

УДК 575.22; 577.25

**Эффект воздействия антиоксидантов
на формирование среднесрочной памяти
у мутанта *cardinal Drosophila melanogaster***

© 2018 Е.А. НИКИТИНА^{1,2,*}, Д.А. ЧЕРНИКОВА², О.В. ВАСИЛЬЕВА^{3,**}, А.В. ЖУРАВЛЕВ¹,
А.В. МЕДВЕДЕВА¹, Н.С. ДОМНИНА⁴, О.Ю. СЕРГЕЕВА⁴, В.Б. ВОЛЬЕВА⁵, Б.Ф. ЩЕГОЛЕВ¹,
Е.В. САВВАТЕЕВА-ПОПОВА¹

¹ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, Санкт-Петербург, 199034

²ФГБОУ ВО Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена,
Санкт-Петербург, 191186

³ФГУП Центральный научно-исследовательский институт конструкционных материалов «Прометей»
им. И.В. Горькина Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»
(НИЦ «Курчатовский институт» – ЦНИИ КМ «Прометей»), Санкт-Петербург, 191015

⁴ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034

⁵ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, 119334

*e-mail: 21074@mail.ru

**e-mail: olga_prometey@mail.ru

Поступила: 03.04.2018 г.

Принята в печать: 04.05.2018 г.

Одна из причин возникновения нейродегенеративных изменений в мозге – нарушение кинуренинового пути обмена триптофана, некоторые метаболиты которого (в частности, 3-гидрокскинурунин) индуцируют в клеточных культурах нейронов процессы свободнорадикального окисления и гибель клеток. Установлено, что введение полимерных антиоксидантов улучшает формирование среднесрочной памяти при стрессе у мутанта *cardinal Drosophila melanogaster*, вызванном накоплением 3-гидрокскинурунина. С целью теоретического предсказания активности фенольного антиоксиданта β-(4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилфенил)пропионовой кислоты, 3-гидрокскинурунина (который может выступать и в качестве антиоксиданта) и полиэтиленгликоля проведены квантово-химические расчеты энергии диссоциации ОН-группы, являющейся донором атома водорода, в составе каждого из этих соединений. Показано, что β-(4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилфенил)пропионовая кислота и 3-гидрокскинурунин способны с легкостью отщеплять гидроксильный атом водорода, что может обуславливать их антиоксидантные свойства.

Ключевые слова: дрозофила, квантово-химические расчеты, обучение, память, полиэтиленгликоль, фенольные антиоксиданты, 3-гидрокскинурунин.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-3-67-77

Список сокращений: АКР – активные кислородсодержащие радикалы; АФК – активные формы кислорода; ИО – индекс обучения; ИУ – индекс ухаживания; КПОТ – кинурениновый путь обмена триптофана; ТШ – тепловой шок; УРПУ – условно-рефлекторное подавление ухаживания; BDE (Bond Dissociation Enthalpies) – энтальпия диссоциации связи; 3-НОК – 3-гидрокскинурунин; PEG – полиэтиленгликоль; SSH-1L – кофилинфосфатаза Slingshot 1L; ТВРА – β-(4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилфенил)пропионовая кислота.

Одной из важнейших проблем здравоохранения на сегодняшний день является растущее число различных заболеваний нервной системы, развивающихся в пожилом возрасте и сопровождающихся прогрессирующей потерей памяти. Исследование молекулярно-биологических механизмов развития подобных патологических состояний осложнено тем, что биохимические и морфологические маркеры этих болезней поддаются изучению только на посмертных образцах мозга пациентов. Поэтому для исследования механизмов этиопатологии нейродегенеративных заболеваний и выработки терапевтических стратегий их лечения необходимо привлечение адекватных модельных объектов.

Drosophila melanogaster (плодовая муха) является одним из наиболее привлекательных среди таких объектов. Проведенное в последнее время секвенирование генома человека и дрозофилы выявило значительную степень гомологии их генов, регулирующих биологические процессы на различных уровнях организации вплоть до поведенческих и когнитивных процессов. Протеомный анализ показал, что более 70% локусов человека, связанных с развитием наследственных заболеваний, имеют гомологи у *D. melanogaster* [1]. Короткий жизненный цикл дрозофилы позволяет успешно проводить различные генетические эксперименты, в том числе исследование особенностей обучения и памяти [2].

Одной из причин возникновения нейродегенеративных изменений в мозге является нарушение кинуренинового пути обмена триптофана (КПОТ) [3]. Некоторые его метаболиты, в частности, 3-гидроксикинуренин (3-НОК), в клеточных культурах нейронов индуцируют процессы свободнорадикального окисления, вызывающие гибель клеток. Исследования показали, что окислительный стресс играет важную роль в генезисе различных патологических состояний, таких как ишемия-реперфузия, атеросклероз, сердечная недостаточность, гипертензия, почечная недостаточность, кардиомиопатия, гипертония, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, диабет. Окислительный стресс также является одной из составляющих процесса старения [4].

Мутантов КПОТ дрозофилы можно рассматривать в качестве моделей нейродегенеративных патологий у человека. Известно несколько мутантных линий *D. melanogaster*, характеризующихся дефектами кинуренинового пути метаболизма триптофана, а именно: *vermilion* (*v*, блок на уровне фермента триптофаноксигеназы, приводящий к отсутствию

кинуренинов и накоплению триптофана), *cinnabar* (*cn*, блок на уровне фермента кинуренин-3-гидроксилазы, приводящий к накоплению в мозге нейропротективного метаболита – кинуреновой кислоты) и *cardinal* (*cd*, блок на уровне фермента феноксазидсинтетазы, приводящий к накоплению в мозге 3-НОК, вызывающему окислительный стресс и нейродегенерацию). Эти мутанты представляют собой адекватные модели для экспериментального изучения роли нейропротективного и нейротоксического эффекта метаболитов КПОТ в изменениях мозговых функций, которые приводят к нарушениям памяти и локомоторного поведения.

