – 2003. – Т. 43. – С. 19-58.
6. Делянин Н.В. Механизмы антиоксидантной защиты организма при изменении режима кислородного обеспечения / Н.В. Делянин, А.М. Герасимов // Материалы международной научной конференции. Гродно. – 1993. – с.18-19.
7. Дмитриев Л.Ф. Создание на внутренней мембране митохондрий 250 мВ является необходимым, но недостаточным условием синтеза АТФ / Л.Ф. Дмитриев, М.В. Иванова, Л.Н. Давлетшина // Биохимия. – 1993. – Т. 58, № 2. – С. 255-260.
8. Дубинина Е.Е. Биологическая роль супероксидного анион-нрадикала и супероксиддисмутазы в тканях организма / Дубинина Е. Е. // Успехи современной биологии. – 1989. – Т. 108, №1. – С. 3-18
9. Землянухин А.А. Большой практикум по физиологии растений / А.А. Землянухин, Л.А. Землянухин. − Учебное пособие. Воронеж: Изд-во Воронежского университета, 1996. − 188с.

10. Зенков Н.К. Окислительный стресс. Диагностика, терапия, профилактика / Н.К. Зенков, Е.Б. Меньшикова, С.М. Шергин // Новосибирск. – 1993. – 181 с.
11. Зенков Н.К. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах / Н.К. Зенков, Е.Б. Меньшикова // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113, №. 3. – С. 286-296.
12. Каталаза биологических сред организма человека и ее клинико-биохимическое значение в оценке эндотоксикоза / Н.В. Безручко, Г.К. Рубцов, Н.Б. Ганяева, Г.А. Козлова, Д.Г. Садовникова // Вестник Томского государственного педагогического университета. – 2012. – № 7. – С. 94-100.
13. Кения М.В. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе / М.В. Кения, А.И. Лукиш, Е.П. Гуськов // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113, №. 4. – С. 456-469.
14. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. − Москва: Высш. шк., 1990. − 351с.
15. Мальстрем Б.Г. Некоторые аспекты структуры и функции медьсодержащих оксидаз / Б.Г. Мальстрем // Итоги и перспективы развития биоорганической химии и молекулярной биологии. – М., 1978. – С. 169-181.
16. Нитрозильные комплексы цитохромов митохондриальной цепи − первичные хромофоры в механизме фотоактивации дыхания / Г.Г. Борисенко и др. // Биол. мембр. – 2002. – Т.19, № 5. С. 378-390.
17. Петрович Ю.А. Свободнорадикальное окисление и его роль в патогенезе воспаления, ишемии и стресса / Ю.А. Петрович, Д.В. Гуткин // Патолог. физиология и экспериментальная терапия. – 1986, №5. – С. 85-92.
18. Роль кооперативного H+/e−-сопряжения (редокс-эффект Бора) в геме a/CuA и геме a/ CuB при трансмембранном переносе протонов цитохром с оксидазой / С. Папа // Биохимия. – 2005. – Т. 70, № 2. – С.

220-230.
19. Рубин А.Б. Транспорт электронов в биологических системах / А.Б. Рубин, В.П. Шинкарев. – М.: Наука, 1984. – 315 с.
20. Санько Н.М. Исследования изоферментов лимфоцитарных популяций в процессе направленной иммунизации и при аутоиммунной патологии / Н.М. Санько, Е.С. Калия, Т.П. Матвейков, В.И. Левин // Гематология и трансфузиология. – 1990. – Т. 3, № 7. – С. 10-13.
21. Семенов В.В. Мутагенная и антимутагенная активность цельной крови человека, ее плазмы и белков / В.В. Семенов, Е.С. Кошпаева // Вестник РАМН. – 1997, № 7. – С. 33-35.
22. Скулачев В.П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода / В.П. Скулачев // Соросовский Образовательный Журнал. – 2001. – Т. 7, №6. – с. 410-414.
23. Структура валентной области кластерной модели активных центров цитохром-с-оксидазы / Т.А. Романова, П.В. Аврамов // Журнал структурной химии. – 2005. – Т.46, № 2. – С. 351-354.
24. Турков М.И. Супероксиддисмутаза: свойства и функции / М. И. Турков //Успехи современной биологии. – 1976. – Т. 81, №. 3. – С. 341-354.
25. Федорова Т.Н. Перекисное окисление липидов при экспериментальной ишемии мозга / Т.Н. Федорова, А.А. Болдырев, Н. В. Галушкина // Биохимия. – 1994 . – Т. 64, № 1. – С. 94-99.
26. Филатов И.А. Строение и свойства цитохромоксидазы / И. А Филатов [и др.] // Биоорг. химия. − 1988. – Т. 14, № 6. С. 725-745.
27. Хаитов Р.М. Иммунология / Р.М. Хаитов, Г.А. Игнатьева, И.Г. Сидорович. – М.: Медицина, 2000. – 432 с.
28. Чернышев Г.А. Вероятность и статистика в биологии и химии / Г.А. Чернышев, В.Н. Стариков. – Воронеж : Издательство Воронежского

университета, 1998. – 270 с.
29. Энергетика биомембран / В.П. Скулачев. – М.: Наука, 1989. – 564 с.
30. 9-Methyl- b -carboline has restorative effects in an animal model of Parkinson’s disease / C. Wernicke [et al.] // Pharmacol. Rep. – 2010. – V. 62. – P. 1.
31. A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure / P. De Lonlay [et al.] // Nat. Genet. – 2001. – V. 29. – P. 57-60.
32. A stable non fluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases / M.J. Zhou et al. // Anal Biochem. – 1997. – V. 253, N 2. – P. 162-168.
33. Age-associated decline in mitochondrial respiration and electron transport in Drosophila melanogaster / M. Ferguson [et al.] // Biochem. J. – 2005. – V. 390, N 2. – P. 501-511.
34. Alfonso-Prieto M. The reaction mechanisms of heme catalases: an atomistic view by ab initio molecular dynamics / M. Alfonso-Prieto, P. Vidossich, C. Rovira // Arch Biochem Biophys. – 2012. – V. 525, N 2. – P. 121-130.
35. Andreyev A.Y. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species / A.Y. Andreyev, Y.E. Kushnareva, A.A. Starkov // Biochemistry (Mosc). – 2005. – V. 70, N 2. – P. 200-214.
36. Anisimov V.N. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program.5. SkQ1 prolongs lifespan and prevents development of traits of senescence / V.N. Anisimov, L.E. Bakeeva, V.P. Skulachev // Biochemistry (Moscow) – 2008. – V. 73, N 12. – P. 1329-1342.
37. Antonenko Y.N. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and in vitro studies / Y.N. Antonenko, A.V.

