ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНСТВО НАУКИ И ОБРАЗОВАНИЯ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАН

КОМИ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ

УДК 57.022+577.24

На правах рукописи

Данилов Антон Александрович

ВЛИЯНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ СИГНАЛЬНЫХ КАСКАДОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ СО СТАРЕНИЕМ, НА ПОКАЗАТЕЛИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ DROSOPHILA MELANOGASTER

Специальность: 03.02.08 – экология (биология)

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, доцент

М.В. Шапошников

Сыктывкар 2015

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 11
1.1. Взаимосвязь механизмов стрессоустойчивости и долгожительства 11
1.2. Роль внутриклеточных сигнальных каскадов в стрессоустойчивости и долгожительстве организма 15
1.2.1. Инсулин/IGF-1 сигнальный путь 15
1.2.2. PI3K/Akt сигнальный путь 17
1.2.3. TOR сигнальный путь 19
1.2.4. p38/MAPK-опосредованный сигнальный путь 22
1.2.5. Транскрипционный фактор NF-κB 24
1.2.6. Индуцибельная синтаза оксида азота iNOS 26
1.3. Фармакологическая коррекция стрессоустойчивости и продолжительности жизни 28
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 33
2.1. Лабораторные линии *Drosophila melanogaster* 33
2.2. Условия содержания *Drosophila melanogaster* 34
2.3. Исследуемые препараты 34
2.4. Анализ локомоторной активности 36
2.5. Анализ фертильности самок 37
2.6. Анализ стрессоустойчивости 37
2.7. Анализ продолжительности жизни 38
2.8. Статистическая обработка данных 38
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ 40
3.1. Адаптогенные и геропротекторные свойства фармакологических ингибиторов IGF-I/PI3K/AKT/TOR внутриклеточного сигнального каскада 40
3.2. Адаптогенные и геропротекторные свойства фармакологических ингибиторов NF-κB/iNOS сигнального пути 46
3.3. Адаптогенные и геропротекторные свойства смеси фармакологических 55

ингибиторов внутриклеточных сигнальных путей (IGF-I/PI3K/AKT/TOR и NF-κB)

3.4. Адаптогенные и геропротекторные свойства нестероидных противовоспалительных препаратов 59

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ 77

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 88

ВЫВОДЫ 91

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 93

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

НСПВП - нестероидные противоспалительные препараты

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПФН – пирофосфат натрия

1400W - N-(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamidine *анг.*

APHS - (2-hept-2-ynylsulfanylphenyl) acetate

CAY10404 - 3-(4-methylsulfonylphenyl)-4-phenyl-5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole

IGF-1 - insulin-like growth factor-1 *анг.* (инсулиноподобный фактор роста - 1)

iNOS - inducible Nitric Oxide Synthase *анг.* (индуцибельная синтаза азота)

INR - insulin-like receptor *анг.* (инсулин-подобный рецептор)

MAPK - mitogen-activated protein kinase *анг.* (митоген-активируемая протеинкиназа)

NF-κB - nuclear factor kappa-B *анг.* (ядерный фактор ядерный фактор «каппа-би»)

NS-398 - N-(2-cyclohexyloxy-4-nitrophenyl)methanesulfonamide

PDTC - пирролидин дитиокарбамат

PI3K - Phosphoinositide 3-kinase *анг.* (Фосфоинозитид-3-киназа)

QNZ - N4-[2-(4-phenoxyphenyl)ethyl]-4,6-quinazolinediamine *анг.*

Rapa – рапамицин

SC-560 - 9 5-(4-chlorophenyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-(trifluoromethyl)pyrazole

SC-58125 - 5-(4-fluorophenyl)-1-(4-methylsulfonylphenyl)-3-(trifluoromethyl)pyrazole

TOR - target of rapamycin *анг.* (мишень рапамицина)

Wm – вортманнин

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Живые системы находятся под постоянным воздействием внешних факторов разной интенсивности. Одной из актуальных задач факториальной экологии является установление механизмов реакции организма на изменение условий окружающей среды. Изменение жизнеспособности может находиться как под контролем генетических программ, так и не быть строго генетически детерминированным (Мыльников, 1997).

Согласно современным представлениям, экологические факторы, вызывающие потенциально вредные изменения на различных уровнях организации биологической системы (от молекулярно-генетического до системного), рассматриваются как стрессовые (Hoffmann, Parsons, 1991; Москалев, 2008). Сресс-факторы способны оказывать повреждающее действие на организм, но также активировать защитные механизмы (Feder, 1999; Activation of homologous recombination..., 2015). Способность адаптироваться к стрессовым воздействиям – это одно из ключевых условий успешной реализации биологической программы организма (Тодоров, Тодоров, 2003; Москалев, 2008).

В настоящее время накоплено множество фактов, свидетельствующих, что такие показатели жизнеспособности организма как стрессоустойчивость, продолжительность жизни, фертильность и локомоторная активность контролируются общими молекулярными механизмами, к которым, в частности, относятся внутриклеточные сигнальные каскады IGF-I/PI3K/AKT/TOR и NF-κB (Longo, Fabrizio, 2002; Moskalev, Shaposhnikov, 2011; Diacylglycerol lipase regulates…, 2014). Мутации в генах, кодирующих ферменты IGF-I/PI3K/AKT/TOR-каскада, вызывают увеличение продолжительности жизни модельных животных и повышают их стрессоустойчивость, но могут вести к замедлению роста, снижению фертильности и локомоторной активности (Extension of life-span…, 2001; Remarkable longevity…, 2008; Nassel et al., 2015). Увеличение активности генов, вовлеченных в NF-κB-зависимый сигнальный путь ведет к повышению устойчивости к патогенам и стресс-факторам, однако снижает

продолжительность жизни организма (Trade-offs between longevity..., 2006; Gudkov, Komarova, 2010). Таким образом, внутриклеточные сигнальные пути обеспечивают как положительную, так и отрицательную корреляцию между различными показателями жизнеспособности организма.

Из данных литературы известно, что подавление активности ферментов сигнальных путей IGF-I/PI3K/AKT/TOR и NF-κB с помощью фармакологических препаратов ведет к увеличению продолжительности жизни модельных животных (PI3-kinase inhibition…, 1999; Regulation of lifespan…, 2004; Insulin-like growth factor…, 2005; Шапошников и др., 2010; Mechanisms of life span…, 2010; Moskalev, Shaposhnikov, 2011). Однако комплексной оценки влияния фармакологических ингибиторов внутриклеточных старение-ассоциированных сигнальных путей на показатели жизнеспособности дрозофил не проводилось.

Мы предположили, что подавление активности старение-ассоциированных внутриклеточных сигнальных каскадов с помощью фармакологических препаратов приведет к увеличению таких показателей жизнеспособности как стрессоустойчивость и продолжительность жизни и не окажет отрицательного эффекта на фертильность и локомоторную активность дрозофил.

Экспериментальную работу проводили на модели плодовой мушки *Drosophila melanogaster*. Использование дрозофилы позволило проводить исследования в хорошо контролируемых лабораторных условиях, минимизируя влияние случайных факторов, а также получать достаточно объемные выборки. В качестве исследуемых показателей нами были выбраны продолжительность жизни, локомоторная активность, фертильность и устойчивость к стресс-факторам разной модальности, таким как прооксидант паракват, гипертермия и голодание. Перед оценкой стрессоустойчивости дрозофил обрабатывали фармакологическими препаратами, подавляющими активность IGF-I/PI3K/AKT/TOR и NF-κB старение-ассоциированных сигнальных каскадов, а также нестероидными противовоспалительными препаратами.

Цель и задачи исследования. Целью исследования было установление роли внутриклеточных, ассоциированных со старением, сигнальных путей в

обеспечении жизнеспособности организма и формировании устойчивости к неблагоприятным факторам среды (действие прооксиданта, гипертермия, голодание). Для достижения данной цели с использованием модели *Drosophila melanogaster* были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать влияние фармакологических ингибиторов внутриклеточных, ассоциированных со старением, сигнальных путей (IGF-I/PI3K/AKT/TOR и NF-κB, а также нестероидных противовоспалительных препаратов) на показатели жизнеспособности (продолжительность жизни, стрессоустойчивость, фертильность, локомоторная активность) особей *Drosophila melanogaster* в оптимальных условиях содержания.
2. Оценить влияние фармакологических ингибиторов внутриклеточных, ассоциированных со старением, сигнальных путей на показатели жизнеспособности дрозофил в условиях воздействия стресс-факторов (действие прооксиданта параквата, гипертермия, голодание).
3. Изучить зависимость эффектов исследуемых препаратов от концентрации и пола модельного объекта.
4. Проанализировать адаптогенные свойства совместного воздействия препаратов, характеризующихся специфичностью к различным внутриклеточным мишеням: PI3K, TOR и NF-κB.

Научная новизна. Проведено комплексное исследование влияния фармакологических ингибиторов внутриклеточных, ассоциированных со старением, сигнальных путей IGF-I/PI3K/AKT/TOR и NF-κB, а также нестероидных противовоспалительных препаратов на показатели жизнеспособности *Drosophila melanogatser*. Показано, что при использовании микро- и наномолярных концентраций препаратов происходит повышение стрессоустойчивости и продолжительности жизни организма без отрицательных последствий для фертильности и локомоторной активности. Впервые показана эффективность совместного использования ингибиторов активности PI3K, TOR и NF-κB с целью улучшения показателей жизнеспособности дрозофилы. Выявлен механизм адаптогенного действия нестероидных противовоспалительных

препаратов (НСПВП) на модели *Drosophila melanogaster*, принимающий участие в контроле жизнеспособности и стрессоустойчивости организма. Установлено, что влияние НСПВП на жизнеспособность дрозофил опосредовано ингибированием эволюционно-консервативного внутриклеточного сигнального пути Pkh2/ypk1/lem3/tat2.

Теоретическая и практическая значимость работы

На модели *Drosophila melanogaster* показано, что возможно улучшение наследственно детерминированных показателей жизнеспособности организма за счет фармакологического подавления активности ассоциированного со старением внутриклеточного сигналинга, без непосредственного изменения структуры наследственного аппарата.

Полученные данные расширяют понимание роли внутриклеточных сигнальных путей (IGF-I/PI3K/AKT/TOR и NF-κB) в формировании устойчивости целого организма к действию стресс-факторов. В отличие от генетических мутаций, фармакологически-индуцированное увеличение стрессоустойчивости и продолжительности жизни не обусловлено перераспределением ресурсов клетки в ущерб плодовитости и локомоторной активности организма.

Впервые установлены адаптогенные свойства у широко используемых медицинских препаратов (аспирин, валерил-салицилат, транс-ресвератрол, SC-560, APHS, NS-398, SC-58125, вальдекоксиб, CAY10404, ликофелон), что раскрывает возможности поиска новых областей их терапевтического применения.

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс при чтении курсов лекций «Экологическая генетика» и «Хемогеномика и хемобиокинетика» при подготовке магистров в Сыктывкарском государственном университете.

Диссертационная работа являлась разделом госбюджетной темы «Молекулярно-генетические механизмы взаимосвязи стрессоустойчивости и продолжительности жизни на модели *Drosophila melanogaster*» (№ Гр.

115012130067), разрабатываемой в лаборатории молекулярной радиобиологии и геронтологии Отдела радиоэкологии Института биологии Коми НЦ УрО РАН.

Диссертационная работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (2011 - 2013) №11-04-00956-а «Влияние активации экспрессии генов стрессоустойчивости (*PARP-1*, *DmChk2*, *Hus1*, *SpnB*, *Brca2*, *Cyp4e2*) и ингибирования активности ферментов старение-ассоциированных сигнальных каскадов (NF-kappaB, p38 MAPK, SGK-1, PKA и PKC) на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster*» и Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (2012-2013) № 14.B37.21.0198 «Влияние ингибиторов внутриклеточных ассоциированных со старением сигнальных путей (PI3K, TOR, NF-kB и COX) на максимальную продолжительность жизни».

Положения, выносимые на защиту

1. Устойчивость особей *Drosophila melanogaster* к неблагоприятному действию абиотических факторов среды (действие прооксиданта параквата, гипертермия, голодание) увеличивается при фармакологическом подавлении активности старение-ассоциированных сигнальных путей IGF-I/PI3K/AKT/TOR, NF-κB/iNOS.

2. Увеличение стрессоустойчивости и продолжительности жизни при фармакологическом подавлении активности старение-ассоциированных сигнальных путей не сопровождается перераспределением ресурсов клетки организма в ущерб локомоторной активности и фертильности.

3. Адаптогенный эффект ингибиторов старение-ассоциированных сигнальных путей зависит от концентрации препарата и пола модельного объекта *Drosophila melanogaster*.

Личный вклад автора состоит в аналитическом обзоре литературы, разработке схемы экспериментов, проведении лабораторных исследований, в обработке, анализе, интерпретации и обобщении результатов, подготовке основных публикаций по теме исследования.

Апробация и реализация диссертации

Результаты работы докладывались на научных конференциях молодых ученых Института физиологии Коми НЦ УрО РАН (Сыктывкар, 2009; 2010; 2011), Института биологии Коми НЦ УрО РАН (Сыктывкар, 2013; 2015), на международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2013; 2014), на международной конференции «Генетика старения и долголетия» (Москва, 2012; Сочи, 2014), на международной конференции «Свободные радикалы в химии, биологии и медицине» (Новосибирск, 2013), на VI съезде Вавиловского Общества Генетиков и Селекционеров (Ростов-на-Дону, 2014), Всероссийской научной конференции «Химия и фармакология растительных веществ» (Сыктывкар, 2014).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 19 работ, в том числе – 4 статьи в рецензируемых журналах из списка изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из ведения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов), выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 297 источника публикаций, в том числе 289 публикаций из зарубежных изданий. Работа изложена на 111 страницах машинописного текста и содержит 26 таблиц и 11 рисунков.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность руководителю диссертации к.б.н., доценту Шапошникову М.В. за научное руководство, терпение и помощь на протяжении всего периода работы над диссертацией. Также автор выражает особую благодарность заведующему лаборатории Молекулярной радиобиологии и геронтологии д.б.н. Москалеву А.А., а также к.б.н. Шиловой Л.А., к.б.н. Плюсниной Е.Н. за консультации и лаборанту-исследователю Земской Н.В. за помощь в осуществлении экспериментов, коллективу отдела радиоэкологии Института биологии Коми НЦ УрО РАН за полезные советы и замечания в ходе работы над диссертацией. Автор благодарен своим родителям и близким людям за их всестороннюю поддержку на протяжении всего исследовательского процесса.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Взаимосвязь механизмов стрессоустойчивости и долгожительства

Живые организмы регулярно подвергаются воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды, таких как экстремальные температуры, недостаток пищи или инфекции. Эти и многие другие факторы окружающей среды могут считаться стрессовыми. Одно из определений стресса дается Хофманом и Парсонсом: "Стресс является экологическим фактором, вызывающим потенциально вредные изменения в биологической системе" (Hoffmann, Parsons, 1991).

Старение, согласно представлениям современной науки, это многопричинный процесс. С одной стороны, он детерминирован факторами наследственности, с другой, экологическими факторами, образом жизни (Busse, 1982). Снижение способности организма сопротивляться воздействиям окружающей среды является одним из проявлений старения (Loss in oxidative stress…, 2002; Тодоров, Тодоров, 2003; Москалев, 2008). Функциональное состояние организма зависит от баланса между сопротивлением зачастую агрессивному воздействию среды и выполнением эволюционных программ, таких как продолжение рода. Способность организма эффективно сопротивляться стрессам, репарировать повреждения зависит от генетических факторов (Kirkwood, Franceschi, 1992). С возрастом накапливаются повреждения ДНК и других макромолекул, что ведет к ухудшению функционирования организма и снижает его стрессоусточивость. Все это нарушает существующий баланс процессов, протекающих в организме, что приводит к функциональным сбоям в его работе. Если раньше полагали, что нарушения в функционировании организма – есть причина старения, то сегодня они скорее определяются как его следствие. Накопление повреждений, ведущее к ухудшению функционирования, происходит из-за неспособности систем репарации и стресс-ответа адекватно реагировать на внешние воздействия. Таким образом, старый организм от молодого отличается не столько функциональными характеристиками, сколько пониженной

способностью адаптироваться к изменениям внешней среды (Фролькис, 1988). Об этом свидетельствует большая подверженность старых животных инфекционным, раковым заболеваниям, более медленное восстановление после травм (Анисимов, Соловьев, 1999). Интересно, что гены, которые отвечают за стресс-ответ, могут иметь значительное влияние на продолжительность жизни (ПЖ), как у дрожжей, нематод, дрозофил, так и у млекопитающих (Sohal, Weindruch, 1996; Murakami, Johnson, 1998; Jazwinski, 1999). Долгоживущие мутанты у дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*), круглых червей (*Caenorhabditis elegans*), мух (*Drosophila melanogaster*) и мышей характеризуются повышенной устойчивостью к голоданию, действию прооксидантов, действию высоких и низких температур (Regulation of longevity…, 2001; Longo, 2003; Is the oxidative stress…, 2009). В то же время, короткоживущие мутанты модельных организмов имеют сниженную устойчивость к неблагоприятным факторам среды (Vermeulen, Loeschcke, 2007).

Установлено, что коэффициент наследуемости продолжительности жизни у разных животных, таких как нематоды, плодовые мушки, мыши внутри линии не превышает 1%, однако между линиями он может достигать 34% у нематод (Анисимов, Соловьев, 1999). Данный факт говорит о том, что существенный вклад в скорость старения организма вносят определенные механизмы, которые контролируются генами, изменяющими с возрастом уровень своей экспрессии. Известно, что существует корреляция между ПЖ долгожителей и их кровными родственниками (Genetic influence…, 2006).

Все гены выполняют свою физиологическую функцию, обеспечивая нормальное функционирование организма. С возрастом происходит накопление повреждений ДНК (The role of DNA damage…, 2013), вследствие чего нарушается нормальная работа генов. Их продукты могут либо не работать, либо отрицательно влиять на состояние клеток и тканей. Возникают возраст-зависимые заболевания, такие как старческие деменции, атеросклероз, диабет 2 типа. Также, при недостаточной эффективности репарации развиваются синдромы преждевременного старения: синдромы Вернера, Блума, Коккейна и другие (Hoeijmakers, 2009; A mouse model of ATR-Seckel…, 2009; A mouse model…,

2012). Таким образом, гены являются не причиной старения, а его участниками. Кроме того, к старению ведет несовершенство систем сопротивления стрессу и репарации повреждений, что в свою очередь ведет к нарушению гомеостаза и снижению физиологической функциональности организма (Wang et al., 2014).

Существуют значительные различия во внутривидовой продолжительности жизни. Особи одной популяции могут гибнуть в самом начале жизни, в том числе на стадии зиготы. Другие особи могут отличаться продолжительностью жизни, значительно превосходящей средний уровень. Таких особей называют долгожителями. Среди факторов, оказывающих влияние на продолжительность жизни можно отметить генетические, куда можно отнести различия по полу и различия в генах, определяющие устойчивость организма и предрасположенность к тем или иным патологиям. Другой комплекс факторов – экологические, куда можно отнести условия окружающей среды и образ жизни. Также можно отметить эпигенетические факторы. Было показано, что, чем больше возраст долгожителя, тем меньше риск развития возраст-зависимых патологий (Health span approximates…, 2012). А, так как набор генов у человека один в течение всей жизни, можно предположить, что причина этого феномена в эпигенетической регуляции активности генов. Вместе с этим, вероятность наследования высокой продолжительности жизни повышается с возрастом долгожителя (The heritability of human…, 1996). В популяционном исследовании 2872 датских пар близнецов, родившихся между 1870 и 1900 годами установлено, что наследуемость продолжительности жизни у взрослых мужчин составляет 0.26, а у женщин 0.23 (The heritability of human…, 1996). Установлено, что долгожители отличаются не здоровым образом жизни, а скорее более высокой способностью сопротивляться стрессам (Lifestyle factors of people…, 2011)

Однако, еще значительнее различия в межвидовой продолжительности жизни. Даже в пределах класса млекопитающих различия могут достигать 10 раз. Так, продолжительность жизни гренландского кита *Balaena mysticetus* может превышать 200 лет (The transcriptome of the bowhead…, 2014; Insights into the evolution…, 2015). Некоторые виды животных практически не проявляют

признаков старения. Это, например, голый землекоп *Heterocephalus glaber*, характеризующийся необычно высокой (более 30 лет) для подобного размера грызунов продолжительностью жизни, а также устойчивостью к раковым заболеваниям и стрессовым абиотическим факторам (Genome sequencing reveals…, 2011). Феномен голого землекопа можно связать с результатами положительного отбора полезных мутаций, в том числе снижающих уровень метаболизма и регулирующих длину теломер. Роль теломер в сохранение нормальной клеточной функции была описана А. Оловниковым, а позже Э. Блекберн подтвердила роль теломер и теломеразы в защите от клеточного старения (Оловников, 1971; Greider, Blackburn, 1985). Также было показано, что у землекопов, в отличие от других млекопитающих и человека, с возрастом лишь небольшая часть генов изменяет свою экспрессию (Genome sequencing reveals…, 2011). Можно сделать вывод, что активность генов и их продуктов вносит существенный вклад в регуляцию продолжительности жизни животных. Летучие мыши (*Tadarida brasiliensis* и *Myotis velifer*), которые имеют высокую продолжительность жизни, характеризуются очень низким уровнем окислительного повреждения белков (The long lifespan…, 2009).

Активность белков и генов в клетке регулируется сложной сетью сигнальных каскадов и молекул. На пересечении различных сигнальных путей могут находиться ключевые ферменты. От активности сигнальных путей, к которым принадлежат эти ферменты, зависит функционирование различных компонентов клетки и ее судьба. К таким сигнальным путям можно отнести инсулин/IGF-1 сигналинг, TOR-путь, p38/MAPK сигнальный путь. Кроме ключевых ферментов можно отметить те продукты, которые имеют широкий спектр влияния на клетку, например, iNOS.

Так или иначе, каждый из перечисленных выше ферментов и сигнальных путей принимает участие в формировании стрессоустойчивости организма, в ответе на стресс, противодействию различным патологиям. Таким образом, продолжительность жизни и стрессоустойчивость организма оказываются

связаны. Это позволяет предположить возможность замедления старения через механизмы активации стрессоустойчивости.

1.2. Роль внутриклеточных сигнальных каскадов в стрессоустойчивости и долгожительстве организма

1.2.1. Инсулин/IGF-1 сигнальный путь

Путь сигнализации инсулина и инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1) является консервативным в эволюции и осуществляется по сходным механизмам у нематод, дрозофил и мышей (Regulation of *C. elegans* life-span…, 2000; Tatar et al., 2003; Role of insulin/insulin-like…, 2005; Broughton, Partridge, 2009). В результате активации инсулин/IGF-1 сигнального пути обеспечивается нормальный рост и развитие оранизма, поддержание метаболического гомеостаза, нормальная плодовитость. Активация инсулин/IGF-1 сигнального пути ведет к фосфорилированию и инактивации транскрипционного фактора FOXO. FOXO является основным регулятором устойчивости к окислительному, тепловому и другим видам стресса. При наступлении неблагоприятных условий: перенаселение, отсутствие пищи, FOXO поступает в ядро, где блокирует ростовые процессы и активирует механизмы стрессоустойчивости (в клетке повышается уровень белков теплового шока, ферментов SOD) (Kenyon, 2010).

Активность инсулинового сигналинга может регулироваться количеством питательных веществ, вкусом и запахом пищи (Kenyon, 2010). У дрозофил при снижении калорийности питания наблюдается увеличение продолжительности жизни. Отсутствие информации о вкусе пищи или запахе также увеличивает продолжительность жизни, повышает сопротивляемость к стрессам дрозофил и нематод (Regulation of *Drosophila*…, 2007).

У нематод снижение активности инсулин/IGF-1 сигнального пути увеличивает продолжительность жизни более, чем в 2 раза, а также может стимулировать деградацию β-амилоида, оказывая нейропротекторное действие (A *C. elegans* mutant…, 1993; Decreased insulin-receptor…, 2007). Также, нематоды со сниженной активностью инсулин/IGF-1 сигнального пути дольше сохраняют

способность к ассоциации температуры с пищей, то есть лучше сохраняют способность к запоминанию (Murakami, 2007). Было показано, что особи линий дрозофил, мутантных по генам инсулиноподобного рецептора *InR* и субстрата инсулинового рецептора *Chico* имели увеличенную продолжительность жизни (Extension of life-span…, 2001; A mutant *Drosophila* insulin…, 2001). А у мышей, гетерозиготных по рецептору IGF-1 наблюдали увеличение продолжительности жизни и устойчивости к окислительному стрессу, а также уменьшенные размеры тела (Dwarf mice…, 1996; IGF-1 receptor regulates…, 2003). Однако, не все так просто. Если снижение активности рецепторов инсулина в жировой ткани у мышей увеличивает их продолжительность жизни (Bluher et al., 2003), то снижение инсулинового сигналинга и последующая активация FOXO в мышцах, печени и головном мозге мышей, может вызвать развитие дегенеративных заболеваний, напоминающих возрастные метаболические патологии человека, связанные с инсулинорезистентностью (Tissue-specific insulin…, 2000; Loss of insulin signaling…, 2000; Diabetes and insulin in…, 2010; Class IIa histone deacetylases…, 2011; The critical role…, 2012). Ограничение калорийности питания снижает активность инсулинового пути и приводит к увеличению продолжительности жизни, повышению стрессоустойчивости модельных животных, а также снижению риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний, рака и диабета (Long-term caloric restriction…, 2006; Caloric restriction delays…, 2009). Мутации, снижающие активность инсулинового пути, представлены у долгожителей ашкенази и японских долгожителей (Association analysis between…, 2004; Functionally significant insulin-like…, 2008).

Таким образом, увеличение продолжительности жизни при воздействии на путь сигнализации инсулина и инсулиноподобных молекул опосредовано в большой степени активацией транскрипционного фактора FOXO, и переходом клетки из режима роста в режим повышенной стрессоустойчивости.

1.2.2. PI3K/Akt сигнальный путь

PI3K – компонент киназного каскада клетки, фосфорилирующий фосфатидилинозитол в положении 3D инозитольного кольца, регулирующий пролиферацию и рост клеток, ремоделинг цитоскелета, метаболизм клеток, принимающий участие в опухолевой трансформации, а также устойчивость к стресс-факторам (Engelman et al., 2006; Remarkable longevity…, 2008; Aspirin inhibits oxidant…, 2013). PI3K является одним из ключевых ферментов инсулинового пути сигнализации. Выделяют 3 класса PI3 киназ.

PI3K класса I – это гетеродиммер около 200 кДа, состоящий из каталитической субъединицы p110 (110-120 кДа) и регуляторного (адаптера) p85 (50-100 кДа), способного фосфорилировать PtdIns (Phosphatidylinositol), PtdIns 4-P и PtdIns(4,5)P2 (Hawkins et al., 1992). Каталитическая и регуляторная субъединицы связаны через iSH2-домен. Ферменты класса PI3K I контролируются внеклеточными сигналами посредством связывания с внутренними рецепторами, фосфорилированных по тирозину белками (например, рецепторами тромбоцитарного, эпидермального, инсулиноподобного факторов роста), рецепторами SRC-подобного белка тирозина или с G-белками (например, гас и Cdc42). PI3K может функционировать, как серин-треоннинновая протеинкиназа, регулируя клеточные MAP-киназы (Bifurcation of lipid…, 1998).

PI3K класса II – белки 170-210 кДа, фосфорилируют PtdIns и PtdIns 4-P, также, возможно, PtdIns(4,5)P2 (Cloning of a human…, 1997).

Класс PI3K III – представляет собой белок Vps34, способный образовывать комплекс с белком Vps15/p150. В качестве субстрата PI3K III использует только PtdIns, а конечным продуктом является PtdIns 3-P (Phosphatidylinositol 3-kinase encoded…, 1993). PI3K III принимает участие в везикулярном транспорте и процессах аутофагии (The class III PI(3)K Vps34 promotes…, 2008).

В результате связывания плекстрин-гомологичного домена киназ Akt и PDK1(phosphoinositide-dependent kinase-1) с PtdIns(3,4,5)P3 и PtdIns(3,4)P2 происходит их транслокация в плазматическую мембрану и активация (Direct

regulation of the…, 1997; King et al., 2015). PI3K/Akt сигнальный путь принимает участие в выживании и пролиферации клеток (Peltier et al., 2007).

Реакции киназного каскада позволяют протекать нормальным ростовым процессам в клетке, но, в то же время, подавляют активность определенных факторов стрессоустойчивости, таких, как транскрипционный фактор FOXO (Roy et al., 2010). То есть, наравне с нормальным делением и ростом клеток при благоприятных условиях (питания, температуры) снижается их стрессоустойчивость, что ускоряет старение организма в целом. С возрастом происходит увеличение активности PI3K. (Morgensztern, McLeod, 2005), что соответственно приводит к снижению стрессоустойчивости организма. К тому же, с повышением активности PI3K увеличивается риск развития онкологических патологий (The structure of a human…, 2007; Zhao, Vogt, 2008). Также было показано, что активность PI3K необходима для долговременной потенциации нейронов, ответственных за обучение и долговременную память (Activation of PI3-kinase…, 2003).