Концепция роли окислительного стресса в патохимических механизмах нейронального повреждения при нейродегенеративных заболеваниях определяет один из путей их терапии, а именно использование антиоксидантов. Антиоксиданты – вещества, которые в малых концентрациях тормозят свободнорадикальные процессы окисления, предохраняя субстраты и клетки живых организмов от их воздействия. Как известно, в условиях окислительного стресса собственная антиоксидантная система организма не всегда способна самостоятельно замедлить процессы окисления, поэтому требуется поступление антиоксидантов извне. В настоящее время ведутся активные работы по применению антиоксидантов в практической медицине; полученные результаты неоднозначны, поэтому исследования в данной области на сегодняшний день являются чрезвычайно актуальными [5].

Целью настоящей работы было исследование воздействия водорастворимых полимерных антиоксидантов, полученных модификацией полиэтиленгликолей β -(4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилфенил)пропионовой кислотой (ТВРА), на процессы обучения и памяти у мутанта *cardinal* (*cd*) *D. melanogaster* в норме и после применения теплового шока (ТШ), который интенсифицирует продукцию активных форм кислорода [6, 7]. Экспериментальные данные об активности синтетического антиоксиданта ТВРА подкреплены квантово-химическими расчетами энтальпии диссоциации связи ароматической гидроксильной группы этого соединения, которая характеризует способность вещества выступать донором атомов водорода.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Объект исследования

Работа проведена на животных из ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и

висцеральных систем», поддерживаемого Программой ФАНО России по сохранению и развитию биоресурсных коллекций.

В качестве материала исследования использовали линии *D. melanogaster cardinal* (*cd*) и *Canton S* (*CS*) (последняя – линия дикого типа из США). Линия *cardinal* содержит мутацию *cd* (3R:94C1, ярко-красный цвет глаз), нарушающую синтез фермента феноксазинсинтетазы, что приводит к накоплению 3-гидроксикинурина, вызывающего оксидативный стресс и нейродегенерацию [8].

Развитие обеих линий дрозофил проходило при температуре $24 \pm 0,5$ °C. Мух выращивали в стаканчиках на изюмно-дрожжевой среде. Самцов собирали без эфирного наркоза и содержали индивидуально в пробирках. Исследуемые антиоксиданты в концентрации 1 мкмоль/л добавляли в состав питательной среды, на которой происходило развитие мух.

Оценка способности к обучению и формированию среднесрочной памяти у дрозофилы

Исследование проводили с использованием методики условно-рефлекторного подавления ухаживания. Метод основан на естественных для полового поведения дрозофилы стимулах [9]. В ухаживании самца за оплодотворенной самкой сочетаются два безусловных стимула – аттрактивный (стимулирующий ухаживание феромон афродизиак) и аверсивный (подавляющий ухаживание феромон антиафродизиак). Антиафродизиаком обладают только оплодотворенные самки, которые освобождают его в ответ на ухаживание самца. Результатом сочетания указанных стимулов у самцов является аверсивный эффект. Степень аттрактивности или аверсивности стимула определяется по таким реакциям животного, как приближение к стимулу или удаление от него.

Исследования проводили на взрослых самцах в возрасте 5 дней при температуре $24 \pm 0,5$ °C в первой половине дня. В качестве объекта ухаживания для самцов обеих линий использовали оплодотворенных за сутки до опыта самок линии *CS*.

ТШ осуществляли по схеме, разработанной в лаборатории нейрогенетики Института физиологии им. И.П. Павлова РАН [10]. Самцов имаго линии *CS* подвергали нагреванию в водяном термостате GFL 1086 (GFL, Германия) при температуре 37 °C в течение 30 мин за 1 ч до эксперимента. В качестве контроля использовали интактных насекомых (не подвергавшихся ТШ).

В ходе опыта пятисуточного самца тестируемой линии, не имеющего опыта полового поведения, помещали в экспериментальную камеру диаметром 15 мм и высотой 5 мм, изготовленную из оргстекла, вместе с оплодотворенной пятисуточной самкой *CS*. Этограмму поведения самца регистрировали в течение 300 с, фиксируя время появления отдельных элементов ухаживания (ориентация и преследование, вибрация, лизание, попытка копуляции), а также время выполнения элементов, не связанных с ухаживанием (побежка, прининг, покой). Регистрацию начинали через 45 с после помещения мухи в камеру. Для расшифровки и анализа данных использовали специально разработанные компьютерные программы (автор Н.Г. Камышев).

Оценку способности к обучению и формированию среднесрочной памяти проводили через разные интервалы времени: сразу после тренировки (ухаживание не имеющего опыта полового поведения самца за оплодотворенной самкой в течение 30 мин) и через 3 ч после тренировки. В каждой группе (контрольной, сразу после тренировки и через 3 ч после тренировки) тестировали не менее 20 пар мух. Для каждого самца вычисляли индекс ухаживания (ИУ), т.е. время ухаживания самца за самкой, выраженное в процентах от общего времени наблюдения. Для количественной оценки результатов обучения сразу после тренировки и через 3 ч вычисляли индекс обучения (ИО) по формуле:

$$\text{ИО} = \frac{(\text{ИУ}_n - \text{ИУ}_t)}{\text{ИУ}_n} \cdot 100\% = (1 - \text{ИУ}_t / \text{ИУ}_n) \cdot 100\%, \quad (1)$$

где ИУ_n и ИУ_t – средние значения индекса ухаживания для независимых выборок самцов, не имеющих опыта полового поведения, и самцов сразу после тренировки и через 3 ч после нее, соответственно.

Получение и изучение свойств антиоксидантов

Водорастворимые полимерные антиоксиданты получали на основе полиэтиленгликолей PEG-1 (молекулярная масса 6800) и PEG-2 (молекулярная масса 21600) (Merck, Германия) путем их химической модификации β -(4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилфенил)пропионовой кислотой (ТВРА) (Vekton, Россия) по конечным гидроксильным группам согласно работе [11]. Структура полученного полимерного продукта представлена на рис. 1.

