На правах рукописи

Сыромятников Михаил Юрьевич

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

Специальность 03.01.04. – биохимия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Воронеж – 2014

Работа выполнена в ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Попов Василий Николаевич

Официальные оппоненты: **Белоусов Всеволод Вадимович**
доктор биологических наук, ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, группа биологии активных форм кислорода, руководитель

Тутукина Мария Николаевна
кандидат биологических наук, ФГБУН Институт биофизики клетки РАН, лаборатория функциональной геномики и клеточного стресса, старший научный сотрудник

Ведущая организация: НИИ Физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского, Московский государственный университет

Защита состоится «18» декабря 2014 года в 13-00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.038.03 при ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет»: 394006, Воронеж, Университетская пл. 1, аудитория 59.

С диссертацией можно ознакомиться в зональной научной библиотеке и на сайте http://www.science.vsu.ru ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет».

Автореферат разослан « » 2014 года.

Учёный секретарь диссертационного
совета, доктор биологических наук,
профессор Грабович Маргарита Юрьевна

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. 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 [Velthuis et al., 2006]. 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% [Cameron et al., 2001]. Главными причинами снижения количества опылителей считаются распространение паразитарных инфекций и использование новых пестицидов, не тестированных на этих насекомых [Richard et al., 2012].

Большая часть биохимических исследований основных коммерчески важных опылителей (пчел и шмелей) была выполнена в 60-70е годы 20 века, 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 [Suarez et al., 2000]. 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 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.

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 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 субстрата пируват+глутамат. Наименьшие скорости были характерны для цитрата, глутамата, малата и 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, которая содержит в себе высокие концентрации пролина. Было показано, что митохондрии летательных мышц шмеля 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 при протекании интенсивных катаболических процессов, которые достигаются во время полёта насекомых.

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-зависимая пероксид-редуктаза, UCP3. Установлено, что их экспрессия уменьшается 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 шмеля приближает к созданию инновационного пестицида, не действующего на насекомых-опылителей. Например, таким пестицидом может быть вещество, способное блокировать кальциевые каналы в митохондриях вредителей, т.к. митохондрии шмелей не способны транспортировать кальций (см. ниже). Изучение механизма неспособности митохондрий летательных мышц шмелей транспортировать 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 с целью оптимизации опылительной активности шмелей в теплицах. 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 проведении 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 экспрессии 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 источник). Иллюстрационный материал включает 32 рисунка, 6 таблиц.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2014-2016 годы (проект 1035) и гранта РФФИ (14-04-31618 мол_а).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследований

Объектом исследования служили самцы шмеля *Bombus terrestris* (L.) в возрасте 10-15 суток, а также личинки и куколки *B. terrestris*. Определение скорости поглощения кислорода и выделения углекислого газа осуществляли с помощью измерителя «Vernier» (Labquest, США).

Выделение митохондрий проводили по схеме, описанной нами ранее [Сыромятников и др., 2012]. Содержание митохондриального белка определяли с помощью коммерческого набора BCA assay (“Pierce Biotechnology”/“Thermo Scientific,” США).

Скорость поглощения кислорода митохондриями регистрировали амперометрически кислородным электродом типа Кларка (Hansatech Instruments, США). Все измерения проводили при 24 °С 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). Мембранный потенциал регистрировали по изменению флуоресценции проникающего катиона сафранина О (20 нмоль/мг белка митохондрий) [Figueira et al., 2010]. Регистрацию H_2O_2 осуществляли с помощью флуоресцентного красителя Amplex Red Ultra (Sigma, USA) как описано ранее [Starkov et al., 2010]. Регистрацию поглощения Ca^{2+} осуществляли с помощью флуоресцентного зонда Calcium Green 5N (CaGr). CaGr добавляли в кювету (1 мл) со средой выделения без ЭГТА спектрофлуориметра в концентрации 1 мкМ. Интенсивность флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре Hitachi F-7000 при 25 °С (волна облучения – 517 нм, волна эмиссии – 535 нм). Субстратом дыхания являлся 10 мМ α-

глицерофосфат. Активность АГ измеряли спектрофотометрически при λ=260 нм [Землянухин и др., 1996].

Целостность внутренней мембраны митохондрий оценивали посредством измерения активности митохондриальной малатдегидрогеназы до и после разрушения митохондрий детергентом. Активность СДГ измеряли спектрофотометрически [Hansford et al., 1972]. Иммунодетекцию осуществляли с помощью моноклональных антител с предварительным разделением белков на SDS-электрофорезе и инкубации в TTBS-буфере.

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). Далее проводили гомогенизацию и разделение фаз; осаждение и промывку РНК. Обратная транскрипция РНК осуществлялась на приборе Mastercycler personal (Eppendorf, Германия) с использованием обратной транскриптазы вируса Moloney лейкоза мышей M-MULVRT (Fermentas, Литва). Полимеразная цепная реакция проводилась с использованием Taq-полимеразы на приборе Mastercycler personal (Eppendorf, Германия). Продукты PCR разделяли с помощью аналитического электрофореза в 2% агарозном геле. 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).

Окислительный метаболизм митохондрий летательных мышц шмелей

Для сравнительного анализа скорости дыхания шмеля по сравнению с теплокровными организмами нами был использован такой лабораторный объект, как *Mus musculus*. Дыхание земляного шмеля в 7,75 раза превышало дыхание домовой мыши. Таким образом, в тканях шмелей проходят высокоскоростные аэробные катаболические процессы, которые, скорее всего, связаны с наличием летательных мышц. Шмели способны осуществлять полёт только во взрослой стадии развития. Был выявлен уровень потребления кислорода шмелями на разных стадиях развития (рис. 1).