Avetisyan, V.P. Skulachev // Biochemistry (Moscow) – 2008. – V. 73 – P. 1589-1606.

38. Apel K. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction / K. Apel, H. Hirt // Annu Rev. Plant. Biol. – 2004. – V. 55. – P. 373-399.

39. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation / V. Yankovskaya et al. / Science. – 2003. – V. 299.– P. 700-704.

40. Architecture of the Qo site of the cytochrome bc 1 complex probed by superoxide production / F. L. Muller [et al.] // Biochemistry. – 2003. – V. 42, N 21. – P. 6493-6499.

41. Azzu V. Degradation of an intra-mitochondrial protein by the cytosolic proteasome / V. Azzu, M. D. Brand // J. Cell Sci. – 2010. – V. 123, N 4. – P. 578-585.

42. Banda E.H. Pollination of greenhouse tomatoes by bees / E. H. J. Banda, R.J. Paxton // Acta Horticulturae. – 1991. – V. 288. – P. 194-198.

43. Bartholomew G.A. Oxygen consumption of moths during rest, pre-flight warm-up, and flight in relation to body size and wing morphology / G.A. Bartholomew, T.M. Casey // J. exp. Biol. – 1978. – V. 76. – P. 11-25.

44. Bayley J.P. Warburg tumours and the mechanisms of mitochondrial tumour suppressor genes. Barking up the right tree? / J.P. Bayley, P. Devilee // Curr. Opin .Genet Dev. – 2010. – V. 20, N 3. – P. 324-329.

45. Bcs1p, an AAA-family member, is a chaperone for the assembly of the cytochrome bc(1) complex / C.M. Cruciat [et al.]// EMBO J. – 1999. – V. 18, N 19. – P. 5226-5233

46. Beckman K.B. The free radical theory of ageing matures / K.B. Beckman, B.N. Ames // Physiol. Rev. – 1998. – V. 78. – P. 547-581.

47. Bergh S.G.V.d. (1967) Insect mitochondri / S.G.V.d. Bergh // Methods in Enzymology. – 1967. – V. 10. – P. 117-122.

48. Bergh V.D.S. The respiratory activity and permeability of housefly sarcosomes / V.S.D. Bergh, E.C. Slater // Biochem. J. – 1962. – V. 82. – P.

362-371.
49. Bertsch A. Foraging in male bumblebees (Bombus lucorum L.): maximizing energy or minimizing water load? / A. Bertsch // Oecologia (Berlin). – 1984. – V. 62, N 3. – P. 325-336.
50. Bewley C.G. α-Glycerophosphate dehydrogenase in Drosophila melanogaster: Kinetic differences and developmental differentiation of the larval and adult isozymes / C.G. Bewley, M.J. Rawls, C.J. Lucchesi // J. Insect. Physiol. – 1976. – V. 20. – P. 153-165.
51. Binding properties of the calcium-activated F2 isoform of Lethocerus troponin C / S.R. Martin [et al.] // Biochemistry. – 2011. – V. 50, N 11. – P. 1839-1847.
52. Bioenergetics of mitochondrial diseases associated with mtDNA mutations / G. Lenaz [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2004. – V. 1658. – P. 89-94.
53. Bovine complex I is a complex of 45 different subunits / Carrol J. [et al.] // J. Biol. Chem. – 2006. – V. 281, N 43. – P. 32724-32727.
54. Boyer P.D. The ATP synthase – a splendid molecular machine / P.D. Boyer // Annu. Rev. Biochem. – 1997. – V. 66. – P. 717-749.
55. Boyer P.D. The binding change mechanism for ATP synthase–some probabilities and possibilities / P.D. Boyer // Biochim. Biophys. Acta. – 1993. – V. 1140. – P. 215–250.
56. Boyland E. The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis / E. Boyland, L.F. Chasseaud // Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. – 1969. – V. 32. – P. 173-219.
57. Brenner D. Mitochondrial cell death effectors / D. Brenner, T.W. Mak // Curr. Opin. Cell Biol. – 2009. – V. 21. – P. 871-877.
58. Bullard B. Regulating the contraction of insect flight muscle / B. Bullard, A. Pastore // J. Muscle. Res. Cell Motil. – 2011. – V. 32, N 4-5. – P. 303-313.
59. Bursell E. Aspects of the metabolism of amino acids in the tsetse fly,

Glossina (Diptera) / E. Bursell // J. Insect Physiol. – 1963. – V. 9. – P. 439-452.

60. Bursell E. Oxaloacetic carboxylase in flight musculature of the tsetse fly / E. Bursell // Comp. Biochem. Physiol. – 1965. – V. 16. – P. 259-266.

61. Bursell E. Substrates of oxidative metabolism in Dipteran flight muscle / E. Bursell // Comparative Biochemistry and Physiology B. – 1975. – V. 52. – P. 235-238.

62. Bursell E. The conversion of glutamate to alanine in the tsetse fly / E. Bursell // Comp. Biochem. Physiol. – 1967. – V. 23. – P. 825-829

63. Candy D.J. Utilization of fuels by the flight muscles / G.J. Goldsworthy, C.H. Wheeler // Insect flight CRC Press. – 1981. – P. 305-319.

64. Cannon B. Brown adipose tissue: function and physiological significance / B. Cannon, J. Nedergaard // Physiol. Rev. – 2004. – V. 84, N 1. – P. 277-359.

65. Carafoli E. A survey of the interaction of calcium ions with mitochondria from different tissues and species / E. Carafoli, A.L. Lehninger // Biochem. J. – 1971. – V. 122. – P. 681-690.