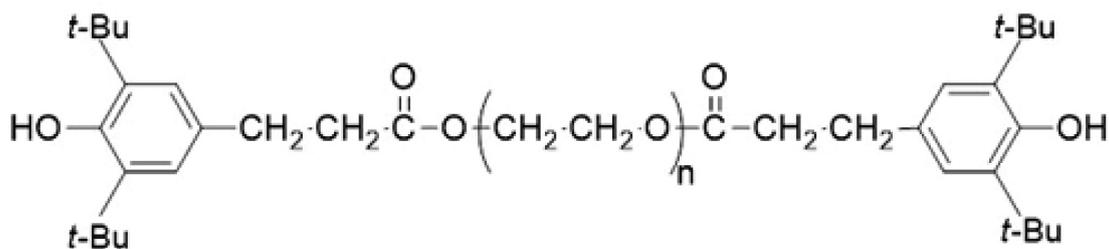


Рис. 1. Структура полимерного антиоксиданта PEG-TBPA; *t*-BU – трет-бутанол

Fig. 1. Structure of polymeric antioxidant PEG-TBPA; *t*-BU – tert-butanol

Количество TBPA, присоединенного к полиэтиленгликолю, измеряли путем анализа ультрафиолетового спектра [12]. Антирадикальную активность полученных продуктов PEG-1-TBPA и PEG-2-TBPA определяли кинетическим методом [13] по константе их взаимодействия со свободным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (Aldrich, США) в водном диоксане (Vekton) при 20 °С, которая составила $24,6 \pm 1,2$ л/(моль·с) и $21,1 \pm 1,2$ л/(моль·с), соответственно.

Источником информации о структуре L-3-гидроксикинурина (3-НОК) служил банк данных PubChem Compound. Структура тримера полиэтиленгликоля (PEG₃) и TBPA была получена с использованием программы VegaZZ [14]. Систематический поиск конформаций PEG₃ и TBPA, имеющих минимальную энергию, был осуществлен с использованием программы Avogadro [15]. Последующая полная оптимизация геометрических параметров всех молекулярных структур была выполнена с помощью программы Firefly 8.1.0, любезно предоставленной А.А. Грановским [17] и частично основанной на программе GAMESS (US) [16]. Оптимизацию геометрических параметров, расчет молекулярных орбиталей методом самосогласованного поля и расчет матрицы Гесса производили последовательно с использованием трех различных полупирических методов AM1 [18], PM3 [19] и RM1 [20], а также с применением более точного метода B3LYP/3-21G* теории функционала плотности (DFT) [21, 22]. Анализ данных квантово-химических расчетов был осуществлен с помощью программы MaSK 1.3.0. [23]. Рассматривались следующие характеристики электронного строения оптимизированных молекул, связанные с их потенциальной активностью:

– энергия высшей занятой молекулярной орбитали (E_{HOMO}), характеризующая способность вещества отдавать электрон, и энергия низшей вакан-

тной молекулярной орбитали (E_{LUMO}), характеризующая способность вещества принимать электрон;

– разность энергий E_{HOMO} и E_{LUMO} (H–L gap), характеризующая химическую стабильность вещества и его способность участвовать в окислительно-восстановительных реакциях;

– энергия диссоциации связи Н–О, рассчитываемая по формуле:

$$\Delta E = E_r + E_h - E_w, \quad (2)$$

где E_r – полная энергия радикала после диссоциации атома водорода, E_h – полная энергия атома водорода, E_w – полная энергия целой молекулы;

– энтальпия диссоциации связи, рассчитываемая по формуле:

$$BDE = \Delta E + \Delta H_t, \quad (3)$$

где ΔH_t – термодинамическая поправка энтальпии, вычисленная при 298,15 К.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Среди нейротоксических метаболитов кинуренинового пути особого внимания заслуживает 3-гидроксикинуренин, который подвержен автоокислению, легко генерирует свободные радикалы, способен претерпевать спонтанное дезаминирование и декарбоксилирование. Реализация указанных процессов приводит к появлению различных активных продуктов, ответственных за необратимые модификации белков. Кроме того, важно отметить, что при любом стрессе, связанном с формированием АФК, наблюдаются определенные нарушения КПОТ, так как скорость образования нейротоксичного 3-НОК намного выше, чем нейротрофактора кинуреновой кислоты. В этих условиях одним из вариантов снижения нежелательных окислительных превращений 3-НОК может стать введение в систему антиоксидантов, способных затормозить данные процессы.

ЭФФЕКТ ВОЗДЕЙСТВИЯ АНТИОКСИДАНТОВ

Нами исследовано влияние полимерных антиоксидантов PEG-1-ТВРА и PEG-2-ТВРА, а также исходных полиэтиленгликолей PEG-1 и PEG-2 на обучение и формирование среднесрочной памяти у дрозофил линий *CS* и *cd* при нормальной температуре

(25 °C) и после теплового шока (37 °C). Использование изучаемых добавок (PEG-1, PEG-2, PEG-1-ТВРА, PEG-2-ТВРА) в корме мух линии дикого типа *CS* не приводило к изменениям формирования среднесрочной памяти (рис. 2).