Резкая интенсификация дыхания во взрослой стадии, скорее всего, обусловлена формированием летательных мышц, которые содержат в себе большое количество митохондрий. Дыхание во время полёта шмеля увеличилось лишь в 1,92 раза (рис. 2), что говорит о высоком уровне дыхания во время покоя *B. terrestris*. Это может быть связано с необходимостью данного вида насекомого поддерживать необходимую температуру тела (ввиду своего северного ареала обитания) во время покоя, что требует дополнительной выработки молекул АТФ митохондриями.

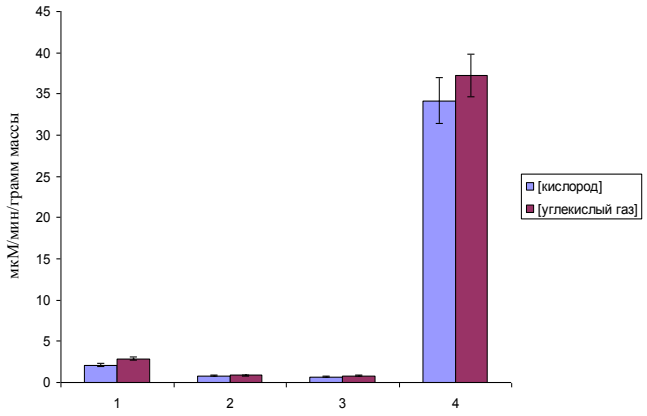

Рис. 1. Дыхание *B. terrestris* на разных стадиях развития. 1 – личинка, 2 – ранняя куколка, 3 – поздняя куколка, 4 – взрослое насекомое.

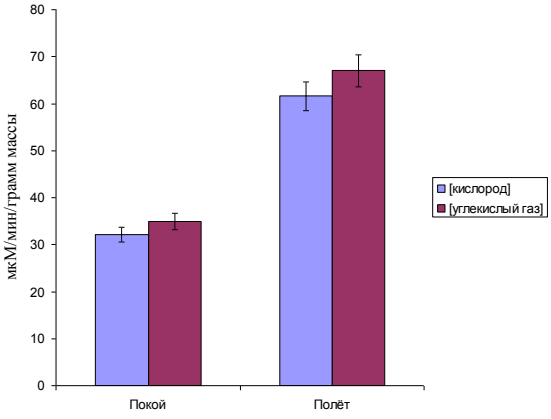

Рис. 2. Дыхание *B. terrestris* в покое и полёте.

Таким образом, изучение биоэнергетических процессов в митохондриях шмелей является важнейшей фундаментальной задачей. В качестве среды инкубации нами была использована «сахарозная среда», т. к. степень сопряжения и скорости дыхания митохондрий были выше, чем при использовании «калиевой среды». Необходимым этапом исследования стала идентификация оптимального субстрата дыхания для митохондрий летательных мышц 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.

Скорость дыхания митохондрий шмелей на различных субстратах.

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
α-Глицерофосфат	202,70±12,4	135,10 ±17,60	1,5

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 окислении пирувата в комбинации с малатом, глутаматом и пролином также наблюдался достаточно высокий дыхательный контроль. Митохондрии шмелей способны окислять пролин, вероятно это связано с питанием пыльцой, которая содержит высокие концентрации этой аминоксилоты [Lehmann et al., 2010]. Митохондрии шмелей окисляют сукцинат с низкой скоростью, равной, примерно, половине скорости дыхания с пируватом, 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. Эти результаты указывают, что оба фактора – низкая активность сукцинатдегидрогеназы и недостаточная активность переносчика дикарбоксилатов – ответственны за низкую скорость окисления сукцината.

Нужно отметить, что ни в одном из известных нам исследований не проводилась оценка мембранного потенциала митохондрий насекомых. Митохондрии шмелей генерировали стабильный мембранный потенциал при окислении пирувата (рис. 3). Мембранный потенциал митохондрий шмелей изменяется в ответ на добавки таким же образом, как и мембранный потенциал митохондрий млекопитающих, что подтверждает значительное сходство дыхательной цепи насекомых и млекопитающих. Митохондрии шмелей имеют особенность, заключающуюся в способности поддерживать значительный мембранный потенциал в отсутствие экзогенных субстратов (рис. 4).

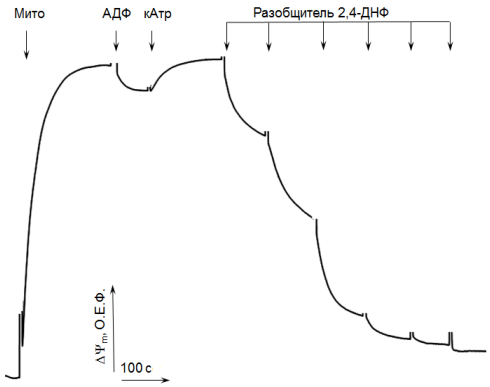

Рис. 3. Мембранный потенциал митохондрий *B. terrestris*. Эффекты АДФ, кАтр и разобщителя на мембранный потенциал митохондрий, окисляющих пируват. О.Е.Ф. – относительные единицы флуоресценции

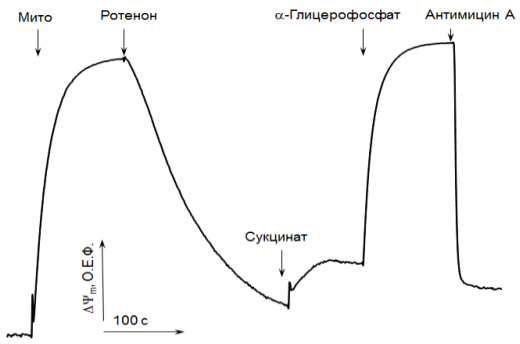

Рис. 4. Мембранный потенциал митохондрий *B. terrestris.* Влияние ФАД-зависимых субстратов на мембранный потенциал митохондрий. О.Е.Ф. – относительные единицы флуоресценции

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. Следует добавить, что митохондрии шмелей практически не способны генерировать потенциал в присутствии сукцината, что, скорее всего, связано с чрезвычайно низкой скоростью работы дикарбоксилатного переносчика.