Установлено, что круглые черви *Caenorhabditis elegans* с пониженной активностью генов, кодирующих белки-элементы PI3K каскада, имеют существенно более высокую продолжительность жизни. Так, линия *C. elegans*, гомозиготная по нонсенс-мутации в гене *age-1*, который кодирует каталитическую субъединицу PI3K ($PI3K_{CS}$), имеет увеличенную, более чем в 10 раз, медианную и максимальную продолжительность жизни (Aspirin inhibits oxidant…, 2013). Одновременно у линии с мутацией *age-1* наблюдается задержка развития, повышенная устойчивость к окислительному стрессу и электрошоку (Aspirin inhibits oxidant…, 2013). Было установлено, что фармакологическое ингибирование PI3K приводит к увеличению продолжительности жизни у нематод (PI3-kinase inhibition…, 1999), коловраток (Insulin-like growth factor…, 2005). У дрозофилы, кроме увеличения продолжительности жизни, также было показано повышение устойчивости к ионизирующему излучению при воздействии ингибиторами PI3K (Москалев, Шапошников, 2008).

1.2.3. TOR сигнальный путь

TOR – серин/треониновая протеинкиназа, входящая в 2 мультибелковых комплекса TORC1 и TORC2 (Target of Rapamycin Complex) (Harris, Lawrence, 2003; Laplante, Sabatini, 2012). В состав TORC1 комплекса входят также белки raptor (regulatory-associated protein of TOR), mLST8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8) и PRAS40 (proline-rich PKB/AKT substrate 40 kDa) (mTOR interacts with…, 2002). Этот комплекс и осуществляет специфическую активность: рост, синтез белков, транскрипция, аутофагия (Phosphatidic acid-mediated…, 2001; mTOR interacts with…, 2002).

Ростовые факторы и инсулин активируют TORC1 через рецептор тирозинкиназы (RTK) и Akt/PKB сигнальный путь, осуществляющий фосфорилирование TSC (Tuberous Sclerosis Complex) (Mendoza et al., 2011). Киназа S6K образует петлю обратной связи, ингибируя чувствительность инсулинового рецептора к инсулину (Ma, Blenis, 2009). Этот механизм играет важную роль при развитии сахарного диабета (Ye, 2013). Ограничение калорийности питания ингибирует активность TOR, и он разрушается лизосомами (Blagosklonny, 2010). Активация TORC1 также может осуществляться по MAPK/ERK сигнальному пути, цитокинами (например, TNFα), которые также фосфорилируют и разрушают комплекс TSC, высвобождая Rheb, который активирует TORC1 (Phosphorylation and functional…, 2005; Mendoza et al., 2011; Context-Dependent Regulation…, 2012). Wnt, участвующий в контроле роста организма и пролиферации клеток регулирует активность TORC1 посредством ингибирования GSK3 (glycogen synthase kinase 3) (Majid et al., 2012). В зависимости от энергетических запасов клетки и наличия питательных веществ киназа AMP (adenosine monophosphate-activated protein kinase) может ингибировать TORC1, активируя TSC или предотвращать образование комплекса TOR с Raptor (AMPK phosphorylation…, 2008; Mihaylova, Shaw, 2011). При гипоксии HIF1α (Hypoxia-inducible factor 1- α) посредством белка REDD1

сохраняет комплекс TSC и не дает высвобождаться Rheb, что ингибирует активность TORC1 (Regulation of mTOR…, 2004).

TORC1 осуществляет фосфорилирование киназы S6K и фактора 4E-BP1 (Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1), что приводит к инициации трансляции (Ma, Blenis, 2009; Targeting the translational…, 2011).

Активация TORC1 приводит к ингибированию процессов аутофагии, необходимых для утилизации поврежденных молекул (Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in…, 2012). Одновременно с активацией трансляции это может привести к накоплению поврежденных белков в клетке. Было показано, что повышенная активность TOR, снижение аутофагии и накопление поврежденных молекул в клетке может быть причинной возникновения нейродегенеративных, сердечно-сосудистых заболеваний и диабета (Codogno, Meijer, 2005). TORC1 играет важную роль в дифференцировке и пролиферации стволовых клеток (mTOR is essential…, 2004). Повышенная активность TORC1 ускоряет старение гемопоэтических клеток, а ингибирование активности, наоборот, способствует сохранению их пула (Chen et al., 2009).

TORC2 контролирует клеточный метаболизм и организацию цитоскелета (Laplante, Sabatini, 2012). Активность TORC2 регулируется инсулином, ростовыми факторами, наличием аминокислот и питательных веществ (mSin1 is necessary for…, 2006). Рапамицин не ингибирует TORC2, однако он может ингибировать свободный TOR, не давая ему образовывать активный комплекс TORC2 (Phosphorylation and regulation…, 2005; Prolonged rapamycin treatment…, 2006). Регуляция цитоскелета осуществляется через взаимодействие с PKCα (protein kinase C α), Cdc42 (Cell division control protein 42), Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1), RhoA (Ras homolog gene family, member), паксиллин (белок трансдуктор сигналов) и стимуляцию стресс-волокон F-актина (Rictor, a novel binding partner…, 2004).

TOR является консервативным белком, он присутствует у дрожжей, нематод, дрозофил, мышей и человека. Полное выключение активности TOR у мышей приводит к смерти на эмбриональной стадии развития (Disruption of the mouse…,

2004). Однако, выключение, например, только TORC1 снижает уровень пролиферации, но не является летальным (Target of rapamycin in yeast…, 1993). Снижение активности TOR приводит к уменьшению размеров тела животных (Regulation of cellular growth…, 2000). Мутация в гене, кодирующем киназу SCH9, ортолога киназы млекопитающих S6K, приводила к увеличению продолжительности жизни дрожжей в 2 раза (Regulation of longevity…, 2001).

Так же как и PI3K TOR является проонкогеном, повышение его активности увеличивает риск возникновения новообразований (Aoki et al., 2001). Кроме того, было показано, что активность TOR влияет на развитие диабета 2 типа, ожирения и различных деменций (Johnson et al., 2013). Фармакологическое ингибирование TOR рапамицином осуществляется при образовании комплекса FKBP12-рапамицин-TOR. Ингибирование приводит к остановке клеточного цикла, переключению программы роста и развития на программу поддержания жизнеспособности и стрессоустойчивости. При кормлении мышей рапамицином наблюдали замедление развитие нейродегенерации у мышей за счет активации процесса аутофагии (Sarkar, Rubinsztein, 2008). Ингибирование TOR приводило к увеличению продолжительности жизни дрожжей (Autophagy is required…, 2009), дрозофил (Mechanisms of life span…, 2010; Moskalev, Shaposhnikov, 2010) и мышей разных линий (Rapamycin fed late…, 2009). Кроме того, ингибирование TOR повышало устойчивость дрозофил к голоданию и окислительному стрессу (Mechanisms of life span…, 2010).

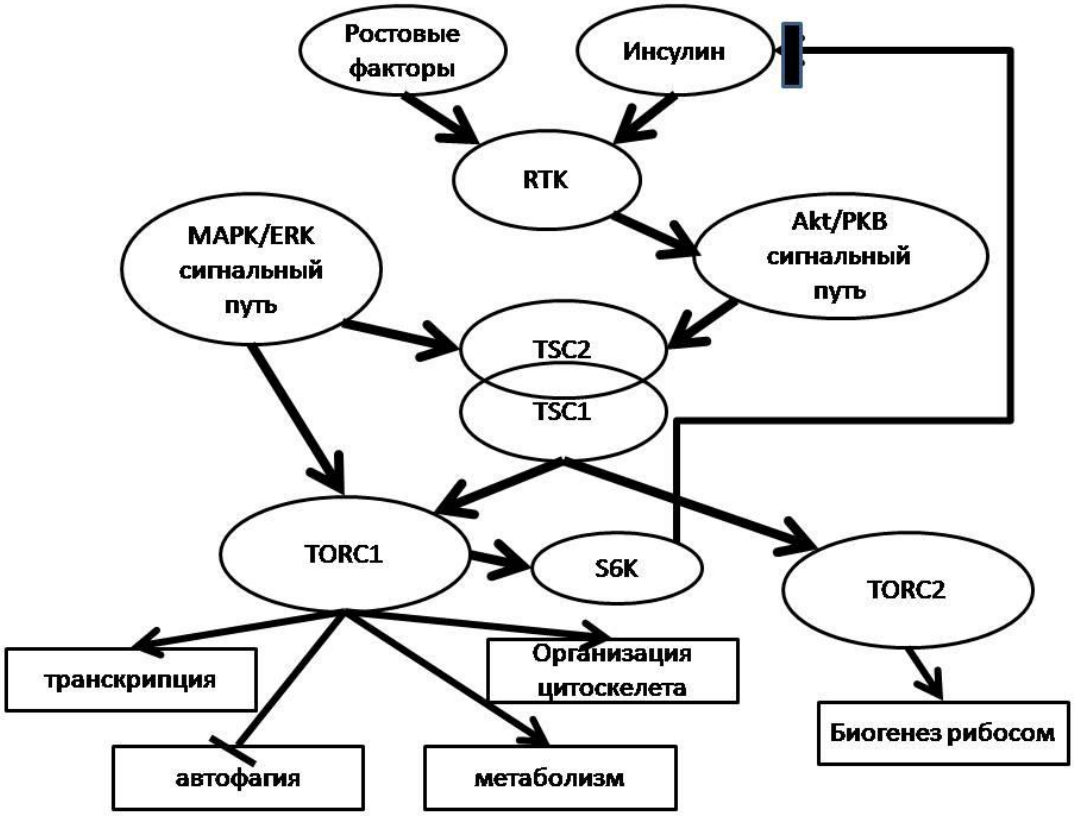


Рис. 1. Схема сигнального пути TOR.

1.2.4. P38/МАРК-опосредованный сигнальный путь

Существует 4 вида p38: α, β, γ и δ. Активация p38 инициируется внешнесредовыми сигналами. p38 – эволюционно-консервативная изоформа митоген активируемой протеинкиназы (МАРК). У млекопитающих активируется стресс-факторами (осмотически шок, УФ, тепловой шок), воспалительными цитокинами (TNF-α и IL-1) и ростовыми факторами (CSF-1) (A protein kinase involved…, 1994; Interleukin-1 activates…, 1994; A MAP kinase targeted…, 1994; A novel kinase cascade…, 1994; Hemopoietic growth factors…, 1997). Кроме того, активация p38 может осуществляться киназами МКК3 и МКК6, белком TAB1(transforming growth factor- -activated protein kinase 1 (TAK1)-binding protein) (MAPKK-independent activation…, 2002). Инактивацию p38 осуществляют группа белков МКР (MAP kinase phosphatase) (МКР-1 (3CH134), an immediate early gene…, 1993), а также другие фосфатазы, регулирующие также уровень киназ МКК (Maeda et al., 1994; Yeast HOG1 MAP kinase…, 1996; Regulation of the

Saccharomyces…, 1997; Takekawa et al., 1998). Идентифицировано несколько субстратов для p38. Прежде всего, это МК2 (MAP kinase-activated protein kinase 2), и МК3 (A novel kinase cascade…, 1994; Identification of mitogen-activated…, 1996). Данные протеин киназы, в свою очередь могут взаимодействовать с рядом субстратов, активируя их: белок теплового шока 27 (HSP27), лимфоцит-специфический белок 1 (LSP1), транскрипционный фактор CREB (cAMP response element-binding protein) и тирозин гидроксилазу (Identification of MAPKAP kinase 2…, 1992; Interleukin-1 activates…, 1994; Thomas et al., 1997; LSP1 is the major…, 1997). МК2 также фосфорилирует белок TTP (tristetraprolin), участвующий в дестабилизации мРНК (Mitogen-activated protein…, 2001). Другими субстратами для p38 являются киназы MNK1 и MNK2, фосфорилирующие eIF-4E (eukaryotic initiation factor-4e) (Mitogen-activated protein…, 1997; Fukunaga, Hunter, 1997). Кроме того, p38 активирует широкий спектр факторов транскрипции: транскрипционный фактор SRF (Serum response factor), белок ATF1 (activating transcription factor), GADD153 (growth arrest and DNA damage inducible gene 153), MEF2C (myocyte enhance factor 2C), MEF2A, MITF1 (microphthalmia-associated transcription factor), DDIT3 (DNA damage-inducible transcript 3), ELK1, NFAT (Nuclear factor of activated T-cells), p53, C/EBP (CCAAT-enhancer-binding proteins), HBP1 (high mobility group-box protein) (Pro-inflammatory cytokines…, 1995; Wang, Ron, 1996; FGF and stress regulate…, 1996; p38/RK is essential for…, 1996; Janknecht, Hunter, 1997; Activation of the transcription…, 1997; Role of p38 and JNK…, 1997; Regulation of the MEF2…, 1999; p38 kinase mediates…, 1999; A role for the p38…, 2000; The Usf-1 transcription…, 2001; The HBP1 transcriptional…, 2004; Pereira et al., 2004). Также p38 взаимодействует с cPLA2 (calcium-dependent phospholipase A2), белком Na+/H+ обменника (NHE-1), тау-белком и кератином 8 (Pyridinyl imidazoles inhibit…, 1993; Reactivating kinase/p38…, 1997; p38 Kinase is a negative…, 1998; Pervanadate-mediated tyrosine…, 1999).

Было показано участие p38 в реакциях синтеза провоспалительных цитокинов, развитии ревматоидного артрита, болезни Альцгеймера, развитии рака (A protein kinase involved…, 1994; Sequential activation of the…, 2002; Johnson,

Bailey, 2003; Sweeney, Firestein, 2004). Также p38 участвует в регуляции пролиферации и дифференцировки иммунных клеток (p38 MAPK is required…, 1998), процессе апоптоза (Opposing effects of ERK…, 1995; Kummer et al., 1997), регуляции клеточного цикла (Cdc42Hs, but not Rac1, inhibits…, 1997; Takenaka et al., 1998; Involvement of the MKK6…, 2000). Активность p38 влияет на старение клеток, ассоциированное с укорочением теломер (Iwasa et al., 2003). Выключение p38 в мышцах может приводить к повышению чувствительности к оксидативному стрессу и снижению продолжительности жизни дрозофил (A muscle-specific p38 MAPK…, 2011). Однако фармакологическое ингибирование p38 увеличивало продолжительность жизни плодовых мушек (Novel protein kinase…, 2012).

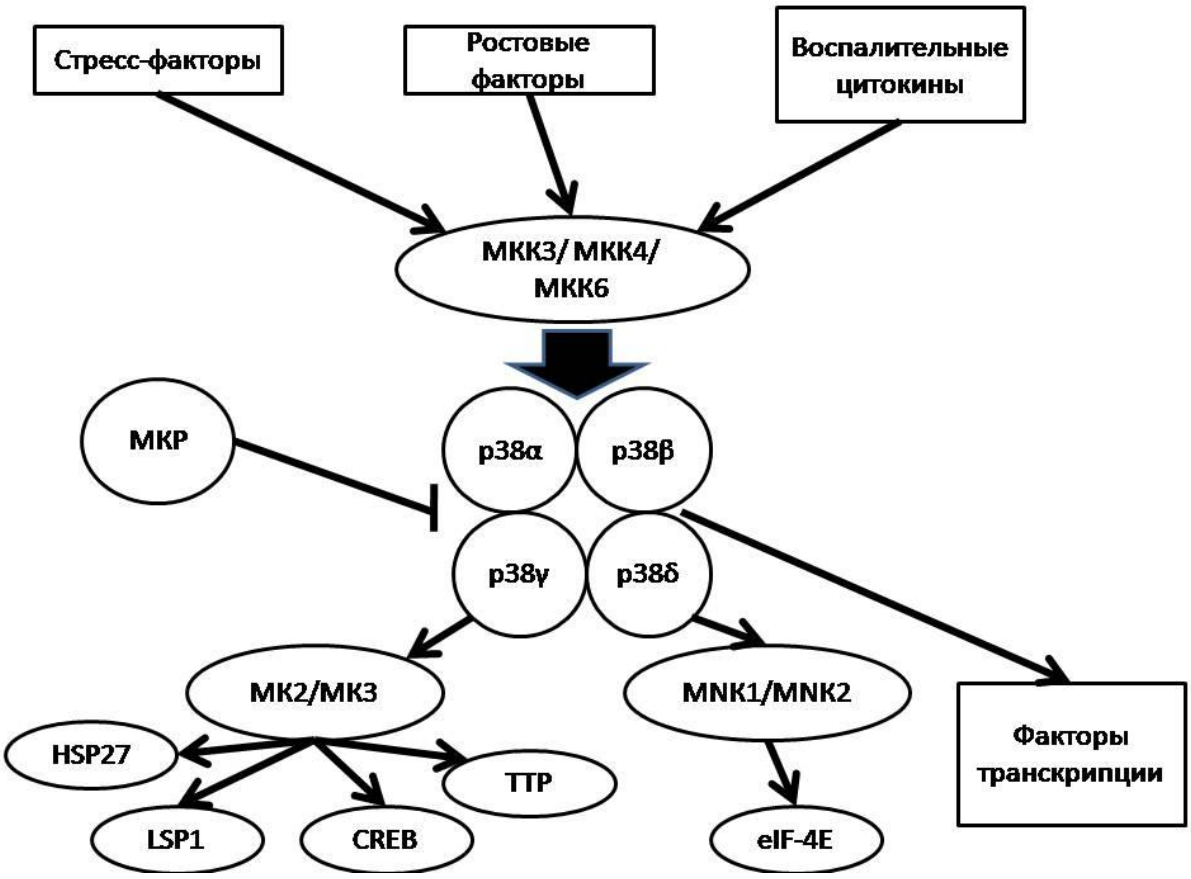


Рис. 2. Схема P38/MAPK сигнального пути

1.2.5. Транскрипционный фактор NF-κB

Транскрипционный фактор NF-κB состоит из 5 субъединиц (p50, p52, RelA, RelB, c-Rel) (Oeckinghaus, Ghosh, 2009) у млекопитающих. Принимает участие в

формировании иммунитета, регуляции синтеза цитокинов, факторов роста, а также играет важную роль в процессе эмбриогенеза, формировании костей, кожи и центральной нервной системы (Brasier, 2006; Gilmore, 2006; Perkins, 2007; Baker et al., 2011). Активация NF-κB предшествует экспрессии генов, участвующих в воспалении, антимикробных генов, а также индуцирует активность генов супероксиддисмутазы, элиминирующей активные формы кислорода (Liu et al., 1999b). 11951023. С возрастом происходит повышение активности NF-κB, что приводит к хроническому воспалению, оксидативному стрессу и дегенеративным заболеваниям (Simmonds, Foxwell, 2008; NFkappaB promotes inflammation…, 2010).

В активации NF-κB могут участвовать различные факторы: активные формы кислорода, TNFα (tumor necrosis factor α), IL-1β, бактериальные липополисахариды (ЛПС), кокаин, ионизирующее излучение (Effects of antioxidant enzyme…, 1997; The DNA-dependent protein…, 1998; Role of oxidants…, 2000; Cocaine, not morphine…, 2003; LPS induces CD40 gene expression…, 2005; Tumour necrosis factor-alpha…, 2007). Одним из основных активаторов NF-κB является RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor к B), который ингибируется остеопротегерином (RANKL, RANK, osteoprotegerin…, 2007). Toll-подобные рецепторы, отвечающие за врожденный и приобретенный иммунитет, в том числе отвечающие за рецепцию бактериальных ЛПС, также активируют NF-κB (Hayden et al., 2006; Doyle, O'Neill, 2006). Ингибирование NF-κB активности осуществляют ферменты семейства IκBs (Inhibitor of κB), локализуя его в цитоплазме (Jacobs, Harrison, 1998). Под воздействием IKK (IκB kinase), происходит фосфорилироание IκB и диссоциация комплекса IκB и NF-κB и высвобождение NF-κB (IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated…, 1997). Транслоцируясь в ядро, NF-κB активирует транскрипцию генов, с которыми имеет сайт связывания, в том числе и транскрипцию IκB, замыкая петлю обратной связи (Oscillations in NF-kappaB…, 2004). IFRD1 (Interferon-related developmental regulator 1) подавляет активность NF-κB, повышая HDAC-опосредованное ацетилирование субъединицы p65 (PC4 coactivates MyoD…, 2005).

NF-κB контролирует активность анти-апоптозных генов TRAF1 и TRAF2 (TNF receptor-associated factor 1) и активность ферментов семейства каспаз, принимающих участие в процессах апоптоза (PC4 coactivates MyoD…, 2005). В опухолевых клетках высокая активность NF-κB обычно обусловлена либо мутацией в генах самих субъединиц, либо в генах, контролирующих NF-κB. Блокирование NF-κB способно замедлить рост опухоли и сделать ее более чувствительной к другим противораковым препаратам (The transcription factor…, 2007). С другой стороны, NF-κB способен активировать FAS-опосредованный апоптоз в клетках опухоли (NF-kappaB directly…, 2012). Являясь регулятором воспаления, NF-κB участвует в развитие многих связанных с ним патологических процессах: артрите, астме, атеросклерозе (Canonical pathway of nuclear…, 2004). Кроме того, имеются данные о том, что повышенная активность NF-κB отмечается при шизофрении (The interaction of nuclear…, 2009).

Блокада NF-κB вызывала «омоложение» кожи мышей, повышение пролиферативной активности ее клеток и снижение количества маркеров клеточного старения (Reversal of aging by…, 2008). Снижение уровня активности NF-κB препятствует развитию дегенеративного фенотипа у мышей, нокаутных по гену сиртуина Sirt6, участвующего в эксцизионной репарации оснований (Kawahara et al. 2009). Также было показано, что фармакологическое подавление NF-κB увеличивает продолжительность жизни дрозофил (Moskalev, Shaposhnikov, 2011).

1.2.6. Индуцибельная синтаза оксида азота iNOS

iNOS – фермент семейства синтаз азота. В отличие от других ферментов семейства, экспрессия iNOS не является конститутивной или кальций-зависимой. Активная форма представляет из себя димер с заключенным в него гемом (Nitric oxide synthases…, 2001; Distinct dimer interaction…, 2002). Активация происходит при появлении провоспалительных сигналов, таких как интерлейкин 1 (IL-1) или фактор некроза опухолей α (TNFα) (Nitric oxide…, 1994). Также активность iNOS контролируется регуляторным фактором интерферона (Higher harmonic

anisotropic…,). На уровне транскрипции iNOS может регулироваться протеинкиназой C (PKC), тирозинкиназой, митоген-активируемой протеинкиназой (MAPK) (Wang et al., 1999; Antioxidant enzymes suppress…, 2001; Lahti et al., 2002). iNOS имеет сайты связывания с транскрипционными факторами NF-κB, C/EBT, CREB и STAT (In murine 3T3 fibroblasts…, 1996; Marks-Konczalik et al., 1998; Cytokine induction of…, 1998).

Продуцируемый iNOS оксид азота (NO) может выступать в роли нейротрансмитера, регулятора тонуса сосудов, участвовать в иммунном ответе. Радикал NO· может выступать в качестве цитотоксического агента, принимать участие в патологических процессах, в том числе воспалительных (Moncada, Higgs, 1991; Bogdan, 2001). Кроме того, высокие концентрации NO· могут ингибировать элементы дыхательной цепей митохондрий (Brown, 2001). При взаимодействии с супероксидом образует пероксинитрит (ONOO-), который может повреждать белки, углеводы, липиды и ДНК клеток и нарушать их функционирование (Nitric oxide regulation…, 2000). Пероксинитрит может повреждать элементы дыхательной цепи митохондрий и необратимо ингибировать процесс дыхания, а также ингибировать работу глутатионпероксидазы и снижать уровень внутриклеточных антиоксидантных ферментов (Antioxidant enzymes suppress…, 2001). Активатор протеина-1 (AP-1) и PI3K могут выступать в качестве ингибиторов транскрипции iNOS (Cytokine induction of…, 1998; Negative regulation…, 1999).

Влияние iNOS на скорость старения и развитие возраст-зависимых патологий нельзя оценить однозначно. Было также показано, что NO и iNOS могут быть вовлечены в развитие сердечно-сосудистой, легочной, опорно-двигательной неврологической патологии и рака (Foster et al., 2009; Tang et al., 2012). Кроме того, повышенная активность iNOS отмечена при старение-ассоциированной инсулинорезистентности (Targeted disruption of inducible…, 2013). Сверхактивация iNOS ингибировала репарацию ДНК (Tang et al., 2012). Нокаутные по гену *iNOS* мыши характеризуются снижением продолжительности жизни, однако сверхактивация этого гена приводит к увеличению риска сердечно-

сосудистой патологии (Nitric oxide synthases…, 2009). Фармакологическое блокирование iNOS снижает риск сердечно-сосудистой патологии у крыс, а также оказывает нейропротекторное действие (Inhibition of iNOS protects…, 2010; Neuroprotection by the selective…, 2011). Следовательно, как сверхактивация, так и полное подавление iNOS могут приводить к негативным последствиям для организма (Nitric oxide synthases…, 2009).

1.3. Фармакологическая коррекция стрессоустойчивости и продолжительности жизни

В настоящее время появляется все больше информации о препаратах, способных влиять на скорость старения и продолжительность жизни модельных животных. Часть этих веществ относится к гериатрическим и адаптогенным препаратам, которые призваны облегчить симптомы старости, помочь при каких-либо возраст-зависимых заболеваниях. Другую часть препаратов можно отнести к так называемым геропротекторам, то есть веществам, защищающим от старения. Механизмы действия геропротекторов могут быть различны. Было показано, что гормоны, иммуномодуляторы, антиоксиданты, нейротропные и антидиабетические средства могут увеличивать продолжительность жизни у крыс и дрозофил (Prolongation of the life-span…, 1974; Dilman, Anisimov, 1980; McCarty, 1994; Anisimov et al., 1998; Izmaylov, Obukhova, 1999).

Интересной группой препаратов являются ингибиторы внутриклеточных ферментов, сигнальных молекул и элементов сигнальных каскадов. В недавнем исследовании на нематоде *Caenorhabditis elegans* ряда веществ с известным фармакологическим действием у млекопитающих (1280 потенциальных геропротекторов), 60 веществ оказали положительное влияние на продолжительность жизни, а 33 из этих 60 также увеличивали устойчивость нематод к окислительному стрессу. 89% из 60, имеют среди своих мишеней белки, вовлеченные во внутриклеточные сигнальные каскады (A pharmacological network…, 2014). Эти сигнальные белки во многих случаях находятся на пересечении различных сигнальных путей, являясь ключевыми, определяющими судьбу клетки. Также, часто мутации в генах, кодирующих эти белки, или их

сверхактивация приводят к резкому увеличению продолжительности жизни модельных животных. Примером может служить ген PI3K, мутация в гомологе этого гена у нематод увеличивает их продолжительность жизни в 10 раз (Remarkable longevity…, 2008). При ингибировании IKK-β и NF-κB в гипоталамусе или мозге у старых мышей наблюдается замедление старения и увеличение продолжительности жизни на 20% (Zhang et al., 2013). Ингибирование также приводит к увеличению продолжительности жизни дрозофил (Moskalev, Shaposhnikov, 2011). Кроме того, ингибирование IκB киназы предотвращает стресс-индуцированное клеточное старение у мышей (NF-kappaB inhibition…, 2012).

Нарушения в обмене и гомеостазе белков, происходящие при старении, приводят к различным заболеваниям: болезни Паркинсона, Альцгеймера, Гентингтона (Selkoe, 2003). В связи этим представляют интерес препараты, предотвращающие накопление патологических белков. Было показано, что препараты, способствующие расщеплению или утилизации патологических белков, могут увеличивать продолжительность жизни модельных животных (Reserpine can confer stress…, 2008; Arya et al., 2009; The novel hydroxylamine…, 2011; Amyloid-binding compounds…, 2011).

Антиоксиданты в течение долгого времени считали перспективным средством, способным замедлять старение и увеличивать продолжительность жизни. Это соответствовало предложенной Д. Харманом свободнорадикальной теории старения и ключевой роли митохондрий в этом процессе (Harman, 1972). Существует ряд работ, демонстрирующий увеличение продолжительности жизни модельных животных, после воздействия антиоксидантами (Izmaylov, Obukhova, 1999; Extension of life-span…, 2000; Coenzyme Q10 can prolong…, 2004; Comparative approaches to facilitate…, 2007). Однако дальнейшие исследования показали, что окислительный стресс небольшой интенсивности, оказывая горметический эффект, способен увеличивать продолжительность жизни (Extension of lifespan…, 2011). Кроме того, увеличение уровня экспрессии антиоксидантых ферментов у мышей не приводило к увеличению

продолжительности жизни (Overexpression of Mn superoxide…, 2009), а длительное кормление мышей антиоксидантами не снижало риск развития возрастной патологии (Effects of antioxidant…, 2007). Таким образом, хотя применение антиоксидантов может помочь в сохранении окислительного баланса, нельзя говорить о достоверной и высокой эффективности антиоксидантов, как геропротекторов.

В последнее время появляются данные о геропротекторной активности соединений, либо открытых недавно, либо уже давно использующихся в научных исследованиях или в лечении различных заболеваний. Тиофлавин-Т, долгое время использовавшийся в качестве флуорисцентного красителя, увеличил продолжительность жизни нематод за счет связывания с амилоидным белком и торможения развития возрастной патологии (Amyloid-binding compounds…, 2011). Фулерены – молекулярные соединения, относящиеся к классу аллотропных форм углерода, увеличили продолжительность жизни мышей (A carboxyfullerene SOD mimetic…, 2008).

Многие лекарственные препараты в настоящее время начинают рассматриваться как средства, способные замедлить старение и увеличить продолжительность жизни. К ним можно отнести противораковые и противовоспалительные средства. В нашей лаборатории было показано, что фармакологическое ингибирование киназ PI3K и TOR, а также транскрипционного фактора NF-κB увеличивает продолжительность жизни особей *Drosophila melanogaster* (Moskalev, Shaposhnikov, 2010; Moskalev, Shaposhnikov, 2011).