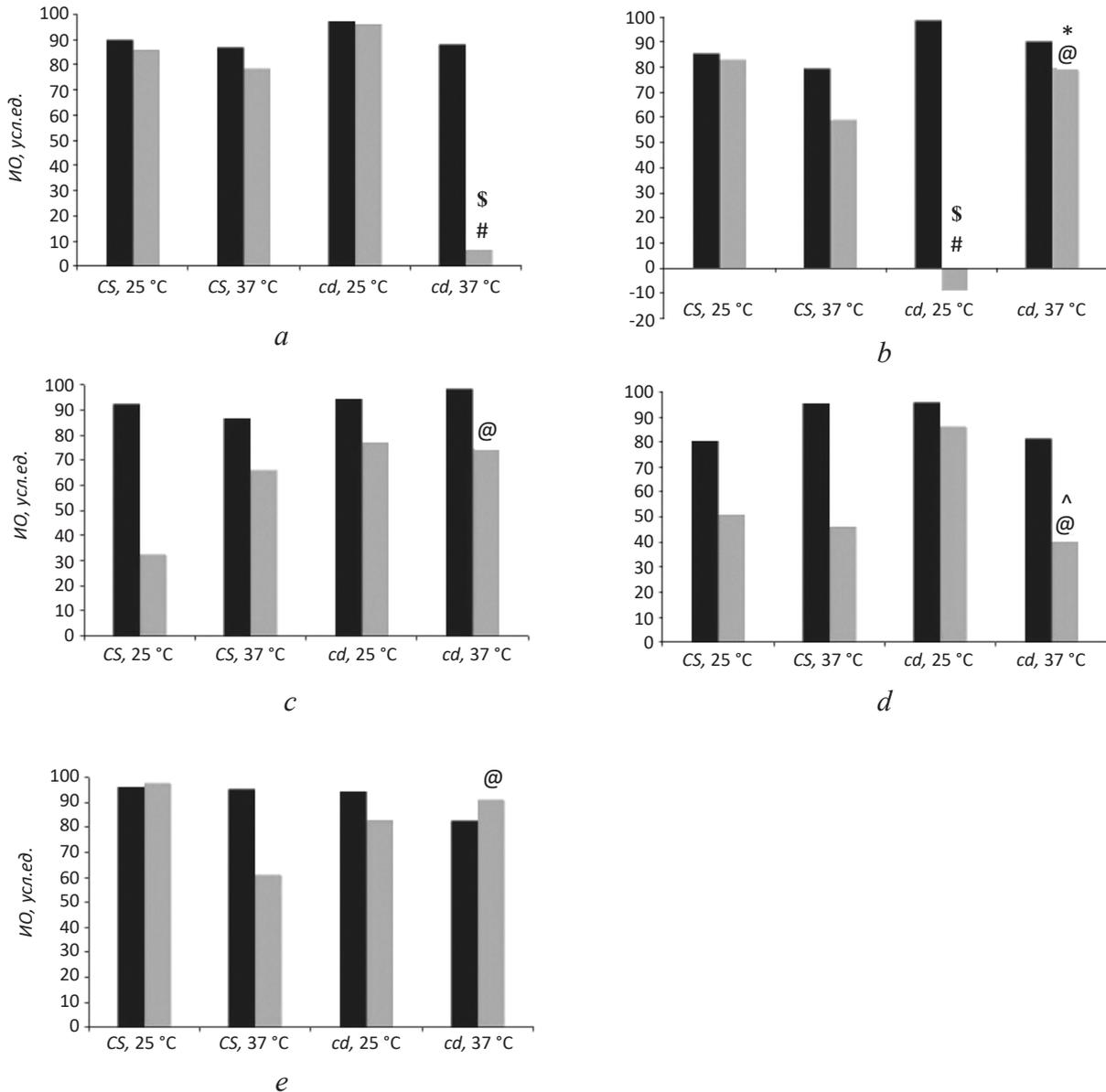


Рис. 2. Динамика сохранения условно-рефлекторного подавления ухаживания при тестировании обучения и среднесрочной памяти у самцов *D. melanogaster* линий *CS* и *cd* без (25 °C) и после (37 °C) теплового шока: *a* – контроль (в отсутствие антиоксидантов); *b* – PEG-2-ТВРА; *c* – PEG-1-ТВРА; *d* – PEG-2, *e* – PEG-1. Темные столбики – тест сразу после тренировки; светлые столбики – тест через 3 ч после тренировки. * – ИО после воздействия ТШ достоверно отличается от интактного контроля; # – ИО в отсроченном тесте достоверно ниже, чем в тесте сразу после тренировки; & – ИО достоверно ниже, чем у линии дикого типа *CS* в аналогичных условиях; @ – ИО достоверно отличается от варианта без воздействия препарата; ^ – ИО при действии PEG достоверно отличается от варианта при действии PEG-ТВРА (двусторонний тест рандомизации, $p < 0,05$)

Fig. 2. Dynamics of retaining of suppression of conditioned reflex courtship when testing learning and medium-term memory in *D. melanogaster* males of *CS* and *cd* lines without (25 °C) and after (37 °C) thermal shock: (*a*), control (without antioxidants); (*b*), PEG-2-TBPA; (*c*), PEG-1-TBPA; (*d*), PEG-2; and (*e*), PEG-1. Dark bars designate test immediately after training; light bars, 3 h after training. *, learning index (LI) after thermal shock reliably differs from intact control; #, LI in delayed test is reliably lower than immediately after training; &, LI is reliably lower than in wild type line of *CS* under analogous conditions; @, LI reliably differs from variant without oxidants; ^, LI under the action of PEG differs reliably from variant with PEG-TBPA (bilateral randomization test, $p < 0,05$)

Из рис. 2*b* видно, что при добавлении в корм PEG-2-ТВРА у мутанта *cd* в интактном контроле были выявлены нарушения формирования среднесрочной памяти. Однако при ТШ применение данного антиоксиданта привело к достоверному улучшению среднесрочной памяти. Особо следует отметить, что при добавлении вещества PEG-2 без антиоксиданта не было выявлено достоверных отличий формирования памяти у мутанта *cd* в интактном контроле (25 °С); после воздействия ТШ (37 °С) и у этого мутанта было отмечено достоверное улучшение среднесрочной памяти (см. рис. 2*d*). В то же время, применение PEG-2-ТВРА достоверно улучшало формирование среднесрочной памяти при действии ТШ по сравнению с PEG-2. Из этого следует, что PEG-2 вне зависимости от модификации антиоксидантом может оказывать благоприятное воздействие на формирование среднесрочной памяти, которое усиливается при наличии ТВРА. Нарушения же памяти в интактном контроле, связанные с действием антиоксиданта PEG-2-ТВРА, могут быть вызваны конформационными особенностями данного полимерного антиоксиданта, имеющего высокую молекулярную массу.

При добавлении в корм мух PEG-1-ТВРА в интактном контроле у мутанта *cd* не обнаружено дефектов среднесрочной памяти (см. рис. 2*c*). Добавление же данного антиоксиданта после ТШ привело к достоверному улучшению среднесрочной памяти дрозофил. Введение вещества PEG-1 в интактном контроле нарушений памяти не вызвало, а при тепловом шоке, используемом для моделирования стрессовой ситуации, добавление PEG-1 привело к достоверному улучшению среднесрочной памяти у мутанта *cd* (см. рис. 2*e*). В данном случае PEG-1 вне зависимости от наличия антиоксиданта может оказывать благоприятное воздействие на формирование среднесрочной памяти.