Была произведена оценка продукции АФК митохондриями шмелей. Зависимость продукции пероксида водорода митохондриями летательных мышц шмелей от метаболического состояния показаны на рис. 5. Кроме того, была выявлена зависимость продукции АФК в зависимости от ингибиторов комплекса I ЭТЦ (ротенон) и комплекса III ЭТЦ (антимицин А). Результаты представлены на рис. 6.

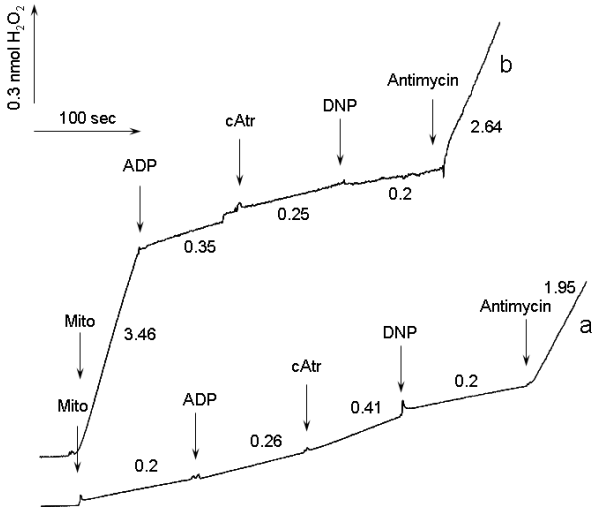

Рис. 5. Продукция H_2O_2 митохондриями *B. terrestris* в зависимости от метаболического состояния (состояние 3 и 4 по Чансу). Числовое значение над кривыми выражено в нмоль H_2O_2 /мин/мг белка.

a – субстрат дыхания пируват+глутамат;

b – субстрат дыхания α-глицерофосфат.

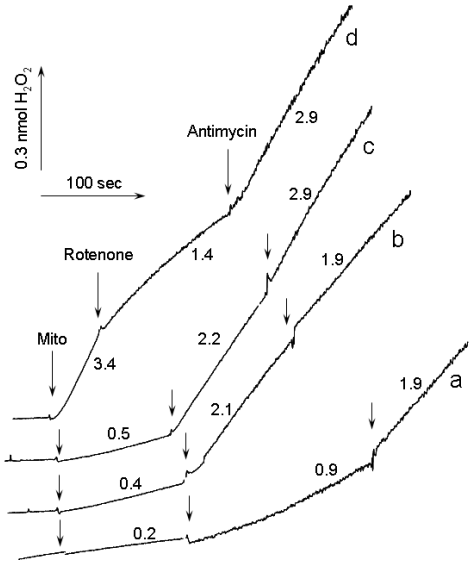

Рис. 6. Эффект ингибиторов ЭТЦ на продукцию АФК митохондриями *B. terrestris*. Числовое значение над кривой выражено в нмоль H_2O_2 /мин/мг белка.

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).

Наибольший уровень продукции H_2O_2 наблюдался на α-глицерофосфате – 3,4 нмоль H_2O_2/мин/мг белка. Наименьший уровень продукции H_2O_2 наблюдался в присутствии сукцината. Стимулирующее действие антимицина А на продукцию пероксида водорода обусловлено 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 связано с блокировкой ингибитором обратного транспорта электронов через комплекс I ЭТЦ, который вносит существенный вклад в продукцию свободных радикалов Примечательно, что добавление 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 низкой работы переносчика, а усиление продукции происходит вследствие окисления эндогенных субстратов митохондрий через комплекс I ЭТЦ, который и блокирует ротенон. 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 возможно опосредован снижением мембранного потенциала внутренней мембраны митохондрий. Для подтверждения гипотезы о том, что мембранный потенциал является ключевым фактором снижения или повышения продукции АФК, было произведено измерение мембранного потенциала митохондрий летательных мышц шмелей с аналогичными добавками и одинаковыми временными интервалами между добавками (рис. 7).

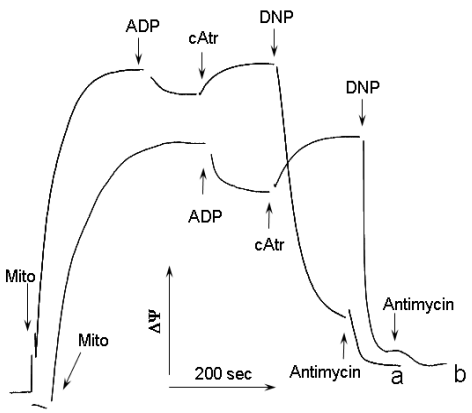

Рис. 7. Изменение мембранного потенциала митохондрий *B. terrestris* в зависимости от метаболического состояния (состояние 3 и 4 по Чансу).

Мембранный потенциал напрямую влияет на продукцию H_2O_2 митохондриями. 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 стимулирующим эффектом АДФ на активность пируватдегидрогеназы, а не с изменением мембранного потенциала, при этом продукция АФК усиливалась за счет усиления потока электронов через комплексы ЭТЦ.

Для выявления процента кислорода, идущего на продукцию АФК при дыхании митохондрий летательных мышц шмелей in vitro, параллельно проводили измерение дыхания

и продукции пероксида водорода, при этом добавки вносили в одинаковом количестве через одинаковые промежутки времени (табл. 2).

Таблица 2.

Продукция H_2O_2 митохондриями шмелей в различных метаболических состояниях.

Состояние митохондрий	Дыхание, нмоль O_2/мин/мг белка	Продукция H_2O_2, нмоль/мин/мг белка	Продукция 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	-	-

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.

Для определения возможности транспортировки кальция митохондриями летательных мышц шмелей с помощью зонда Ca-green был исследован этот процесс в митохондриях из клеток различных органов домовой мыши (*Mus musculus*), как модельного объекта закачки кальция внутрь митохондрий, и тораксов земляного шмеля (*Bombus terrestris*) для сравнительного анализа в одних и тех же условиях. На рис. 8 и рис. 9 изображены кривые закачки кальция.

