

## **ОТЗЫВ**

**Официального оппонента на диссертацию 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.**

Диссертационная работа Сыромятникова М.Ю. посвящена изучению биоэнергетических характеристик митохондрий летательных мышц шмелей *Bombus terrestris* L. К настоящему времени о дыхательных свойствах митохондрий шмелей практически ничего не известно, поэтому данная тема является, несомненно, актуальной, как для сельского хозяйства, так и понимания фундаментальных основ функционирования электротранспортной цепи, мембранных переносчиков и систем антиоксидантной защиты насекомых.

В работе впервые были описаны основные биоэнергетические характеристики митохондрий летательных мышц шмелей. Выявлена зависимость процессов дыхания митохондрий от присутствия дыхательных субстратов для первого комплекса электротранспортной цепи, а также а-глицерофосфата и сукцината. Впервые был измерен мембранный потенциал в митохондриях летательных мышц шмелей, и показано, что в присутствии сукцината мембранный потенциал не генерируется. Кроме того, было показано, что без добавления ингибиторов на продукцию активных форм кислорода в митохондриях летательных мышц шмелей идет не более 1% потребленного кислорода. Очень интересным фактом является то, что несмотря на присутствие в геноме шмелей генов, кодирующих кальциевый унипортер MCU и его белок-регулятор, митохондрии летательных мышц шмелей не способны транспортировать кальций.

Научно-практическая значимость работы заключается в том, что понимание особенностей функционирования митохондрий летательных мышц шмеля приближает нас к созданию инновационного пестицида, не действующего на насекомых-опылителей. Так, например, в работе было показано, что ряд фунгицидов являются ингибиторами и разобщителями дыхания. Такими пестицидами могут являться вещества, блокирующие переносчики во внутренней мембране митохондрий. Кроме того, исследование влияния пестицидов на биоэнергетические характеристики митохондрий позволит составить рекомендации для тепличных хозяйств с целью оптимизации опылительной активности шмелей в теплицах.

Таким образом, актуальность и практическая значимость данной диссертационной работы не вызывает сомнений.

Диссертационная работа Сыромятникова М. Ю. изложена на 144 страницах машинописного текста и состоит из следующих основных разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Объекты и методы

исследования», «Результаты и их обсуждения», «Заключение», «Выводы», «Список использованных источников». Работа содержит 32 рисунка и 6 таблиц, список литературы включает 251 источник, в том числе 222 на иностранном языке.

Обзор литературы изложен на 42 страницах и включает в себя три основных раздела, в которых описаны характеристики митохондрий из различных организмов и особенности катаболических процессов в летательных мышцах насекомых. Последний раздел посвящен общей характеристике антиоксидантной системы и принципам ее организации. В целом, автором был проведен глубокий анализ литературы в данной области, и обзор литературы отражает общую картину имеющихся к настоящему времени знаний.

Вторая глава диссертационной работы включает 2 основных пункта: объекты и методы исследования, а также результаты и их обсуждение. В качестве объекта исследования автором выбран шмель *Bombus terrestris* L., являющийся важным объектом сельского хозяйства. Для оценки биоэнергетических характеристик митохондрий летательных мышц шмелей автор использовал все основные методы современной биоэнергетики, такие как измерения скорости дыхания митохондрий с помощью электрода Кларка, измерения мембранныго потенциала, продукции АФК и транспорта кальция. Для идентификации генов, кодирующих белки-переносчики кальция, а также основные ферменты системы антиоксидантной защиты, были использованы молекулярно-биологические методы, такие как выделение РНК и ДНК, ПЦР, обратная транскрипция и ОТ-ПЦР в реальном времени. Для детекции соответствующих белков была использована вестерн-блот гибридизация. Раздел, посвященный методам исследования, очень лаконичен и изложен всего на 9 страницах. В принципе, в нем описаны все основные методы, однако наличие в нем общей таблицы с использованными в работе праймерами сильно упростило бы восприятие экспериментального материала.

В разделе, посвященном результатам и их обсуждению, приведены данные, полученные автором по биохимическим характеристикам митохондрий и детекции генов исследуемых ферментов и транспортеров, а также их белковых продуктов. В первой части работы было показано, что скорость дыхания митохондрий существенно усиливается при переходе насекомого во взрослую стадию, а также в состоянии полета. Автор логично предполагает, что это может быть связано с формированием летательных мышц, которые содержат большое количество митохондрий. На следующем этапе исследования был впервые измерен мембранный потенциал митохондрий шмелей, и оказалось, что они генерировали стабильный потенциал при окислении пирувата. Это говорит о сходстве организации ЭТЦ насекомых и млекопитающих. Однако, в присутствии в качестве субстрата янтарной кислоты (сукцината) митохондрии летательных мышц были неспособны генерировать потенциал, что может объясняться низкой

