



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (канд.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

03.12.14 № 163-2171-1015

на №_____ от _____

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Сыромятникова Михаила Юрьевича "Биоэнергетические характеристики митохондрий летательных мышц шмелей (*Bombus terrestris L.*)", представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - "Биохимия"

Важность насекомых-опылителей для сельского хозяйства трудно переоценить. Суммарная стоимость сельскохозяйственной продукции, получаемой с помощью этих насекомых в развитых странах, исчисляется десятками миллиардов евро. Из них значительную долю составляет тепличная продукция, опыляемая с помощью шмелей. Это обуславливает необходимость оптимизации их разведения и содержания, а значит, исключительную важность изучения метаболизма этих насекомых. В частности, основными факторами патогенеза у шмелей считаются паразитарные инфекции и новые пестициды. Последние могут являться митохондриальными токсинами, но при этом ничего не известно о функционировании митохондрий шмелей, в частности, митохондрий летательных мышц. С точки зрения фундаментальной биоэнергетики, эти митохондрии также представляют особый интерес, так как уровень метаболизма в летательных мышцах насекомых самый высокий среди животных, и митохондрии в них, по-видимому, обладают уникальными свойствами. Изучение этих свойств позволило бы гораздо лучше понять базовые принципы функционирования митохондрий в тканях с экстремальной метаболической нагрузкой.

Таким образом, можно заключить, что рецензируемая работа посвящена решению актуальной научной проблемы современной биохимии и физиологии и делает попытку решить эту проблему классическими методами современной биохимии и биофизики,

которыми, к сожалению, часто пренебрегают в эру "омиксных" технологий.

Диссертационная работа М.Ю. Сыромятникова изложена на 144 страницах по традиционному плану и состоит из Списка сокращений, Введения с описанием целей и задач исследования, Обзора литературы, раздела Объекты и методы исследования, раздела Результаты и их обсуждение, Заключения и Выводов. Затем следует список цитируемой литературы (всего 251 источник).

В Обзоре литературы приводятся необходимые данные о происхождении, строении и функциях митохондрий. Рассмотрена организация дыхательной цепи митохондрий, приведены базисные данные о строении и функционировании дыхательной цепи, сопряженном с синтезом АТФ. Также рассмотрены процессы разобщения митохондрий и генерация митохондриями активных форм кислорода. Вторая часть обзора литературы представляет наибольший интерес, поскольку рассматривает особенности метаболизма летательных мышц насекомых. В частности, обсуждается окисление пролина митохондриями, а также использование насекомыми липидов в качестве энергетического субстрата. В третьей, заключительной части анализа литературных источников приводятся данные об активных формах кислорода и основных компонентах антиоксидантных систем.

Недостатком данной части обзора литературы является, на мой взгляд, неточности такого рода, которые свидетельствуют о спешке в написании работы. Характерным примером является фраза «... перенос восстановительных эквивалентов на пируват с окислением последнего в лактат...», где автор явно имеет в виду не окисление, а восстановление. Кроме того, в главе, посвященной антиоксидантным системам не упомянуты пероксиредоксины, которые являются одной из двух основных систем (наряду с глутатионпероксидазами) элиминации пероксида водорода в клетке. При этом, пероксиредоксины фигурируют в разделе Результаты.

В разделе Материалы и методы изложены основные методические подходы, использованные автором при выполнении работы. Данный раздел достаточен для понимания экспериментальной части работы. Следует отметить, что в данном разделе представлена авторская методика выделения интактных митохондрий летательных мышц шмелей, которая позволила авторам впервые охарактеризовать параметры этих органелл.

В разделе Результаты и обсуждение подробно изложены выполненные автором эксперименты. Основные данные представлены в виде микрофотографий гелей, графиков и таблиц, что позволяет читателю самостоятельно оценить их качество, достоверность и интерпретацию результатов автором. Приведенной информации вполне достаточно, чтобы заключить о высоком методическом уровне проведенных исследований, адекватности использованных методов и высокой достоверности полученных автором данных.

Интерпретация автором полученных данных представляется убедительной и обоснованной.

Работа М.Ю. Сыромятникова посвящена изучению базовых свойств митохондрий летательных мышц шмелей и их сравнению с митохондриями млекопитающих. Исследованы параметры митохондриального дыхания на широком спектре митохондриальных субстратов, что позволило выявить наиболее вероятные субстраты, используемые митохондриями шмелей *in vivo*. На примере митохондрий шмелей впервые была проведена оценка динамики мембранныго потенциала внутренней мембраны митохондрий летающих насекомых. Анализ изменений мембранныго потенциала под действием ингибиторов и разобщителей позволил сделать вывод о значительном сходстве устройства дыхательной цепи и окислительного фосфорилирования насекомых и млекопитающих. Однако выявлены и отличия, как например большое количество окисляемых субстратов в матриксе митохондрий шмелей.