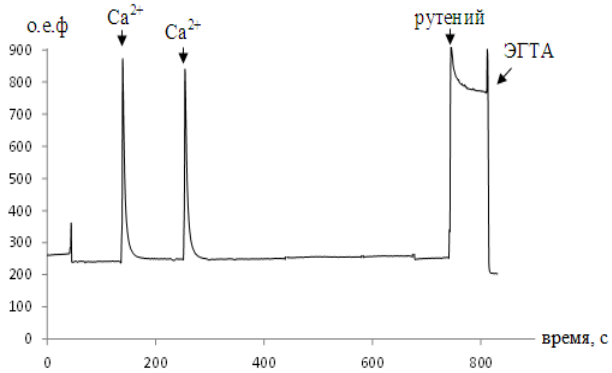

Рис. 8. Диаграмма закачки кальция митохондриями печени *M. musculus*.

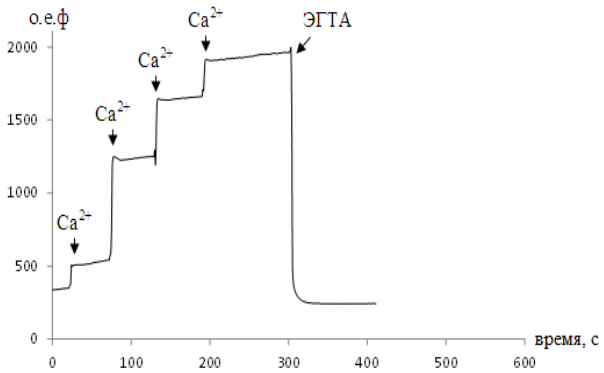

Рис. 9. Диаграмма закачки кальция митохондриями летательных мышц *B. terrestris*.

Как видно из представленных диаграмм, митохондрии летательных мышц шмелей не способны транспортировать кальций в отличие от митохондрий печени домовой мыши. Для

более убедительного доказательства неспособности транспортировать 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 изображены на рис. 10 и рис. 11 соответственно.

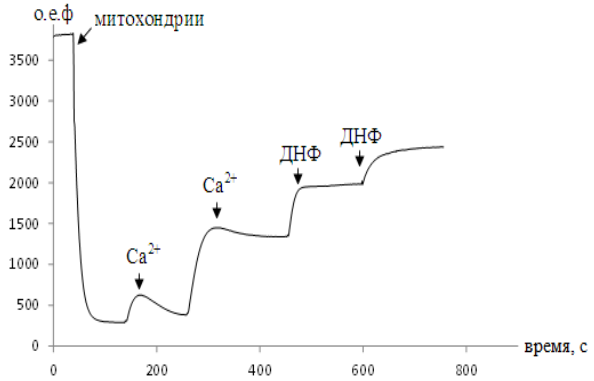

Рис. 10. Влияние ионов кальция на мембранный потенциал митохондрий печени *M. musculus*.

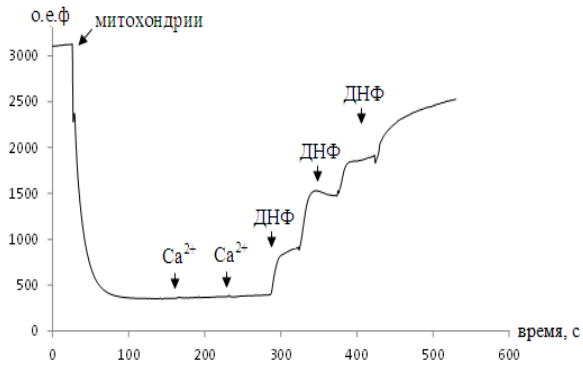

Рис. 11. Влияние ионов кальция на мембранный потенциал митохондрий летательных мышц *B. terrestris*.

Мембранный потенциал митохондрий летательных мышц шмеля не чувствителен к действию кальция в отличие от митохондрий печени домовой мыши. 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”) [Kirichok et al., 2004]. Также выделяют регуляторы кальциевого унипортера MICU1 и EMRE [Sancak et al., 2013].

Нами были идентифицированы гомологичные последовательностям генов домовой мыши кодирующие белки MCU, MICU1 и EMRE в ДНК земляного шмеля. На рис. 12. изображена фореграмма ПЦР-продукта ключевого гена, ответственного за транспортировку кальция – MCU из домовой мыши и земляного шмеля.

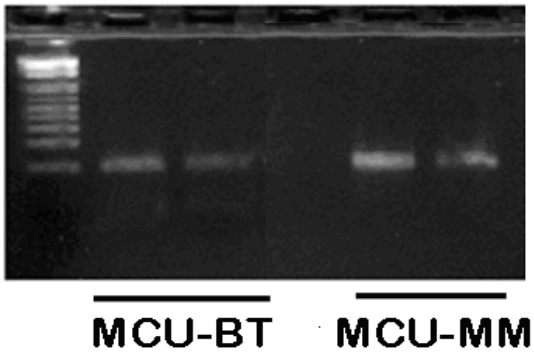

Рис. 12. Фореграмма продуктов ПЦР-реакции гена MCU из *Mus musculus* (MCU-MM) и *Bombus terrestris* (MCU-BT).

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 кальциевого 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

Ген кальциевого унипортера – MCU активно экспрессируется в летательных мышцах *B. terrestris*. В то же время наблюдается чрезвычайно низкая экспрессия гена белка-регулятора кальциевого унипортета MICU1.

С помощью вестерн-блота с антителами на MCU был идентифицирован белок MCU в летательных мышцах *B. terrestris* (рис. 13). В качестве маркера митохондрий использовалась цитратсинтетаза (рис. 14). Величины R_f белков совпали из различных организмов.