66. Carroll A.M. Starvation sensitive UCP 3 expression in rat thymus and spleen / A.M. Carroll, R.K. Porter // Biochim. Biophys. Acta. – 2004. – V. 1700, N 2. – P. 145-150.

67. Chance B. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs / B. Chance, H. Sies, A. Boveris // Physiol Rev. – 1979. – V. 59, N 3. – P. 527-605.

68. Chelikani P. Diversity of structures and properties among catalases / P. Chelikani, I. Fita, P.C. Loewen // Cell Mol. Life Sci. – 2004. – V. 61, N 2. – P. 192-208.

69. Chino H. Diacylglycerol-carrying lipoprotein of hemolymph of the locust and some insects // H. Chino, K. Kitazawa // J. Lipid Res. – 1981. – V. 22, N 7. – P. 1042-1052.

70. Chino. H. Lipid transport: Biochemistry of hemolymph lipophorin / H. Chino. // In Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and

Pharmacology. – 1985. – V. 10. – P. 115-135

71. Chu F.F. Expression, characterization and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx- GI / F.F. Chu, J.H. Doroshow, R.S. Esworthy // J. Biol. Chem. – 1993. – V. 268, N 4. – P. 2571-2576.

72. Clinical and molecular findings in children with complex I deficiency / M. Bugiani [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2004. – V. 1659. – P. 136-147.

73. Collier G.E. Purification of alpha-glycerophosphate dehydrogenase from Drosophila melanogaster / G.E. Collier, D.T. Sullivan, R.J. MacIntyre // Biochim. Biophys. Acta. – 1976. – V. 429, N 2. – P. 216-223.

74. Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex / S. Iwata [et al.] // Science. – 1998. – V. 281. – P. 64-71.

75. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II / F. Sun [et al.] // Cell. – 2005. – V. 121. – P. 1043-1057.

76. Cysteine labeling studies of beef heart aconitase containing a 4Fe, a cubane 3Fe, or a linear 3Fe cluster./ D.W. Plank [et al.] // J. Biol Chem. – 1989. – V. 264, N 34. – P. 20385-20393.

77. Danks S.M. Changes in intramitochondrial adenine nucleotides in blowfly flight-muscle mitochondria / S.M. Danks, J.B. Chappell // Biochem J. – 1974. – V. 142. – P. 353-358

78. Daves R.A. The oxygen consumption of flies during flight / R.A. Daves, G. Fraenkel // J. Exp. Biol. – 1940. – V. 17. – P. 402-407.

79. Defining the mitochondrial proteomes from five rat organs in a physiologically significant context using 2D blue-native/SDS–PAGE / N.H. Reifschneider [et al.] // J. Proteome Res. – 2006. – V. 5. – P. 1117–1132.

80. Devenish R.J. The structure and function of mitochondrial F1F0-ATP synthases / R.J. Devenish, M. Prescott, A.J. Rodgers // Int. Rev Cell Mol. Biol. – 2008. – V. 267. – P. 1–58.

81. Differential effects of mitochondrial complex I inhibitors on production

of reactive oxygen species / R. Fato [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – V. 1787, N 5. – P. 384-392.

82. Distribution of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production / D. Arsenijevic [et al.] // Nat. Genet. – 2000. – V. 26. – P. 435-439.

83. Dröse S. Ambivalent effects of diazoxide on mitochondrial ROS production at respiratory chain complexes I and III / S. Dröse, P.J. Hanley, U. Brandt // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – V. 1790, N 6. – P. 558-565.

84. Dröse S. Measurement of superoxide formation by mitochondrial complex I of Yarrowia lipolytica / S. Dröse, A. Galkin, U. Brandt // Methods Enzymol. – 2009. – V. 456. – P. 475-490.

85. Emil F.P.S. The Catalytic Mechanism of Glutathione Reductase as Derived from X-ray Diffraction Analyses of Reaction Intermediates / F.P. S. Emil, G.E. Schulz // J. Biol. Chem. – 1983. – V. 258, N 3. – P. 1752-1757.

86. EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex / Y. Sancak [et al.] // Science. – 2013. –V. 342. – P. 1379-1382.

87. Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice / A.J. Vidal-Puig [et al.] // J. Biol. Chem. – 2000 – V. 275, N 21. – P. 16258-16266

88. Epp O. The refined structure of the selenoenzyne glutathione peroxidase at 0.2 nm resolution / O. Epp, R. Ladenstein, A. Wendel // Eur. J. Biochem. – 1983. – V. 133, N 1. – P. 51-69.

89. Ernster L. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function / L. Ernster, G. Dallner // Biochim. Biophys. Acta. – 1995, N 1. – V. 1271. – P. 195-204

90. Estabrook R.W. Alpha-Glycerophosphate oxidase of flight muscle mitochondria / R.W. Estabrook, B. Sacktor // J. Biol. Chem. – 1958. – V. 233. – P. 1014-1019.

91. Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: a review with new insights / F. Palmieri [et al.] // Plant J. – 2011. – V. 66, N 1. – P. 161-

181.
92. Expression of uncoupling proteins in human skin and skin-derived cells / S. Mori [et al.] // J. Invest. Dermatol. – 2008. – V. 128. – P. 1894-1900
93. Fatty acid activation of the uncoupling proteins requires the presence of the central matrix loop from UCP1 / J. Jimenez-Jimenez [et al.] // Biochim. Biophys. Acta – 2006. – V. 1757. – P. 1292-1296.
94. Flight activity, mortality rates, and lipoxidative damage in Drosophila / T. Magwere [et al.] // Journal of Gerontology: Biologiccal sciences. – 2006. – Vol. 61A, N 2. – P. 136-145.
95. Fourteen novel human members of mitochondrial solute carrier family 25 (SLC25) widely expressed in the central nervous system / T. Haitina [et al.] // Genomics. – 2006. – V. 88, N 6. – P. 779-790.
96. Fuel uptake, storage and use in male bumble bees Bombus terrestris L. / B. Surhot [et al.] // J. Comp. Physiol. – 1988. – V. 158. – P. 263-269.
97. Gäde G. Flight substrates and their regulation by a member of the AKH/RPCH family of neuropeptides in Cerambycidae / G. Gäde, L. Auerswald // Journal of Insect Physiology. – 2000. – V. – 46, N 12. – P. 1567-1576.
98. Galkin A. Superoxide radical formation by pure complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from Yarrowia lipolytica / A. Galkin, U. Brandt // J. Biol. Chem. – 2005. – V. 280, N 34. – P. 30129-30135.
99. Ghezzi D. SDHAF1, encoding a LYR complex-II specific assembly factor, is mutated in SDH-defective infantile leukoencephalopathy / D. Ghezzi [et al.] // Nat. Genet. – 2009. – V. 41, N 6. – P. 654-656.
100. Glutathione peroxidase protects cultured mammalian cells from the toxicity of adriamycin and paraquat / S.D. Taylor [et al.] // Arch. Biochem. Biophys. – 1993. – V. 305. – P. 600-605.
101. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants / N. Graham [et al.] // J. Experi. Bot. – 1998. – V. 49, N 321. – P. 623-647.