Анализ полученных данных позволяет сделать вывод о благоприятном воздействии на формирование среднесрочной памяти у мутантов дрозофилы линии *cd* как PEG, так и полимерных антиоксидантов на их основе. Положительный эффект внесения полимерной добавки в корм, возможно, связано с уникальными поверхностно-активными свойствами полиэтиленгликолей, обуславливающих их трансмембранное действие [24, 25].

Известно, что антиоксиданты PEG-ТВРА характеризуются высокой активностью в отношении радикальных реакций. Основным механизмом функционирования антиоксидантов – взаимо-

действие с активными радикалами, обрыв реакционных цепей и образование малоактивных радикалов.

В работе Suzuki [26] показано, что свободные радикалы стимулируют передачу сигнала в клетках, воздействуя на Ca^{2+} -каналы, помпы и транспортеры, способствуют высвобождению ионов кальция из эндоплазматического ретикула, митохондрий и Ca^{2+} -связывающих белков. Кроме того, АФК влияют на активность протеинкиназ. Непосредственно сама АКР-индуцированная трансдукция сигнала связана с посттрансляционными окислительными модификациями серосодержащих аминокислот белкового полимера, в частности, с формированием дисульфидных мостиков [27]. Важную роль АКР играют и в реорганизации цитоскелета.

Наличие редокс-чувствительных сайтов у Rho (малые клеточные сигнальные белки) ГТФаз и актина позволяет регулировать соответствующие каскады свободными радикалами, а значит обуславливать участие последних в развитии неврологических заболеваний, новообразований и болезни сердца [28]. Множество фактов свидетельствуют о роли АКР в регуляции сигнального пути RhoA/ROCK [29]. При гипоксии сниженное содержание АКР коррелирует с уменьшением активности Rac1 ГТФаз и, наоборот, активация RhoA/ROCK сопровождается формированием стрессорных фибрилл [30]. Кроме того, на ремоделирование актинового цитоскелета может влиять редокс-регуляция активности актин-связывающего белка. Существенную роль в реорганизации актина играет кофилин. Известно, что АКР увеличивает активность кофилинфосфатазы SSH-1L, что обусловлено удалением из комплекса ингибирующего белка 14-3-3 при окислении последнего. Гиперактивация пути SSH-1L–кофилин приводит к формированию актин-кофилиновых включений (палочек) [31].

При окислительном стрессе, микроишемии, старении, процессах, сопровождающихся снижением функций митохондрий, а также дефорилированием актиновых фибрилл и кофилина, происходит разборка фибрилл, ассоциация актина с кофилином и формирование из этих двух компонентов новых полимерных структур, которые в патологических случаях необратимо нарушают жизнедеятельность нейрона [32]. Учитывая тот факт, что начальным звеном системы ремоделирования актина является глутаматергический сигнальный каскад [33], АКР-опосредованное формирование актин-кофилиновых включений

при стрессорных воздействиях и является причиной нарушений среднесрочной памяти у мух линии *cd* при температурном воздействии. Вместе с тем, антиоксиданты, по-видимому, связывая свободные радикалы, снижают их содержание в клетке; соответственно падает и уровень фосфатазы Slingshot-1L и актин-кофилиновых включений. Таким образом исчезает препятствие для нейронного транспорта белков и мРНК, необходимых для формирования среднесрочной памяти, что благоприятно сказывается на индексе обучения линии *cd* после воздействия антиоксидантов.

Помимо того, что 3-НОК может индуцировать гиперпродукцию АФК в клетке в процессе окислительной димеризации, сам по себе он также обладает свойствами антиоксиданта. С целью сравнительного изучения природы антирадикальной активности 3-НОК и ТВРА были проведены квантово-химические расчеты равновесной геометрии и особенностей электронного строения этих соединений. Хорошо известно, что многие фенольные соединения, к которым относятся и 3-НОК, и ТВРА, являются антиоксидантами. Это обуслов-

лено легкостью диссоциации атома водорода ароматической гидроксильной группы, а также ее высокой способностью отдавать электрон. Результаты расчетов энтальпии диссоциации Н–О-связи для воды, PEG₃ и фенольных групп молекул 3-НОК и ТВРА тремя полуэмпирическими методами AM1, PM3 и RM1, а также методом функционала плотности B3LYP/3-21G* представлены на рис. 3; в таблице приведена структура молекул PEG₃ и использованных антиоксидантов после их модификации методом B3LYP/3-21G*.

Из вышеуказанных методов расчета наиболее точным является метод функционала плотности B3LYP/3-21G*, поскольку полученные с его помощью значения энтальпии диссоциации связи (BDE) близки к результатам неэмпирических расчетов с использованием атомных базисных функций высокого качества 6-311G** [34]; он также позволяет получить корректное значение величины полного спина радикала. Подобные расчеты ранее проводили для другого фенольного антиоксиданта, ДТВА, а также для кинурениновых метаболитов [34]. Полученный с использова-