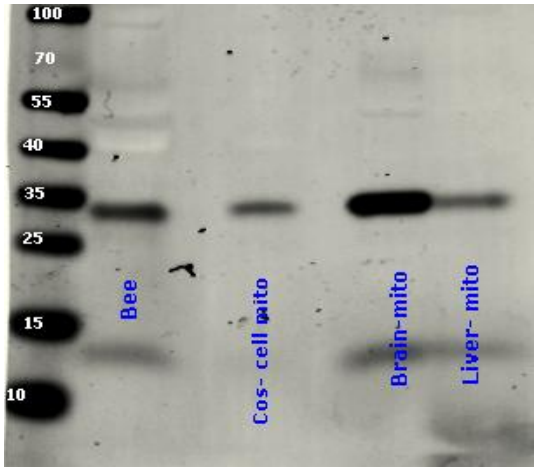

Рис. 13. Иммунодетекция белка MCU. «Bee», экстракт летательных мышц *B. terrestris*; «Cos-cell mito», культура клеток остеосаркомы человека; «Brain-mito», митохондрии мозга мыши; «Liver-mito», митохондрии печени мыши.

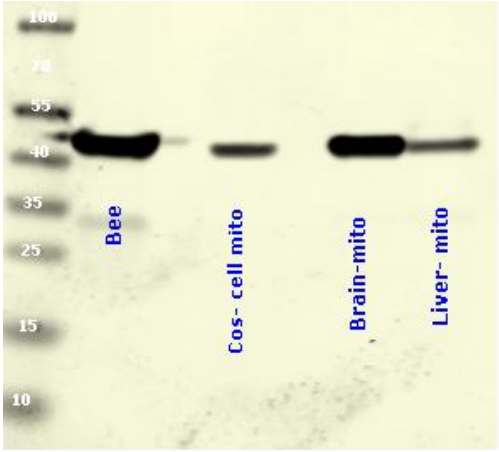

Рис. 14. Иммунодетекция фермента цитратсинтетазы. «Bee», экстракт летательных мышц *B. terrestris*; «Cos-cell mito», культура клеток остеосаркомы человека; «Brain-mito», митохондрии мозга мыши; «Liver-mito», митохондрии печени мыши.

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 подтверждает наши данные, во-вторых, возможно, белки MCU, MICU1 и EMRE не обязательно участвуют только в транспорте кальция внутрь митохондрий.

Влияние пестицидов на биоэнергетические процессы митохондрий летательных мышц шмелей.

Важнейшей задачей является идентификация токсического действия пестицидов на биоэнергетику митохондрий насекомых опылителей. Гербициды не применяются в теплицах. Исследование влияния инсектицидов на процессы в митохондриях летательных мышц шмеля не представляется целесообразным, поскольку они изначально оказывают сильное токсическое действие на насекомых. В теплицах часто применяют фунгициды из-за большого количества разнообразных грибковых инфекций. В то же время исследование влияния фунгицидов на токсичность для шмелей носит ограниченный характер, практически отсутствуют данные по их влиянию на функционирование митохондрий. 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 регистрировали скорость потребления кислорода. При этом измерения проводились на двух субстратах: α-глицерофосфат и пируват+глутамат. Из 16 фунгицидов (гимексазол, диниконазол, дитианон, дифеноконазол, ипродион, карбендазим, пенконазол, процимидон, тиабендазол, тирам триадимефон, флуатриафол, флудиоксонил, хлороталонил, ципроконазол, эпоксиконазол) дитианон и дифеноконазол оказались ингибиторами дыхания митохондрий. Дитианон ингибировал 50% дыхания на субстрате пируват+глутамат в концентрации 2 мкМ, а на α-глицерофосфате 13 мкМ. 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. Из всех фунгицидов разобщающим эффектом обладали только 2 из них - диниконазол и флудиоксонил, что подтвердило связь стимулирующего эффекта на дыхание этих фунгицидов с разобщением внутренней мембраны митохондрий. Диниконазол уменьшил 50% мембранного потенциала митохондрий при концентрации 72 мкМ, в то время как флудиоксонил проявил аналогичное действие при 40 мкМ.

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 (рис. 15) и через митохондриальную α-глицерофосфатдегидрогеназу (рис. 16).

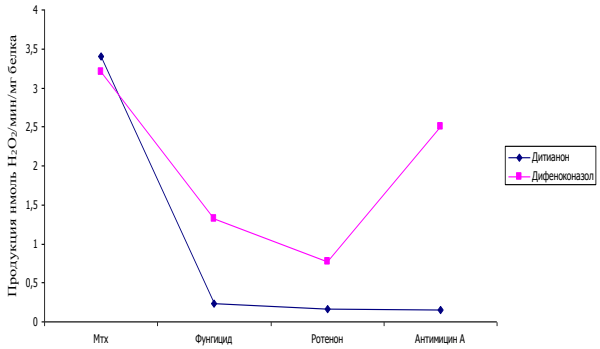

Рис. 15. Влияние фунгицидов и ингибиторов ЭТЦ на скорость продукции АФК митохондриями *B. terrestris* при дыхании на α-глицерофосфате. На оси X отображено последовательное добавление веществ к митохондриям.

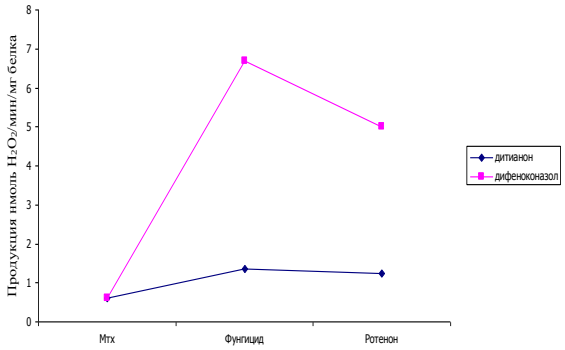

Рис. 16. Влияние фунгицидов и ингибиторов ЭТЦ на скорость продукции АФК митохондриями *B. terrestris* при дыхании на пирувате. На оси X отображено последовательное добавление веществ к митохондриям.