102. Grossmann A. Non-reactivity of the selenoenzyme glutathione peroxidase with enzymically hydroperoxidised phospholipids / A. Grossmann, A. Wendel // Eur. J. Biochem. – 1993. – V. 135. – P. 549-552.
103. Hainsworth F. R. Energy regulation in hummingbirds / F. R. Hainsworth // American Scientist. – 1981. – V. 69. – P. 420-429.
104. Halliwel B. Free radicals in biology and medicine / B. Halliwel, J.M.C. Gutteridge // Clarendon Prees, Oxford. – 1989. – V. 47. – P. 8445-8449.
105. Hansford R.G. Some properties of pyruvate and 2-oxoglutarate oxidation by blowfly flight-muscle mitochondria / R.G. Hansford // Biochem J. – 1972. – V. 127. – P. 271-283.
106. Hatefi Y. Preparation and properties of succinate: ubiquinone oxidoreductase (complex II) / Y. Hatefi, D.L. Stiggall // Methods Enzymol. – 1978. – V. 53. – P. 21-27.
107. Haunerland N.H. Fatty acid binding protein in flight muscle of the locust, Schistocerca gregaria / N.H. Haunerland, J.M. Chisholm // Biochim. Biophys. Acta. – 1990. – V. 1047, N 3. – P. 233–238.
108. Hayes J.D. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress / J.D. Hayes, L.I. McLellan // Free Radic. Res. – 1999. –V. 31, N 4. –P. 273-300.
109. Heinrich B. Thermoregulation in bumblebees / B. Heinrich // J. of comparative physiology. – 1975. – V. 96. – P. 155-166.
110. Hetz S.K. Insects breathe discontinuously to avoid oxygen toxicity / S.K. Hetz, T.J. Bradley // Nature. – 2005. – V. 433. – P. 516-519.
111. Hirst J. The production of reactive oxygen species by complex I / J. Hirst, M.S King., K.R. Pryde // Biochem. Soc. Trans. – 2008. – V. 36, N 1. – P. 976-980.
112. Hoekstra W.G. Biochemical function of selenium and its relation to vitamin E / W.G. Hoekstra // Fed. Proc. – 1975. – V. 34, N 11. – P. 2083-2089.
113. Homologues of the uncoupling protein from brown adipose tissue

(UCP1): UCP2, UCP3, BMCP1 and UCP4 / F. Bouillaud [et al.] // Biochim. Biophys. Acta – 2001. – V. 1504, N 1. – P. 107–119

114. How do uncoupling proteins uncouple? / K.D. Garlid [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2000. – V. 1459. – P. 383–389.

115. How to reduce bee poisoning from pesticides / H. Riedl [et al.] // A Pacific Northwest Extension publication Oregon State University. – 2006. – 26 p.

116. Hung C.H. Modulation of mitochondrial calcium as a pharmacological target for Alzheimer's disease / C.H. Hung, Y.S. Ho, R.C. Chang // Ageing Res. Rev. – 2010. – V. 9, N 4. – P. 447-456.

117. Increase in glutathione peroxidase activity in malaria parasite after selenium supplementation / B. Gamain [et al.] // Free Radical Biol. Med. – 1996. – V. 21. – P. 559-565.

118. Inhibitors of succinate:quinone reductase/complex II regulate production of mitochondrial reactive oxygen species and protect normal cells from ischemic damage but induce specific cancer cell death / S.J. Ralph [et al.] // Pharm. Res. – 2011. – V. 28. – P. 2695-2730.

119. Interaction of Ca2+ with blowfly flight muscle mitochondria / Carafoli E. [et al.] // Biol. Chem. –1971. – 246. – P. 964-972.

120. Isolated complex I deficiency in children: clinical, biochemical and genetic aspects / J. L. Loeffen [et al.] // Hum. Mutat. – 2000. – V. 15, N 2. – P. 123–134.

121. Isolation, ultrastructure, and biochemical characterization of glycogen in insect flight muscle / C.C. Childress [et al.] // J. Cell Biol. – 1970. – V. 45. – P. 83-90.

122. Kelly O.M. Absence of mitochondrial uncoupling protein 3: effect on thymus and spleen in the fed and fasted mice / O.M. Kelly, R.K. Porter // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – V. 1807, N 9. – P. 1064-1074.

123. Kirichok Yu. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel / Yu. Kirichok, G. Krapivinsky, E.C. David // Nature. – 2004. –

V. 427. – P. 360-364.

124. Kirkinezos I.G. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases / I.G. Kirkinezos, C.T. Moraes // Semin. Cell Dev. Biol. – 2001. – V. 12, N 6. – P. 449-457.

125. Klingenberg M. Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue / M. Klingenberg, S.G. Huang // Biochim. Biophys. Acta – 1999. – V. 1415, N 2. – P. 271-296.

126. Kort C.A.D.De. The significance of L-proline for oxidative metabolism in the flight muscles of the Colorado beetle, Leptinotarsa decemlineata / C.A. D.De Kort, A.K.M. Bartelink, R.R. Schuurmans // Insect Biochem. – 1973. – V. 3, N 9. – P. 11-17.

127. Krause F. Detection and analysis of protein-protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (membrane) protein complexes and supercomplexes / F. Krause // Electrophoresis. – 2006. – V. 27, N 13. – P. 2759-2781.