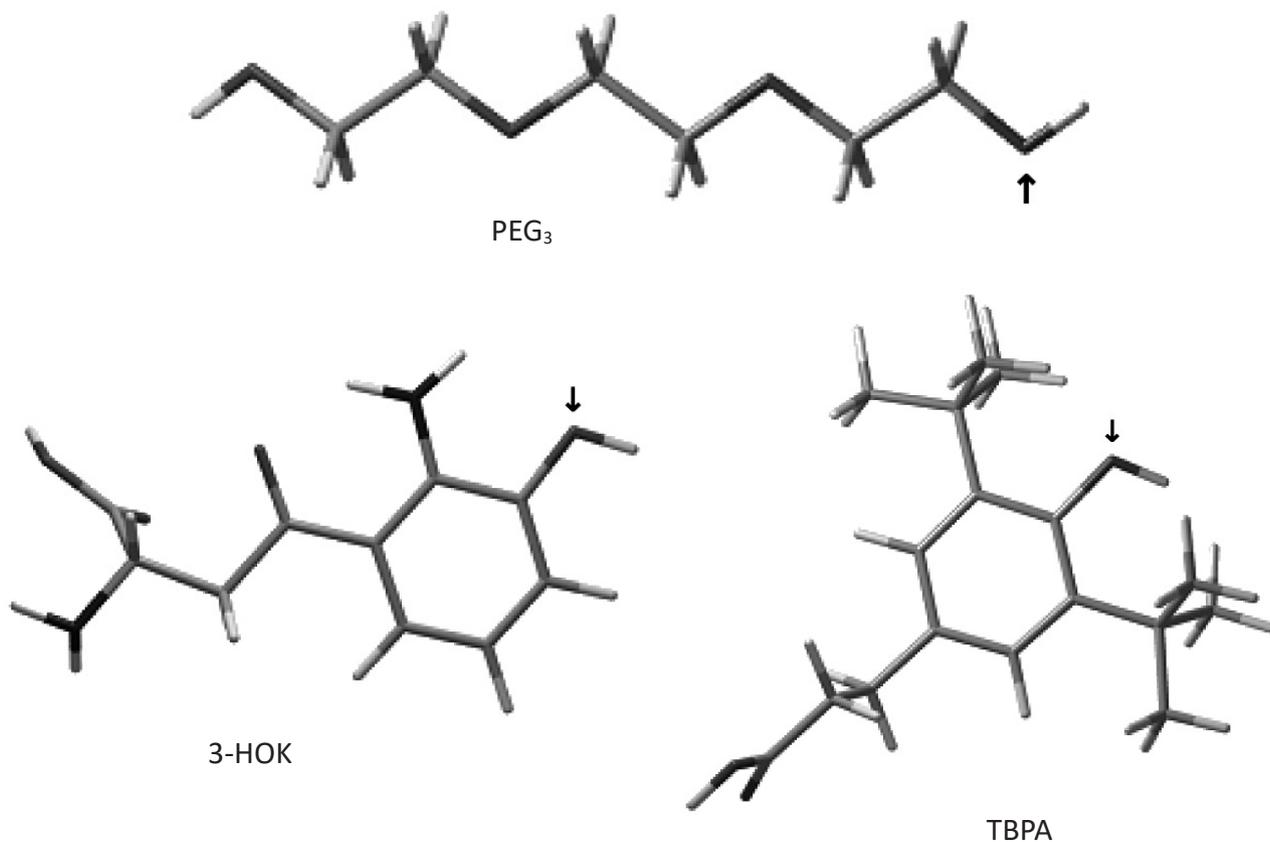


Рис. 3. Структура PEG₃, 3-НОК и ТВРА, оптимизированная методом B3LYP/3-21G*. Стрелкой указан гидроксил, отщепляющий атом водорода

Fig. 3. Structures of PEG₃, 3-HOC and TBPA optimized by method B3LYP/3-21G*. Arrows show hydrogen-releasing hydroxyl

Энтальпия диссоциации O–H-связей (BDE, ккал/моль) и энергия граничных молекулярных орбиталей (ккал/моль), рассчитанные полуэмпирическими методами и методом функционала плотности

Enthalpy of O–H bonds dissociation (BDE, kcal/mol) and energy of boundary molecular orbitals (kcal/mol) calculated by semi-empirical methods and density functional method

Соединение	AM1	PM3	RM1	B3LYP/3-21G*			
	BDE			BDE	E_{HOMO}	E_{LUMO}	H–L gap
Вода	105,437	101,515	106,418	102,330	–161,207	54,782	–215,989
PEG ₃	91,596	84,690	88,144	92,024	–149,598	43,173	–192,771
ТВРА	66,198	67,752	65,236	71,039	–133,032	3,765	–136,797
3-НОК	64,975	63,774	63,498	69,196	–117,846	–26,732	–91,114

нием трех полуэмпирических расчетных методов порядок убывания величин BDE для различных молекул оказался одинаковым: H₂O > PEG₃ > ТВРА > 3-НОК. Метод функционала плотности B3LYP/3-21G* дает тот же порядок уменьшения BDE и абсолютной величины H–L gap: H₂O > PEG₃ > ТВРА > 3-НОК. Таким образом, способность OH-группы к передаче электрона и радикала водорода минимальна для воды и максимальна для 3-НОК. Согласно нашим расчетам, 3-НОК является даже более сильным антиоксидантом, чем ТВРА. PEG₃, как и вода, не обладает антиоксидантной активностью.

Как антиоксидантные, так и прооксидантные свойства 3-НОК связаны с его орто-аминофенольной группой [35]. Катаболиты 3-НОК, такие, как ксантомматин и пероксид водорода, являются агентами прооксидантной активности этого соединения [36]. Однако, если феноксильные радикалы, образующиеся из ТВРА, являются достаточно устойчивыми и не могут инициировать радикальные процессы [37], то перекисное окисление 3-НОК приводит, наоборот, к появлению значительной прооксидантной активности, обусловленной образованием пероксида водорода и гидроксильных радикалов. Именно поэтому в случае нарушения КПОТ для снижения содержания внутриклеточных активных форм кислорода, индуцируемых 3-НОК, необходимо присутствие антиоксидантов, например, исследованных в данной работе полимерных соединений.

Таким образом, было изучено действие полимерных добавок на основе полиэтиленгликолей с разной молекулярной массой, содержащих ковалентно связанный антиоксидант (PEG-1-ТВРА, PEG-2-ТВРА) и не содержащих его (PEG-1, PEG-2), на процесс формирования среднесрочной памяти у мутанта дрозофилы *cd*, характеризующегося накоплением метаболита триптофана 3-НОК. Присутствие указанных

добавок в корме мух при 25 °С и в стрессовых условиях (тепловой шок, 37 °С) оказывает благоприятное воздействие на обучение и формирование среднесрочной памяти. Квантово-химические расчеты показали, что 3-НОК обладает антирадикальной активностью, превышающей таковую антиоксиданта ТВРА, тогда как у PEG данная активность отсутствует. Положительное влияние добавок на формирование памяти может быть обусловлено именно макромолекулярной природой PEG, способствующей конформационным модификациям водно-белковых взаимодействий. Кроме того, изучаемые полимерные антиоксиданты, связывая свободные радикалы, снижают их содержание в клетке, что может вызывать соответствующее падение уровня фосфатазы Slingshot-1L и актин-кофилиновых включений. Таким образом исчезает препятствие в процессе нейронного транспорта белков и мРНК, необходимых для формирования среднесрочной памяти. Полученные данные отвечают представлениям о согласованности биохимических каскадов в процессах адаптации к стрессорным воздействиям [38–40].