В работе подробно изучена продукция активных форм кислорода митохондриями летательных мышц шмелей. Показана зависимость скорости продукции АФК от субстрата, который используется митохондриями. Так, наибольшие значения уровня АФК были зарегистрированы в присутствии α -глицерофосфата. Источником электронов для АФК в этом случае являлся обратный перенос электронов в дыхательной цепи. В отсутствие ингибиторов дыхательной цепи, митохондрии, функционирующие на НАД⁺-зависимых субстратах практически не генерировали H₂O₂. Уровень продукции АФК положительно коррелировал с величиной мембранныго потенциала митохондрий. По оценке автора, подкрепленной экспериментальными данными, в отсутствие ингибиторов дыхательной цепи 0,3-0,8% потребляемого митохондриями кислорода идет на образование АФК. Автор считает, что это низкие значения, отталкиваясь от цифры 2%, полученной ранее в классических работах Чанса. Однако, стоит отметить, что величина 2% не так уж сильно отличается от, например, 0,8%. Кроме того, было бы корректно не сравнивать полученные данные с литературными, а провести параллельные эксперименты на митохондриях из мышц, например, мыши, и сравнить продукцию АФК на тех же субстратах. Поэтому авторская интерпретация 0,3-0,8%, как низкого уровня продукции АФК, спорная.

Несомненно удивительным результатом данной работы является обнаружение неспособности митохондрий шмелей закачивать ионы кальция. Это фундаментальное свойство митохондрий из всех до сих пор исследованных видов насекомых и млекопитающих заключается в электрофоретической закачке кальция в матрикс посредством унипорта, для которого недавно был открыт молекулярный механизм - белок MCU, митохондриальный кальциевый униporter. Способность митохондрий закачивать кальций важна как для буферной функции поддержания низкого уровня кальция в цитоплазме, так и для регуляции кальций-зависимых процессов в митохондриях, в т.ч. дыхания. Еще более интересным

является факт наличия белка MCU в митохондриях летательных мышц шмелей. Несмотря на присутствие унипортера, транспорта кальция в матрикс не происходит. Так как митохондрии многих насекомых-вредителей способны закачивать кальций, их кальциевый унипорт потенциально может являться мишенью новых селективных инсектицидов, которые будут нетоксичны для шмелей.

Несомненной фундаментальной и прикладной ценностью обладают результаты по тестированию фунгицидов, широко применяемых в теплицах, на митохондрии шмелей. Среди них обнаружены разобщители митохондрий, а также ингибиторы дыхательной цепи, что не может не сказываться на активности животных. Таким образом, можно рекомендовать исключить из использования те фунгициды, которые оказывают на шмелей негативное воздействие.

Интересным результатом является обнаружение снижения экспрессии генов антиоксидантных ферментов после продолжительного полета. Казалось бы, напротив, при увеличенной оксидативной нагрузке продукция АФК и защита от них должны усиливаться. Но этого не происходит, возможно из-за того, что все клеточные ресурсы расходуются на полет. Впечатление от данной части работы несколько снижает отсутствие контроля - какого-либо гена, не связанного с антиоксидантными путями, экспрессия которого в полете не снижалась бы. Иначе создается впечатление, что экспрессия всех генов падает, и антиоксидантные гены падают вместе с остальными.

Основными результатами работы М.Ю. Сыромятникова являются следующие:

1. Установлено, что уровень физиологического дыхания шмеля исключительно высок, как в полете, так и в состоянии покоя (практически в 8 раз выше, чем у домовой мыши).
2. Оптимальными субстратами для митохондриального дыхания являются α -глициерофосфат и смесь пируват-глутамат.
3. Митохондрии летательных мышц шмелей имеют высокие значения мембранныго потенциала.
4. Уровень продукции АФК митохондриями шмелей ниже по сравнению с общепринятыми цифрами для митохондрий млекопитающих.
5. Митохондрии шмелей не способны закачивать кальций при наличии генов, ответственных за кальциевый унипорт и его регуляцию.
6. Некоторые из широко используемых фунгицидов являются митохондриальными токсинами для шмелей.
7. В клетках шмелей присутствуют все ключевые ферментативные антиоксидантные системы.
8. Экспрессия антиоксидантных генов снижается в результате продолжительного полета.

Заключая рассмотрение диссертационной работы М.Ю. Сыромятникова , можно констатировать, что автором получены данные, обладающие несомненной фундаментальной и практической научной ценностью и новизной. Это несомненный признак полностью состоятельной кандидатской диссертации. По материалам работы опубликовано 4 работы в научных журналах, включенных в перечень ВАК, 2 патента, а также ряд работ в сборниках научных трудов и тезисов докладов. Сделанные замечания не являются принципиальными и не снижают высокую оценку данной работы. Содержание автореферата полностью соответствует содержанию диссертации. выводы диссертации корректны, обоснованы, и отражают суть полученных результатов.

Таким образом, диссертационная работа Сыромятникова Михаила Юрьевича "Биоэнергетические характеристики митохондрий летательных мышц шмелей (*Bombus terrestris* L.)" полностью соответствует п. 9. "Положения о присуждении ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013, а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - "Биохимия"

Всеволод Вадимович Белоусов,
доктор биологических наук,

руководитель Группы биологии активных форм кислорода
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997.
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12,
E-mail: vsevolod.belousov@gmail.com

Подпись Белоусова В.В. заверяю.
Ефремов Роман Гербертович, д. ф.-м.н.,
заместитель директора Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Институт биоорганической
химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