128. Krauss S. The mitochondrial uncoupling-protein homologues / S. Krauss, C.Y. Zhang, B.B. Lowell // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2005. – V. 6, N 3. – P. 248-261.

129. Krinsky N.L. Membrane antioxidants / N.L. Krinsky // Ann. NY. Acad. Sci. – 1988. – V. 551. – P. 17-33.

130. Lack of correlation between mitochondrial reactive oxygen species production and life span in Drosophila / S. Miwa [et al.] // Ann N Y Acad Sci. – 2004. – V. 1019, N 1. – P. 388-391.

131. Lehninger A.L. Biochemistry, the molecular basis of cell structure and function: Second Edition / Albert L. Lehninger // Worth Publishers Inc., New York. – 1975. – P. 1104.

132. Lewis M. R. Mitochondria in tissue culture / M. R. Lewis, W. H. Lewis // Science. – 1914. – V. 39. – P. 330–333.

133. Lill R. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins / R. Lill // Nature. – 2009. – V. 460. – P. 831-838.

134. Lin M.T. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases / M.T. Lin, M.F. Beal // Nature. – 2006. – V. 443. – P. 787-795.
135. Lipoprotein lipase activity in the flight muscle of Locusta migratoria and its specificity for haemolymph lipoproteins / M.C. Van Heusden [et al.] // Insect Biochemistry. – 1986. – V. 16. – P. 517-523.
136. Lipoproteins act as a reusable shuttle for lipid transport in the flying death's head hawkmoth acherontia atropos / B. Surholt [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta. – 1991. – V. 1086. – P. 15-21.
137. Liu S.S. Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria / S. S. Liu // Biosci Rep. – 1997. – V. 17, N 3. – P. 259-272.
138. Liu S.S. Mitochondrial Q cycle-derived superoxide and chemiosmotic bioenergetics / S.S. Liu // Ann. NY Acad. Sci. – 2010. – V. 1201. – P. 84-95
139. Liu Y. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain / Y. Liu, G. Fiskum, D. Schubert // J. Neurochem. – 2002. – V. 80, N 5. – P. 780-787.
140. Lombardi A. Defining the transcriptomic and proteomic profiles of rat ageing skeletal muscle by the use of a cDNA array, 2D- and Blue native-PAGE approach / A. Lombardi [et al.] // Proteomics. – 2009. – V. 72, N 4. – P. 708-721.
141. Lopes V.M. Bitondi induction of heat shock proteins in the larval fat body of Apis mellifera L. bees / V.M. Lopes, C.Z. Luz . Simõesb M.M.G. Bitondi // Apidologie. – 2000. – V. 31. – P. 487-501.
142. Macrophages decreases atherosclerotic lesion formation in low-density lipoprotein receptor–deficient mice / Q. Mu [et al.] // J. American Heart Association. – 2007. – P. 1375-1382.
143. Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation and reactive oxygen species generation / W.J. Koopman [et al.] // Antioxid. Redox. Signal. – 2010. – V. 12, N 12. – P. 1431-1470.
144. Manodori A. (3Fe-4S) to (4Fe-4S) cluster conversion in Escherichia coli

fumarate reductase by site directed mutagenesis / A. Manodori, G. Cecchini, M.K. Johnson // Biochemistry. − 1992. − Vol. 31, N 10. − P. 2703-2712.

145. McKenzie M. Analysis of respiratory chain complex assembly with radiolabeled nuclear- and mitochondrial-encoded subunits / M. McKenzie, M. Lazarou, M.T. Ryan // Methods Enzymol. – 2009. – V. 456. – P. 321-339.

146. Measurement of the molecular masses of hydrophilic and hydrophobic subunits of ATP synthase and complex I in a single experiment / J. Carroll [et al.] // Anal. Biochem. – 2009. – V. 395, N 2. – P. 249-255.

147. Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism (MAPEG). A widespread protein superfamily / P.J. Jakobsson [et al.] // Am. J Respir. Crit. Care Med. – 2000. – V. 161. – P. 20-24.

148. Metabolic pathways in Anopheles stephensi mitochondria / C. Giulivi [et al.] // Biochem J. – 2008. – V. 415, N 2. – P. 309-316.

149. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese / S. Enerbäck [et al.] // Nature. – 1997. – V. 387. – P. 90-94.

150. Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean / J.C. Clapham [et al.] // Nature. – 2000. – V. 406. – P. 415-418.

151. Missense mutations in the BCS1L gene as a cause of the Bjornstad syndrome / J.T. Hinson [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2007. – V. 356, N 8. – P. 809-819.

152. Mitchell P. The protonmotive Q cycle: a general formulation / P. Mitchell // FEBS Lett. – 1975. – V. 59, N 2. – P. 137-139.

153. Mitochondrial ATP synthase deficiency due to a mutation in the ATP5E gene for the F1 epsilon subunit / J.A. Mayr [et al.] // Hum. Mol. Genet. – 2010. – V. 19, N 17. – P. 3430-3439.

154. Mitochondrial complex I: structure, function and pathology / R.J. Janssen [et al.] // J. Inherit. Metab. Dis. – V. 29, N 9-10. – P. 499-515.

155. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high

rates in both the forward and reverse reactions / C.L. Quinlan [et al.] // J. Biol. Chem. – 2012. – V. 287, N 32. – P. 27255-27264.

156. Mitochondrial function in flying honeybees (Apis mellifera): respiratory chain enzymes and electron flow from complex III to oxygen / R.K. Suarez [et al.] // The Journal of Experimental Biology. – 2000. – V. 203. – P. 905-911.

157. Mitochondrial proton and electron leaks / M. Jastroch [et al.] // Essays Biochem. – 2010. – V. 47. – P. 53-67.

158. Mitochondrial ROS production correlates with, but does not directly regulate lifespan in Drosophila / A. Sanz [et al.] // Aging (Albany NY). – 2010. – V. 2, N 4. – P. 200-223.

159. Mitochondrial UCP5 is neuroprotective by preserving mitochondrial membrane potential, ATP levels, and reducing oxidative stress in MPP+ and dopamine toxicity / K.H. Kwok [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 2010. – V. 49, N 6. – P. 1023-1035.