Как было показано в главе 1.2.1, хроническое воспаление может являться причиной нарушения функционирования клеток и тканей, приводящего к различным патологиям и старению организма. В связи с этим подавление хронического воспаления различными методами, в том числе фармакологическими, является одним из возможных путей увеличения продолжительности жизни и защиты от возраст-ассоциированых заболеваний. Было показано, что нестероидные противовоспалительные препараты (НСПВП)

способны увеличивать продолжительность жизни дрожжей (Enhanced longevity by…, 2014), нематод (Celecoxib extends…, 2011), дрозофил (Enhanced longevity by…, 2014) и мышей (Nordihydroguaiaretic acid…, 2008; Cyclooxygenase-2 inhibitors…, 2012). Также их применение снижает темпы развития нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и болезнь Гентингтона (Breder, 1997; Black, 2002; The molecule role ontology…, 2004; Cyclooxygenase-1 inhibition…, 2013). НСПВП оказывают противоопухолевый эффект и стимулируют апоптоз (Potentiation of the antitumor…, 2007). Кроме того, для данного класса соединений была показана антиоксидантная и мембранопротекторная активность (The *in vitro* effects…, 1999; Orhan, Sahin, 2001) на молекулярном (Liposomes as carriers of the lipid…, 2013), клеточном и организменном уровнях (Protective effect of resveratrol…, 2008; Kalonia et al., 2011).

Природные соединения также могут позиционироваться как адаптогены и средства против старения. Чаще всего это экстракты из растений, имеющие в своем составе большой комплекс биологически активных веществ, обычно полифенолов, оказывающих антиоксидантый и противовоспалительный эффект (Ginkgo biloba extract…, 2002; Blueberry polyphenols increase…, 2006; The effects of pectins…, 2014).

При старении организма накапливается большое количество повреждений и ошибок в функционировании разных систем. Эти нарушения приводят к патологиям, которые и являются проявлением старения. Причиной же этих нарушений часто является снижение способности клеток и тканей восстанавливаться и утилизировать метаболиты или токсины. Препараты, описанные в данном разделе оказывают геропротекторный эффект на организм, в том числе через повышение устойчивости к внешним воздействиям и нейтрализации негативных эффектов стрессовых реакций. Возможность фармакологической коррекции продолжительности жизни позволит нам экстраполировать данные, полученные на модельных животных на человека, когда невозможно проводить генетические вмешательства. Применение

геропротекторов в молодом возрасте позволит эффективно регулировать функциональное состояние организма и выстроить оптимальную стратегию для продления жизни. Однако прежде необходимо подробное изучение влияния геропротекторов на физиологические показатели, такие как фертильность, локомоторная активность и уровень основного обмена.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Лабораторные линии *Drosophila melanogaster*

В экспериментах были использованы мухи, полученные из коллекции Международного дрозофилиного центра (Блумингтон, США). При изучении эффектов фармакологического ингибирования внутриклеточных старение-ассоциированных сигнальных путей на жизнеспособность и стрессоустойчивость в качестве объекта использовали особей *Drosophila melanogaster* линии дикого типа *Canton-S*.

Для изучения роли Pkh2/ypk1/lem3/tat2 сигнального пути в эффектах, оказываемых на дрозофил нестероидными противовоспалительными препаратами (НСПВП), были использованы следующие линии:

Линия с нокаут мутацией:

tat2/CG14741 (#18847, генотип: w^{1118}*; PBac{WH}ATP8B*^{f05203}) – линия с нокаут мутацией в гене триптофановой пермеазы *tat2/CG14741* (Mutational analysis of the traffic..., 1994).

Линии с конструкциями для РНК-интерференции:

Pkh2/Pdk1RNAi (#27725, генотип: y^1 v^1; *P{TRiP.JF02807}attP2*) – линии с *RNAi* конструкцией для подавления экспрессии гена *Pkh2/Pdk1* (Functional counterparts…, 1999).

ypk1/S6kRNAi#1 (#41702, генотип: y^1 v^1; *P{TRiP.HMS02267}attP2*) и *ypk1/S6kRNAi*#2 (#41895, генотип: y^1 *sc** v^1; *P{TRiP.GL01327}attP2*) – линии с *RNAi* конструкцией для подавления экспрессии гена *ypk1/S6k* (Regulation of lifespan…, 2004).

lem3/CG8679RNAi (#38348, генотип: y^1 v^1; *P{TRiP.HMS01816}attP40*) – линии с *RNAi* конструкцией для подавления экспрессии гена *lem3/CG8679* (The *Drosophila melanogaster* LEM-domain..., 2006).

Драйверная линия:

Act-GS (#9431, генотип: *P{hsFLP}12*, y^1 *w**; *P{UAS-GFP.S65T}Myo31DFT2*; P*{Act5C(-FRT)GAL4.Switch.PR}3/TM6B, Tb1*) с мифепристон-индуцируемым драйвером *GAL4,* экспрессия которого находится под контролем активного во всех тканях промотора гена актина 5С.

Для подавления экспрессии генов Pkh2/ypk1/lem3/tat2 сигнального пути проводили скрещивания самок линий с РНК-интерференцией и самцов драйверной линии. Потомство первого поколения отбирали для проведения экспериментов. Опытных мух, обрабатывали мифепристоном (RU486, Sigma), содержащимся в составе дрожжевой пасты в концентрации 250 мкг/мл. Контрольных мух содержали на дрожжевой пасте без добавления мифепристона (Characterization of the..., 2008).

2.2. Условия содержания *Drosophila melanogaster*

Мух содержали в термостате при 25°С и 12-часовом режиме освещения в емкостях объемом 120 мл с 20 мл агарно-дрожжевой питательной среды. Использовали питательную среду следующего состава (на 1 л): дрожжи сухие – 8 г, агар – 7 г, сахар – 30 г, крупа манная – 30 г, кислота пропионовая – 20 мл (Ashburner, 1989). Для получения экспериментальной выборки дрозофил родительских особей предварительно рассаживали в емкости с питательной средой в количестве по 10 самцов и самок и оставляли на 24 ч для откладки яиц. После появления имаго мух наркотизировали парами эфира и разделяли по полу, далее рассаживали в емкости с питательной средой по 30 штук для анализа продолжительности жизни, стрессоустойчивости и активности, по 20 особей для анализа плодовитости.

2.3. Исследуемые препараты

Исследуемые препараты (табл. 1) наносили на поверхность питательной среды в составе дрожжевой пасты. Имаго дрозофил обрабатывали на протяжении всей жизни следующими веществами в указанных концентрациях:

Ингибиторы PI3K/AKT/TOR сигнального пути: вортманнин, рапамицин

Ингибиторы NF-κB/iNOS сигнального пути: PDTC, QNZ, 1400W.

Нестероидные противовоспалительные препараты: аспирин, валерил-салицилат, транс-ресвератрол, SC-560, APHS, NS-398, SC-58125, вальдекоксиб, CAY10404, ликофелон.

Таблица 1

Исследуемые препараты и их обозначения

Обозначение	Мишень	Название согласно официальной номенклатуре ИЮПАК	Используемые концентрации, мкМ	Ссылки на литературу
Вортманнин	PI3K	1R,3R,5S,9R,18S)-18-(Methoxymethyl)-1,5-dimethyl-6,11,16-trioxo-13,17-dioxapentacyclo[10.6.1.0^{2,10}.0^{5,9}.0^ {15,19}] - nonadeca-2(10),12(19),14-trien-3-yl-acetat	0.005, 5	(Wortmannin, a potent and selective…, 1994)
Рапамицин	TOR	3S,6R,7E,9R,10R,12R,14S,15E,17E,19E,21S,23S,26R,27R,34aS)-9,10,12,13,14,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-hexadecahydro-9,27-dihydroxy-3-[(1R)-2-[(1S,3R,4R)-4-hydroxy-3-methoxycyclohexyl]-1-methylethyl]-10,21-dimethoxy-6,8,12,14,20,26-hexamethyl-23,27-epoxy-3H-pyrido[2,1-c][1,4]-oxaazacyclohentriacontine-1,5,11,28,29(4H,6H,31H)-pentone	0.005	(Structure of the human…, 2010)
PDTC	NF-κB	Pyrrolidine-1-carbodithioic acid	1.25, 12.5, 125	(Dithiocarbamates as potent…, 1992; Liu et al., 1999b)
QNZ	NF-κB	N4-[2-(4-phenoxyphenyl)ethyl]-4,6-quinazolinediamine	0.03, 0.3, 3	(Discovery of quinazolines …, 2003)

1400W	iNOS	N-(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamidine	0.03, 0.3, 3	(1400W is a slow…, 1997)
Аспирин	*	2-(acetoxy)benzoic acid	0.05, 0.5, 1	
Валерил-салицилат	*	acetyl 2-pentanoyloxybenzoate	0.05, 0.5, 1	
Транс-ресвератрол	*	5-[(E)-2-(4-hydroxyphenyl)ethenyl]benzene-1,3-diol	0.05, 0.5, 1	
SC-560	*	5-(4-chlorophenyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-(trifluoromethyl)pyrazole	0.05, 0.5, 1	
APHS	*	2-(hept-2-ynylsulfanylphenyl) acetate	0.05, 0.5, 1	
NS-398	*	N-(2-cyclohexyloxy-4-nitrophenyl)methanesulfonamide	0.05, 0.5, 1	
SC-58125	*	5-(4-fluorophenyl)-1-(4-methylsulfonylphenyl)-3-(trifluoromethyl)pyrazole	0.05, 0.5, 1	
Вальдекоксиб	*	4-(5-methyl-3-phenyl-1,2-oxazol-4-yl)benzenesulfonamide	0.05, 0.5, 1	
CAY10404	*	3-(4-methylsulfonylphenyl)-4-phenyl-5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole	0.05, 0.5, 1	
Ликофелон	*	2-[2-(4-chlorophenyl)-6,6-dimethyl-1-phenyl-5,7-dihydropyrrolizin-3-yl]acetic acid	0.05, 0.5, 1	

Примечание: * Для НСПВП показана способность ингибировать ферменты Pkh2/ypk1/lem3/tat2 пути у дрожжей и нематод (Celecoxib extends…, 2011; Enhanced longevity by…, 2014).

Смеси препаратов:

Для оценки совместного действия на жизнеспособность и стрессоустойчивость ингибиторов различных сигнальных путей использовали следующие комбинации:

- смесь 5 мкМ рапамицина и 5 мкМ вортманнина, для совместного ингибирования TOR и PI3K.

- смесь 125 мкМ PDTC и 0.005 мкМ рапамицина, для совместного ингибирования NF-κB и TOR.

- смесь 125 мкМ PDTC и 0.005 мкМ вортманнина, для совместного ингибирования NF-κB и PI3K.

2.4. Анализ локомоторной активности

Динамику изменения локомоторной активности оценивали на протяжении всей жизни с помощью аппаратно-программного комплекса “Drosophila population monitor” (TriKinetics Inc., США). Интервал между измерениями составлял от трех до десяти дней. Измеряли спонтанную локомоторную активность (в течение 3 мин) и проводили тест на отрицательный геотаксис (мух стряхивали на дно пробирки и измеряли движение в течение 20 сек в 3 повторностях). Для теста на отрицательный геотаксис считали среднее арифметическое для трех повторностей, чтобы нивелировать воздействие случайных факторов. Далее вычисляли средний уровень активности на одну муху. Измерения в каждом варианте проводились до тех пор, пока в живых оставалось достаточное для анализа количество мух (30 шт.).

2.5. Анализ фертильности самок

Динамику изменения фертильности анализировали на протяжении всей жизни с интервалом от трех до десяти дней. Во время каждого измерения пары одновозрастных особей рассаживали в емкости со свежей средой. Через 24 ч мух пересаживали на новую среду и считали количество отложенных яиц. Через 10 сут проводили подсчет сформировавшихся куколок. Среднюю фертильность вычисляли как отношение количества яиц к количеству самок в группе.

2.6. Анализ стрессоустойчивости

Перед анализом стрессоустойчивости мух в течение 10 сут обрабатывали исследуемыми веществами. В качестве стресс-факторов использовали гипертермию, действие прооксиданта параквата и голодание. Каждый эксперимент проводили в трех независимых повторностях по 120-150 особей в каждой.

Гипертермия:

Для исследования влияния повышенной температуры на выживаемость мух использовали стандартную агарно-дрожжевую питательную среду. Экспериментальных мух помещали в термостат при 35 °С. Подсчет умерших особей проводили 2 раза в сутки.

Действие прооксиданта параквата:

Для исследования влияния окислительного стресса готовили 20 мМ раствор прооксиданта параквата в 5 % сахарозе, который в количестве 300 мкл наносили на фильтровальную бумагу, помещенную в емкости вместо питательной среды. Далее в емкости рассаживали мух и помещали в термостат, где поддерживались стандартные условия. Подсчет умерших особей проводили 2 раза в сутки.

Голодание:

Для исследования влияния голодания мух рассживали в емкости с фильтровальной бумагой, пропитанной 1 мкл дистиллированной воды и помещали в термостат, где поддерживались стандартные условия. Подсчет умерших особей проводили 2 раза в сутки.

2.7. Анализ продолжительности жизни

Для анализа продолжительности жизни отбирали свежевылетевших одновозрастных имаго каждого пола. Самцов и самок рассаживали раздельно в емкости объемом 120 мл, содержащие 20 мл стандартной питательной среды. Мух пересаживали на свежую среду 2 раза в неделю. Подсчет умерших мух проводили ежедневно. Продолжительность жизни самцов и самок анализировали раздельно. Оценивали медианную продолжительность жизни и возраст гибели 90% особей выборки, а также строили кривые дожития. Продолжительность жизни анализировали в трех биологических повторностях.

2.8. Статистическая обработка данных

При статистической обработке результатов анализа продолжительности жизни применяли непараметрические методы. Функции дожития оценивали с помощью процедуры Каплана-Мейера и представляли в виде функций дожития. При сравнении функций дожития использовали модифицированный критерий Колмогорова-Смирнова (Modified Kolmogorov-Smirnov…, 1980). Для оценки достоверности различий по медианной продолжительности жизни применяли критерии Гехана-Бреслоу-Вилкоксона (Breslow, 1970) и Ментеля-Кокса (Mantel, 1966). Для оценки статистической значимости различий возраста гибели 90% особей использовали тест Ванг-Аллисона (Statistical methods for testing…, 2004). Построение кривых Каплана-Мейера осуществляли с помощью программы

Statistica, версия 6.1 (StatSoft, США), расчет параметров продолжительности жизни и их статистический анализ проводили в среде статистического программирования R (R Core Team, 2014).

Для оценки стрессоустойчивости использовали F-критерий Фишера (Fisher, 1922; OASIS: Online Application…, 2011). Статистическую обработку данных стрессоустойчивости проводили при помощи среды OASIS: Online Application for the Survival Analysis of Lifespan Assays (OASIS: Online Application…, 2011).

Оценку статистической достоверности различий возрастного изменения плодовитости и двигательной активности проводили с использованием критерия $\chi 2$ (Low doses of paraquat…, 2013). Для обработки данных, полученных при измерении локомоторной активности и плодовитости, использовали Microsoft Excel 2010 (Microsoft, США).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Адаптогенные и геропротекторные свойства фармакологических ингибиторов IGF-I/PI3K/AKT/TOR внутриклеточного сигнального каскада

IGF-I/PI3K/AKT/TOR сигнальный путь необходим для протекания нормальных ростовых процессов в клетке, однако, его активация в благоприятных условиях среды (избыток пищи, оптимальная для роста и размножения температура, освещенность и влажность) ведет к снижению стрессоустойчивости и сокращению продолжительности жизни. Напротив, подавление активности PI3K/AKT/TOR-каскада при генетических нарушениях или фармакологических вмешательствах вызывает повышение стрессоустойчивости и увеличение продолжительности жизни модельных животных. Однако, эти нарушения могут вести к замедлению роста, снижению плодовитости и локомоторной активности (PI3-kinase inhibition…, 1999; Regulation of lifespan…, 2004; Insulin-like growth factor…, 2005; Remarkable longevity…, 2008; Шапошников и др., 2010; Mechanisms of life span…, 2010). Для выяснения роли PI3K/AKT/TOR сигнального пути в формировании стрессоустойчивости и поддержании жизнеспособности организма мы использовали специфические фармакологические ингибиторы PI3K (вортманнин) и TOR (рапамицин).

Воздействие рапамицином (0.005 мкМ) привело к статистически значимому ($p< 0.01$) увеличению медианой продолжительности жизни у самцов (на 14%) и самок (на 12%) (табл. 2).

Вортманнин в концентрации 5 мкМ достоверно ($p<0.05$) увеличивал медианную продолжительность жизни самцов на 5%, но уменьшал ее у самок на 8.2% ($p<0.05$). В концентрации 0.005 мкМ вортманнин не оказывал статистически значимых эффектов на продолжительность жизни (табл. 2).

При воздействии рапамицином в концентрации 0.005 мкМ мы наблюдали увеличение спонтанной локомоторной активности и активности в тесте на

отрицательный геотаксис на 45 и 56 сут у самцов, а у самок – только спонтанной локомоторной активности. Воздействие вортманнином в концентрации 0.005 мкМ мы наблюдали увеличение активности в тесте на отрицательный геотаксис у самцов на протяжении практически всего периода измерений, а у самок – во второй половине периода измерений. Вортманнин в концентрации 5 мкМ увеличивал спонтанную активность самцов в конце времени измерений, однако, негативно влиял на активность самок в первой половине времени измерений. Стоит отметить, что, при анализе влияния вортманнина и рапамицина на локомоторную активность дрозофил, мы наблюдали чередование периодов повышения активности относительно контрольной группы с периодами ее понижения (табл. 3 и 4).

Вортманнин и рапамицин не оказывали значительного влияния на фертильность самок дрозофил (табл. 5 и 6).

Таблица 2

Влияние ингибиторов PI3K и TOR на продолжительность жизни особей *Drosophila melanogaster*

Вещество (концентрация)	**Мишень**	**Самцы**			**Самки**		
		M	**90%**	**n**	**M**	**90%**	**n**
Контроль		50	64	421	50	62	433
Рапамицин (0.005 мкМ)	TOR	57(+14%)*	67(+4.7%)	344	56(+12%)**	67(+4.8%)	363
Вортманнин (0.005 мкМ)	PI3K	54(+8%)	67(+4.7%)	312	54(+8%)	67(+4.8%)	355
Контроль		39	50	259	49	59	275
Вортманнин (5 мкМ)	PI3K	42 (+5%)*	51 (+2%)	259	45 (-8.2%)*	58 (-1.7%)	252

Здесь и далее: M – медианная продолжительность жизни, 90% - возраст гибели 90% особей выборки, n - объем выборки.

* $p< 0.001$, ** $p< 0.01$,* ** $p< 0.05$ по критерию Гехана-Бреслоу-Вилкоксона и Мантеля-Кокса для изменения медианой продолжительности жизни, по критерию Ванг-Алиссона для изменения возраста гибели 90% особей выборки.

Таблица 3

Влияние ингибиторов PI3K и TOR на спонтанную локомоторную активность особей *Drosophila melanogaster*

Вещество (концентрация)	**Пол**	**Возраст (сут)**								
		4	**11**	**19**	**32**	**37**	**39**	**42**	**46**	**50**
Спонтанная активность (среднее количество пересений датчика на муху)										
Контроль	♂	76.3	49.0	76.3	46.0	22.0	21.3	11.3	6.0	24.7
Рапамицин (0.005 мкМ)	♂	70.0*	48.0	76.3*	45.0	24.3	14.0*	26.7*	15.0*	32.3*
Вортманнин (0.005 мкМ)	♂	35.0*	98.0*	65.7	13.3*	59.3*	2.3*	18.0*	4.0	13.0*
Контроль	♂	-	225	216	88	52	96	-	-	-
Вортманнин (5 мкМ)	♂	-	257*	154*	58	57	6*	-	-	-
Контроль	♀	37.7	4.7	9.7	31.0	15.7	11.7	17.0	5.7*	1.7*
Рапамицин (0.005 мкМ)	♀	51.0*	4.7	8.0	20.0*	12.0*	12.0	15.3	12.0	8.7
Вортманнин (0.005 мкМ)	♀	30.3*	19.7*	33.7*	21.0*	25.7*	12.3	12.0	4.3	
Контроль	♀	-	35	80	60	54	65	17	31	26
Вортманнин (5 мкМ)	♀	-	71*	77	49*	10*	13*	22	38	84*

«-» - измерения не велись, *$p<0.05$ по критерию $\chi 2$

Таблица 4

Влияние ингибиторов PI3K и TOR на активность в тесте на отрицательный геотаксис особей *Drosophila melanogaster*

Вещество (концентрация)	**Пол**	**Возраст (сут)**								
		4	**11**	**19**	**32**	**37**	**39**	**42**	**46**	**50**
Активность в тесте на отрицательный геотаксис (среднее количество пересений датчика на муху)										
Контроль	♂	22.3	13.0	18.0	12.3	7.7	6.7	2.0	1.7	1.7
Рапамицин (0.005 мкМ)	♂	21.7	14.7	19.7*	14.3	10.0*	12.7*	6.3*	7.0*	4.7*
Вортманнин (0.005 мкМ)	♂	18.7*	30.7*	25.3*	19.7*	23.0*	16.0*	17.3*	5.0*	7.7*
Контроль	♂	-	50.67	51.33	34.33	13	5	-	-	-
Вортманнин (5 мкМ)	♂	-	47.67	49.67	36.67	20*	20.33*	-	-	-

Контроль	♀	17.0	2.3	13.3	11.3	5.3	2.0	3.7	2.3	0.3
Рапамицин (0.005 мкМ)	♀	17.3	1.0	12.0	7.3	2.3	4.0	1.3	1.3	0.7
Вортманнин (0.005 мкМ)	♀	19.0*	13.3*	12.7	14.0*	9.3*	17.3*	7.3*	4.3	-
Контроль	♀	-	37.33	34	23.67	12	3.67	9.67	7.33	19.67
Вортманнин (5 мкМ)	♀	-	36.33*	33*	18*	8.67*	8.33*	10.33	13.33*	8*

«-» - измерения не велись,*$p<0.05$ по критерию $\chi 2$

Таблица 5

Влияние ингибиторов PI3K и TOR на фертильность самок *Drosophila melanogaster*

Вещество (концентрация)	**Возраст (сут.)**					
	5	**8**	**19**	**36**	**48**	**57**
Количество яиц в кладке на одну самку (шт.)						
Контроль	15.4	25.3	3.8	3.2	0.0	0.0
Рапамицин (0.005 мкМ)	11.6	32.0	3.4	7.3	1.0	0.0
Вортманнин (0.005 мкМ)	17.4	30.3	2.8	4.6	0.9	0.5
Контроль	13.8	12.4	7.57	7.5	0.1	0
Вортманнин (5 мкМ)	14.1	10.1	5.1	6.5	0.4	0.5

* $p<0.05$ по критерию $\chi 2$

Таблица 6

Влияние ингибиторов PI3K и TOR на количество куколок *Drosophila melanogaster*, сформировавшихся на десятые сутки

Вещество (концентрация)	**Возраст (сут.)**					
	5	**8**	**19**	**36**	**48**	**57**
Количество куколок на одну самку (шт.)						
Контроль	12.9	22.9	3.1	1.4	0.0	0.0
Рапамицин (0.005 мкМ)	3	29.3	2.5	3.0	0.1	0.0
Вортманнин (0.005 мкМ)	17.4	28.5	2.4	1.3	0.0	0.0
Контроль	10.1	9.5	5.5	1.2	0.0	0.0
Вортманнин (5 мкМ)	11.2	8.7	4.9	1.0	0.0	0.0

* $p<0.05$ по критерию $\chi 2$

Мы наблюдали значительное повышение стрессоустойчивости самок после воздействия рапамицином в концентрации 0.005 мкМ. Вортманнин в концентрациях 0.005 мкМ и 5 мкМ увеличивал устойчивость самок к голоданию.

Рапамицин в концентрации 0.005 мкМ и вортманнин в концентрации 5 мкМ увеличивали устойчивость самцов к окислительному стрессу (рис. 4).

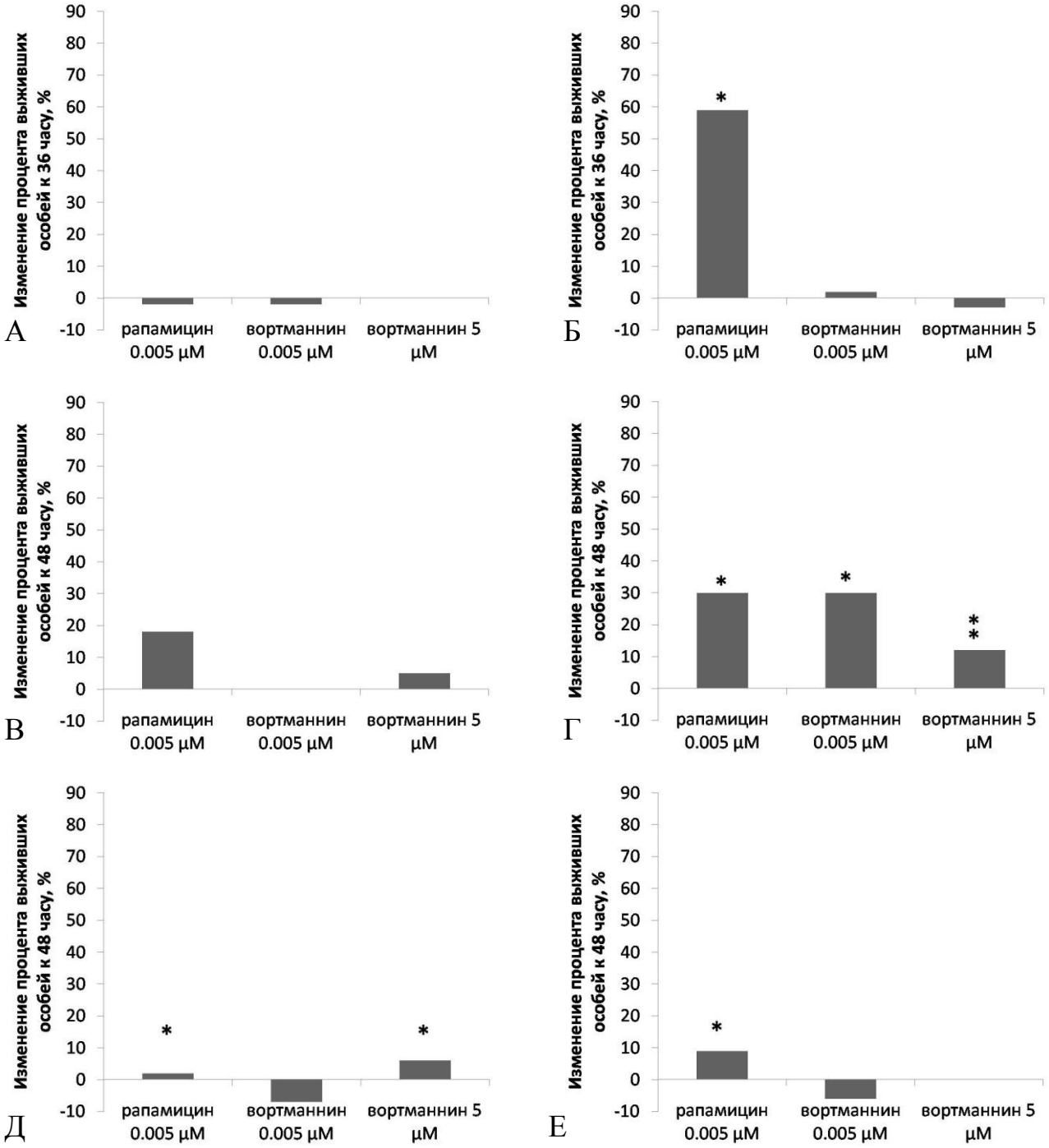


Рис. 4. Влияние ингибиторов PI3K и TOR на стрессоустойчивость особей *Drosophila melanogaster*.

Тепловой шок: А – самцы, Б – самки;

Голодание: В – самцы, Г – самки;

Окислительный стресс: Д – самцы, Е – самки;

* $p < 0.001$, ** $p < 0.001$,* ** $p < 0.05$ по F-критерию Фишера.

Таким образом, мы наблюдали увеличение стрессоустойчивости и продолжительности жизни (до 14%) особей *Drosophila melanogaster* при воздействии на них ингибиторами PI3K/Akt-TOR сигнального пути в наномолярных концентрациях.

3.2. Адаптогенные и геропротекторные свойства фармакологических ингибиторов NF-κB/iNOS сигнального пути

Выживание организма зависит от его способности быстро и эффективно реагировать на неблагоприятные изменения в окружающей среде. Это часто достигается за счет изменения уровня экспрессии генов и выработки клеткой белков, которые оказывают защитное действие. Эукариотические клетки обладают рядом сигнальных путей, связывающих стимулы окружающей среды и уровень экспрессии генов. Один из таких путей связан с активностью транскрипционного фактора NF-κB (Mercurio, Manning, 1999). NF-κB играет важную роль в росте и дифференциации клеток, апоптозе и адаптивных реакциях на изменения окислительно-восстановительного баланса. Множество экзогенных или эндогенных факторов, представляющих опасность для организма, способны активировать NF-κB, в том числе вирусная и бактериальная инфекция, повреждение ДНК и окислительный стресс (Mercurio, Manning, 1999). Однако чрезмерная транскрипционная активность NF-κB и увеличение уровня экспрессии генов-мишеней может иметь неблагоприятные биологические эффекты. Повсеместная активация сверхэкспрессии гена пептидогликан-распознающего белка (PGRP-LE) ведет к снижению продолжительность жизни дрозофилы (DeVeale et al., 2004; Trade-offs between longevity..., 2006). Для выяснения роли NF-κB-зависимого сигнального пути в формировании стрессоустойчивости и поддержании жизнеспособности организма мы использовали специфические фармакологические ингибиторы NF-κB (QNZ и PDTC), а также ингибитора iNOS (1400W).