Исходя из диаграмм продукции H_2O_2, а также данных по ингибированию дыхания митохондрий можно предположить, что дифеноконазол разрушает убихиноновый пул, а дитианон ингибирует как комплекс I ЭТЦ, так и комплекс III (либо комплекс IV) ЭТЦ.

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

С помощью программы «Vector NTI» были разработаны праймеры к ключевым генам антиоксидантных белков *Bombus terrestris* L. (пероксиредоксин 5 (Per5), пероксиредоксин 6 (Per6), Mn-супероксиддисмутаза (MnSOD), Cu/Zn-супероксиддисмутаза (Cu/ZnSOD), белок UCP3 (UCP3), тиоредоксин-зависимая пероксид-редуктаза (TDPOR), каталаза (Cat), глутатионпероксидаза (GP)). Была получена РНК из тораксов шмелей и проведена обратная транскрипция, после чего была осуществлена PCR-реакция. Были получены PCR-продукты, длина которых совпала с теоретически ожидаемыми значениями.

Диаграмма изменения экспрессии антиоксидантных генов до и после полёта представлена на рис. 17. Выявлено, что их экспрессия снижается после продолжительного полёта. Возможно, это связано с падением мембранного потенциала митохондрий во время

полёта. Поэтому был произведен опыт по влиянию митохондриального разобщителя 2,4-динитрофенола на уровень экспрессии этих генов (рис. 18).

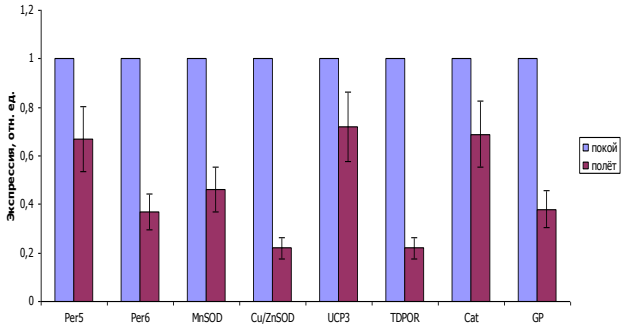

Рис. 17. Экспрессия генов антиоксидантных ферментов в летательных мышцах *B. terrestris* в покое и после полёта. Экспрессия генов в состоянии покоя принята за 1.

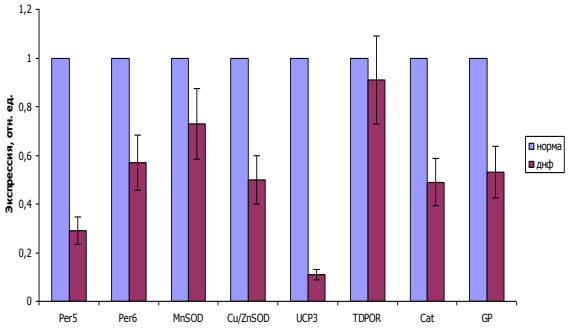

Рис. 18. Экспрессия генов антиоксидантных ферментов в летательных мышцах *B. terrestris* в норме и после кормления ДНФ. Экспрессия генов в норме принята за 1.

Таким образом, мембранный потенциал способен влиять на уровень экспрессии генов антиоксидантных ферментов. Скорее всего, этот процесс носит опосредованный характер: снижение мембранного потенциала уменьшает производство АФК, уровень которых в свою очередь может регулировать экспрессию генов антикосидантных ферментов.

Влияние антиоксиданта SkQ на продолжительность жизни шмеля

В сироп для кормления опытных групп были добавлены различные концентрации SkQ. «Контроль» получал сироп без добавления SkQ. Далее в течение 47 сут. производили подсчет погибших шмелей. Результаты эксперимента представлены на рис. 19.

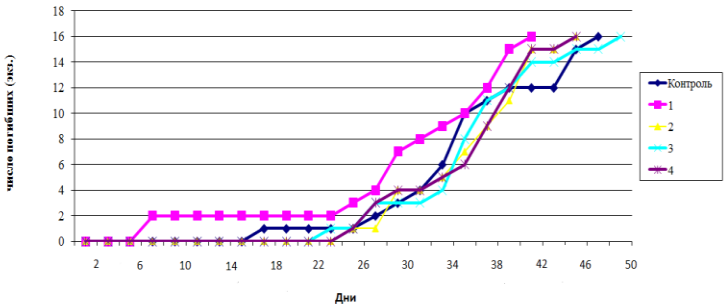

Рис. 19. Смертность самцов шмеля *B. terrestris*: контроль — сироп без SkQ, 1-концентрация SkQ 5 нМ/л, 2-концентрация SkQ 50 нМ/л, 3-концентрация SkQ 250 нМ/л, 4-концентрация SkQ 1000 нМ/л.

Достоверных различий в смертности не было обнаружено, однако наблюдалась тенденция снижения смертности в ранние периоды жизни шмеля. Активность аконитатгидратазы увеличилась в митохондриях в опыте с концентрацией SkQ 5 нМ/л в 8,5 раза, что говорит о резком снижении количества АФК в клетках шмелей.

Кормление шмелей сиропом с добавлением антибиотика (амикацин-виал 0,01%) и SkQ 5 нМ/л более выраженно снижает смертность в ранние периоды жизни насекомых. Таким образом, антибиотик повышает эффективность SkQ за счет снижения смертности от инфекционных заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Процессы дыхания, происходящие в этих насекомых, интенсивнее (более чем в 7 раз), чем у млекопитающих. Установлено, что полет усиливает дыхание в 1,92 раза. Отчасти это можно объяснить процессами терморегуляции шмеля. Максимальное дыхание через комплекс I ЭТЦ наблюдалось в присутствии смеси субстратов пируват+глутамат, наименьшие скорости были характерны для цитрата, глутамата, малата и смеси субстратов глутамат+малат. Наиболее сильное дыхание происходит при добавлении α-глицерофосфата (202,7 нмоль O_2/мин/мг). Митохондрии летательных мышц шмеля практически не способны генерировать потенциал в присутствии сукцината, что, скорее всего, связано с низкой скоростью работы дикарбоксилатного переносчика. Установлено, что фунгициды дитианон и дифеноконазол являются ингибиторами, а диниконазол и флудиоксонил разобщителями митохондриального дыхания.