160. Modulation of oxidative phosphorylation machinery signifies a prime mode of anti-ageing mechanism of calorie restriction in male rat liver mitochondria / D. Dani [et al.] // Biogerontology. – 2009. – V. 11, N 3. – P. 321-334.

161. Morandin L.A. Bumble bee (Hymenoptera: Apidae) activity and pollination levels in commercial tomato greenhouses / L.A. Morandin [et al.] / J. of Economic Entomology. – 2001. – V. 94, N 2. – P. 462-467.

162. Muller F.L. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane / F.L. Muller, Y.H. Liu, H. Van Remmen // J. Biol. Chem. – 2004. – V. 279, N 47. – P. 49064-49073.

163. Mutations in TTC19 cause mitochondrial complex III deficiency and neurological impairment in humans and flies / D. Ghezzi [et al.] // Nat. Genet. – 2011. – V. 43, N 3. – P. 259-263.

164. Nichol H. Iron metabolism in insects / H. Nichol, J.H. Law, J.J. Winzerling // Annu Rev Entomol. – 2002. – V. 47. – P. 535-559.

165. Nicholls D.G.A History of the first uncoupling protein, UCP1 / D.G. Nicholls, E. Rial // J. Bioenerg. Biomembr. – 1999. – V. 31, N 5. – P. 399-406.
166. Nobrega F.G. BCS1, a novel gene required for the expression of functional Rieske iron–sulfur protein in Saccharomyces cerevisiae / F.G. Nobrega, M.P. Nobrega, A. Tzagoloff // EMBO J. – 1992. – V. 11, N 11. – P. 3821-3829.
167. Overlapping specificities of the mitochondrial cytochrome c and c1 heme lyases / D.G. Bernard [et al.] // J. Biol. Chem. – V. 278. – P. 49732-49742.
168. Oxidative stress pathologies and antioxidants:The importance of glutathione in human disease / M. T. Danyelle [et al.] // Biomed & Pharmacotherapy. – 2003. – V. 57. – P. 145-155.
169. Palmieri F. The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications / F. Palmieri // Pflugers Arch. – 2004. – V. 447, N 5. – P. 689-709.
170. Pathogenesis of primary defects in mitochondrial ATP synthesis / E.A. Schon [et al.] // Semin. Cell Dev. Biol. – 2001. – V. 12. – P. 441-448.
171. Patterns of widespread decline in North American bumble bees / S. A. Cameron [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2001. – V. 108. – P. 662-667.
172. Pearson D.J. Enzyme activities in flight and leg muscle of the dung beetle in relation to proline metabolism // D.J. Pearson, M.O. Imbuga, J.B. Hoek // Insect Biochemistry. – 1979. – V. 9, N 5. – P. 461-466.
173. Primary structure of human plasma glutathione peroxidase deduced from cDNA sequences / K. Takahashi [et al.] // J. Biochem. – 1990. – V. 108, N 2. – P. 145-148.
174. Production of reactive oxygen species by complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from Escherichia coli and comparison to the enzyme from mitochondria / D. Esterhazy [et al.] // Biochemistry. – 2008. – V. 47, N 12. – P. 3964-3971.
175. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of

complex III / Q. Chen [et al.] // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278. – N 38. – P. 36027-36031.

176. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria / E. Cadenas [et al.] // Arch. Biochem. Biophys. – 1977. – V. 180. – P. 248-257.

177. Proline dehydrogenase: a key enzyme in controlling cellular homeostasis / C. Servet [et al.] // Front Biosci. (Landmark Ed). – 2012. – V.17. – P. 607-620.

178. Proline metabolism and transport in plant development / S. Lehmann [et al.] // Amino Acids. – 2010. – V. 39, N 4. – P. 949-962.

179. Properties of Ca(2+) transport in mitochondria of Drosophila melanogaster / V.S. Stockum [et al.] // J. Biol. Chem. – 2011. – V. 286, N 48. – P. 41163-41170.

180. Proteome alterations in rat mitochondria caused by aging / N.A. Dencher [et al.] // Ann. N Y Acad. Sci. – 2007. – V. 1100. – V. 291-298.

181. Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme / K. Takahashi [et al.] // Arch. Biochem. Biophys. – 1987. – V. 256, N 2. – P. 677–686.

182. Purification, properties, and distribution of ascorbate peroxidase in legume root nodules / A.D. Dalton [et al.] // Plant Physiol. – 1987. – V. 83, N 4. – P. 789-794.

183. Rajinder S.D. Drought stress, Enzymes of glutathione metabolism, oxidation injury, and protein synthesis in Tortula Ruralis / S.D. Rajinder // Plant Physiol. – 1991. – V. 95, N 2. – P. 648-651.

184. Rasheed Z. Hydroxyl radical damaged Immunoglobulin G in patients with rheumatoid arthritis: biochemical and immunological studies / Z. Rasheed // Clin Biochem. – 2008. – V.41, N 9. – P. 663-669.

185. Reactivity of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase with

membrane and lipoprotein lipid hydroperoxides / M. Maiorino [et al.] // Free Rad. Res. Comm. – 1991. – V. 12. – P. 131-135.

186. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells / I.R. Indran [et al.] // Biochim. Biophys Acta. – 2011. – V. 1807, N 6. – P. 735-745.

187. Rees D.M. The structure of the membrane extrinsic region of bovine ATP synthase / D.M. Rees [et al.] // Proc. Natl. Acad Sci. – 2009. – V. 106, N 51. – P. 21597–21601.

188. Regulation of pyruvate oxidation in blowfly flight muscle mitochondria: requirement for ADP / B.A. Bulos [et al.] // Arch. Biochem. Biophys. – 1984. – V. 234. – P. 382-393.

189. Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria / H. Eubel [et al.] // Plant. Physiol. Biochem. – 2004. – V. 42. – P. 937-942.

190. Richard J.G. Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees / J.G. Richard, O. Ramos-Rodriguez, N.E. Raine // Nature. – 2012. – V. 491. – P. 105-108.