Применение QNZ в каждой из исследуемых концентраций не приводило к статистически значимому увеличению продолжительности жизни самцов. Мы наблюдали уменьшение продолжительности жизни у самок, наиболее значительное оно было при воздействии QNZ в концентрации 0.03 мкМ – уменьшение медианой продолжительности жизни на 15% (табл. 7).

Воздействие PDTC в каждой концентрации приводило к статистически значимому увеличению медианой продолжительности жизни самцов на 6-10%, а также к увеличению возраста гибели 90% особей выборки в концентрациях 12.5 и 1.25 мкМ (табл. 7). При воздействии PDTC в концентрации 125 мкМ на самок, их медианная продолжительность жизни достоверно увеличивалась на 12% (табл. 7). PDTC в концентрации 1.25 мкМ увеличивал активность самцов дрозофил в середине времени измерений и уменьшал в конце (табл. 8 и 9). PDTC в концентрации 12.5 мкМ не оказывал влияния на активность самцов в тесте на отрицательный геотаксис, однако, увеличивал спонтанную активность в первой половине времени измерений и уменьшал во второй половине. При воздействии PDTC в концентрации 125 мкМ на самцов мы наблюдали снижение параметров локомоторной активности в первой половине времени измерений и увеличение во второй (табл. 8 и 9).

Мы не наблюдали значительных изменений локомоторной активности в тесте на отрицательный геотаксис у самок при воздействии PDTC в концентрациях 1.25 и 12.5 мкМ. Можно отметить негативное влияние на спонтанную локомоторную активность в начале периода измерений при воздействии данными концентрациями PDTC. PDTC в концентрации 125 мкМ оказывал положительное влияние на активность самцов в тесте на отрицательный геотаксис (табл. 8 и 9).

QNZ в концентрации 0.03 и 0.3 мкМ (табл. 8 и 9) снижал спонтанную локомоторную активность самцов и самок. В тесте на отрицательный геотаксис при воздействии QNZ в концентрациях 0.03 и 0.3 мкМ мы наблюдали увеличение активности самок в середине периода измерений и снижение этого параметра у самцов в конце периода измерений. QNZ в концентрации 3 мкМ оказывал

значительное положительное влияние на активность самцов, однако, у самок мы не наблюдали значительных положительных эффектов (табл. 8 и 9).

QNZ в концентрациях 3 мкМ значительно увеличивал количество яиц в кладке и куколок на протяжении большей части периода измерений (табл. 10 и 11).

Таблица 7

Влияние ингибиторов NF-κB на продолжительность жизни особей *Drosophila melanogaster*

Вещество (концентрация)	**Мишень**	**Самцы**			**Самки**		
		M	**90%**	**n**	**M**	**90%**	**n**
Контроль		58	72	421	59	76	433
PDTC (1.25 мкМ)	NF-κB	61(+6%)*	73 (+2%)	437	58(-2%)*	72 (-5%)*	451
PDTC (12.5 мкМ)	NF-κB	62(+7%)**	76(+6%)**	448	58 (-2%)*	76 (0%)	433
Контроль		50	64	273	50	62	345
PDTC (125 мкМ)	NF-κB	55(+10%)	62(-3,1%)	322	56(+12%)	65(+4,8%)	361
Контроль		58	73	275	61	79	305
QNZ (0.03 мкМ)	NF-κB	59 (+2%)	76 (+4%)	297	52 (-15%)**	76 (-4%)**	298
QNZ (0.3 мкМ)	NF-κB	58 (0%)	79 (+8%)	279	59 (-4%)	76 (-4%)**	290
QNZ (3 мкМ)	NF-κB	59 (+2%)	73 (0%)	282	59 (-4%)	76 (-4%)**	312

Таблица 8

Влияние ингибиторов NF-κB на спонтанную локомоторную активность особей *Drosophila melanogaster*

Вещество (концентрация)	**Возраст (сут)**									
	5	**15**	**25**	**35**	**45**	**5**	**15**	**25**	**35**	**45**
	Самцы					**Самки**				
Спонтанная активность (среднее количество пересечений датчика на муху)										
Контроль	76.3	49.0	76.3	22.0	6.0	37.7*	4.7	9.7	15.7	5.7*
PTDC (125 мкМ)	71.3	37.7*	56.7*	23.0	14.3*	29.3*	8.3	15.0	17.3	16.3*
Контроль	20.7	21.0	7.7	8.7	8.0	18.0	10.3	7.3	0.7	1.0
PTDC (12.5 мкМ)	20.7	22.0	5.0*	7.7*	6.4*	15.7*	10.7*	5.7	0.7	0.3
PTDC(1.25 мкМ)	18.7*	25.7	14.7*	6.3*	4.4*	14.7	10.7	4.0	0.7	0.9
QNZ(3 мкМ)	23.0*	22.7*	15.7*	14.3*	11.5*	15.7*	13.7*	9.7	2.0	0.6*
QNZ(0.3 мкМ)	19.0*	20.0*	10.7	6.3*	2.1*	15.3*	12.3*	12.3	0.0*	1.0*
QNZ(0.03 мкМ)	23.3*	20.3	11.0*	6.7*	3.2*	15.0*	10.7*	11.0*	3.0	3.1

* $p<0.05$ по критерию $\chi 2$

Таблица 9

Влияние ингибиторов NF-κB на активность особей *Drosophila melanogaster* в тесте на отрицательный геотаксис

Вещество (концентрация)	Возраст (сут)									
	5	15	25	35	45	5	15	25	35	45
	Самцы					Самки				
Активность в тесте на отрицательный геотаксис (среднее количество пересений датчика на муху)										
Контроль	22.3	13.0	18.0	7.7	1.7	17.0	2.3	13.3	5.3	2.3
PTDC (125 мкМ)	18.3*	10.0	20.7	12.3*	4.0*	16.0	9.0*	13.0	7.7*	3.7*
Контроль	81.3	73.7	12.0	30.0	27.0	67.3	34.3	21.0	7.3	9.2
PTDC (12.5 мкМ)	110.7	74.3	20.0	21.0	19.0	81.3	27.7	16.7	8.0	10.0
PTDC(1.25 мкМ)	84.7	76.3*	24.7*	16.3	12.3*	57.3	25.3	27.7*	6.7	7.0
QNZ(3 мкМ)	99.0	94.0	42.7*	41.0*	33.1*	85.0	24.3*	22.0	2.0	3.0
QNZ(0.3 мкМ)	48.3	54.0	8.0	10.0	8.0*	43.0	28.3	27.0*	1.0	1.5
QNZ(0.03 мкМ)	57.3	76.3	23.3*	14.3	6.9*	44.3	21.0	30.3*	9.0*	11.2

* $p<0.05$ по критерию $\chi 2$

Таблица 10

Влияние ингибиторов NF-κB на фертильность самок *Drosophila melanogaster*

Вещество (концентрация)	Возраст (сут)					
	5	15	25	35	45	55
Количество яиц в кладке на одну самку (шт.)						
Контроль	15.4	9.5	10.2	3.2	0.0	0.0
PTDC (125 мкМ)	23.9*	11.4	16.0	5.1	0.9	0.0
Контроль	7.70	12.43	11.10	3.31	0.50	0.00
PTDC (1.25 мкМ)	10.67	11.83	13.27	4.06	0.00	0.00
PTDC (12.5 мкМ)	10.20	12.27	11.87	9.35*	2.22	2.33
QNZ (0.03 мкМ)	10.17	12.43	11.73	5.41	0.17	0.50
QNZ (0.3 мкМ)	12.43	16.13	22.52*	10.23*	0.13	0.00
QNZ (3 мкМ)	15.63*	19.40*	19.14*	9.22*	1.67	2.50

*$p<0.05$ по критерию $\chi 2$

Таблица 11

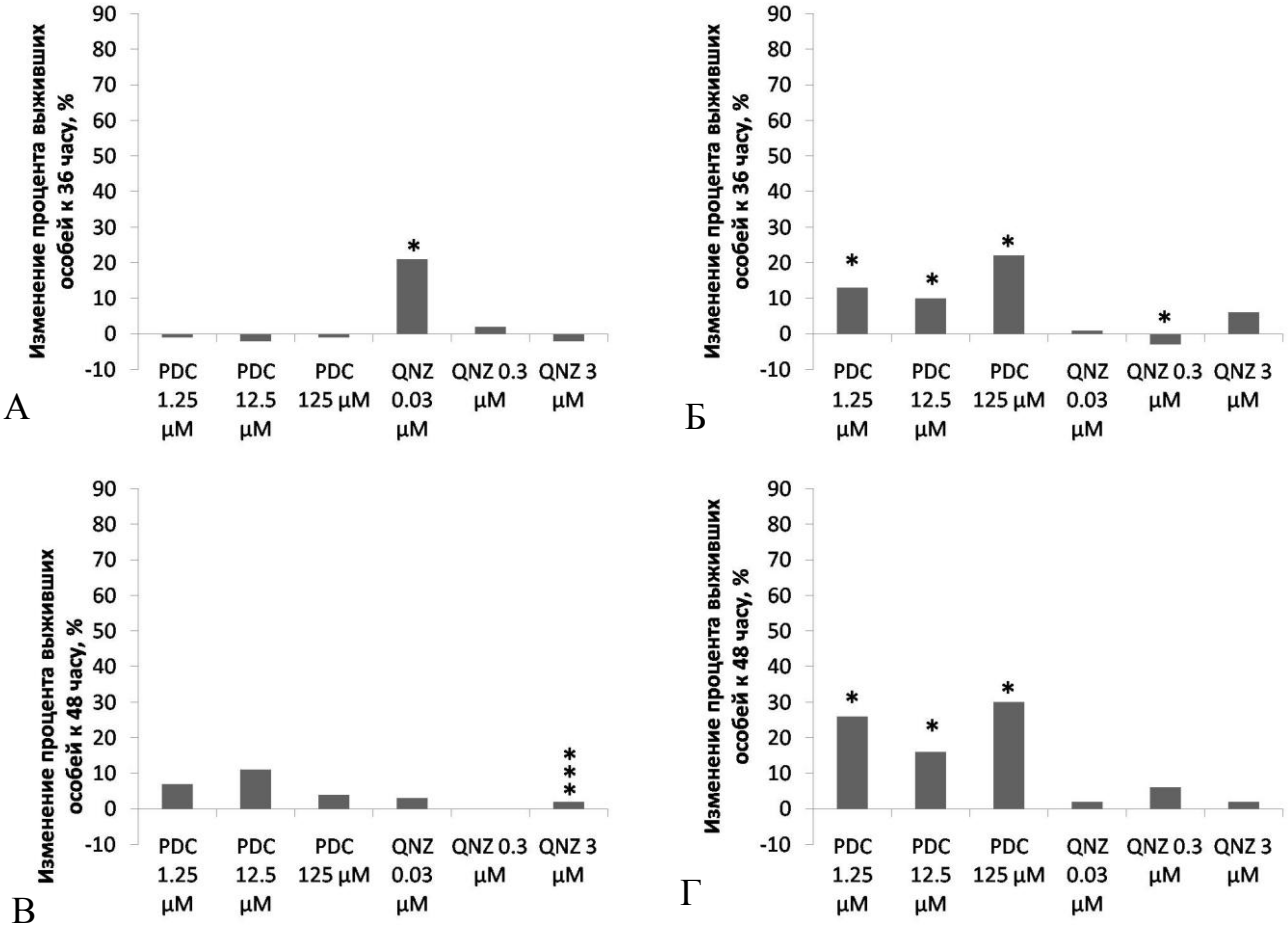
Влияние ингибиторов NF-κB на количество куколок *Drosophila melanogaster*, сформировавшихся на десятые сутки

Вещество (концентрация)	Возраст (сут)					
	5	15	25	35	45	55
Количество куколок на одну самку (шт.)						
Контроль	12.96	22.9	3.1	1.4	0.0	0.0
PTDC (125 мкМ)	22.94*	21.1	2.6	2.9	0.2	0.0
Контроль	7.03	11.37	7.30	2.13	0.50	0.00
PTDC (1.25 мкМ)	7.83	11.83	9.10	8.70	1.33	0.00
PTDC (12.5 мкМ)	9.00	10.10	8.60	1.56*	0.00	0.00

QNZ (0.03 мкМ)	12.83	17.00	18.17*	8.00	0.67	0.50
QNZ (0.3 мкМ)	10.60	15.83	16.93*	7.23	0.13	0.00
QNZ (3 мкМ)	7.60*	11.90*	14.17*	2.47*	0.17	0.50

*p<0.05 по критерию $\chi 2$

PDTC в концентрациях 1.25, 12.5 и 125 мкМ увеличивал устойчивость самок к тепловому шоку и голоданию. QNZ в концентрации 0.3 мкМ снижал устойчивость самок к тепловому шоку. При воздействии QNZ в концентрации 0.03 мкМ мы наблюдали повышение устойчивости самцов к тепловому шоку, а при воздействии QNZ в концентрации 3 мкМ – к голоданию. PDTC в концентрации 1.25 мкМ и QNZ в концентрации 3 мкМ снижали устойчивость самцов к окислительному стрессу (рис. 4).



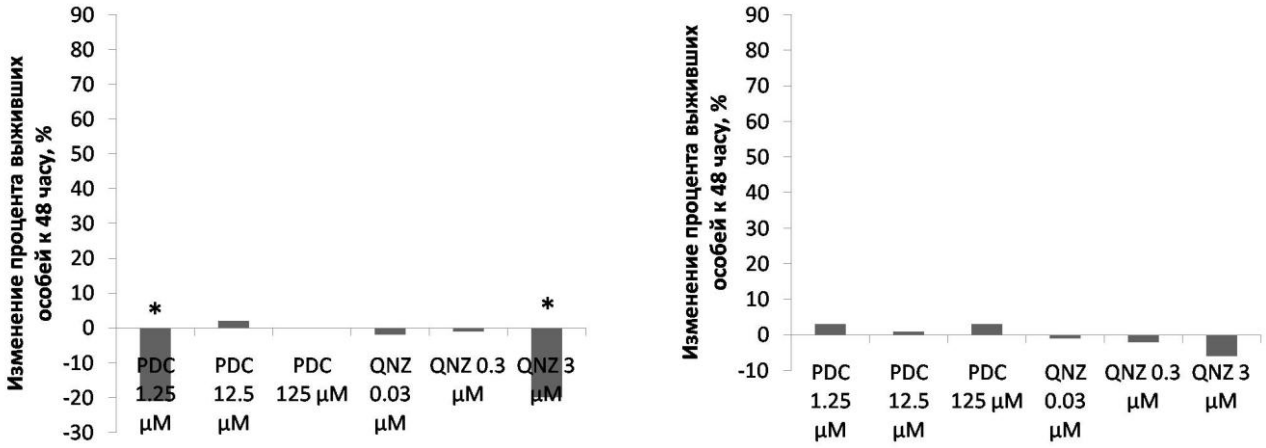


Рис. 4. Влияние ингибиторов NF-κB на стрессоустойчивость особей *Drosophila melanogaster.*

Тепловой шок: А- самцы, Б – самки;

Голодание: В- самцы, Г – самки;

Окислительный стресс: Д- самцы, Е – самки;

* $p< 0.001$, ** $p< 0.001$,* ** $p< 0.05$ по F-критерию Фишера.

Эффект, оказываемый ингибиторами NF-κB на дрозофил, во многом зависит от вещества и его концентрации. PDTC значительно увеличивал продолжительность жизни самцов (на 10%), однако не оказывал положительного влияния на их стрессоустойчивость. У самок же, наоборот, PDTC значительно увеличивал выживаемость при тепловом стрессе и голодании, однако, положительный эффект на продолжительность жизни мы наблюдали только при воздействии самой высокой концентрацией (125 мкМ, увеличение на 12%). При воздействии QNZ мы не наблюдали положительного эффекта на продолжительность жизни или стрессоустойчивость. Также стоит отметить отсутствие негативного влияния исследуемых веществ на фертильность самок.

При воздействии ингибтором iNOS 1400W в концентрациях 3 и 0.03 мкМ на самцов мы наблюдали статистически значимое увеличение медианной продолжительности жизни (на 7% и 3% соответственно) и возраста гибели 90% особей выборки (на 5% и 13% соответственно). У самок мы наблюдали достоверное уменьшение медианой продолжительности жизни (на 2-5%) и

возраст гибели 90% особей выборки (на 4-5%) при воздействии 1400W в каждой из концентраций (табл. 12).

В концентрации 0.03 мкМ 1400W увеличивал активность самцов на 35 сут измерений. При воздействии 1400W в концентрации 0.3 мкМ мы наблюдали значительное увеличние активности самцов. При воздействии 1400W в концентрации 3 мкМ на самцов увеличивалась только их спонтанная активность на 15 и 35 сут. 1400W в концентрациях 3 и 0.03 мкМ оказывал негативное вляние на локомотрную активность самок, а при воздействии концентрацией 0.3 мкМ активность самок была ниже контрольной в первой точке измерений (табл. 13 и 14). В тоже время 1400W не оказывал значительного влияния на фертильность самок табл. 15 и 16).

Таблица 12

Влияние ингибиторов iNOS на продолжительность жизни особей *Drosophila melanogaster*

Вещество (концентрация)	**Мишень**	**Самцы**			**Самки**		
		M	**90%**	**n**	**M**	**90%**	**n**
Контроль		58	72	421	59	76	433
1400W (0.03 мкМ)	iNOS	60 (+3%)**	81 (+13%)**	396	56 (-5%)**	72 (-5%)**	437
1400W (0.3 мкМ)	iNOS	58 (0%)	72 0%	419	58 (-2%)**	72 (-5%)**	453
1400W (3 мкМ)	iNOS	62 (+7%)**	75 (+5%)*	428	58 (-2%)**	73 (-4%)**	449

Таблица 13

Влияние ингибиторов iNOS на спонтанную локомоторную активность особей *Drosophila melanogaster*

Вещество (концентрация)	**Возраст (сут)**									
	5	**15**	**25**	**35**	**45**	**5**	**15**	**25**	**35**	**45**
	Самцы					**Самки**				
Спонтанная активность (среднее количество пересечений датчика на муху)										
Контроль	20.7	21.0	7.7	8.7	8.0	18.0	10.3	7.3	0.7	1.0
1400W(3 мкМ)	21.0	19.3*	9.7	8.0*	7.7	15.3	15.0*	3.7*	0.0	0.0
1400W(0.3 мкМ)	26.7*	22.7	12.3	15.3*	10.0*	13.3*	12.7	6.0*	0.3	0.0
1400W(0.03 мкМ)	21.7*	21.0*	8.0	11.7*	7.0	12.0*	*11.3	5.3	1.3	1.6

*$p<0.05$ по критерию $\chi 2$

Таблица 14

Влияние ингибиторов iNOS на активность особей *Drosophila melanogaster* в тесте на отрицательный геотаксис

Вещество (концентрация)	**Возраст (сут)**									
	5	**15**	**25**	**35**	**45**	**5**	**15**	**25**	**35**	**45**
	Самцы					**Самки**				
Активность в тесте на отрицательный геотаксис (среднее количество пересений датчика на муху)										
Контроль	81.3	73.7	12.0	30.0	27.0	67.3	34.3*	21.0*	7.3	9.2
1400W(3 мкМ)	77.7	94.3	16.4	40.3	27.5	64.7	15.7	11.3	6.3	8.4
1400W(0.3 мкМ)	142.7*	73.3	15.7*	57.0*	35.0	40.0*	34.3	28.3	6.3	7.0
1400W(0.03 мкМ)	50.0	55.3	17.0	38.3*	24.2	23.3*	23.7	18.7	10.0	13.1

*p<0.05 по критерию $\chi 2$

Таблица 15

Влияние ингибитора iNOS на фертильность самок *Drosophila melanogaster*

Вещество (концентрация)	**Возраст (сут)**					
	5	**15**	**25**	**35**	**45**	**55**
Количество яиц в кладке на одну самку (шт.)						
Контроль	15.4	9.5	10.2	3.2	0.0	0.0
1400W (0.03 мкМ)	10.00	13.97	15.23	9.42*	2.33	1.00
1400W (0.3 мкМ)	11.73	15.90	10.66	5.75	0.00	0.00
1400W (3 мкМ)	8.23	11.83	14.17	4.36	0.00	0.00

*p<0.05 по критерию $\chi 2$

Таблица 16

Влияние ингибитора iNOS на количество куколок *Drosophila melanogaster*, сформировавшихся на десятые сутки

Вещество (концентрация)	**Возраст (сут)**					
	5	**15**	**25**	**35**	**45**	**55**
Количество куколок на одну самку (шт.)						
Контроль	7.03	11.37	7.30	2.13	0.50	0.00
1400W (0.03 мкМ)	7.67	12.23	13.83*	4.47	0.67	0.00
1400W (0.3 мкМ)	9.50	15.10	7.97	1.20	0.00	0.00
1400W (3 мкМ)	6.77	9.70	9.20	1.36	0.00	0.00

*p<0.05 по критерию $\chi 2$

1400W в концентрации 0.3 мкМ значительно увеличивал устойчивость самцов к тепловому шоку, а также увеличивал устойчивость самцов к окислительному стрессу. При воздействии 1400W в концентрации 3 мкМ мы наблюдали снижение устойчивости к окислительному стрессу у самцов и повышение этого параметра у самок (рис. 5).

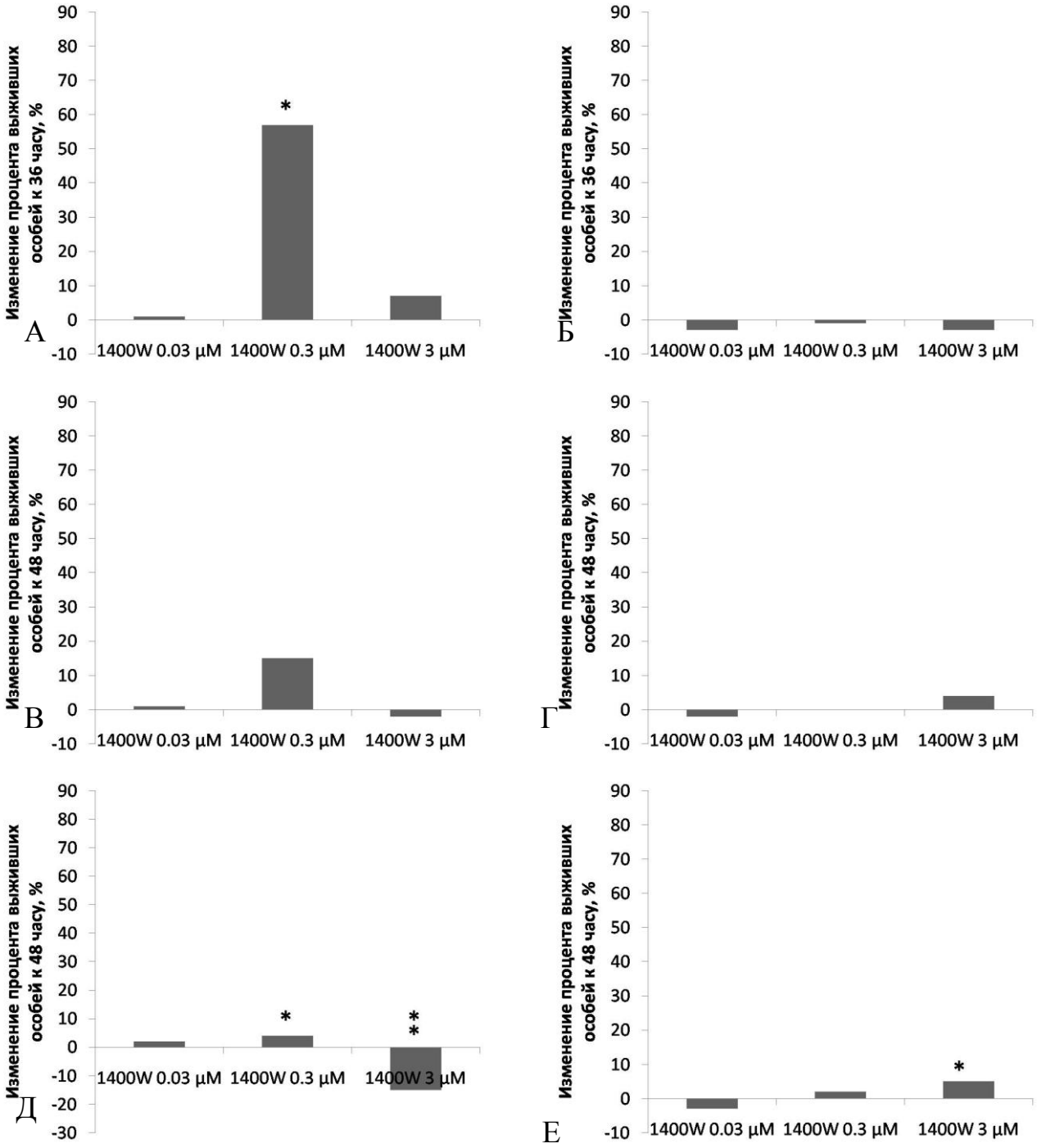


Рис. 5. Влияние ингибиторов iNOS на стрессоустойчивость особей *Drosophila melanogaster.*

Тепловой шок: А – самцы, Б – самки;

Голодание: В – самцы, Г – самки;

Окислительный стресс: Д – самцы, Е – самки;

* $p< 0.001$, ** $p< 0.001$,* ** $p< 0.05$ по F-критерию Фишера.

При воздействии ингибитором iNOS 1400W мы наблюдали значительное увеличение продолжительности жизни самцов (до 13%), однако увеличение

выживаемости при тепловом стрессе наблюдали только после воздействия 1400W в концентрации 0.3 мкМ. При воздействии на самок 1400W снижал их продолжительность жизни и не оказывал влияния на стрессоустойчивость.

3.3. Адаптогенные и геропротекторные свойства смеси фармакологических ингибиторов внутриклеточных сигнальных путей (IGF-I/PI3K/AKT/TOR и NF-κB)

PI3K, TOR и транскрипционный фактор NF-κB – компоненты внутриклеточных сигнальных путей, регулирующих ответную реакцию организма на изменение условий среды. Нами показано, что ингибирование этих путей приводит к увеличению продолжительности жизни модельных животных и изменению стрессоустойчивости (см. раздел 3.1 и 3.2). Мы предположили, что совместное применение препаратов, действующих на разнличные молекулярные мишени, приведет к большему адаптогенному эффекту, чем применение каждого вещества по отдельности.

Мы исследовали 2 типа смесей: 1) сместь с высокой концентрацией PDTC (125 мкМ) и низкой вортманнина и рапамицина (0.005 мкМ); 2) смесь с одинаковой концентрацией вортманнина и рапамицина (5 мкМ).

В результате воздействия смесью вортманнина (5 мкМ) и рапамицина (5 мкМ) мы наблюдали увеличение медианной продолжительности жизни на 14.6%, а возраст гибели 90% особей выборки на 23.4% у самок. Медианная продолжительность жизни самцов увеличивалась на 2.4% (табл. 17).

Смесь PDTC (125 мкМ) и вортманнина (0.005 мкМ), а так же PDTC (125 мкМ) и рапамицина (0.005 мкМ) увеличивала медианную продолжительность жизни самцов (на 10%) и самок (на 10 и 12% соответственно). Также мы наблюдали увеличение возраста гибели 90% особей выборки у самок на 11.3% и 8.1%, соответственно (табл. 17).

При воздействии смесями PDTC (125 мкМ) и вортманнина (0.005 мкМ), PDTC (125 мкМ) и рапамицина (0.005 мкМ) мы наблюдали значительное увеличение активности самцов в тесте на отрицательный геотаксис (табл. 18, 19).

Смесь PDTC (125 мкМ) и вортманнина (0.005 мкМ) значительно увеличивала локомоторную активность самок. Смесь PDTC (125 мкМ) и рапамицина (0.005 мкМ) значительно увеличивала спонтанную локомоторную активность самок, однако снижала активность в тесте на отрицательный геотаксис в первой половине периода измерений (табл. 18, 19).

При исследовании возрастной динамики фертильности самок не выявлено отрицательного влияния смеси PDTC (125 мкМ) и рапамицина (0.005 мкМ), PDTC (125 мкМ) и вортманнина (0.005 мкМ) (табл. 20, 21).