На продукцию активных форм кислорода в митохондриях летательных мышц шмелей идет всего 0,3-0,8% кислорода. Столь низкие значения процента выработки АФК могут иметь адаптивное значение к полёту. Митохондрии летательных мышц шмелей не способны закачивать кальций. Возможно, это связано с особенностями функционирования летательных мышц, митохондрии которых утратили функцию регуляции гомеостаза кальция в клетке из-за высокой частоты сокращения мускулатуры. Митохондриальный антиоксидант SkQ снижает смертность на ранних этапах жизни шмеля. В ДНК шмелей были идентифицированы гены основных антиоксидантных ферментов. Их экспрессия падает после продолжительного полёта и кормления 2,4-динитрофенолом. Гипотетическая схема организации и регуляции биоэнергетических процессов в митохондриях летательных мышц шмеля представлена на рисунке 20.

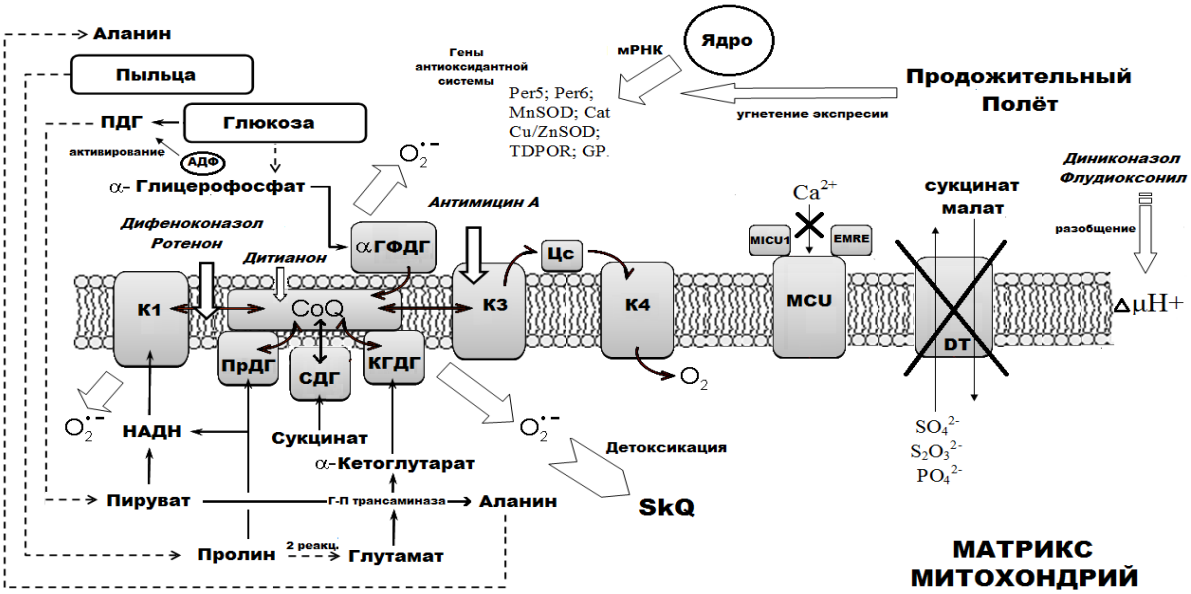

Рис. 20. Гипотетическая схема организации и регуляции биоэнергетических процессов, происходящих в митохондриях летательных мышц *Bombus terrestris* L.

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 ПУБЛИКАЦИЙ

Публикации в научных изданиях, включенных в перечень ВАК

1. Сыромятников М. Ю. Выделение и свойства митохондрий летательных мышц шмеля *Bombus terrestris*. / М. Ю. Сыромятников, А. В. Лопатин, А. А. Старков, В.Н. Попов // Биохимия. – 2013. – Т. 78. – Вып. 8. – С. 1158-1164.

2. Горбачева Т. М. Особенности функционирования сукцинатдегидрогеназы из летательных мышц шмелей *Bombus terrestris* / Т. М. Горбачева, М. Ю. Сыромятников, А. В. Лопатин, В. Н. Попов // Известия РАН. Серия биологическая. – 2013. – №5. С. 520-532.

3. Влияние пестицидов на дыхание митохондрий летательных мышц земляного шмеля / М. Ю. Сыромятников [и др.] // Пчеловодство. – 2012. – №6. – С. 60-61.

4. Исследование аминокислотного состава кормовой пыльцы для шмелей с использованием сверхпроизводительной жидкостной хроматографии (СВЭЖХ) / М. Ю. Сыромятников [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2012. – Т.12. – Вып. 4. – С. 592-597.

Патенты

5. Пат. 136683 Российская Федерация, МПК A01K 49/00 (2006.01), A01K 47/00 (2006.01) Шкаф-инсектарий для выращивания шмелей, а также насекомых и клещей для защиты растений от вредителей / А. В. Лопатин, М. Ю. Сыромятников, Д. В. Востриков, Д. М. Герасимов, В. Н. Попов.; заявитель и патентообладатель – ООО «Технологии шмелеводства, ФГБОУ ВПО Воронежский государственный университет. – № 2013121285/13; заявл. 13.05.13; опубл. 20.01.14; Бюл. № 2. – 2 С.

6. Пат. 2485767 Российская Федерация, МПК A01H 1/02 (2006.01), A01G 7/00 (2006.01) Устройство для стимуляции развития колоний шмелей / А. В. Лопатин, М. Ю. Сыромятников, Г. К. Усков, В. Н. Попов.; заявитель и патентообладатель – ООО «Технологии шмелеводства». – № 2011141922/13; заявл. 18.10.11; опубл. 27.06.13; Бюл. №18. – 4 С.