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013–2020 гг. (ГП-14, раздел 63).

ЛИТЕРАТУРА

1. Reiter L.T., Potocki L., Chien S., et al. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.*, 2001, 11(6), 1114–1125. doi: 10.1101/gr.169101
2. Журавлев А.В., Никитина Е.А., Савватеева-Попова Е.В. Обучение и память у дрозофилы: физиолого-генетические основы. *Успехи физиол. наук*, 2015. 46(1), 76–92. PMID: 25854115.

3. Savvateeva E.V. Kynurenines in the regulation of behavior in insects. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1991, 294, 319–328. doi:10.1007/978-1-4684-5952-4_29
4. Shoki O., Nobuyoshi N., Hiroshi S., Hiroshi K. 3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity. *J. Neurochem.*, 1998, 70(1), 299–307. doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.70010299.x
5. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Кандалинцева Н.В. Фенольные антиоксиданты в биологии и медицине. Структура, свойства, механизмы действия. М.: LAP Lambert Academic Publishing. 2012, 496.
6. Vierling E. The roles of heat-shock proteins in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1991, 42, 579–620. doi:10.1146/annurev.pp.42.060191.003051
7. Рихванов Е.Г., Федосеева И.В., Пятрикас Д.В. и др. Механизм функционирования кальциевой сигнальной системы у растений при действии теплового стресса. Роль митохондрий в этом процессе. *Физиол. растений*, 2014, 61(2), 155–169. doi:10.7868/S0015330314020134
8. Howells A.J., Summers K.M., Ryall R.L. Developmental patterns of 3-hydroxykynurenine accumulation in white and various other color mutants of *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.*, 1977, 15 (11, 12), 1049–1059. PMID: 414739.
9. Kamyshev N.G., Iliadi K.G., Bragina J.V. *Drosophila* conditioned courtship: two ways of testing memory. *Learn. & Mem.* 1999, 6(1), 1–20. PMID: PMC311276.
10. Никитина Е.А., Токмачева Е.В., Савватеева-Попова Е.В. Тепловой шок в период развития центральных структур мозга дрозофилы: формирование памяти у мутанта *l(1)ts403 Drosophila melanogaster*. *Генетика*, 2003, 39(1), 33–40. doi: 10.1023/A:1022062609102
11. Белостоцкая И.С., Вольева В.Б., Комиссарова Н.Л. и др. Синтез и свойства макромолекулярных эфиров карбоксизамещенных производных пространственно-затрудненных фенолов. *Журн. органич. химии*, 2010, 46(11), 1646–1651. doi:10.1134/S1070428010110060
12. Арефьев Д.В., Домнина Н.С., Сергеева О.Ю. и др. Гибридные макромолекулярные антиоксиданты на основе гидрофильных полимеров и пространственно-затрудненных фенолов. *Известия Академии наук, Серия Химическая*, 2007, 56(4), 751–760. doi: 10.1007/s11172-007-0117-x
13. Arefiev D.V., Domnina N.S., Komarova E.A., Bilibin A.Yu. Sterically hindered phenol-dextran conjugates: radical scavenging activity in water and water-organic media, *Europ. Polym. J.*, 2000, 36(4), 857–860. doi: 10.1016/S0014-3057(99)00134-2
14. Pedretti A., Villa L., Vistoli G. VEGA – an open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 2004, 18(3), 167–173.
15. Hanwell M.D., Curtis D.E., Lonie D.C. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminformatics*, 2012, 4(1), 1–17. doi:10.1186/1758-2946-4-17
16. Schmidt M.W., Baldrige K.K., Boatz J.A., et al. General atomic and molecular electronic structure system. *J. Comput. Chem.*, 1993, 14, 1347–1363. doi:10.1002/jcc.540141112
17. Granovsky A.A. Firefly version 8. Интернет-портал программы Firefly. 1997. URL: <http://classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html>
18. Dewar M.J.S., Zoebisch E.G., Healy E.F., Stewart J.J.P. Development and use of quantum molecular models. 75. Comparative tests of theoretical procedures for studying chemical reactions. *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, 107(13), 3902–3909. doi: 10.1021/ja00299a023
19. Stewart J.J.P. Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method. *J. Comput. Chem.*, 1989, 10(2), 209–220. doi:10.1002/jcc.540100208
20. Rocha G.B., Freire R.O., Simas A.M., Stewart J.J.P. RM1: a reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I. *J. Comput. Chem.*, 2006, 27(10), 1101–1111. doi: 10.1002/jcc.20425
21. Lee C., Yang W., Parr R.G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B. Condens. Matter.*, 1988, 37(2), 785–789. doi: 10.1103/PhysRevB.37.785
22. Nantasenamat C., Isarankura-Na-Ayudhya C., Naenna T., Prachayasittikul V. Prediction of bond dissociation enthalpy of antioxidant phenols by support vector machine. *J. Mol. Graph. Model.*, 2008, 27(2), 188–196. doi: 10.1016/j.jmgh.2008.04.005
23. Podolyan Y., Leszczynski J. MaSK: a visualization tool for teaching and research in computational chemistry. *Int. J. Quantum Chem.*, 2009, 109(1), 8–16. doi: 10.1002/qua.21662
24. Luo J., Borgens R., Shi R. Polyethylene glycol immediately repairs neuronal membranes. *J. Neurochem.*, 2002, 83, 471–480. doi:10.1046/j.1471-4159.2002.01160.x
25. Wu J., Zhao C., Lin W. et al. Binding characteristics between polyethylene glycol (PEG) and proteins in aqueous solution. *J. Materials Chemistry B.*, 2014, 2, 2983–2992. doi:10.1039/C4TB00253A
26. Suzuki Y.J., Forman H.J., Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Rad. Biol. Med.*, 1997, 22(1–2), 269–285. doi:10.1016/S0891-5849(96)00275-4
27. Roos G., Messens J. Protein sulfenic acid formation: from cellular damage to redox regulation. *Free Rad. Biol. Med.*, 2011, 51(2), 314–326. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.031
28. Heo J. Redox control of GTPases: from molecular mechanisms to functional significance in health and disease. *Antioxid. Redox Signal.*, 2011, 14(4), 689–724. doi:10.1089/ars.2009.2984