Таблица 17

Влияние ингибиторов iNOS на продолжительность жизни особей *Drosophila melanogaster*

Вещество (концентрация)	**Мишень**	**Самцы**			**Самки**		
		M	**90%**	**n**	**M**	**90%**	**n**
Контроль		41	50	350	41	47	395
Вортманнин (5 мкМ) + рапамицин (5 мкМ)	PI3K + TOR	42 (+2.4%)*	54 (+8%)	372	47 (+14.6%)*	58 (+23.4%)*	400
Контроль		50	64	273	50	62	345
PDTC (125 мкМ) + вортманнин (0.005 мкМ)	NF-κB + PI3K	55(+10%)	66(-3,1%)	304	55(+10%)	69 (+11,3%)	370
PDTC (125 мкМ) + рапамицин (0.005 мкМ)	NF-κB + TOR	55(+10%)	67(+4,7%)	305	56(+12%)	67(+8,1%)	342

Таблица 18

Влияние совместного применения ингибиторов PI3K, TOR и NF-κB на спонтанную локомоторную активность особей *Drosophila melanogaster*

Вещество (концентрация)	**Пол**	**Возраст (сут)**									
		4	**8**	**11**	**15**	**32**	**37**	**39**	**43**	**46**	**50**
Спонтанная активность (среднее количество пересений датчика на муху)											
Контроль	♂	76.3	66.7	49.0	76.3	46.0	22.0	21.3	11.3	6.0	24.7
PDTC (125 мкМ) + вортманнин (0.005 мкМ)	♂	9.0*	102*	68.7*	46.7*	39.7	81.7*	24.0	37.7*	1.7	9.3*
PDTC (125 мкМ) + рапамицин (0.005 мкМ)	♂	10.3*	65.3	39.0*	39.7*	13.0*	64.0*	14.3*	14.0	1.0	3.7*
Контроль	♀	37.7	35.0	4.7	9.7	31.0	15.7	11.7	17.0	5.7	1.7
PDTC (125 мкМ) + вортманнин (0.005 мкМ)	♀	22.0*	26.3*	34.0*	38.3*	24.0	55.0*	19.3*	28.0*	4.7	7.0
PDTC (125 мкМ + рапамицин (0.005	♀	38.0	24.3*	39.7*	35.3*	40.3*	68.0*	20.7*	12.3	1.7	6.7

мкМ)											

*p<0.05 по критерию χ2

Таблица 19

Влияние совместного применения ингибиторов PI3K, TOR и NF-κB на ную активность особей *Drosophila melanogaster* в тесте на отрицательный геотаксис

Вещество (концентрация)	**Пол**	**Возраст (сут)**									
		4	**8**	**11**	**15**	**32**	**37**	**39**	**43**	**46**	**50**
Активность в тесте на отрицательный геотаксис (среднее количество пересений датчика на муху)											
Контроль	♂	22.3	20.7	13.0	18.0	12.3	7.7	6.7	2.0	1.7	1.7
PDTC (125 мкМ) + вортманнин (0.005 мкМ)	♂	15.3*	28.3*	25.7*	23.3*	19.0*	24.3*	21.7*	17.3*	2.7	5.7*
PDTC (125 мкМ) + рапамицин (0.005 мкМ)	♂	15.7*	27.3*	23.0*	22.0*	14.3*	19.7*	16.0*	11.7*	1.7	3.7
Контроль	♀	17.0	17.0	2.3	13.3	11.3	5.3	2.0	3.7	2.3	0.3
PDTC (125 мкМ) + вортманнин (0.005 мкМ)	♀	17.3	21.3*	16.7*	9.0*	22.0*	11.7*	21.7*	13.7*	1.7	7.7*
PDTC (125 мкМ) + рапамицин (0.005 мкМ)	♀	17.3*	17.0	11.0*	17.3*	14.7*	16.0*	16.3	14.0	2.3	6.0*

*p<0.05 по критерию χ2

Таблица 20

Влияние совместного применения ингибиторов PI3K, TOR и NF-κB на фертильности самок *Drosophila melanogaster*

Вещество (концентрация)	**Возраст (сут)**					
	5	**8**	**19**	**36**	**48**	**57**
Количество яиц в кладке на одну самку (шт.)						
Контроль	15.4	25.3	3.8	3.2	0.0	0.0
PDTC (125 мкМ) + рапамицин (0.005 мкМ)	31.2*	28.5	2.2	5.0	1.3	0.3
PDTC (125 мкМ) + вортманнин (0.005 мкМ)	19.1	30.4	6.3	5.4	1.0	0.0

*p<0.05 по критерию χ2

Таблица 21

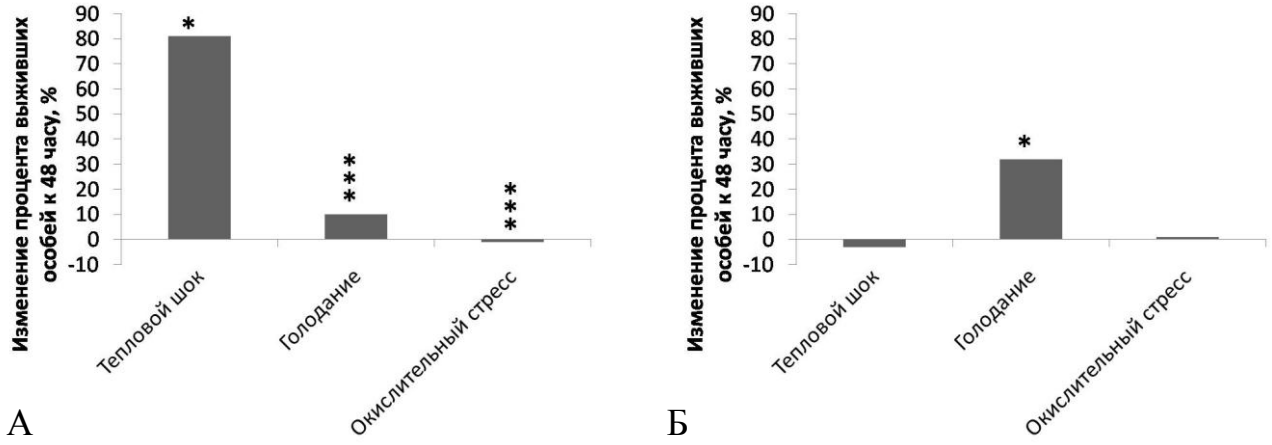
Влияние совместного применения ингибиторов PI3K, TOR и NF-κB на количество куколок *Drosophila melanogaster*, сформировавшихся на десятые сутки

Вещество (концентрация)	**Возраст (сут)**

	5	8	19	36	48	57
Количество куколок на одну самку (шт.)						
Контроль	13.0	22.9	3.1	1.4	0.0	0.0
PDTC (125 мкМ) + рапамицин (0.005 мкМ)	29.0*	26.2	1.5	2.3	0.1	0.0
PDTC (125 мкМ) + вортманнин (0.005 мкМ)	17.5	27.8	5.3	1.6	0.5	0.0

*p<0.05 по критерию $\chi 2$

Мы наблюдали повышение устойчивости самцов к тепловому шоку и голоданию, но в тоже время снижение устойчивости к окислительному стрессу. При совместном воздействии рапамициина и вортманнина повышалась устойчивость самок к голоданию (рис. 6).



А Б

Рис. 6. Влияние совместного применения ингибиторов PI3K и TOR на стрессоустойчивость особей *Drosophila melanogaster*.

А – самцы, Б – самки.

* p< 0.001, ** p< 0.001,* ** p< 0.05 по F-критерию Фишера.

Таким образом, совместное воздействие ингибиторами PI3K, TOR и NF-κB способно значительно увеличивать продолжительность жизни (до 23.4 %) и стрессоустойчивость дрозофил, не оказывая отрицательного влияния на фертильность самок, а также, повышать локомоторную активность самцов в некоторых вариантах эксперимента.

3.4. Адаптогенные и геропротекторные свойства нестероидных противовоспалительных препаратов

В нашей работе мы изучали воздействие 10 НСПВП в концентрациях 0.05, 0.5 и 1 мкМ.

Воздействие аспирином увеличивало медианную продолжительность жизни у самцов на 6-12.5%, и самок на 7.7-32.7%. Возраст 90% смертности также увеличивался на 6.7-8.5% у самцов и на 1.6-13.7% у самок (табл. 22). В тесте на отрицательный геотаксис аспирин увеличивал активность самцов в последней точке измерений на 45 сутки (табл. 23-24). На спонтанную активность самцов влияние было более негативное во второй половине жизни в концентрации 0.05 мкМ, в начале и второй половине жизни в концентрации 0.5 мкМ и в первой половине жизни в концентрации 1 мкМ. У самок спонтанная активность при применении концентрации 0.05 мкМ снижалась в первой половине жизни и повышалась в возрасте 35 сутки, концентрация 0.5 мкМ повышала спонтанную активность самок в середине жизни, а при воздействии концентрацией 1 мкМ этот показатель снижался в начале жизни и повышался на 35 сутки (табл. 22, 23). Фертильность самок при воздействии аспирином в концентрации 0.05 мкМ снижалась. Другие концентрации не оказывали достоверного влияния на фертильность (табл. 25, 26).

SC-560 в концентрации 0.5 мкМ достоверно снижал медианную продолжительность жизни самцов на 6%, а также снижал возраст 90% смертности у самцов на 8.3% и самок на 3.2%. При воздействии концентрацией 0.05 мкМ мы наблюдали увеличение медианой продолжительности жизни у самцов, на 8.3%, и самок на 10%, а также возраст 90% смертности на 8.5% у самцов и на 6.9% у самок. В концентрации 1 мкМ SC-560 увеличивал возраст 90% смертности самок на 4.1% (табл. 23). В тесте на отрицательный геотаксис применение SC-560 в каждой концентрации увеличивал активность на 45 суток. У самок этот показатель достоверно уменьшался только при воздействии концентрацией 0.05 мкМ на 25 сутки (табл. 23, 24). Также в этой концентрации мы наблюдали

уменьшение спонтанной активности самок с 5 по 25 сутки и ее увеличение на 35 сутки. У самцов спонтанная локомоторная активность в концентрации 0.05 мкМ уменьшалась на 5 и 25 сутки и увеличивалась на 35 сутки, в концентрации 0.5 мкМ уменьшалась на 5 сутки и увеличивалась на 25 сутки, в концентрации 1 мкМ уменьшалась на 15 сутки и увеличивалась на 25 сутки (табл. 23-24).

Валерил-салицилат в концентрации 0.05 мкМ увеличивал медианную продолжительность жизни самцов на 17.4%, и самок на 7.8%, а также возраст 90% смертности самцов на 14%. В концентрации 1 мкМ мы наблюдали уменьшение времени 90% смертности самок на 4.1% (табл. 22). В тесте на отрицательный геотаксис активность самцов увеличивалась на 45 сутки при воздействии каждой концентрацией (табл. 23, 24). Спонтанная локомоторная активность самцов при воздействии концентрацией 0.05 мкМ уменьшалась на 5 сутки и увеличивалась на 35, при концентрации 1 мкМ уменьшалась на 15 сутки и увеличивалась на 5, 25 и 45 сут. У самок при концентрации 0.05 мкМ мы наблюдали уменьшение спонтанной активности на 5 и 25 сут, увеличение на 35 и 45 сут; в концентрации 0.5 мкМ на 35 и 45 сутки происходило увеличение активности; в концентрации 1 мкМ увеличение активности было на 5, 25 и 45 сутки (табл. 23, 24). Также мы наблюдали уменьшение фертильности самок при воздействии концентрацией 0.05 мкМ (табл. 25, 26).

Применение транс-ресвератрола в концентрации 0.05 мкМ увеличивало медианную продолжительность жизни самцов на 19.6%, а возраст 90% смертности на 12.3%. У самок мы наблюдали увеличение медианой продолжительности жизни при воздействии 0.05 мкМ и 1 мкМ на 7.8% и 9.6%, соответственно, а также увеличение возраста 90% смертности на 5.1%, в концентрации 0.05 мкМ и на 4.1%, в концентрации 1 мкМ (табл. 23). В тесте на отрицательный геотаксис активность самцов увеличивалась в конце жизни (табл. 24). Спонтанная активность самцов при воздействии 0.05 мкМ уменьшалась на 5 сутки и увеличивалась на 35, при воздействии 1 мкМ уменьшалась на 15 сутки и увеличивалась на 5 и 25 сут. Спонтанная активность самок увеличивалась во второй половине жизни при воздействии каждой концентрацией (табл. 24).

Препарат CAY10404 в концентрации 0.05 мкМ увеличивал медианную продолжительность жизни самцов на 12.5% и возраст 90% смертности на 5.1%, а в концентрации 0.5 мкМ увеличивал медианную продолжительность жизни на 8%. У самок при воздействии концентрацией 0.05 мкМ мы наблюдали увеличение медианой продолжительности жизни на 8%, при концентрации 0.5 мкМ – снижение возраста 90% смертности на 4.8%, в концентрации 1 мкМ – увеличение медианой продолжительности жизни на 12.5% и возраста 90% смертности на 4.1% (табл. 23). В тесте на отрицательный геотаксис активность самцов увеличивалась на 45 сутки в каждой концентрации и уменьшалась на 15 и 25 сутки при концентрации 1 мкМ. У самок этот показатель уменьшался на 25 сутки при воздействии концентрацией 0.05 мкМ (табл. 24). CAY1004 оказывал негативное влияние на спонтанную активность самцов. У самок при воздействии концентрацией 0.05 мкМ происходило снижение спонтанной активности на 5-25 сутки и увеличение на 35-45 сут, при концентрации 0.5 мкМ – снижение на 5 и увеличение на 35-45 сут, при концентрации 1 мкМ спонтанная активность увеличивалась на 25 сутки (табл. 23).

Воздействие APHS в каждой концентрации увеличивало медианную продолжительности жизни самцов на 2-16.9% и самок на 8-11.5%, а также возраст 90% смертности самцов при концентрации 0.05 мкМ на 15.3% и при 0.5 мкМ на 11.7%, самок при концентрации 1 мкМ на 4.1% (табл. 23). В тесте на отрицательный геотаксис активность самцов увеличивалась на 45 сутки в каждой концентрации, а у самок только на 25 сутки при воздействии 0.05 мкМ (табл. 24). Спонтанная активность самцов при концентрации 0.05 мкМ снижалась на 5 сутки и увеличивалась на 35 сут, при концентрации 0.5 мкМ снижалась на 5, 15 и 35 сут, при концентрации 1 мкМ снижалась на 15 сут. У самок при воздействии концентрацией 0.05 мкМ спонтанная активность снижалась на 5 и 25 сутки и увеличивалась на 35 сут, при концентрации 0.5 мкМ снижалась на 15 и 35 сут, при концентрации 1 мкМ увеличивалась на 25 сутки и снижалась на 45 (табл. 23).

NS-398 в каждой концентрации увеличивал медианную продолжительность жизни самцов на 6-14.6% и самок на 7.7-13.5%, а также возраст 90% смертности

самцов в концентрации 0.05 мкМ на 20.3% и 1 мкМ на 3.9 %, и самок в каждой концентрации на 5.5-6.9% (табл. 23). В тесте на отрицательный геотаксис активность самцов увеличивалась на 45 сутки при концентрации 0.05 мкМ и 0.5 мкМ, а у самок снижалась на 5 сутки при концентрации 0.05 мкМ (табл. 24). Спонтанная активность самцов при концентрации 0.05 мкМ снижалась на 5 и 25 сут, при концентрации 0.5 мкМ – на 5 сут, при концентрации 1 мкМ увеличивалась на 5, 35 и 45 сутки и снижалась на 15 сут. У самок при концентрации 0.05 мкМ спонтанная активность снижалась на 5 и 25 сутки и увеличивалась на 35 и 45 сут, при концентрации 0.5 мкМ увеличивалась 35 сут, при концентрации 1 мкМ увеличивалась на 25 сутки (табл. 23, 24). Также мы наблюдали снижение фертильности самок при воздействии концентрацией 0.05 мкМ (табл. 25, 26).

SC-58125 увеличивал медианную продолжительности жизни самцов при воздействии каждой концентрацией на 4-17.4%, а также возраст 90% смертности при концентрации 0.05 мкМ на 12.3%. У самок мы наблюдали увеличение медианой продолжительности жизни при концентрации 0.05 мкМ на 5.9% и времени 90% смертности при концентрации 1 мкМ на 4.1% (табл. 23). В тесте на отрицательный геотаксис активность самцов увеличивалась на 45 сутки при каждой концентрации вещества (табл. 24). Спонтанная активность самцов при воздействии концентрацией 0.05 мкМ снижалась на 5 сутки и увеличивалась на 35, при концентрации 0.5 мкМ снижалась на 15 сут, при концентрации 1 мкМ снижалась на 15 и 35 сутки и увеличивалась на 25 и 45 сут. У самок при концентрации 0.05 мкМ спонтанная активность снижалась на 5 сутки и увеличивалась на 35 сут, при концентрации 0.5 мкМ увеличивалась на 35 сутки и снижалась на 45 сут, а при концентрации 1 мкМ снижалась на 45 сутки (табл. 23).

Вальдекоксиб при концентрации 0.05 мкМ и 1 мкМ увеличивал медианную продолжительность жизни самцов на 19.6% и 7.5%, соответственно, и самок на 7.8% и 15.4%, соответственно. Увеличение возраста 90% смертности мы наблюдали у самцов при воздействии концентрацией 0.05 мкМ на 14%, а у самок при воздействии концентрацией 0.05 мкМ на 3.4% и концентрацией 0.5 мкМ на

5.5% (рис. 22). В тесте на отрицательный геотаксис активность самцов увеличивалась на 45 сутки при каждой концентрации (табл. 23). Спонтанная активность самцов при концентрации 0.05 мкМ увеличивалась на 35 сут, при концентрации 0.5 мкМ снижалась на 15 сут, при концентрации 1 мкМ увеличивалась на 5, 25 и 45 сутки и снижалась на 15 сут. У самок спонтанная активность при воздействии концентрацией 0.05 мкМ снижалась на 25 сутки и увеличивалась на 35, при концентрации 0.5 мкМ снижалась на 5 сутки и увеличивалась 35 сутки (табл. 23). Мы наблюдали увеличение фертильности самок при воздействии вальдекоксибом в концентрации 0.5 мкМ (табл. 25 и 26).

Ликофелон, в концентрации 0.05 мкМ и 0.5 мкМ увеличивал медианную продолжительности жизни самцов на 19.6% и 4%, соответственно, а также увеличивал возраст 90% смертности на 14% при концентрации 0.05 мкМ. У самок при концентрации 0.05 мкМ и 1 мкМ ликофелон увеличивал медианную продолжительности жизни на 5.9% и 9.6%, соответственно и увеличивал возраст 90% смертности на 5.5% при концентрации 1 мкМ (табл. 23). В тесте на отрицательный геотаксис активность самцов увеличивалась на 45 сутки при воздействии концентрацией 0.05 мкМ и 0.5 мкМ, а при концентрации 1 мкМ на 35 и 45 сутки (табл. 23, 24). Спонтанная активность самцов при концентрации 0.05 мкМ увеличивалась на 25-45 сут, при концентрации 0.5 мкМ снижалась на 15 сутки и увеличивалась на 45, при концентрации 1 мкМ увеличивалась на 5, 25, 45 сут. У самок спонтанная активность при концентрации 0.05 мкМ увеличивалась на 35 сут, при концентрации 0.5 мкМ снижалась на 5 сутки и увеличивалась 35 и 45 сут, при концентрации 1 мкМ увеличивалась на 25 сутки (табл. 23). Мы наблюдали снижение фертильности самок при воздействии ликофелоном в концентрации 0.05 мкМ и увеличение при воздействии в концентрации 0.5 мкМ (табл. 25 и 26).

Таблица 22

Влияние НСПВП на продолжительность жизни особей *Drosophila melanogaster*

Вещество (концентрация)	**Самцы**			**Самки**		
	M	**90%**	**n**	**M**	**90%**	**n**
Контроль	59	77	321	52	73	311
CAY10404 (0.05 мкМ)	59 (0%)	77 (0%)	308	58.5 (+12.5 %)*	76 (+4.1 %)*	283
Аспирин (0.05 мкМ)	63 (+6.8 %)*	83 (+7.8%)*	324	69 (+32.7 %)*	83 (+13.7 %)*	294
APHS (0.05 мкМ)	69 (+16.9 %)*	77 (0%)	289	58(+11.5%)**	76 (+4.1 %)*	244
SC-560 (0.05 мкМ)	61 (+3.4%)	77 (0%)	313	51 (-1.9 %)	76 (+4.1 %)**	189
NS-398 (0.05 мкМ)	65 (+10.2%)***	80 (+3.9 %)*	354	59 (+13.5 %)*	77 (+5.5 %)*	192
Контроль	53	77	276	53	77	278
SC-58125 (0.05 мкМ)	57 (+7.5 %)***	77 (0%)	280	55 (+5.8 %)	76 (+4.1 %)*	221
Валерил-салицилат (0.05 мкМ)	54.5 (+2.8 %)	77 (0%)	297	51 (-1.9 %)	70(-4.1 %)***	231
Транс-ресвератрол (0.05 мкМ)	57 (+7.5 %)	77 (0%)	297	57(+9.6%)***	76 (+4.1 %)**	207
Вальдекоксиб (0.05 мкМ)	57 (+7.5 %)***	77 (0%)	281	60 (+15.4 %)*	77 (+5.5 %)*	237
Ликофелон (0.05 мкМ)	57 (+7.5 %)	77 (0%)	288	57 (+9.6 %)**	77 (+5.5 %)*	234
Контроль	50	60	302	52	63	212
CAY10404 (1 мкМ)	54 (+8%)**	65 (+8.3%)	306	54 (+3.8 %)	60 (-4.8 %)*	282
Аспирин (1 мкМ)	53 (+6%)**	64 (+6.7%)***	286	56 (+7.7 %)*	64(+1.6%)***	284
APHS (1 мкМ)	51 (+2%)***	67 (+11.7 %)**	294	57 (+9.6 %)*	61 (-3.2 %)	303
SC-560 (1 мкМ)	47 (-6%)*	55 (-8.3 %) **	300	53 (+1.9 %)	61 (-3.2 %)**	275
NS-398 (1 мкМ)	53 (+6%)*	63 (5%)	305	56 (+7.7 %)*	67 (+6.3 %)*	308
Контроль	50	60	289	55	60	295
SC-58125 (1 мкМ)	52(+4%)**	61 (+1.7 %)	300	55 (0%)	62 (+3.3 %)	288
Валерил-салицилат (1 мкМ)	52 (4%)	62 (+3.3 %)	312	55 (0%)	61 (+1.7 %)	306
Транс-ресвератрол (1 мкМ)	52 (4%)	61 (+1.7 %)	288	54 (-1.8 %)	63 (5%)	299
Вальдекоксиб (1 мкМ)	52 (4%)	61 (+1.7 %)	291	54 (-1.8 %)	62 (+3.3 %)	294
Ликофелон (1 мкМ)	52 (4%)**	61 (+1.7 %)	289	53 (-3.6 %)	61 (+1.7 %)	308
Контроль	48	59	265	50	58	288
CAY10404 (0.5 мкМ)	54 (+12.5 %)*	62 (+5.1 %)*	254	54 (+8%)*	62 (+6.9 %)	290
Аспирин (0.5 мкМ)	54 (+12.5 %)*	64 (+8.5 %)*	295	56 (+12%)*	62 (+6.9 %)	245
APHS (0.5 мкМ)	54 (+12.5 %)*	68 (+15.3 %)*	292	54 (+8%)*	58 (0%)	305
SC-560 (0.5 мкМ)	52 (+8.3 %)*	64 (+8.5 %)***	268	55 (+10%)*	62 (+6.9 %)	273
NS-398 (0.5 мкМ)	55 (+14.6 %)*	71 (+20.3 %)*	247	54.5 (+9%)*	62 (+6.9 %)	256
Контроль	46	57	277	51	59	294
SC-58125 (0.5 мкМ)	54 (+17.4 %)*	64 (+12.3 %)*	259	54 (+5.9 %)***	58 (-1.7 %)	239
Валерил-салицилат (0.5 мкМ)	54 (+17.4 %)*	65 (+14%)*	268	55 (+7.8 %)**	58 (-1.7 %)	214
Транс-ресвератрол (0.5 мкМ)	55 (+19.6 %)*	64 (+12.3 %)*	245	55 (+7.8 %)*	62 (+5.1 %)***	217
Вальдекоксиб (0.5 мкМ)	55 (+19.6 %)*	65 (+14%)*	269	55 (+7.8 %)*	61 (+3.4 %)***	219
Ликофелон (0.5 мкМ)	55 (+19.6 %)*	65 (+14%)*	245	54 (+5.9 %)***	61 (+3.4 %)	205

Таблица 23

Влияние НСПВП на спонтанную локомоторную активность особей *Drosophila melanogaster*

Вещество (концентрация)	**Возраст (сут)**									
	5	**15**	**25**	**35**	**45**	**5**	**15**	**25**	**35**	**45**
	Самцы					**Самки**				
Спонтанная активность (среднее количество пересений датчика на муху)										
Контроль	295	218	110	45	60	78	126	99	10	55
Аспирин (0.05 мкМ)	180	343	73	127*	80	42*	152	13*	107*	78
Аспирин (0.5 мкМ)	118*	171	16*	4*	66	82	248*	119*	35*	67
SC-560 (0.05 мкМ)	162*	254	18*	145*	44	34*	71*	18*	67*	71
SC-560 (0.5 мкМ)	76*	297	212*	50	42	131	137	144	12	60
Валерил-салицилат (0.05 мкМ)	100*	250	121	164*	93	20*	78	27*	79*	109*
Валерил-салицилат (0.5 мкМ)	325	131	171	37	100	93	129	186	25	110
Транс-ресвератрол (0.05 мкМ)	113*	277	71	158*	71	24	144	38*	83*	123*
Транс-ресвератрол (0.5 мкМ)	237	131	81	70	56	103	86	127	29*	107*
CAY10404 (0.05 мкМ)	199	269	48*	58	100	20*	55*	3*	68*	102*
CAY10404 (0.5 мкМ)	62*	113*	21*	2*	102	26	144	115	47*	97*
APHS (0.05 мкМ)	50*	156	113	94*	59	26*	135	10*	54*	31
APHS (0.5 мкМ)	84*	79*	124	17*	57	52	63*	238	39*	32
NS-398 (0.05 мкМ)	162*	219	58*	55	98	32*	117	10*	49*	104*
NS-398 (0.5 мкМ)	166*	76	110	53	98	110	167	177	52*	95
SC-58125 (0.05 мкМ)	96*	365	131	93*	102	43	137	57	80*	34
SC-58125 (0.5 мкМ)	340	102*	118	65	87	84	117	146	50*	27*
Вальдекоксиб (0.05 мкМ)	322	332	64	110*	94	100	171	28*	39*	92
Вальдекоксиб (0.5 мкМ)	324	120*	152	47	89	37	143	110	54*	90
Ликофелон (0.05 мкМ)	332	222	344*	89*	130*	58	154	65	95*	90
Ликофелон (0.5 мкМ)	197	115*	135	37	122*	34	81	114	49*	100*
контроль	134	332	12	22	53	116	199	29	21	64
Аспирин (1 мкМ)	158	140*	19	13	77	63	172*	55	16	70
SC-560 (1 мкМ)	109	65*	50*	12	39	114	133	38	21	67
Валерил-салицилат (1 мкМ)	253*	201*	156*	28	109	206	135*	91	30	119*
Транс-ресвератрол (1 мкМ)	301*	123*	76*	16	61	177	149	54	59	114*
CAY10404 (1 мкМ)	57*	54*	20	5*	105*	107	163	71	17	100
APHS (1 мкМ)	131	195*	31	17	66	172	211*	129	50	29*
NS-398 (1 мкМ)	290*	248*	35	69*	106*	146	229*	134	33	102
SC-58125 (1 мкМ)	136	154*	144*	7*	100*	153	157*	35	20	29*
Вальдекоксиб (1 мкМ)	361*	191*	86*	38	117*	109	132	52	19	86
Ликофелон (1 мкМ)	253*	226	142*	90*	144*	139	138*	127	41	95

*$p<0.05$ по критерию $\chi 2$

Таблица 24

Влияние НСПВП на активность особей *Drosophila melanogaster* в тесте на отрицательный геотаксис

Вещество (концентрация)	**Возраст (сут)**									
	5	**15**	**25**	**35**	**45**	**5**	**15**	**25**	**35**	**45**
	Самцы					**Самки**				
Активность в тесте на отрицательный геотаксис (среднее количество пересений датчика на муху)										
Контроль	24.7	22.7	15	7.7	2.3	18.3	17	15	7.3	6.4
Аспирин (0.05 мкМ)	21	24	16.6	14.3	7.5*	8	17	6.7	5	4.5
Аспирин (0.5 мкМ)	20	15.7	8.7	13	12.1*	19.3	16.7	19.7	6.7	5.6
SC-560 (0.05 мкМ)	18.7	25.7	13.7	13.3	8.8*	11	12	5*	9	3
SC-560 (0.5 мкМ)	17.7	23.3	21.3	15	10.2*	22.7	15.7	16.3	4.3	2
Валерил-салицилат (0.05 мкМ)	18	22.7	21.3	17	10.5*	12.7	14.7	5.7	6.3	4.1
Валерил-салицилат (0.5 мкМ)	21	18.3	18.7	14.7	14.1*	20.3	17	15.3	6.3	1.6
Транс-ресвератрол (0.05 мкМ)	21.3	25	18.3	17	16*	10.3	17	8.7	6.7	11
Транс-ресвератрол (0.5 мкМ)	22.3	18.7	19.3	10.7	13.2*	16.3	18.7	19	9.7	7.5
CAY10404 (0.05 мкМ)	16.7	24	15.7	16	9.4*	6.7	17.3	0.3*	8.7	5.6
CAY10404 (0.5 мкМ)	26.3	21.7	15.7	8.7	9.8*	21	16	15.3	8.3	6.4
APHS (0.05 мкМ)	13	17	17	16	12*	9	14.7	6*	16	5
APHS (0.5 мкМ)	22	25.7	19	14.7	11.4*	21.7	16	18.3	3.7	3.5
NS-398 (0.05 мкМ)	16.3	14	11.7	9.7	9.2*	6.3*	17	6.7	9	7.7
NS-398 (0.5 мкМ)	22.7	19	15.3	14	8*	18.3	17	13.7	8.3	6.1
SC-58125 (0.05 мкМ)	15.7	21.3	15.7	9.3	13.5*	15.7	16	13.7	6	6.9
SC-58125 (0.5 мкМ)	23.3	15	17	12.7	12*	16	11.7	13.3	5.3	8
Вальдекоксиб (0.05 мкМ)	19.3	20.7	15.7	8.3	11.1*	6*	19.3	12	4.7	9
Вальдекоксиб (0.5 мкМ)	24	24.7	22.3	21.7	18.3*	13.3	17	14	10.7	11.7
Ликофелон (0.05 мкМ)	20.3	22.7	29.7	19.7	17*	14.7	21	9.7	2.3	8.8
Ликофелон (0.5 мкМ)	21	18	19.7	14.7	14.2*	19.3	13.7	15	6.7	6.6
Контроль	16.67	19.67	12.67	4.67	3.33	14	14	11.67	9	6.67
Аспирин (1 мкМ)	20	18	16	10.67	14.33*	15.67	14.33	12.67	10.67	7
SC-560 (1 мкМ)	22.23	13.33	16.33	10	11.67*	14.67	12	6.67	6.67	2.67
Валерил-салицилат (1 мкМ)	22.33	23	24	11.67	13.33*	18.67	14	14	12.67	3.33
Транс-ресвератрол (1 мкМ)	24.33	17.67	19.33	15.67*	15.33*	18.33	17	12	11	10
CAY10404 (1 мкМ)	15.67	4.67	4.67	2	10*	15.33	14.33	13	9.67	7.33
APHS (1 мкМ)	18.67	20	19.33	10.33	11.67*	16	17.33	13.67	8.67	4.67
NS-398 (1 мкМ)	20.33	19.67	15	10.33	7.67*	16.33	17.67	14	8.33	8.33
SC-58125 (1 мкМ)	21.67	14.67	17.67	3.33	14*	15	17	10.33	3.67	8.33
Вальдекоксиб (1 мкМ)	23.3	19.67	18	11.67	13*	15.33	18.33	11.33	10.67	9.67
Ликофелон (1 мкМ)	21.33	17.67	18.33*	13.67*	16.67*	18	18.67	16.33	15.33	8.67