191. Richards T.A. Cell evolution: gene transfer agents and the origin of mitochondria / T.A. Richards, J.M. Archibald // Curr. Biol. – 2011. – V. 21, N 3. – P. 112-114.

192. Ricquier D. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP / D. Ricquier, F. Bouillaud // Biochem. J. – 2000. – V. 345. – P. 161–179.

193. Role of phospholipids in the lipophorin particles of Rhodnius prolixus / K.C. Gondim [et al.] // Arch. Insect. Biochem. Physiol. – 1992. – V. 20. – P. 303-314.

194. Sacktor B. Biochemical adaptations for flight in the insect / B. Sacktor // Biochem Soc. Symp. – 1976, N 41. – P. 111-131.

195. Sacktor B. Biological oxidation and energetics in insect mitochondria / B. Sacktor // In The Physiology of Insecta (Ed. Rockstein M), Academic Press, New York. – 1974. – V. 4. – P. 271-353.

196. Sacktor B. Pathways of hydrogen transport of extra-mitochondrial reduced dephosphopyridine nucleotide in flight muscles / B. Sacktor, A. Dick. – J. Biol Chem. – V. 237. – P. 3259–3262.
197. Sacktor B. Regulation of metabolism in working muscle in vivo. I. Concentrations of some glycolytic, tricarboxylic acid cycle, and amino acid intermediates in insect flight muscle during flight / B. Sacktor, E. Wormser-Shavit // Journal of Biological Chemistry. – 1966. – V. 241. – P. 624–631.
198. Sacktor B. Regulation of metabolism in working muscle in vivo. II. Concentrations of adenine nucleotides, arginine phosphate and inorganic phosphate in insect flight muscle during flight / B. Sacktor, E. C. Hurlbut // J. Biol. Chem. – V. 241, N 3. – P. 632–634.
199. Sacktor B. The role of mitochondria in respiratory metabolism of flight muscle / B. Sacktor // Annu. Rev. Entomol. – 1961. – V. 6. – P. 103-130.
200. Safranine as a fluorescent probe for the evaluation of mitochondrial membrane potential in isolated organelles and permeabilized cells / T.R. Figueira [et al.] // Arch. Biochem. Biophys. – 2010. – V. 201. – P. 255-265.
201. Sanz A. Production of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain in Drosophila melanogaster / A. Sanz, R. Stefanatos, G. McIlroy // J Bioenerg Biomembr. – 2010. – V. 42, N 2. – P. 135-142.
202. Schägger H. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form / Schägger H., G. Von Jagow // Anal. Biochem. – 1991. – V. 199, N 2. – P. 223-231.
203. Schägger H. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria / H. Schägger, K. Pfeiffer // EMBO J. – 2000. – V. 19, N 8. – P. 1777-1783.
204. O. Schmidt Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms / O. Schmidt, N. Pfanner, C. Meisinger // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2010. – V. 11, N 9. – P. 655-667.
205. Schrader M. Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species / M. Schrader, H.D. Fahimi // Histochem. Cell Biol. – 2004. – V. 122, № 4. – P.

383-393.
206. Simon J.Yu. The toxicology and biochemistry of insecticides / CRC Press. – 2008. – 283 p.
207. Smith D.S. The structure of flight muscle sarcosomes in the blowfly calliphora erythrocephala (Diptera) / D.S. Smith // J. Cell Biol. – 1963. – V. 19, N 1. – P. 115-138.
208. Specificity and locale of the L-3-glycerophosphate-flavoprotein oxidoreductase of mitochondria isolated from the flight muscle of Sarcophaga barbata thoms / J.F. Donnellan [et al.] // Biochem. J. – 1970. – V. 120. – P. 467-478.
209. Staples J.F. Futile cycle enzymes in the flight muscles of North American bumblebees / Staples J.F., E.L. Koen, T.M. Laverty // The J. of Exp. Biol. – 2004. – V. 207. – P. 749-754.
210. Starkov A.A. Measurement of mitochondrial ROS production / A.A. Starkov // Methods Mol. Biol. – 2010. – V. 648. – P. 245-255.
211. Starkov A.A. Regulation of brain mitochondrial H2O2 production by membrane potential and NAD(P)H redox state / A.A. Starkov, G. Fiskum // J. Neurochem. – 2003. – V. 86, N 5. – P. 1101-1107.
212. Structural and mechanistic insights into MICU1 regulation of mitochondrial calcium uptake / L. Wang [et al.] // EMBO J. – 2014. – V. 33, N 6. – P. 594-604.
213. Studies on chromated erythrocytes: Effect of Sodium Chromate on Erythrocyte Glutathione Reductase / A.K. George [et al.] // J. Clin. Invest. – 1964. – V. 43, N 2. – P. 323-331.
214. Suarez R.K. Energy metabolism during insect flight: biochemical design and physiological performance / R.K. Suarez // Physiological and Biochemical Zoology. – 2000. – V. 73. – P. 765-771.
215. Suarez R.K. Mitochondrial respiration in locust flight muscles / R.K. Suarez, C.D. Moyes // J. of Exp. Zoology. – 1992. – V. 263. – P. 351-355.
216. Substrate redox potential controls superoxide production kinetics in the

cytochrome bc 1 complex / J.L. Cape [et al.] // Biochemistry. – 2009. – V. 48, N 45. – P. 10716-10723.

217. Sunde R.A. Molecular biology of selenoproteins / R.A. Sunde // Ann. Rev. Nutr. – 1990. – V. 10. – P. 451-474.

218. Superoxide and hydrogen peroxide production by Drosophila mitochondria / S. Miwa [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 2003. – V. 35, N 8. – P. 938-948.

219. Supramolecular organization of the respiratory chain in Neurospora crassa mitochondria / I. Marques [et al.] // Eukaryot. Cell. – 2007. – V. 6, N 12. – P. 2391–2405.

220. Tatuch Y. The mitochondrial DNA mutation at 8993 associated with NARP slows the rate of ATP synthesis in isolated lymphoblast mitochondria / Y. Tatuch, B.H. Robinson // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1993. – V. 192, N 1. – P. 124-128/

221. Tetsuo Y. Effects of pesticides on isolated rat hepatocytes, mitochondria, and microsomes / Y. Tetsuo, M. Shigeru // Arch. Environ. Contam. Toxicol. – 1993. – V. – 25. – P. 271-278.