Монография

7. Воздействие пестицидов на шмелей в условиях защищенного грунта / А. В. Лопатин, М. Ю. Сыромятников, Н. В. Солдатова, А. В. Понамарев. – изд. Роза ветров. – 2012. – 52 с.

Статьи в сборниках научных трудов

8. Сыромятников М. Ю. Влияние НАД+-зависимых субстратов на скорость работы электрон-транспортной цепи митохондрий летательных мышц шмеля (*Bombus terrestris* L.) / М. Ю. Сыромятников, М. Ю. Чугреев, А. В. Лопатин, В. Н. Попов // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. – 2012. – Выпуск 14. – с. 202-206.

9. Влияние различных концентраций направленного митохондриального антиоксиданта SKQ1 на физиолого-биохимические показатели *Bombus terrestris* / М. Ю. Сыромятников [и др.] // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: сборник научных работ. ВГУ: 2009. – вып. 11. – С. 229-233.

10. Понамарев В. А. К истории взаимоотношения шмелей с человеком и современному состоянию шмелеводства / В. А. Понамарев, А. В. Лопатин, М. Ю. Сыромятников // Научный поиск. – 2012. – №2 (4). – С. 61-65.

11. Некоторые особенности ингибирования электрон-транспортной цепи митохондрий летательных мышц *Bombus terrestris* / Т. М. Горбачева, М. Ю. Сыромятников, А. В. Лопатин, В. Н. Попов, О. Ю. Гусева // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. – 2011. – Выпуск 13. – с. 53-56.

12. Лопатин А. В. Оценка качества цветочной пыльцы, собранной медоносной пчелой, с использованием биотестов на рабочих особях земляного шмеля / А. В. Лопатин, М. Ю. Сыромятников // Природничий альманах. Біологічні науки. – 2013. – вып. 19. – С. 157-166.

13. Сыромятников М. Ю. Очистка и физико-химические свойства сукцинатдегидрогеназы из летательных мышц шмелей (*Bombus terrestris* L.) / М. Ю. Сыромятников, Т. М. Горбачева, В. Н. Попов // Труды молодых ученых: сборник научных работ. ВГУ: 2009. – вып. 1-2. – С. 44-51.

14. Чугреев М. Ю. Экспрессионная регуляция митохондриальной Mn/Zn-пероксиддисмутазы в тканях земляного шмеля (*Bombus terrestris* L.) в процессе онтогенеза / М. Ю. Чугреев, М. Ю. Сыромятников, А. А. Пестриков, Н. В. Губань, А. В. Лопатин, В. Н. Попов // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. – Воронеж, 2013 . – Вып. 15. – С. 207-210.

15. Сыромятников М. Ю. Классификация химических инсектоакарицидов по степени опасности для шмелей / М. Ю. Сыромятников, А. В. Лопатин, В. А. Пономарев // Научный поиск. – 2013. – №1. – С. 43-67.

16. Особенности дыхания митохондрий летательных мышц шмелей / М. Ю. Сыромятников [и др.] // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: межрегион. сб науч. работ. – Воронеж, 2010. – Вып. 12. – С. 212-215

17. Лаборатория биологии пчел биоцентра ВГУ "Веневитиново" / А. В. Лопатин, М. Ю. Сыромятников, Н. И. Простаков, В. Н. Попов // Состояние и проблемы экосистем Среднерусской лесостепи. – Воронеж, 2013. – Вып. 27. – С. 76-91.

Тезисы докладов

18. Горбачева Т. М. Особенности процесса окисления сукцината в полетных мышцах шмелей (Bombus terrestris L.) / Т. М. Горбачева, М. Ю. Сыромятников, В. Н. Попов // Биология наука XXI века: 14-я международная Пущинская школа-конференция молодых ученых, Пущино, 19-23 апр. 2010 г.: сб. тез. – Пущино, 2010. – С. 18-19.

19. Сыромятников М. Ю. Влияние специфических ингибиторов электрон-транспортной цепи на дыхание и продукцию пероксида водорода митохондрий летательных мышц шмеля / М. Ю. Сыромятников, Саба А. Хади // Симбиоз Россия 2011: материалы 4-го Всерос. с междунар. участием конгресса студ. и аспирантов-биологов, Воронеж, 23-27 мая 2011 г.: сб. тез. – Воронеж, 2011. – Т. 1. – С. 44-46.
20. Некоторые особенности дыхания митохондрий летательных мышц шмеля *Bombus terrestris* (L.) / М. Ю. Сыромятников [и др.] // Биология - наука XXI века: 15-я Междунар. Пущинская школа-конф. молодых ученых, Пущино, 18-22 апр. 2011 г.: сб. тез. – Пущино, 2011. – С. 402-403.
21. Сыромятников М. Ю. Влияние продолжительности полета на некоторые биохимические показатели в летательных мышцах шмеля *Bombus terrestris* (L.) / М. Ю. Сыромятников, Т. М. Горбачева, А. В. Лопатин // Студент и научно-технический прогресс: материалы XLIX междунар. науч. студ. конф., 16-20 апр. 2011 г.: сб. тез. – Новосибирск, 2011. – С. 206.
22. Горбачева Т. М. Закономерности и биохимические особенности индивидуального развития *Bombus terrestris* / Т. М. Горбачева, М. Ю. Сыромятников, А. В. Лопатин, В. А. Попов // Закономерности распространения, воспроизведения и адаптаций растений и животных: материалы Всерос. конф. – Махачкала, 2010 . – С. 277-279.
23. Syromyatnikov M. Y. Effect of mitochondrial antioxidant SKQ1 on aging and biochemical parameters of Bombus terrestris / M. Y. Syromyatnikov, A. V. Lopatin, V. N. Popov // Genetics of aging and longevity: Abstracts of reports of 3rd international conference (April 06-10 2014). - Sochi, 2014. - P. 102.