скоростью работы дикарбоксилатного транспортера. При измерении скорости продукции АФК было выявлено, что минимальный уровень их продукции наблюдался, опять же, на сукцинате, тогда как при дыхании на а-глицерофосфате он достигал 3,4 нмоль  $H_2O_2$ /мин/мг белка. Особое внимание автор уделяет влиянию ингибиторов I и III комплексов ЭТЦ – ротенона и антимицина, соответственно. Было показано, что антимицин оказывал стимулирующее действие на выработку АФК – по-видимому, вследствие блокирования убихинонового цикла между цитохромами  $b_1$  и  $b_h$ , что приводит к увеличению времени жизни убисемихинона, который напрямую взаимодействует с кислородом с образованием супероксид-анион радикала. Ротенон, напротив, приводил к снижению скорости продукции АФК за счет блокирования обратного транспорта электронов через комплекс I. Однако, при дыхании на сукцинате ротенон имел прямо противоположный эффект, что подтверждает низкую скорость работы дикарбоксилатного транспортера – вследствие этого, сукцинат практически не проникает через внутреннюю мембрану митохондрий, и окисление эндогенных субстратов через комплекс I, блокированный ротеноном, усиливает продукцию АФК.

С помощью зонда Ca-green автором было показано, что митохондрии летательных мышц шмелей не способны транспортировать кальций. При этом, в геноме шмелей присутствуют как гены соответствующих переносчиков, так и непосредственно белок кальциевого унипортера MCU. Более того, с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени автором была показана их экспрессия и оценена динамика в состоянии покоя и полета. Это очень интересно и, несомненно, требует дальнейшего изучения.

Научно-практическая часть работы Сыромятникова М.Ю. была связана с выявлением ингибирующего и разобщающего действия некоторых фунгицидов, необходимых для оптимизации опылительной активности шмелей. Было проверено 16 пестицидов, из которых два – дитианон и дифеноконазол – оказались ингибиторами дыхания митохондрий. В ходе исследования митохондриально направленного антиоксиданта SkQ не было выявлено существенного увеличения продолжительность жизни *Bombus terrestris* L., однако, наблюдалась тенденция снижения смертности в ранние этапы жизни насекомого.

По результатам диссертационной работы опубликовано 20 научных работ, из них 4 в научных изданиях, включенных в Перечень ВАК. Имеется 1 монография и 2 патента.

Сформулированные Сыромятниковым М.Ю. выводы соответствуют поставленным целям и задачам.

Однако, работа не лишена и некоторых недостатков.

В первую очередь, хотелось бы увидеть нуклеотидные последовательности ПЦР-продуктов, полученных в результате ПЦР и ОТ-ПЦР – только после этого можно будет с уверенностью говорить об идентификации генов.

Для оценки уровня транспортера MCU в различных тканях с помощью иммуноблота (Рис. 17 и 18, стр. 91) было бы неплохо использовать какой-либо белок, который отражал бы идентичность количества белка в нанесенных образцах. Альтернативно можно было бы показать гель, окрашенный Кумасси.

Не очень понятно, почему при оценке уровня кальциевого гомеостаза для сравнения были использованы только митохондрии мозга мыши (Табл.3, стр. 90) – пробовал ли автор другие ткани?

Кроме того, автор использует огромное количество англицизмов (PCR, RT-PCR, названия всех белков расшифрованы только на английском) и «слэнга» («закачка», «наводили тризольный реагент», «сахарозная среда», «калиевая среда», и т.п.), без которых вполне можно было бы обойтись.

Это, конечно, нисколько не снижает фундаментальной и практической значимости рецензируемой работы, которая является хорошо продуманным и полноценным исследованием. Достоверность результатов не вызывает никаких сомнений, а сформулированные выводы обоснованы и убедительны. Автореферат соответствует содержанию диссертации, а в 23 публикациях автора отражены практически все результаты.

По актуальности темы, объему и важности проведенных исследований и сделанных выводов рецензируемая работа Сыромятникова М.Ю., несомненно, соответствует требованиям, предъявляемым ВАК к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия, а ее автор – Сыромятников М.Ю. – заслуживает присуждения искомой степени.

02.12.14

Кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник  
лаборатории функциональной геномики  
и клеточного стресса, Института биофизики  
клетки РАН  
142290, г.Пущино Московской области, Институтская, 3, ИБК РАН  
Тел.: +74967 739 140  
E-mail для связи: maria@icb.psn.ru

 М.Н. Тутукина



Подпись  
*М.Н. Тутукина*  
Удостоверяю *раб. начин.*