222. The activities of fructose diphosphatase in flight muscles from the bumble-bee and the role of this enzyme in heat generation / E.A. Newsholme [et al.] // Biochem. J. – 1971. – Vol. 128, N 1. – P. 89-97.

223. The F1F0-ATPase complex from bovine heart mitochondria: the molar ratio of the subunits in the stalk region linking the F1 and F0 domains / I.R. Collinson et al. // Biochemistry. – 1996. – V. 35, N 38. – P. 12640-12646.

224. The genome sequence of Rickettsia prowazekii and the origin of mitochondria / S.G. Andersson [et al.] // Nature. – 1998. – V. 396. – P. 133-140.

225. The mitochondrial production of reactive oxygen species in relation to aging and pathology / M.L. Genova [et al.] // Ann N Y Acad Sci. – 2004. – V. 1011. – P. 86-100.

226. The role of oxidized cytochrome c in regulating mitochondrial reactive

oxygen species production and its perturbation in ischaemia / P. Pasdois [et al.] // Biochem. J. – 2011. – V. 436. – P. 493-505.

227. The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubisemiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2 / M.L. Genova [et al.] // FEBS Lett. – 2001. – V. 505, N 3. – P. 364-368.

228. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation / E.B. Tahara [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 2009. – V. 46. – P. 1283-1297.

229. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain / J. St Pierre [et al.] // J. Biol. Chem. – 2002. – V. 277, N 47. – P. 44784-44790.

230. Transgenic mice overexpressing glutathione peroxidase are resistant to myocardial ischaemia reperfusion injury / Yoshida T. [et al.] // J. Mol. Cell Cardiol. – 1996. – V. 28. – P. 1759-1767.

231. Treberg J.R. Evidence for two sites of superoxide production by mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) / J.R. Treberg, C.L. Quinlan, M.D. Brand // J. Biol. Chem. – 2011. –V. 286, N 31. – P. 27103-27110.

232. Turrens J.F. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria / J.F. Turrens, A. Boveris // Biochem. J. – 1980. – V. 191, N 2. – P. 421-427.

233. UCP2 is a mitochondrial transporter with an unusual very short half-life / S. Rousset [et al.] // FEBS Lett. – V. 581, N 3. – P. 479-482.

234. UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells / W. Mao [et al.] // FEBS Lett. – 1999. – V. 443, N 3. – P. 326-330.

235. Uncoupling protein 3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue speci fi c expression / O. Boss [et al.] // FEBS Lett. – 1997. – V. 408. – P. 39-42.

236. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and

hyperinsulinemia / Fleury C. [et al.] // Nat. Genet. – 1997. –V. 15, N 3. – P. 269-272.

237. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species / M.P. Murphy [et al.] // Cell Metab. – 2011. – V. 13, N 4. – P. 361-366.

238. Velthuis H.W.A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination / H. W. Velthuis, A.V. Doorn // Apidologie. – 2006. – V. 37. – P. 421-451.

239. Vernberg F.J. Thermal influence on invertebrate respiration / F.J. Vernberg, W.B. Vernberg // Chesapeake Science. – 1969. – V. 10. – P. 234-240.

240. Vogel R.O. Human mitochondrial complex I assembly: a dynamic and versatile process / R.O. Vogel, J.A. Smeitink, L.G. Nijtmans // Biochim. Biophys. Acta. – 2007. – V. 1767, N 10. – P. 1215–1227.

241. Votyakova T.V. Δψ-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria / T.V. Votyakova, I.J. Reynolds // J. Neurochem. – 2001. – V. 79. – P. 266-277.

242. Walker P. R. A comparison of the properties of the phosphofructokinases of the fat body and flight muscle of the adult male desert locust / P. R. Walker, E. Bailey // Biochem J. – 1969. – V. 111. – P. 365–369.

243. Weeda E. Oxidation of proline and pyruvate by flight muscle mitochondria of the Colorado beetle, Leptinotarsa decemlineata Say / E. Weeda, C.A.D.De Kort, A.M.T. Beenakkers // Insect Biochemistry. – 1980. – V. 10, N 3. – P. 305-311.

244. Weis-Fogh T. Fat combustion and metabolic rate of flying locusts (Schistocerca gregaria) / T. Weis-Fogh // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. – 1952. – V. 237. – P. 1-36.

245. Whittington R. Comparison and examination of Bombus occidentalis and Bombus impatiens (Hymenoptera: Apidae) in tomato greenhouses / R. Whittington, M.L. Winston // J. of Economic Entomology. – 2004. – V. 97, N 4. – P. 1384-1389.

246. Winterbourn C.C. Thiol chemistry and speci fi city in redox signaling /

C.C. Winterbourn, M.B. Hampton // Free Radic. Biol. Med. – 2008. – V. 45, N 5. – P. 549-561.

247. Yan Lian-Jun Mitochondrial adenine nucleotide translocase is modified oxidatively during aging / Yan Lian-Jun, R.S. Sohal // Biochemistry. – 1998. – Vol. 95, N 22. – P. 12896–12901.

248. Yan Lian-Jun Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase / Yan Lian-Jun, R.L. Levine, R.S. Sohal // Biochemistry. – 1997. – Vol. 94, N 21. – P. 11168-11172.

249. Zahavi M. Activity of mitochondrial NAD-linked isocitric dehydrogenase in alatiform and apteriform larvae of Myzus persicae / M. Zahavi, A.S Tahori // Journal Insect Physiol. – V. 18, N 3. – P. 609-614.

250. Zara V. Identification and characterization of cytochrome bc(1) subcomplexes in mitochondria from yeast with single and double deletions of genes encoding cytochrome bc(1) subunits / V. Zara, L. Conte, B. L. Trumpower // FEBS J. – 2007. – V. 274, N 17. – P. 4526-4539.

251. Zündorf G. Calcium dysregulation and homeostasis of neural calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases provide multiple targets for neuroprotection / G. Zündorf, G. Reiser // Antioxid. Redox Signal. – 2011. – V. 14, N 7. – P. 1275-1288.