*$p<0.05$ по критерию $\chi 2$

Таблица 24

Влияние НСПВП на фертильность самок *Drosophila melanogaster*

Возраст (сут)	**Количества яиц в кладке (шт.)**					**Количество куколок сформировавшихся на десятые сутки (шт.)**				
	5	**15**	**25**	**35**	**45**	**5**	**15**	**25**	**35**	**45**
Контроль	17,3	14,2	3,1	5,7	0,4	16,1	11,4	2,6	4,7	0,3
CAY10404 (0,05 мкМ)	17,3	8,4*	8,5*	3,0*	0,1	16,0	5,8*	6,4*	2,3*	0,0
Аспирин (0,05 мкМ)	21,5	6,6*	1,0	6,1	0,0	20,0*	4,3*	0,8*	1,5*	0,0
APHS (0,05 мкМ)	21,3*	6,5*	7,4*	3,1	0,0	19,6	5,0*	6,1*	2,0	0,0
SC-560 (0,05 мкМ)	20,1	10,2*	9,8*	2,5*	0,1	18,1	8,3	7,1*	1,1*	0,0
NS-398 (0,05 мкМ)	18,5	8,3*	1,0*	1,2*	0,5	16,5	7,1*	0,7*	0,9*	0,1
SC-58125 (0,05 мкМ)	27,0*	14,3	2,3	4,0	0,0	24,7*	10,5	2,1	2,2	0,0
Валерил-салицилат (0,05 мкМ)	21,9*	6,2*	5,3	2,7*	0,0	21,2*	4,7*	4,8	1,0*	0,0
Транс-ресвератрол (0,05 мкМ)	22,8*	7,4*	5,1	4,2	0,2	21,4*	5,8*	4,3	3,5	0,0
Вальдекоксиб (0,05 мкМ)	20,3	10,0*	2,1	5,1	0,0	19,3	8,1*	1,8	4,7	0,0
Ликофелон (0,05 мкМ)	18,4	6,9*	5,0	3,3	0,0	15,7	5,5*	4,8	2,5	0,0
Контроль	24,3	9,2	4,8	7,7	0,6	15,2	5,3	4,1	1,5	0,0
CAY10404 (0,5 мкМ)	22,0	14,5*	8,8*	3,5	0,3*	14,8	9,9*	7,2*	0,7	0,0
Аспирин (0,5 мкМ)	21,8*	13,2*	10,6*	7,3*	0,1	12,0	9,0*	8,9	1,4	0,0
APHS (0,5 мкМ)	23,0	13,5*	12,5*	4,6	1,1	13,8	10,5*	9,9*	1,2	0,4
SC-560 (0,5 мкМ)	22,8	17,4*	10,8*	5,2	0,4	16,1*	11,8*	9,5	0,1	0,0
NS-398 (0,5 мкМ)	15,7*	14,2*	8,5*	4,7*	0,1	13,1	11,4*	7,2*	0,9	0,0
SC-58125 (0,5 мкМ)	20,0	19,8*	6,4	5,0	0,0	14,8	13,1*	5,7	0,0	0,0
Валерил-салицилат (0,5 мкМ)	22,8	13,9*	9,8*	3,1*	0,0	12,5	10,1*	8,8*	0,0	0,0
Транс-ресвератрол (0,5 мкМ)	22,0	12,5*	8,7*	3,6*	0,5	17,1*	9,2*	7,7*	0,3	0,0
Вальдекоксиб (0,5 мкМ)	21,6	20,8*	11,4*	4,4	0,0	14,3	13,7*	9,7*	0,0	0,0
Ликофелон (0,5 мкМ)	23,3	11,6	17,6*	4,5	0,0	15,9	10,3*	14,0*	0,0	0,0
контроль	31,9	21,4	24,5	7,7	0,6	13,7	11,1	14,5	1,9	0,0
CAY10404 (1 мкМ)	32,9	16,6*	21,5	3,5	0,8	16,1*	11,0	13,9	0,5	0,0
Аспирин (1 мкМ)	31,8	18,1	23,4	7,4	0,1	7,9	11,2	15,0	2,8	0,0
APHS (1 мкМ)	29,2	16,2*	21,1*	4,7	2,7	5,4*	10,2	15,1	1,3	0,4
SC-560 (1 мкМ)	34,8	14,8*	22,3	5,4	0,6	4,9*	10,4	13,9	0,1	0,0
NS-398 (1 мкМ)	44,7*	18,7	19,2*	4,8	0,0	6,8*	9,2*	12,3*	1,0	0,0
SC-58125 (1 мкМ)	17,2*	35,0*	9,7*	7,9	0,0	14,2	14,1*	8,5*	0,0	0,0
Валерил-салицилат (1 мкМ)	22,6*	33,5*	13,6*	3,2*	0,0	19,7*	15,7*	11,7	0,0	0,0
Транс-ресвератрол (1 мкМ)	26,8	30,7*	13,5*	3,9*	0,5	21,4*	16,0*	10,8*	0,0	0,0
Вальдекоксиб (1 мкМ)	18,2*	36,1*	14,3*	4,8	0,0	16,3*	18,7*	8,7*	0,0	0,0
Ликофелон (1 мкМ)	16,8*	30,0*	14,3*	5,0	0,0	11,4	17,9*	8,6*	0,0	0,0

* $p<0.05$ по критерию $\chi 2$

Мы показали, что НСПВП в концентрации 0.05 мкМ значительно увеличивают устойчивость самцов к окислительному стрессу, а при воздействии концентрацией 1 мкМ значительно увеличили выживаемость самцов при

тепловом шоке. Мы не наблюдали столь значительных положительных эффектов у самцов при голодании. При воздействии CAY10404, аспирина, APHS, SC-560 и транс-ресвератрола в концентрации 1 мкМ, мы наблюдали снижение устойчивости к окислительному стрессу. SC-560, SC-58125, транс-ресвератрол, ликофелон в концентрации 1 мкМ снижали устойчивость самцов к голоданию (рис. 7).

Было показано, что APHS в концентрации 1 мкМ, NS-398 в концентрации 0.05 мкМ, вальдекоксиб в концентрации 0.05 мкМ и 1 мкМ повышают устойчивость самок к тепловому шоку. Все исследуемые НСПВП, кроме ликофелона, в концентрации 0.05 мкМ, а также CAY10404, SC-58125 и валерил-салицилат в концентрации 1 мкМ повышают выживаемость самок при голодании. APHS, SC-560, NS-398, транс-ресвератрол и ликофелон в концентрации 0.05 мкМ, а также SC-58125 в концентрации 1 мкМ повышают устойчивость самок к окислительному стрессу. Мы наблюдали снижение устойчивости самок к голоданию при воздействии аспирина, транс-ресвератрола и ликофелона в концентрации 1 мкМ, а также снижение устойчивости к окислительному стрессу при воздействии CAY10404 в концентрации 1 мкМ (рис. 7).

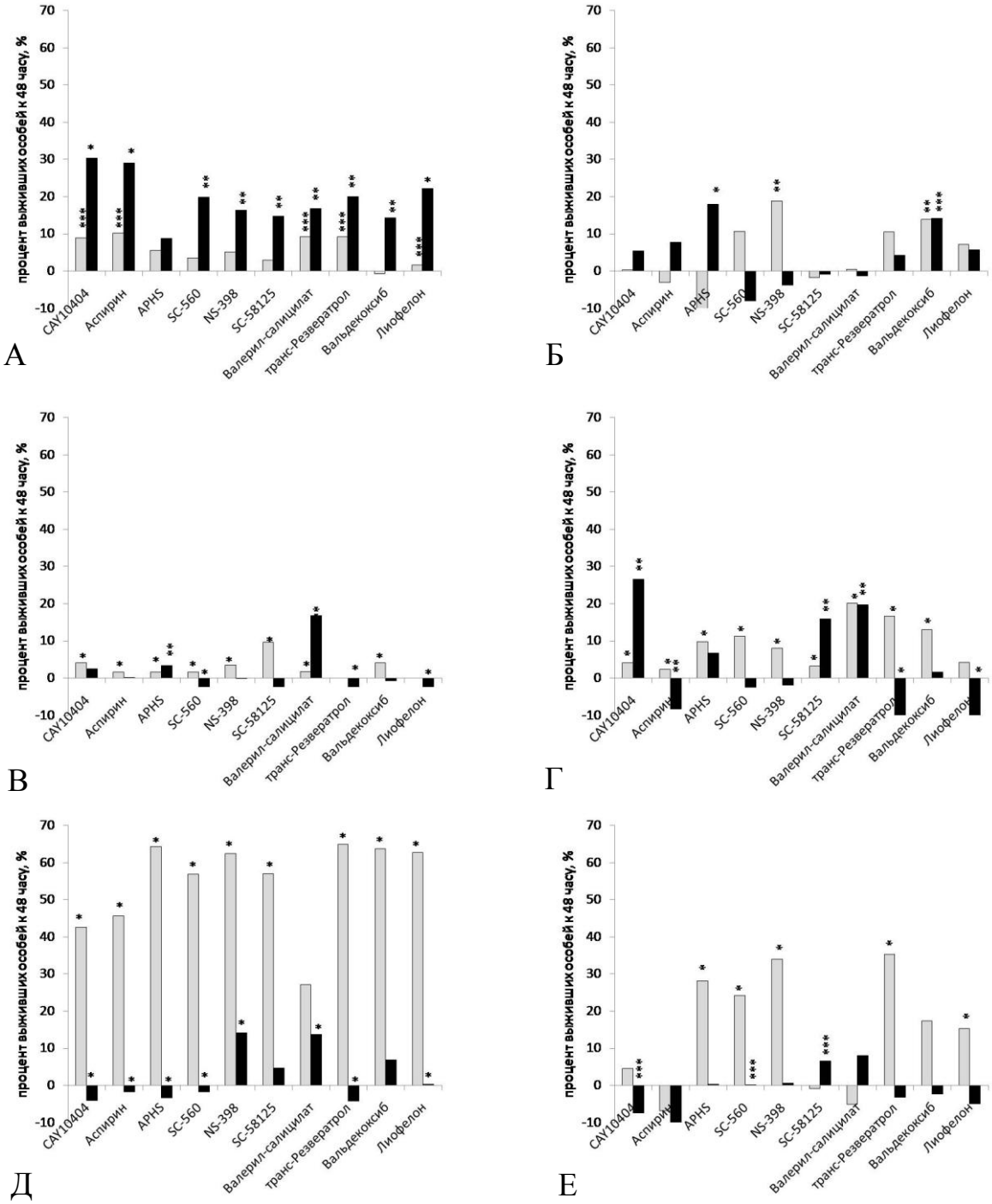


Рис. 7. Влияние НСПВП на стрессоустойчивость особей *Drosophila melanogatser.*

Тепловой шок: А – самцы, Б – самки;

Голодание: В – самцы, Г – самки;

Окислительный стресс: Д – самцы, Е – самки;

0.05 мкМ;

1 мкМ

* p< 0.001, ** p< 0.001,* ** p< 0.05 по F-критерию Фишера.

Для того, чтобы понять механизмы геропротекторных свойств НСПВП, было изучено влияние аспирина, вальдекоксиба и NS-398 на продолжительность жизни дрозофил со сниженной активностью элементов Pkh2/ypk1/lem3/tat2 сигнального пути.

Мы наблюдали снижение продолжительности жизни у мух с РНК интерференцией генов ypk1/S6K, Pkh2/PDK1 и lem3/CG8679 при воздействии аспирина, вальдекоксиба, NS-398 в концентрации 1 мкМ (рис 8-10). Тем не менее, у самцов линии ActGS> ypk1/S6kRNAi # 2 при воздействии NS-398 мы наблюдали незначительное увеличение продолжительности жизни. У самок линии ActGS>lem/CG8679RNAi мы также наблюдали увеличение продолжительности жизни. Воздействие НСПВП на мух линии tat2/CG14741 снижало продолжительность жизни самцов, но увеличивало ее у самок.

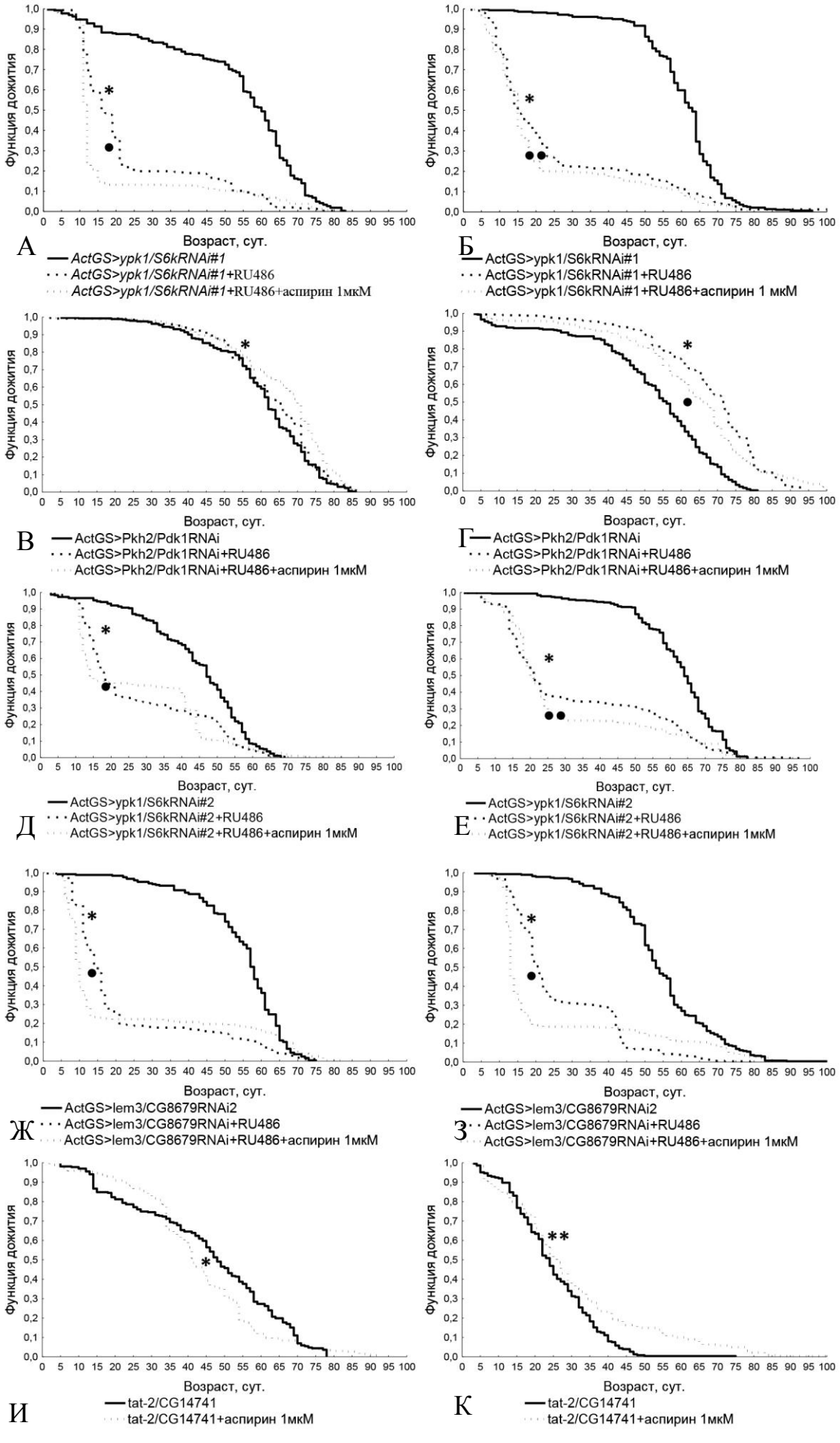

Функция дожития
Возраст, сут.
А
ActGS>ypk1/S6kRNAi#1
ActGS>ypk1/S6kRNAi#1+RU486
ActGS>ypk1/S6kRNAi#1+RU486+аспирин 1мкМ
Б
ActGS>ypk1/S6kRNAi#1
ActGS>ypk1/S6kRNAi#1+RU486
ActGS>ypk1/S6kRNAi#1+RU486+аспирин 1 мкМ
В
ActGS>Pkh2/Pdk1RNAi
ActGS>Pkh2/Pdk1RNAi+RU486
ActGS>Pkh2/Pdk1RNAi+RU486+аспирин 1мкМ
Г
ActGS>Pkh2/Pdk1RNAi
ActGS>Pkh2/Pdk1RNAi+RU486
ActGS>Pkh2/Pdk1RNAi+RU486+аспирин 1мкМ
Д
ActGS>ypk1/S6kRNAi#2
ActGS>ypk1/S6kRNAi#2+RU486
ActGS>ypk1/S6kRNAi#2+RU486+аспирин 1мкМ
Е
ActGS>ypk1/S6kRNAi#2
ActGS>ypk1/S6kRNAi#2+RU486
ActGS>ypk1/S6kRNAi#2+RU486+аспирин 1мкМ
Ж
ActGS>lem3/CG8679RNAi2
ActGS>lem3/CG8679RNAi+RU486
ActGS>lem3/CG8679RNAi+RU486+аспирин 1мкМ
З
ActGS>lem3/CG8679RNAi2
ActGS>lem3/CG8679RNAi+RU486
ActGS>lem3/CG8679RNAi+RU486+аспирин 1мкМ
И
tat-2/CG14741
tat-2/CG14741+аспирин 1мкМ
К
tat-2/CG14741
tat-2/CG14741+аспирин 1мкМ

Рис. 8. Влияние аспирина (1мкМ) на дрозофил со сниженной активностью компонентов Pkh2/ypk1/lem3/tat2 сигнального пути.

А – *ActGS>ypk1/S6kRNAi#1* самцы, Б – *ActGS>ypk1/S6kRNAi#1* самки, В – *ActGS>Pkh2/Pdk1RNAi* самцы, Г – *ActGS>Pkh2/Pdk1RNAi* самки, Д – *ActGS>ypk1/S6kRNAi#2* самцы, Е – *ActGS>ypk1/S6kRNAi#2* самки, Ж – *ActGS>lem3/CG8679RNAi* самцы, З – *ActGS>lem3/CG8679RNAi* самки, И – *tat2/CG14741* самцы, К – *tat2/CG14741* самки.

*$p<0.001$, **$p<0.05$ при сравнении мух интактной группы с мухами, на которых воздействовали RU486, согласно тесту Колмогорова-Смирнова;

•$p<0.001$, ••$p<0.05$ при сравнении мух, на которых воздействовали RU486 с мухами группы RU486 +НСПВП, согласно тесту Колмогорова-Смирнова.

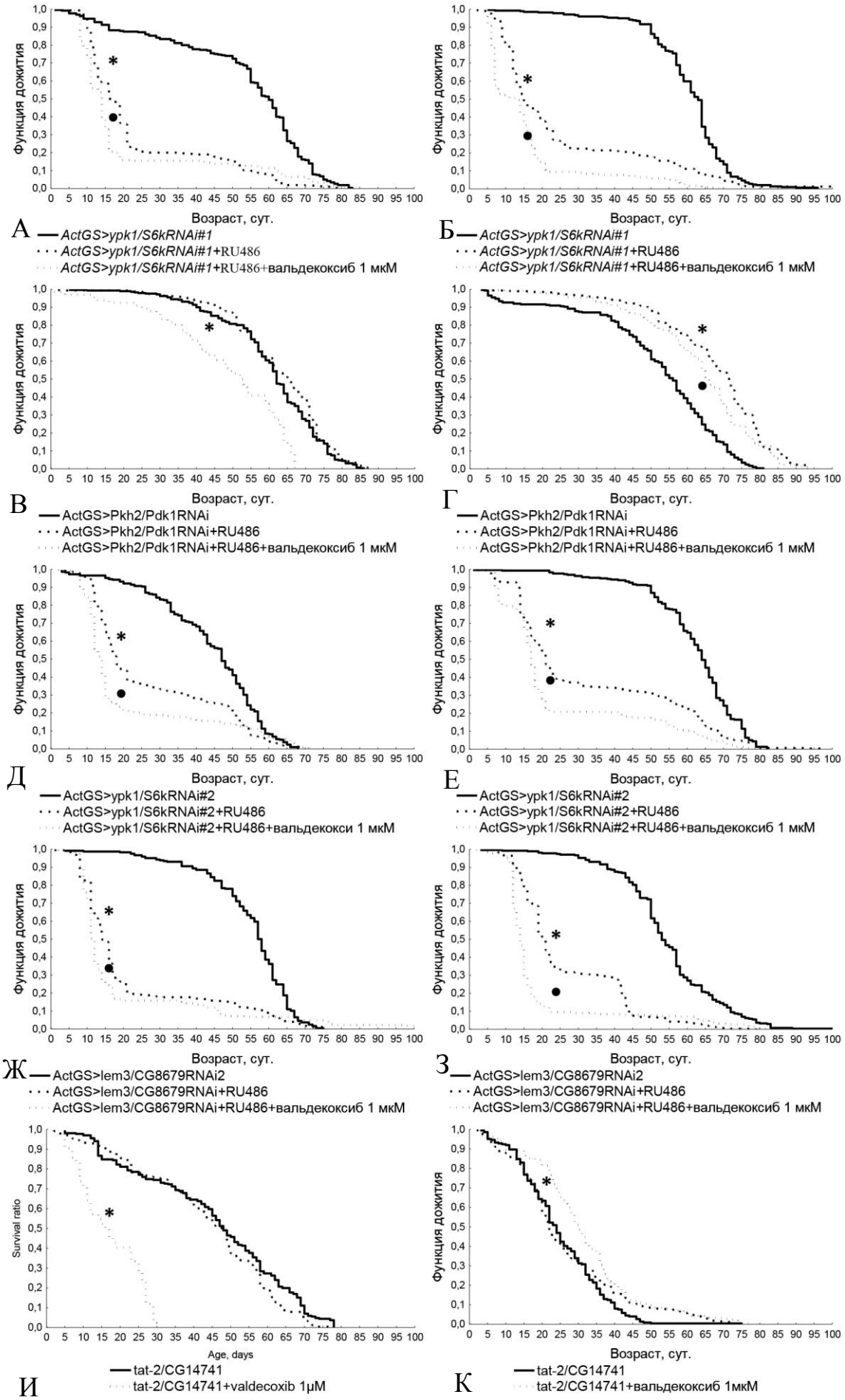

Функция дожития
Возраст, сут.
А
ActGS>ypk1/S6kRNAi#1
ActGS>ypk1/S6kRNAi#1+RU486
ActGS>ypk1/S6kRNAi#1+RU486+вальдекоксиб 1 мкМ
Б
ActGS>ypk1/S6kRNAi#1
ActGS>ypk1/S6kRNAi#1+RU486
ActGS>ypk1/S6kRNAi#1+RU486+вальдекоксиб 1 мкМ
В
ActGS>Pkh2/Pdk1RNAi
ActGS>Pkh2/Pdk1RNAi+RU486
ActGS>Pkh2/Pdk1RNAi+RU486+вальдекоксиб 1 мкМ
Г
ActGS>Pkh2/Pdk1RNAi
ActGS>Pkh2/Pdk1RNAi+RU486
ActGS>Pkh2/Pdk1RNAi+RU486+вальдекоксиб 1 мкМ
Д
ActGS>ypk1/S6kRNAi#2
ActGS>ypk1/S6kRNAi#2+RU486
ActGS>ypk1/S6kRNAi#2+RU486+вальдекокси 1 мкМ
Е
ActGS>ypk1/S6kRNAi#2
ActGS>ypk1/S6kRNAi#2+RU486
ActGS>ypk1/S6kRNAi#2+RU486+вальдекоксиб 1 мкМ
Ж
ActGS>lem3/CG8679RNAi2
ActGS>lem3/CG8679RNAi+RU486
ActGS>lem3/CG8679RNAi+RU486+вальдекоксиб 1 мкМ
З
ActGS>lem3/CG8679RNAi2
ActGS>lem3/CG8679RNAi+RU486
ActGS>lem3/CG8679RNAi+RU486+вальдекоксиб 1 мкМ
Survival ratio
Age, days
И
tat-2/CG14741
tat-2/CG14741+valdecoxib 1μM
К
tat-2/CG14741
tat-2/CG14741+вальдекоксиб 1мкМ

Рис. 9. Влияние вальдекоксиба (1мкМ) на дрозофил со сниженной активностью компонентов Pkh2/ypk1/lem3/tat2 сигнального пути.

А – *ActGS>ypk1/S6kRNAi#1* самцы, Б – *ActGS>ypk1/S6kRNAi#1* самки, В – *ActGS>Pkh2/Pdk1RNAi* самцы, Г – *ActGS>Pkh2/Pdk1RNAi* самки, Д – *ActGS>ypk1/S6kRNAi#2* самцы, Е – *ActGS>ypk1/S6kRNAi#2* самки, Ж – *ActGS>lem3/CG8679RNAi* самцы, З – *ActGS>lem3/CG8679RNAi* самки, И – *tat2/CG14741* самцы, К – *tat2/CG14741* самки.

*$p<0.001$, **$p<0.05$ при сравнении мух интактной группы с мухами, на которых воздействовали RU486, согласно тесту Колмогорова-Смирнова;

•$p<0.001$, ••$p<0.05$ при сравнении мух, на которых воздействовали RU486 с мухами группы RU486 +НСПВП, согласно тесту Колмогорова-Смирнова.

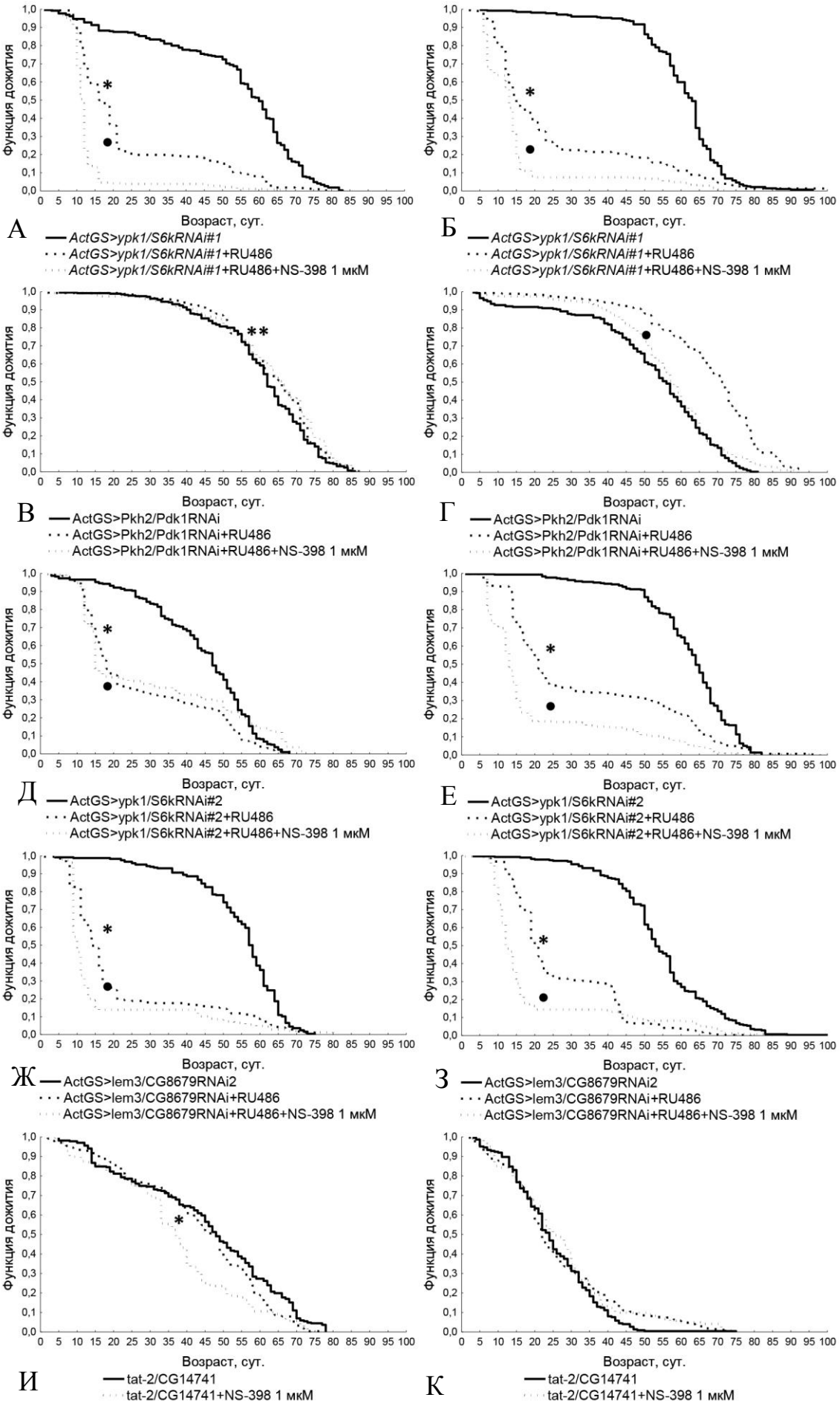

Функция дожития
Возраст, сут.
А
ActGS>ypk1/S6kRNAi#1
ActGS>ypk1/S6kRNAi#1+RU486
ActGS>ypk1/S6kRNAi#1+RU486+NS-398 1 мкМ
Б
ActGS>ypk1/S6kRNAi#1
ActGS>ypk1/S6kRNAi#1+RU486
ActGS>ypk1/S6kRNAi#1+RU486+NS-398 1 мкМ
В
ActGS>Pkh2/Pdk1RNAi
ActGS>Pkh2/Pdk1RNAi+RU486
ActGS>Pkh2/Pdk1RNAi+RU486+NS-398 1 мкМ
Г
ActGS>Pkh2/Pdk1RNAi
ActGS>Pkh2/Pdk1RNAi+RU486
ActGS>Pkh2/Pdk1RNAi+RU486+NS-398 1 мкМ
Д
ActGS>ypk1/S6kRNAi#2
ActGS>ypk1/S6kRNAi#2+RU486
ActGS>ypk1/S6kRNAi#2+RU486+NS-398 1 мкМ
Е
ActGS>ypk1/S6kRNAi#2
ActGS>ypk1/S6kRNAi#2+RU486
ActGS>ypk1/S6kRNAi#2+RU486+NS-398 1 мкМ
Ж
ActGS>lem3/CG8679RNAi2
ActGS>lem3/CG8679RNAi+RU486
ActGS>lem3/CG8679RNAi+RU486+NS-398 1 мкМ
З
ActGS>lem3/CG8679RNAi2
ActGS>lem3/CG8679RNAi+RU486
ActGS>lem3/CG8679RNAi+RU486+NS-398 1 мкМ
И
tat-2/CG14741
tat-2/CG14741+NS-398 1 мкМ
К
tat-2/CG14741
tat-2/CG14741+NS-398 1 мкМ

Рис. 10. Влияние NS-398 (1мкМ) на дрозофил со сниженной активностью компонентов Pkh2/ypk1/lem3/tat2 сигнального пути.