29. Kajimoto H., Hashimoto K., Bonnet S.N., et al. Oxygen activates the Rho/Rho-kinase pathway and induces RhoB and ROCK-1 expression in human and rabbit ductus arteriosus by increasing mitochondria-derived reactive oxygen species: a newly recognized mechanism for sustaining ductal constriction. *Circulation*, 2007, 115(13), 1777–1788. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.649566
30. Wojciak-Stothard B., Tsang L.Y., Haworth S.G. Rac and Rho play opposing roles in the regulation of hypoxia/reoxygenation-induced permeability changes in pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2005, 288(4), L749–L760. doi: 10.1152/ajplung.00361.2004
31. Kim J.-S., Huang T.Y., Bokoch G.M. Reactive oxygen species regulate a slingshot-cofilin activation pathway. *Mol. Biol. Cell.*, 2009, 20(11), 2650–2660. doi: 10.1091/mbc.E09-02-0131
32. Minamide L.S., Striegl A.M., Boyle J.A., et al. Neurodegenerative stimuli induce persistent ADF/cofilin–actin rods that disrupt distal neurite function. *Nat. Cell Biol.*, 2000, 2(9), 628–636. doi: 10.1038/35023579
33. Kim K., Lakhanpal G., Lu H.E., et al. A temporary gating of actin remodeling during synaptic plasticity consists of the interplay between the kinase and structural functions of CaMKII. *Neuron*, 2015, 87(4), 813–826. doi: 10.1016/j.neuron.2015.07.023
34. Zhuravlev A.V., Zakharov G.A., Shchegolev B.F., Savvateeva-Popova E.V. Antioxidant properties of kynurenes: density functional theory calculations. *PLOS Computational Biology*, 2016, 12(11), e1005213. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005213
35. Reyes Ocampo J., Lugo Huitrón R., González-Esquivel D., et al. Kynurenes with neuroactive and redox properties: relevance to aging and brain diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2014. doi: 10.1155/2014/646909
36. Vazquez S., Garner B., Sheil M.M., Truscott R.J. Characterisation of the major autoxidation products of 3-hydroxykynurenine under physiological conditions. *Free Radic. Res.*, 2000, 32(1), 11–23. doi: 10.1080/10715760000300021
37. Ершов В.В., Никифоров Г.А., Володькин А.А. Пространственно-затрудненные фенолы. М.: Химия, 1972, 352.
38. Каминская А.Н., Никитина Е.А., Паялина Т.Л. и др. Влияние соотношения изоформ LIMK1 на поведение ухаживания *Drosophila melanogaster*: комплексный подход. *Экол. генетика*, 2011, 9(4), 3–14. doi: 10.1134/S2079059712050024
39. Никитина Е.А., Медведева А.В., Долгая Ю.Ф. и др. Участие GDNF, LIMK1 и белков теплового шока в формировании процессов обучения и памяти у дрозофилы. *Журн. эвол. биохим. физиол.*, 2012, 48(6), 588–596. doi: 10.1134/S0022093012050076
40. Никитина Е.А., Медведева А.В., Захаров Г.А., Савватеева-Попова Е.В. Синдром Уильямса как модель изучения пути гены – мозг – когнитивные функции: генетика и эпигенетика. *Acta Naturae*, 2014, 6(1(20)), 9–23. PMID: PMC3999462

Effect of Antioxidants on Medium-Term Memory Formation in *Drosophila melanogaster cardinal* Mutant

E.A. NIKITINA^{1,2,*}, D.A. CHERNIKOVA², O.V. VASILYEVA^{3,**}, A.V. ZHURAVLEV¹,
A.V. MEDVEDEVA¹, N.S. DOMNINA⁴, O.Yu. SERGEEVA⁴, V.B. VOL' EVA⁵, B.F. SHCHEGOLEV¹,
E.V. SAVVATEEVA-POPOVA¹

¹The Pavlov Institute of Physiology, Russ. Acad. Sci., 199034, St-Petersburg

²The Herzen Russian State Pedagogical University, 191186, St-Petersburg

³The Gorynin Central Research Institute of Structural Materials “Prometey”, National Research Centre “Kurchatov Institute” (NRC “Kurchatov Institute” – CRISM “Prometey”), 191015, St-Petersburg

⁴The Saint-Petersburg State University, 199034, St-Petersburg

⁵The Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russ. Acad. Sci., 119334, Moscow

*e-mail: 21074@mail.ru

**e-mail: olga_prometey@mail.ru

Received April 4, 2018

Accepted May 4, 2018

Abstract—Disturbances of the kynurenine pathway of the tryptophan metabolism are one of the causes for the neurodegeneration development in brain. Some metabolites of this pathway (3-hydroxykynurenine) induce the processes of free radical oxidation in neuronal cell cultures that causes cell death. It has been shown that polymeric antioxidants improve middle-term memory formation in a *D. melanogaster cardinal* mutant under stressful conditions due to the accumulation of 3-hydroxykynurenine. In order to theoretically predict the activity of phenolic antioxidant β -(4-hydroxy-3,5-di-tert-bulylphenyl)propionic acid, 3-hydroxykynurenine and polyethylenglycol, quantum chemical calculations of the dissociation energy of their OH-groups, H atom donors, were performed. It was shown that β -(4-hydroxy-3,5-di-tert-bulylphenyl)propionic acid and 3-hydroxykynurenine can easily release the hydroxyl H atom which may provide their antioxidant properties.

Key words: *Drosophila*, quantum chemical calculations, learning, memory, polyethylene glycol, phenolic antioxidants, 3-hydroxykynurenine.

Acknowledgments—This study was supported by the Program of Fundamental Scientific Research of State Academies for 2013–2020 (GP-14, section 63).

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-3-67-77