А – *ActGS>ypk1/S6kRNAi#1* самцы, Б – *ActGS>ypk1/S6kRNAi#1* самки, В – *ActGS>Pkh2/Pdk1RNAi* самцы, Г – *ActGS>Pkh2/Pdk1RNAi* самки, Д – *ActGS>ypk1/S6kRNAi#2* самцы, Е – *ActGS>ypk1/S6kRNAi#2* самки, Ж – *ActGS>lem3/CG8679RNAi* самцы, З – *ActGS>lem3/CG8679RNAi* самки, И – *tat2/CG14741* самцы, К – *tat2/CG14741* самки.

*$p<0.001$, **$p<0.05$ при сравнении мух интактной группы с мухами, на которых воздействовали RU486, согласно тесту Колмогорова-Смирнова;

•$p<0.001$, ••$p<0.05$ при сравнении мух, на которых воздействовали RU486 с мухами группы RU486 +НСПВП, согласно тесту Колмогорова-Смирнова.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе нами проведено исследование механизмов формирования устойчивости к различным стресс-факторам на модели *Drosophila melanogaster*. Для выяснения роли внутриклеточных старение-ассоциированных сигнальных путей в формировании жизнеспособности мы использовали ингибиторы IGF-I/PI3K/AKT/TOR и NF-κB, а также нестероидные противовоспалительные препараты.

Согласно базе данных Geroprotectors, известно более 200 фармакологических препаратов, способных продлевать жизнь модельным животным (Geroprotectors.org: a new, structured…, 2015). При этом около 90 препаратов оказывают положительное или отрицательное влияние на устойчивость к абиотическим стресс-факторам, включая гипертемию, действие прооксидантов и голодание. Кроме того, из литературных источников известно, что мутации в генах-регуляторах, являющихся переключателями клеточных программ поддержания роста или устойчивости к стрессам, например, в гене субъединицы PI3K, ведут к значительному увеличению продолжительности жизни и стрессоустойчивости (Novel protein kinase…, 2012). Можно предположить, что наиболее эффективными потенциальными адаптогенными препаратами могут являться вещества, обладающие специфичностью к продуктам генов, контролирующих эволюционно-консервативные механизмы старения, мутации в которых оказывали наибольший эффект на продолжительность жизни и стрессоустойчивость. В связи с этим мы исследовали адаптогенные свойства специфических фармакологических ингибиторов продуктов генов *PI3K, TOR, NF-κB, iNOS*, ассоциированных со старением, и нестероидных противовоспалительных препаратов.

На сегодняшний день у *Drosophila melanogaster* описаны гомологи TOR (Genetic and biochemical…, 2000), PI3K (MacDougall et al., 1995), NF-κB (Dushay et al., 1996) и iNOS (The *Drosophila* nitric-oxide synthase…, 2001). Для изученных

нами НСПВП известно несколько мишеней, таких как пероксидаза Pxt, ферменты IGF-I/PI3K/AKT/TOR и MAPK пути (Tootle, Spradling, 2008; Effects of CAY10404…, 2009; Demidenko, Blagosklonny, 2009; Celecoxib extends…, 2011; Enhanced longevity by…, 2014). Наличие у дрозофилы белков-мишеней позволяет использовать ее в качестве модели для фармакологического скрининга препаратов с предполагаемой адаптогенной активностью.

Мы показали, что рапамицин обладает старение-супресорным эффектом даже в низкой, наномолярной концентрации (0.005 мкМ), при которой он значительно увеличивает медианную продолжительность жизни самок (на 14%) и самцов (на 12%) и улучшает качество жизни модельных животных согласно анализу локомоторной активности. Ранее было показано, что фармакологическое ингибирование TOR увеличивает продолжительность жизни дрожжей (Autophagy is required…, 2009), дрозофил (Mechanisms of life span…, 2010; Moskalev, Shaposhnikov, 2010) и мышей (Rapamycin fed late…, 2009; Rapamycin, but not resveratrol…, 2011). В экспериментах на дрожжах была показана старение-супрессорная активность рапамицина в концентрациях 10, 20 и 40 нМ (Autophagy is required…, 2009). Увеличение продолжительности жизни дрозофил сопровождалось повышенной устойчивостью к окислительному стрессу и голоданию (Mechanisms of life span…, 2010), а у мышей наблюдалось повышение двигательной активности стареющих самцов (Rapamycin, but not resveratrol…, 2011). Однако эффект увеличения продолжительности жизни дрозофил при концентрации рапамицина 50, 200 и 400 мкМ сопровождался существенным снижением фертильности (Mechanisms of life span…, 2010). Однако в нашем исследовании мы не наблюдали отрицательного влияния рапамицина на фертильность самок дрозофил.

Специфическое ингибирование PI3K вортманнином в концентрации 0.005 мкМ не привело к статистически значимым эффектам на продолжительность жизни. Вортманнин в концентрации 5 мкМ вызвал увеличение медианной продолжительность жизни самцов (на 5%) и ее снижение у самок (на 8.2%). При

этом вортманнин в концентрациях 0.005 и 5 мкМ привел к увеличению локомоторной активности самцов.

Ранее нами было установлено, что вортманнин (0.5 мкМ) и LY294002 (5 мкМ) вызывают увеличение медианной и максимальной продолжительности жизни как у самцов, так и у самок (Москалев, Шапошников, 2008; Moskalev, Shaposhnikov, 2010). Кроме того, обработка вортманнином (5 мкМ) и LY294002 (5, 100 мкМ) приводила к увеличению устойчивости самок и самцов *Drosophila melanogaster* к воздействию острого облучения в дозе 30 Гр по показателям выживаемости (Шапошников и др., 2010). Таким образом, эффект ингибирования PI3K зависит от концентрации ингибитора и, по-видимому, определяется вовлеченностью данного фермента в поддержание тонкого баланса между развитием/репродукцией с одной стороны и стрессоустойчивостью/продолжительностью жизни с другой. Кроме концентрационной зависимости нами отмечено различие эффектов ингибирования PI3K у особей разного пола.

Согласно данным литературы, ингибирование PI3K с помощью специфического ингибитора LY294002 ведет к увеличению продолжительности жизни коловраток (Insulin-like growth factor…, 2005), продолжительности жизни и термотолерантности нематод (PI3-kinase inhibition…, 1999). Особи *Caenorhabditis elegans*, гомозиготные по нонсенс-мутации в гене *age-1*, который кодирует каталитическую субъединицу PI3K ($PI3K_{CS}$), имеют увеличенную, более чем в 10 раз, медианную и максимальную продолжительность жизни (Remarkable longevity…, 2008). Одновременно у линии с мутацией *age-1* наблюдается задержка развития, повышенная устойчивость к окислительному стрессу и электрошоку (Remarkable longevity…, 2008). Удаление у дрозофилы медианных нейросекреторных клеток мозга, продуцирующих инсулин-подобный пептид, приводит к снижению плодовитости и термотолерантности (Longer lifespan…, 2005). Тем не менее, недостаток инсулин-подобного пептида вызывает увеличение медианной и максимальной продолжительности жизни и повышение устойчивость к окислительному стрессу и голоданию (Longer lifespan…, 2005).

Во всех вариантах обработки ингибитором активности NF-κB PDTC (1.25, 12.5, 125 мкМ) продолжительность жизни самцов увеличивалась (до 7%). Продолжительность жизни самок, при воздействии PDTC в концентрациях 1.25 и 12.5 мкМ уменьшалась (на 2%). При воздействии QNZ (0.03, 0.3, 3 мкМ) мы наблюдали уменьшение продолжительности жизни самок до 15%. Различия в эффектах PDTC и QNZ могут быть связаны с разным механизмом действия данных препаратов. В то время как PDTC ингибирует активацию NF-κB за счет предотвращения деградации I-κB (Dithiocarbamates as potent…, 1992; Liu et al., 1999a), QNZ подавляет активность NF-κB на уровне транскрипционной активности (Discovery of quinazolines…, 2003). Кроме того, PDTC обладает металл хелатирующим и антиоксидантным свойствами (Dithiocarbamates as potent…, 1992; Liu et al., 1999a), что может усиливать его старение-супрессирующее действие.

Известно, что транскрипционный фактор NF-κB контролирует возраст-зависимые изменения в экспрессии генов воспаления. Например, с возрастом происходит увеличение экспрессии NF-κB-зависимых генов в эндотелии кровеносных сосудов человека, что, прежде всего, связано со снижением IκB-опосредованного ингибирования NF-κB. С возрастом увеличивается экспрессия NF-κB-зависимых генов, вызывающих развитие атеросклероза в почечных клубочках крыс (NFkappaB promotes inflammation…, 2010). Также показана роль NF-κB в онкогенезе и развитии опухолей и метастаз (Kim et al., 2006). Вместе с тем, специфическое ингибирование активности NF-κB в эндотелиальных клетках кровеносных сосудов препятствует развитию атеросклероза. Также фармакологическое ингибирование NF-κB может тормозить развитие опухолей (Kim et al., 2006). Снижение уровня активности NF-κB препятствует развитию дегенеративного фенотипа у мышей, нокаутных по гену сиртуина Sirt6, участвующего в эксцизионной репарации оснований (SIRT6 links histone H3…, 2009). Кавахара и соавт. предполагают, что важнейшая гомеостатическая функция SIRT6 состоит в предотвращении сверхактивации NF-κB-зависимых генов посредством деацетилирования лизина 9 гистона H3 (H3K9) на промоторах генов-

мишеней NF-κB, в то время как сверхактивация NF-κB способствует нормальному и ускоренному старению (SIRT6 links histone H3…, 2009). Фармакологическое ингибирование IκB киназы (IKK) ведет к задержке развития возраст-зависимых патологий у мышей с прогерией, снижает уровень окислительных повреждений ДНК и предотвращает стресс-индуцированное клеточное старение (NF-kappaB inhibition…, 2012). Также было показано, что IKK-β и NF-κB ингибируют гонадолиберин, опосредуя возраст-зависимое снижение функции гипоталамуса (Hypothalamic programming…, 2013). После ингибирования возраст-зависимой активации IKK-β и NF-κB в гипоталамусе или мозге у мышей наблюдается задержка процесса старения и увеличение продолжительности жизни (на 20%) (Hypothalamic programming…, 2013). Также, ранее в наших исследованиях было показано увеличение продолжительности жизни дрозофил при воздействии PDTC в концентрации 125 мкМ (Moskalev, Shaposhnikov, 2011).

Отмеченное нами увеличение продолжительности жизни самцов и ее уменьшение у самок при ингибировании iNOS с помощью 1400W (0.03, 0.3, 3 мкМ) может быть следствием неоднозначной роли этого фермента. Например, блокирование iNOS препаратами приводит к снижению риска сердечно-сосудистой патологии у крыс (Inhibition of iNOS protects…, 2010). Нокаутные по гену *iNOS* мыши характеризуются снижением продолжительности жизни, однако, повышение активности этого гена приводит к увеличению риска сердечно-сосудистой патологии (Nitric oxide synthases…, 2009). Следовательно, как сверхактивация, так и полное подавление iNOS приводят к негативным последствиям (Nitric oxide synthases…, 2009). Так как самки потребляют больше пищи в течение жизни, они получают большее количество исследуемого вещества. Это может вести к чрезмерной инактивации dNOS и негативным последствиям на продолжительность жизни и локомоторную активность. Таким образом, можно предположить, что полученный эффект зависел от пол-специфической реакции на препарат и количества поступившего в организм вещества. Исследования показывают, что iNOS может быть вовлечен в развитие сердечно-сосудистых, легочных, нервно-мышечных патологий, а также в

процессы канцерогенеза, в развитие инсулинорезистентности (Foster et al., 2009; Tang et al., 2012; Targeted disruption of inducible…, 2013). К тому же, активация iNOS может блокировать процессы репарации ДНК, которые играют важную роль в формировании устойчивости к неблагоприятным факторам (Tang et al., 2012; The role of DNA damage…, 2013).

Поскольку жизнеспособность является сложным процессом, в который вовлечены многие внутриклеточные сигнальные пути, мы сделали предположение, что наиболее выраженный эффект на жизнеспособность будет оказывать совместное ингибирование нескольких сигнальных путей.

Согласно полученным нами данным, совместное воздействие рапамицина (5 мкМ) и вортманнина (5 мкМ), а также сочетание PDTC (125 мкМ) с рапамицином (0.005 мкМ) и вортманином (0.005 мкМ), в наибольшей степени положительно сказывается на продолжительности жизни самок. У самцов сочетанное действие препаратов не приводит к увеличению продолжительности жизни в большей степени, чем каждый из исследованных ингибиторов в отдельности. Наблюдаемое нами различие эффектов у самцов и самок может быть связано с изначально существующими различиями между полами в метаболизме препаратов (Chang et al., 2011), стрессоустойчивости (Weber et al., 2012) и репродукции (Bonduriansky et al., 2008). Из источников литературы известен пример, когда использование куркумина и тифлавина Т, также не имело совместного эффекта на продолжительность жизни нематод (Amyloid-binding compounds…, 2011).

Таким образом, нами проведено комплексное исследование рапамицина, вортманнина, PDTC, QNZ и 1400W в разных концентрациях и сочетаниях на продолжительность жизни дрозофил. Полученные нами данные подтверждают предположение о том, что ингибирование PI3K, TOR, NF-κB и iNOS может приводить к увеличению продолжительности жизни дрозофил и вместе с тем, не вызывать снижения ее качества (фертильности и локомоторной активности).

При этом воздействие низкими концентрациями исследованных препаратов характеризуется меньшей вероятностью возникновения отрицательных эффектов на качество жизни. Также нами выявлены значительные различия эффектов

воздействия ингибиторов между самцами и самками. У самок мы наблюдали больше отрицательных эффектов на продолжительность жизни, но без снижения активности или фертильности. Во всех вариантах обработки продолжительность жизни самцов увеличивалась, а показатели локомоторной активности были не ниже значений интактной группы. Обнаружено, что сочетанное действие препаратов имеет наибольший положительный эффект на продолжительность жизни самок.

Нами было показано, что практически все исследуемые нами НСПВП способны увеличивать медианную продолжительность жизни дрозофил (на 4-19% у самцов и на 2-33% у самок), а также увеличивать возраст гибели 90% особей выборки (на2-20% у самцов и на 2-13% у самок). Также воздействие SC-560 в концентрации 0.5 мкМ у самцов, а у самок валерил-салицилатом в концентрации 1 мкМ, приводило к снижению продолжительности жизни. Наиболее сильное увеличение продолжительности жизни у самцов мы наблюдали при воздействии APHS (на 17%), SC-58125 (на 17%), валерил-салицилатом (на 17%), транс-ресвератролом (на 20%), вальдекоксибом (на 20%), ликофелоном (на 20%). У самок наиболее значительный положительный эффект на продолжительность жизни оказывали вальдекоксиб (увеличение на 15%) и аспирин (увеличение на 33%). Наибольшие эффекты на продолжительность жизни у самцов мы наблюдали при воздействии концентрацией 0.05 мкМ, у самок – 1 мкМ.

Полученные нами данные согласуются с результатами, полученными другими исследователями на дрожжах (Enhanced longevity by…, 2014), нематодах (Amyloid-binding compounds…, 2011; Celecoxib extends…, 2011; Enhanced longevity by…, 2014), мухах (Enhanced longevity by…, 2014) и на мышах (Nordihydroguaiaretic acid…, 2008). Кроме того, ранее нами было показано, что ингибировании провоспалительных внутриклеточных ферментов, таких как NF-κB (Moskalev, Shaposhnikov, 2011) и iNOS (Selective anticancer agents…, 2013) также увеличивает продолжительность жизни дрозофил.

Мы показали, что исследуемые нами НСПВП способны замедлять возраст-зависимое снижение локомоторной активности. Это может быть связано с

нейропроекторным эффектом, который оказывают вещества данной группы (Black, 2002; Asanuma et al., 2004). Было показано, что аспирин способен тормозить возраст-зависимое снижение функциональной активности у нематод (Amyloid-binding compounds…, 2011).

При применении аспирина (1 мкМ), валерил-салицилата (0.05 мкМ), NS-398 (0.05 мкМ) и ликофелона (0.05 мкМ) мы наблюдали снижение фертильности самок. Это может быть связано с тем, что НСПВП способны ингибировать пероксидазу Pxt, которая у дрозофил принимает участие в фулликулогенезе (Tootle, Spradling, 2008). Эффект увеличения продолжительности жизни часто бывает сопряжен со снижением плодовитости.

Известно, что старение и стрессоустойчивость взаимосвязаны (Stress resistance and longevity…, 1999). Мы наблюдали увеличение устойчивости к различным видам стресса при воздействии исследуемыми НСПВП. Это может быть связано со способностью данных препаратов ингибировать инсулин/IGF-1 сигнальный путь, что приводит к повышению стрессоустойчивости (Effects of CAY10404…, 2009; Celecoxib extends…, 2011).

Было показано, что ингибирование ЦОГ оказывает нейропротекторный эффект за счет снижения синтеза АФК при метаболизме арахидоновой кислоты, снижения синтеза простагландинов и уменьшения накопления β-амилоида (Breder, 1997; Black, 2002; Asanuma et al., 2004). SC-560 замедляет развитие патологии при болезни Альцгеймера (Choi et al., 2013). Ликофелон способен нормализовать показатели ПОЛ в тканях головного мозга и поведенческую активность у животных с экспериментальным синдромом Хантингтона (Kalonia et al., 2011).

Известно, что НСПВП могут обладать собственной антиоксидантной активностью (Qadri et al., 2009; Targeting oxidative stress…, 2011; Liposomes as carriers of the lipid…, 2013). Так например, комплексная биологическая активность ресвератрола связана не только с его способностью взаимодействовать со множеством молекулярных мишеней, в частности, с циклооксигеназой, но и с высокой антиоксидантной активностью, обусловленной как непосредственной

элиминацией АКФ, так и ингибированием ферментов, участвующих в их формировании, а также усилением активности ферментов антиоксидантной защиты. Экспериментально показано, что ресвератрол проявляет высокую антиоксидантную активность на модельных мембранах (Liposomes as carriers of the lipid…, 2013), клетках (DNA damage induced…, 2006; Qadri et al., 2009; Search for dilepton resonances…, 2011), а также на уровне организма (Protective effect of resveratrol…, 2008; Sengottuvelan et al., 2009). Кроме того, многие эффекты ресвератрола обусловлены действием его метаболитов, при этом даже очень низкие дозы ресвератрола могут оказывать воздействие на организм благодаря опосредованному действию (Antioxidant effects of resveratrol…, 2013).

Согласно недавно опубликованным данным положительный эффект ибупрофена на продолжительность жизни дрожжей опосредован дестабилизацией триптофановой пермеаза Tat2p (Enhanced longevity by…, 2014). Увеличение продолжительности жизни нематоды после обработки целекоксибом обусловлено ингибированием фосфоинозитид-зависимой протеинкиназы-1 (PDK-1), ключевого компонента инсулинового/IGF-1 зависимого сигналинга, и последующей активации транскрипционного фактора DAF-16/FOXO (Celecoxib extends…, 2011). Функциональные гомологи отдельных звеньев Pkh2/ypk1/lem3/tat2 сигнального пути известны также и у дрозофилы (Functional counterparts…, 1999), поэтому мы исследовали роль Pkh2/ypk1/lem3/tat2 сигнального пути в эффектах НСПВП на модели дрозофилы.

В нашем исследовании, РНК-интерференция гена Pkh2/PDK1 привела к увеличению продолжительности жизни самок дрозофил. Наши данные согласуются с эффектами фармакологического ингибирования Pkh2/PDK-1 у нематод (Celecoxib extends…, 2011). Возможно, одновременное воздействие НСПВП снижает положительный эффект РНК-интерференции у самок. Следует отметить, что воздействие НСПВП на мухах со сниженной активностью других компонентамов Pkh2/ypk1/lem3/tat2 сигнального пути также снижало продолжительность жизни. Таким образом, увеличение продолжительности

жизни при воздействии НСПВП опосредуется элементами Pkh2/ypk1/lem3/tat2 сигнального пути.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что ингибирование ферментов PI3K, TOR, NF-κB и iNOS, а также воздействие нестероидными противовоспалительными препаратами может увеличивать продолжительность жизни модельных животных, а также повышать устойчивость к воздействию стрессовых факторов. Даже микро- и наномолярные концентрации ингибиторов PI3K, TOR, NF-κB и iNOS, а также НСПВП способны оказывать геропротекторный эффект, сохранять физиологические параметры, такие как фертильность и локомоторная активность на уровне более молодых особей. Таким образом, одним из возможных путей увеличения продолжительности жизни и сохранения функциональной активности является воздействие на механизмы, повышающие стрессоустойчивость организма.

Согласно теории Кирквуда (Kirkwood, 1977), у каждого организма есть оптимум соотношения ресурсов, который он тратит либо на размножение, либо на поддержание сомы (тела). Повышение жизнеспособности согласно этой теории возможно благодаря появлению адаптаций, выводящих организм из-под давления агрессивных факторов среды и дающих возможность освободить ресурсы для самообслуживания в ущерб высокой плодовитости. Снижение активности IGF-I/PI3K/AKT/TOR и NF-κB каскадов смещает акценты распределения ресурсов организма на поддержание жизнеспособности, мобилизует защитные системы клетки. Ингибиторы PI3K, TOR, NF-κB и iNOS и НСПВП оказывают адаптогенный эффект на организм через активацию механизмов стрессоустойчивости. Это ведет к повышению жизнеспособности организма как в условиях острого стрессового воздействия (температура, голодание, окислительный стресс), так и в условиях фоновых воздействий. Стоит отметить, что в отличие от мутаций в генах IGF-I/PI3K/AKT/TOR и NF-κB каскадов, ингибирование данных ферментов не ведет к резкому снижению фертильности самок. Таким образом, находит подтверждение гипотеза, согласно которой жизнеспособность организма обусловливается адаптационными возможностями

организма, его способностью противостоять разрушающему влиянию факторов внешней среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе мы исследовали роль внутриклеточных старение-ассоциированных сигнальных путей в обеспечении жизнеспособности организма и формировании устойчивости к неблагоприятному действию абиотических факторов (действие прооксиданта, гипертермия, голодание).

Согласно теории жизненных стратегий, показатели жизнеспособности конкурируют между собой за ограниченные энергетические ресурсы (Stearns, 1992). Например, перераспределение ресурсов в пользу устойчивости к неблагоприятным факторам среды снижает уровень ресурсов, доступных для фертильности и формирует отрицательную связь между данными показателями. Однако, даже в условиях избыточного количества ресурсов организм может обладать пониженной стрессоустойчивостью при нормальной фертильности. В тоже время накапливаются экспериментальные факты, свидетельствующие, что в основе отрицательных взаимосвязей между показателями жизнеспособности находится не конкуренция за распределение энергетических ресурсов, а изменение активности старение-ассоциированных сигнальных путей, участвующих в переключении программы роста и размножения на программу поддержания жизнеспособности и стрессоустойчивости (Leroi, 2001; Barnes, Partridge, 2003).

В свете этих данных, мы сделали предположение, что фармакологическое ингибирование ферментов внутриклеточных сигнальных каскадов приведет к повышению устойчивости дрозофил к абиотическим стресс-факторам без ущерба для локомоторной активности и фертильности.

Установлено, что устойчивость дрозофил к неблагоприятному действию абиотических факторов (прооксидант паракват, гипертермия, голодание) увеличивается при фармакологическом подавлении активности, ассоциированных со старением, сигнальных путей IGF-I/PI3K/AKT/TOR и NF-κB/iNOS. При этом увеличение стрессоустойчивости и продолжительности жизни не сопровождается

перераспределением ресурсов организма в ущерб локомоторной активности и фертильности (рис. 11).

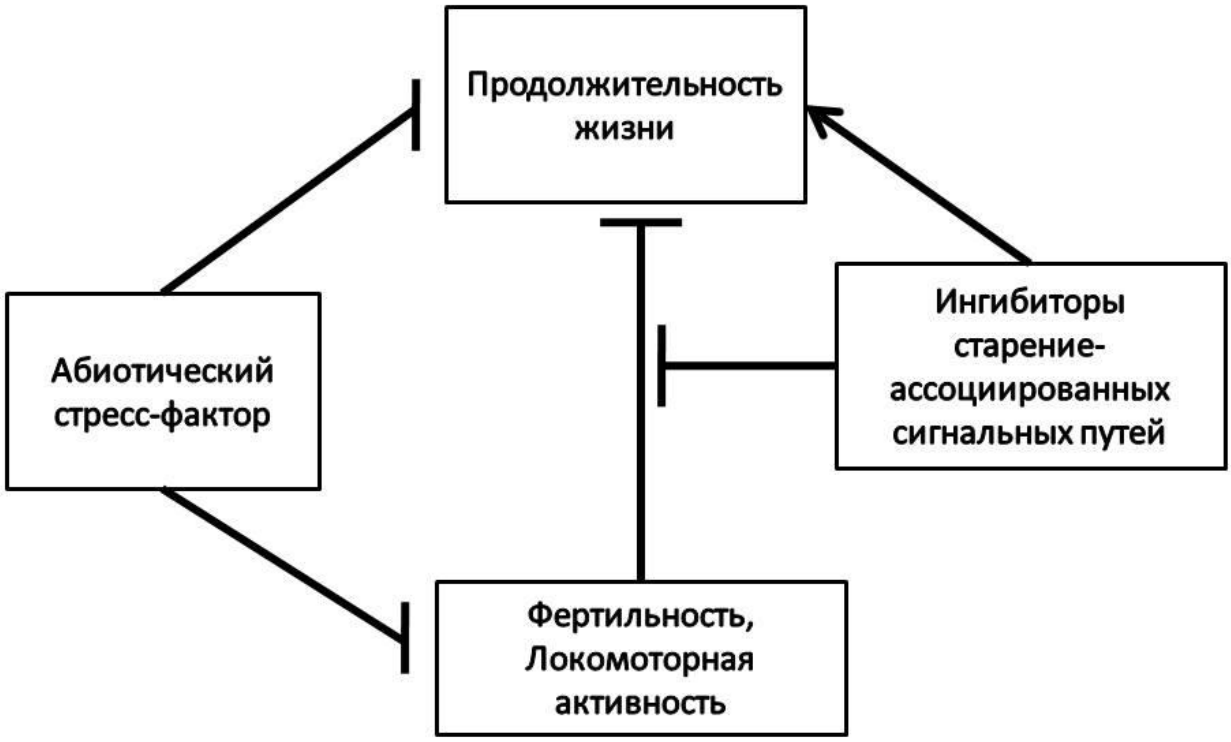


Рис. 11. Изменение показателей жизнеспособности под влиянием абиотических факторов и ингибиторов старение-ассоциированных сигнальных путей.

Кроме того, воздействие на дрозофил нестероидными противовоспалительными препаратами в концентрации 0.05 мкМ значительно увеличивало устойчивость дрозофил к окислительному стрессу, а в концентрации 1 мкМ – к тепловому шоку. Однако для других исследованных нами препаратов не было выявлено концентрационных зависимостей.

Также нами было выдвинуто предположение, что одновременное воздействие на разные ферменты одного сигнального пути может оказать более значительный адаптогенный эффект, чем воздействие на эти ферменты по отдельности, за счет задействования разных внутриклеточных механизмов. Мы

подтвердили это предположение. При совместном воздействии ингибиторами киназ PI3 и TOR происходило более значительное повышение устойчивости дрозофил к внешним абиотическим факторам (тепловой шок, голодание, действие прооксиданта), чем при раздельном применении этих веществ.

Отсутствие у дрозофил ферментов класса циклооксигеназ, которые являются основными мишенями исследуемых нами нестероидных противовоспалительных препаратов у млекопитающих, позволило нам изучить альтернативные мишени для данного класса веществ. Из литературных данных известно, что одной из мишеней для нестероидных противовоспалительных препаратов у нематод является фермент PDK-1, входящий в состав IGF-I/PI3K/AKT/TOR сигнального пути (Celecoxib extends…, 2011). Гомологом PDK-1 у дрозофил является Pkh2. Нами впервые было показано, что адаптогенный эффект, оказываемый на дрозофил исследуемыми нестероидными противовоспалительными препаратами, опосредован их влиянием на активность Pkh2/ypk1/lem3/tat2 сигнального пути.

Таким образом, нами была подтверждена возможность фармакологического повышения устойчивости дрозофил к воздействию абиотических стресс-факторов, без ущерба для локомоторной активности и фертильности. Также впервые выявлен механизм действия на дрозофил нестероидных противовоспалительных препаратов посредством воздействия на Pkh2/ypk1/lem3/tat2 сигнальный путь.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что фармакологическое ингибирование внутриклеточных, ассоциированных со старением, сигнальных путей (IGF-I/PI3K/AKT/TOR и NF-κB) ведет к увеличению стрессоустойчивости *Drosophila melanogaster* до 59% при гипертермии, до 30% при голодании и до 9% при воздействии прооксиданта.
2. Установлено, что адаптогенный эффект фармакологического ингибирования, ассоциированных со старением, сигнальных путей зависит от пола модельного животного. У самок наблюдается наибольший положительный эффект на стрессоустойчивость, а у самцов – на продолжительность жизни в оптимальных условиях.
3. Обнаружено, что увеличение стрессоустойчивости и продолжительности жизни *Drosophila melanogaster* при фармакологическом ингибировании внутриклеточных, ассоциированных со старением, сигнальных путей не сопровождается отрицательными эффектами на фертильность самок и локомоторную активность особей обоего пола.
4. Показано, что адаптогенные свойства совместного воздействия препаратов, характеризующихся специфичностью к различным ферментам внутриклеточных, ассоциированных со старением, сигнальных путей (TOR, PI3K, NF-κB) выражены в большей степени, чем действие каждого препарата в отдельности. При совместном использовании ингибиторов TOR и PI3K увеличивается устойчивость дрозофил к тепловому шоку до 81%, к голоданию до 32%.
5. При исследовании концентрационной зависимости эффектов исследуемых веществ, было установлено, что воздействие нестероидными противовоспалительными препаратами в концентрации 0.05 мкМ наиболее сильно увеличивало устойчивость дрозофил к окислительному стрессу, а в концентрации 1 мкМ – к тепловому шоку. Для других исследуемых препаратов концентрационных зависимостей не выявлено.

6. Обнаружено, что адаптогенное действие нестероидных противовоспалительных препаратов опосредовано ингибированием эволюционно-консервативного внутриклеточного сигнального пути Pkh2/ypk1/lem3/tat2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Анисимов, В. Н., Соловьев М. В. Эволюция концепций в геронтологии — СПб:: Эскулап, 1999. — 130 с.

Москалев, А. А. Старение и гены. — СПб.: Наука, 2008. — 358 с.

Москалев, А. А., Шапошников М. В. Продление жизни *Drosophila melanogaster* путем специфического ин-гибирования PI3K // Успехи геронтологии. - 2008. - Т. 21. - № 4. - С. 602-606.

Мыльников, С. В. Генетическая детерминация скорости старения в некоторых линиях *Drosophila melanogaster* // Успехи геронтологии. - 1997. - Т. 3. - № - С. 50-56.

Оловников, А. М. Принцип маргинотомии в матричном синтезе полинуклеотидов // Доклады Академии наук СССР. - 1971. - Т. 201. - № 6. - С. 1496-1499.

Тодоров, И. Н., Тодоров Г. И. Стресс, старение и их биохимическая коррекция. — М.: Наука, 2003. — 479 с.

Фролькис, В. В. Старение и увеличение продолжительности жизни. — Л.: Наука, 1988. — 239 с.

Шапошников, М. В., Данилов А. А., Москалев А. А. Фармакологические ингибиторы PI3-киназы оказывают радиопротекторное действие на имаго *Drosophila melanogaster* // Радиац. биол. Радиоэкология. - 2010. - Т. 50. - № 6. - С. 649-655.

1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo / Garvey, E. P., Oplinger J. A., Furfine E. S. et al. // J. Biol. Chem. - 1997. - Vol. 272. - № 8. - P. 4959-4963.

Activation of PI3-kinase is required for AMPA receptor insertion during LTP of mEPSCs in cultured hippocampal neurons / Man, H. Y., Wang Q., Lu W. Y. et al. // Neuron. - 2003. - Vol. 38. - № 4. - P. 611-624.

Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation / Han, J., Jiang Y., Li Z. et al. // Nature. - 1997. - Vol. 386. - № 6622. - P. 296-299.

AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint / Gwinn, D. M., Shackelford D. B., Egan D. F. et al. // Mol. Cell. - 2008. - Vol. 30. - № 2. - P. 214-226.

Amyloid-binding compounds maintain protein homeostasis during ageing and extend lifespan / Alavez, S., Vantipalli M. C., Zucker D. J. et al. // Nature. - 2011. - Vol. 472. - № 7342. - P. 226-229.

Anisimov, V. N., Mylnikov S. V., Khavinson V. K. Pineal peptide preparation epithalamin increases the lifespan of fruit flies, mice and rats // Mech. Ageing Dev. - 1998. - Vol. 103. - № 2. - P. 123-132.

Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases / Carrizzo, A., Forte M., Damato A. et al. // Food Chem. Toxicol. - 2013. - Vol. 61. - - P. 215-226.

Antioxidant enzymes suppress nitric oxide production through the inhibition of NF-kappa B activation: role of H(2)O(2) and nitric oxide in inducible nitric oxide synthase expression in macrophages / Han, Y. J., Kwon Y. G., Chung H. T. et al. // Nitric Oxide. - 2001. - Vol. 5. - № 5. - P. 504-513.

Aoki, M., Blazek E., Vogt P. K. A role of the kinase mTOR in cellular transformation induced by the oncoproteins P3k and Akt // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2001. - Vol. 98. - № 1. - P. 136-141.

Arya, U., Dwivedi H., Subramaniam J. R. Reserpine ameliorates Abeta toxicity in the Alzheimer's disease model in *Caenorhabditis elegans* // Exp. Gerontol. - 2009. - Vol. 44. - № 6-7. - P. 462-466.

Asanuma, M., Miyazaki I., Ogawa N. Neuroprotective effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on neurodegenerative diseases // Curr. Pharm. Des. - 2004. - Vol. 10. - № 6. - P. 695-700.

Ashburner, M. *Drosophila* в 2 томах. — Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

Aspirin inhibits oxidant stress, reduces age-associated functional declines, and extends lifespan of *Caenorhabditis elegans* / Ayyadevara, S., Bharill P., Dandapat A. et al. // Antioxid. Redox. Signal. - 2013. - Vol. 18. - № 5. - P. 481-490.

Association analysis between longevity in the Japanese population and polymorphic variants of genes involved in insulin and insulin-like growth factor 1 signaling pathways / Kojima, T., Kamei H., Aizu T. et al. // Exp. Gerontol. - 2004. - Vol. 39. - № 11-12. - P. 1595-1598.

Autophagy is required for extension of yeast chronological life span by rapamycin / Alvers, A. L., Wood M. S., Hu D. et al. // Autophagy. - 2009. - Vol. 5. - № 6. - P. 847-849.

Baker, R. G., Hayden M. S., Ghosh S. NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease // Cell Metab. - 2011. - Vol. 13. - № 1. - P. 11-22.

Barnes, A. I., Partridge L. Costing reproduction // Anim. Behav. - 2003. - Vol. 66. - № 2. - P. 199-204.

Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3Kgamma to the protein kinases PKB and MAPK / Bondeva, T., Pirola L., Bulgarelli-Leva G. et al. // Science. - 1998. - Vol. 282. - № 5387. - P. 293-296.

Black, P. H. Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation // Brain Behav Immun. - 2002. - Vol. 16. - № 6. - P. 622-653.

Blagosklonny, M. V. Calorie restriction: decelerating mTOR-driven aging from cells to organisms (including humans) // Cell Cycle. - 2010. - Vol. 9. - № 4. - P. 683-688.

Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans* / Wilson, M. A., Shukitt-Hale B., Kalt W. et al. // Aging Cell. - 2006. - Vol. 5. - № 1. - P. 59-68.

Bluher, M., Kahn B. B., Kahn C. R. Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue // Science. - 2003. - Vol. 299. - № 5606. - P. 572-574.

Bogdan, C. Nitric oxide and the immune response // Nat. Immunol. - 2001. - Vol. 2. - № 10. - P. 907-916.

Brasier, A. R. The NF-kappaB regulatory network // Cardiovasc. Toxicol. - 2006. - Vol. 6. - № 2. - P. 111-130.

Breder, C. D. Cyclooxygenase systems in the mammalian brain // Ann. N. Y. Acad. Sci. - 1997. - Vol. 813. - № - P. 296-301.

Breslow, N. A generalized Kruskal-Wallis test for comparing K samples subject to unequal patterns of censorship // Biometrika. - 1970. - Vol. 57. - № 3. - P. 579-594.

Broughton, S., Partridge L. Insulin/IGF-like signalling, the central nervous system and aging // Biochem. J. - 2009. - Vol. 418. - № 1. - P. 1-12.

Brown, G. C. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase // Biochim Biophys Acta. - 2001. - Vol. 1504. - № 1. - P. 46-57.

Busse, E. W. Hypochondriasis in the elderly // Am. Fam. Physician. - 1982. - Vol. 25. - № 2. - P. 199-202.

A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type / Kenyon, C., Chang J., Gensch E. et al. // Nature. - 1993. - Vol. 366. - № 6454. - P. 461-464.

Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys / Colman, R. J., Anderson R. M., Johnson S. C. et al. // Science. - 2009. - Vol. 325. - № 5937. - P. 201-204.

Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis / Monaco, C., Andreakos E., Kiriakidis S. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2004. - Vol. 101. - № 15. - P. 5634-5639.

A carboxyfullerene SOD mimetic improves cognition and extends the lifespan of mice / Quick, K. L., Ali S. S., Arch R. et al. // Neurobiol. Aging. - 2008. - Vol. 29. - № 1. - P. 117-128.

Cdc42Hs, but not Rac1, inhibits serum-stimulated cell cycle progression at G1/S through a mechanism requiring p38/RK / Molnar, A., Theodoras A. M., Zon L. I. et al. // J. Biol. Chem. - 1997. - Vol. 272. - № 20. - P. 13229-13235.

Celecoxib extends *C. elegans* lifespan via inhibition of insulin-like signaling but not cyclooxygenase-2 activity / Ching, T. T., Chiang W. C., Chen C. S. et al. // Aging Cell. - 2011. - Vol. 10. - № 3. - P. 506-519.

Chen, C., Liu Y., Zheng P. mTOR regulation and therapeutic rejuvenation of aging hematopoietic stem cells // Sci. Signal. - 2009. - Vol. 2. - № 98. - P. ra75.

Class IIa histone deacetylases are hormone-activated regulators of FOXO and mammalian glucose homeostasis / Mihaylova, M. M., Vasquez D. S., Ravnskjaer K. et al. // Cell. - 2011. - Vol. 145. - № 4. - P. 607-621.

The class III PI(3)K Vps34 promotes autophagy and endocytosis but not TOR signaling in *Drosophila* / Juhasz, G., Hill J. H., Yan Y. et al. // J. Cell Biol. - 2008. - Vol. 181. - № 4. - P. 655-666.

Cloning of a human phosphoinositide 3-kinase with a C2 domain that displays reduced sensitivity to the inhibitor wortmannin / Domin, J., Pages F., Volinia S. et al. // Biochem. J. - 1997. - Vol. 326 (Pt 1). - - P. 139-147.

Cocaine, not morphine, causes the generation of reactive oxygen species and activation of NF-kappaB in transiently cotransfected heart cells / Hargrave, B. Y., Tiangco D. A., Lattanzio F. A. et al. // Cardiovasc. Toxicol. - 2003. - Vol. 3. - № 2. - P. 141-151.

Codogno, P., Meijer A. J. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death // Cell Death Differ. - 2005. - Vol. 12 Suppl 2. - № - P. 1509-1518.

Coenzyme Q10 can prolong *C. elegans* lifespan by lowering oxidative stress / Ishii, N., Senoo-Matsuda N., Miyake K. et al. // Mech. Ageing Dev. - 2004. - Vol. 125. - № 1. - P. 41-46.

Comparative approaches to facilitate the discovery of prolongevity interventions: effects of tocopherols on lifespan of three invertebrate species / Zou, S., Sinclair J., Wilson M. A. et al. // Mech. Ageing Dev. - 2007. - Vol. 128. - № 2. - P. 222-226.

Context-Dependent Regulation of Autophagy by IKK-NF-kappaB Signaling: Impact on the Aging Process / Salminen, A., Hyttinen J. M., Kauppinen A. et al. // Int J Cell Biol. - 2012. - Vol. 2012. - - P. 849541.

The critical role of metabolic pathways in aging / Barzilai, N., Huffman D. M., Muzumdar R. H. et al. // Diabetes. - 2012. - Vol. 61. - № 6. - P. 1315-1322.

Cyclooxygenase-1 inhibition reduces amyloid pathology and improves memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease / Choi, S. H., Aid S., Caracciolo L. et al. // J. Neurochem. - 2013. - Vol. 124. - № 1. - P. 59-68.

Cyclooxygenase-2 inhibitors modulate skin aging in a catalytic activity-independent manner / Lee, M. E., Kim S. R., Lee S. et al. // Exp Mol Med. - 2012. - Vol. 44. - № 9. - P. 536-544.

Cytokine induction of NO synthase II in human DLD-1 cells: roles of the JAK-STAT, AP-1 and NF-kappaB-signaling pathways / Kleinert, H., Wallerath T., Fritz G. et al. // Br. J. Pharmacol. - 1998. - Vol. 125. - № 1. - P. 193-201.

Decreased insulin-receptor signaling promotes the autophagic degradation of beta-amyloid peptide in C. elegans / Florez-McClure, M. L., Hohsfield L. A., Fonte G. et al. // Autophagy. - 2007. - Vol. 3. - № 6. - P. 569-580.

Demidenko, Z. N., Blagosklonny M. V. At concentrations that inhibit mTOR, resveratrol suppresses cellular senescence // Cell Cycle. - 2009. - Vol. 8. - № 12. - P. 1901-1904.

DeVeale, B., Brummel T., Seroude L. Immunity and aging: the enemy within? // Aging Cell. - 2004. - Vol. 3. - № 4. - P. 195-208.

Diabetes and insulin in regulation of brain cholesterol metabolism / Suzuki, R., Lee K., Jing E. et al. // Cell Metab. - 2010. - Vol. 12. - № 6. - P. 567-579.

Diacylglycerol lipase regulates lifespan and oxidative stress response by inversely modulating TOR signaling in *Drosophila* and *C. elegans* / Lin, Y. H., Chen Y. C., Kao T. Y. et al. // Aging Cell. - 2014. - Vol. 13. - № 4. - P. 755-764.

Dilman, V. M., Anisimov V. N. Effect of treatment with phenformin, diphenylhydantoin or L-dopa on life span and tumour incidence in C3H/Sn mice // Gerontology. - 1980. - Vol. 26. - № 5. - P. 241-246.

Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate / Franke, T. F., Kaplan D. R., Cantley L. C. et al. // Science. - 1997. - Vol. 275. - № 5300. - P. 665-668.

Discovery of quinazolines as a novel structural class of potent inhibitors of NF-kappa B activation / Tobe, M., Isobe Y., Tomizawa H. et al. // Bioorg. Med. Chem. - 2003. - Vol. 11. - № 3. - P. 383-391.

Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development / Gangloff, Y. G., Mueller M., Dann S. G. et al. // Mol. Cell. Biol. - 2004. - Vol. 24. - № 21. - P. 9508-9516.

Distinct dimer interaction and regulation in nitric-oxide synthase types I, II, and III / Panda, K., Rosenfeld R. J., Ghosh S. et al. // J. Biol. Chem. - 2002. - Vol. 277. - № 34. - P. 31020-31030.

Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells / Schreck, R., Meier B., Mannel D. N. et al. // J. Exp. Med. - 1992. - Vol. 175. - № 5. - P. 1181-1194.

The DNA-dependent protein kinase participates in the activation of NF kappa B following DNA damage / Basu, S., Rosenzweig K. R., Youmell M. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1998. - Vol. 247. - № 1. - P. 79-83.

DNA damage induced by resveratrol and its synthetic analogues in the presence of Cu (II) ions: mechanism and structure-activity relationship / Zheng, L. F., Wei Q. Y., Cai Y. J. et al. // Free Radic. Biol. Med. - 2006. - Vol. 41. - № 12. - P. 1807-1816.

Doyle, S. L., O'Neill L. A. Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity // Biochem. Pharmacol. - 2006. - Vol. 72. - № 9. - P. 1102-1113.

The *Drosophila melanogaster* LEM-domain protein MAN1 / Wagner, N., Kagermeier B., Loserth S. et al. // Eur. J. Cell Biol. - 2006. - Vol. 85. - № 2. - P. 91-105.

The *Drosophila* nitric-oxide synthase gene (dNOS) encodes a family of proteins that can modulate NOS activity by acting as dominant negative regulators / Stasiv, Y., Regulski M., Kuzin B. et al. // J. Biol. Chem. - 2001. - Vol. 276. - № 45. - P. 42241-42251.

Dushay, M. S., Asling B., Hultmark D. Origins of immunity: Relish, a compound Rel-like gene in the antibacterial defense of *Drosophila* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1996. - Vol. 93. - № 19. - P. 10343-10347.

Dwarf mice and the ageing process / Brown-Borg, H. M., Borg K. E., Meliska C. J. et al. // Nature. - 1996. - Vol. 384. - № 6604. - P. 33.

Effects of antioxidant enzyme modulations on interleukin-1-induced nuclear factor kappa B activation / Renard, P., Zachary M. D., Bougelet C. et al. // Biochem. Pharmacol. - 1997. - Vol. 53. - № 2. - P. 149-160.

Effects of antioxidant supplementation on the aging process / Fusco, D., Colloca G., Lo Monaco M. R. et al. // Clin Interv Aging. - 2007. - Vol. 2. - № 3. - P. 377-387.

Effects of CAY10404 on the PKB/Akt and MAPK pathway and apoptosis in non-small cell lung cancer cells / Cho, Y., Park M. J., Park M. et al. // Respirology. - 2009. - Vol. 14. - № 6. - P. 850-858.

The effects of pectins on life span and stress resistance in *Drosophila melanogaster* / Shaposhnikov, M., Latkin D., Plyusnina E. et al. // Biogerontology. - 2014. - Vol. 15. - № 2. - P. 113-127.

Engelman, J. A., Luo J., Cantley L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism // Nat. Rev. Genet. - 2006. - Vol. 7. - № 8. - P. 606-619.

Enhanced Longevity by Ibuprofen, Conserved in Multiple Species, Occurs in Yeast through Inhibition of Tryptophan Import / He, C., Tsuchiyama S. K., Nguyen Q. T. et al. // PLoS Genet. - 2014. - Vol. 10. - № 12. - P. e1004860.

Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics / Melov, S., Ravenscroft J., Malik S. et al. // Science. - 2000. - Vol. 289. - № 5484. - P. 1567-1569.

Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein / Clancy, D. J., Gems D., Harshman L. G. et al. // Science. - 2001. - Vol. 292. - № 5514. - P. 104-106.

Extension of lifespan in *C. elegans* by naphthoquinones that act through stress hormesis mechanisms / Hunt, P. R., Son T. G., Wilson M. A. et al. // PLoS ONE. - 2011. - Vol. 6. - № 7. - P. e21922.

Feder, M. E. Organismal, Ecological, and Evolutionary Aspects of Heat-Shock Proteins and the Stress Response: Established Conclusions and Unresolved Issues // Am. Zool. - 1999. - Vol. 39. - № 6. - P. 857-864.

FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2 / Tan, Y., Rouse J., Zhang A. et al. // EMBO J. - 1996. - Vol. 15. - № 17. - P. 4629-4642.

Fisher, R. A. On the interpretation of $\chi 2$ from contingency tables, and the calculation of P // Journal of the Royal Statistical Society. - 1922. - Vol. - № - P. 87-94.

Foster, M. W., Hess D. T., Stamler J. S. Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective // Trends Mol. Med. - 2009. - Vol. 15. - № 9. - P. 391-404.

Fukunaga, R., Hunter T. MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates // EMBO J. - 1997. - Vol. 16. - № 8. - P. 1921-1933.

Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast / Casamayor, A., Torrance P. D., Kobayashi T. et al. // Curr. Biol. - 1999. - Vol. 9. - № 4. - P. 186-197.

Functionally significant insulin-like growth factor I receptor mutations in centenarians / Suh, Y., Atzmon G., Cho M. O. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2008. - Vol. 105. - № 9. - P. 3438-3442.

Genetic and biochemical characterization of dTOR, the *Drosophila* homolog of the target of rapamycin / Oldham, S., Montagne J., Radimerski T. et al. // Genes Dev. - 2000. - Vol. 14. - № 21. - P. 2689-2694.

Genetic influence on human lifespan and longevity / Hjelmborg, J. V., Iachine I., Skytthe A. et al. // Hum Genet. - 2006. - Vol. 119. - № 3. - P. 312-321.

Genome sequencing reveals insights into physiology and longevity of the naked mole rat / Kim, E. B., Fang X., Fushan A. A. et al. // Nature. - 2011. - Vol. 479. - № 7372. - P. 223-227.

Geroprotectors.org: a new, structured and curated database of current therapeutic interventions in aging and age-related disease / Moskalev, A., Chernyagina E., de Magalhães J. P. et al. // Aging (Albany NY). - 2015. -

Gilmore, T. D. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives // Oncogene. - 2006. - Vol. 25. - № 51. - P. 6680-6684.

Ginkgo biloba extract EGb 761 increases stress resistance and extends life span of *Caenorhabditis elegans* / Wu, Z., Smith J. V., Paramasivam V. et al. // Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand). - 2002. - Vol. 48. - № 6. - P. 725-731.

Greider, C. W., Blackburn E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts // Cell. - 1985. - Vol. 43. - № 2 Pt 1. - P. 405-413.

Gudkov, A. V., Komarova E. A. Radioprotection: smart games with death // J. Clin. Invest. - 2010. - Vol. 120. - № 7. - P. 2270-2273.

Harman, D. The biologic clock: the mitochondria? // J. Am. Geriatr. Soc. - 1972. - Vol. 20. - № 4. - P. 145-147.

Harris, T. E., Lawrence J. C., Jr. TOR signaling // Sci. STKE. - 2003. - Vol. 2003. - № 212. - P. re15.

Hawkins, P. T., Jackson T. R., Stephens L. R. Platelet-derived growth factor stimulates synthesis of PtdIns(3,4,5)P3 by activating a PtdIns(4,5)P2 3-OH kinase // Nature. - 1992. - Vol. 358. - № 6382. - P. 157-159.

Hayden, M. S., West A. P., Ghosh S. NF-kappaB and the immune response // Oncogene. - 2006. - Vol. 25. - № 51. - P. 6758-6780.

The HBP1 transcriptional repressor and the p38 MAP kinase: unlikely partners in G1 regulation and tumor suppression / Yee, A. S., Paulson E. K., McDevitt M. A. et al. // Gene. - 2004. - Vol. 336. - № 1. - P. 1-13.

Health span approximates life span among many supercentenarians: compression of morbidity at the approximate limit of life span / Andersen, S. L., Sebastiani P., Dworkis D. A. et al. // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. - 2012. - Vol. 67. - № 4. - P. 395-405.

Hemopoietic growth factors with the exception of interleukin-4 activate the p38 mitogen-activated protein kinase pathway / Foltz, I. N., Lee J. C., Young P. R. et al. // J. Biol. Chem. - 1997. - Vol. 272. - № 6. - P. 3296-3301.

The heritability of human longevity: a population-based study of 2872 Danish twin pairs born 1870-1900 / Herskind, A. M., McGue M., Holm N. V. et al. // Hum Genet. - 1996. - Vol. 97. - № 3. - P. 319-323.

Higher harmonic anisotropic flow measurements of charged particles in Pb-Pb collisions at sqrt(s(NN)) = 2.76 TeV / Aamodt, K., Abelev B., Abrahantes Quintana A. et al. // Phys Rev Lett. - 2011. - Vol. 107. - № 3. - P. 032301.

Hoeijmakers, J. H. DNA damage, aging, and cancer // N. Engl. J. Med. - 2009. - Vol. 361. - № 15. - P. 1475-1485.

Hoffmann, A. A., Parsons P. A. Evolutionary genetics and environmental stress. — Oxford ; New York: Oxford University Press, 1991. — 284 p.

Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK-beta, NF-kappaB and GnRH / Zhang, G., Li J., Purkayastha S. et al. // Nature. - 2013. - Vol. 497. - № 7448. - P. 211-216.

Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins / Stokoe, D., Engel K., Campbell D. G. et al. // FEBS Lett. - 1992. - Vol. 313. - № 3. - P. 307-313.

Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase / McLaughlin, M. M., Kumar S., McDonnell P. C. et al. // J. Biol. Chem. - 1996. - Vol. 271. - № 14. - P. 8488-8492.

IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice / Holzenberger, M., Dupont J., Ducos B. et al. // Nature. - 2003. - Vol. 421. - № 6919. - P. 182-187.

IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation / Mercurio, F., Zhu H., Murray B. W. et al. // Science. - 1997. - Vol. 278. - № 5339. - P. 860-866.

In murine 3T3 fibroblasts, different second messenger pathways resulting in the induction of NO synthase II (iNOS) converge in the activation of transcription factor NF-kappaB / Kleinert, H., Euchenhofer C., Ihrig-Biedert I. et al. // J. Biol. Chem. - 1996. - Vol. 271. - № 11. - P. 6039-6044.

The *in vitro* effects of new non-steroidal antiinflammatory compounds on antioxidant system of human erythrocytes / Orhan, H., Dogruer D. S., Cakir B. et al. // Exp. Toxicol. Pathol. - 1999. - Vol. 51. - № 4-5. - P. 397-402.

Inhibition of iNOS protects endothelial-dependent vasodilation in aged rats / Tian, J., Yan Z., Wu Y. et al. // Acta Pharmacol Sin. - 2010. - Vol. 31. - № 10. - P. 1324-1328.

Insights into the evolution of longevity from the bowhead whale genome / Keane, M., Semeiks J., Webb A. E. et al. // Cell Rep. - 2015. - Vol. 10. - № 1. - P. 112-122.

Insulin-like growth factor signaling pathway involved in regulating longevity of rotifers / Yoshinaga, T., Kaneko G., Kinoshita S. et al. // Hydrobiologia. - 2005. - Vol. 546. - - P. 347-352.

The interaction of nuclear factor-kappa B and cytokines is associated with schizophrenia / Song, X. Q., Lv L. X., Li W. Q. et al. // Biol Psychiatry. - 2009. - Vol. 65. - № 6. - P. 481-488.

Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27 / Freshney, N. W., Rawlinson L., Guesdon F. et al. // Cell. - 1994. - Vol. 78. - № 6. - P. 1039-1049.

Involvement of the MKK6-p38gamma cascade in gamma-radiation-induced cell cycle arrest / Wang, X., McGowan C. H., Zhao M. et al. // Mol. Cell. Biol. - 2000. - Vol. 20. - № 13. - P. 4543-4552.

Is the oxidative stress theory of aging dead? / Perez, V. I., Bokov A., Van Remmen H. et al. // Biochim Biophys Acta. - 2009. - Vol. 1790. - № 10. - P. 1005-1014.

Iwasa, H., Han J., Ishikawa F. Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway // Genes Cells. - 2003. - Vol. 8. - № 2. - P. 131-144.

Izmaylov, D. M., Obukhova L. K. Geroprotector effectiveness of melatonin: investigation of lifespan of *Drosophila melanogaster* // Mech. Ageing Dev. - 1999. - Vol. 106. - № 3. - P. 233-240.

Jacobs, M. D., Harrison S. C. Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex // Cell. - 1998. - Vol. 95. - № 6. - P. 749-758.

Janknecht, R., Hunter T. Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1a // EMBO J. - 1997. - Vol. 16. - № 7. - P. 1620-1627.

Jazwinski, S. M. Molecular mechanisms of yeast longevity // Trends Microbiol. - 1999. - Vol. 7. - № 6. - P. 247-252.

Johnson, S. C., Rabinovitch P. S., Kaeberlein M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease // Nature. - 2013. - Vol. 493. - № 7432. - P. 338-345.

Johnson, G. V., Bailey C. D. The p38 MAP kinase signaling pathway in Alzheimer's disease // Exp. Neurol. - 2003. - Vol. 183. - № 2. - P. 263-268.

Kalonia, H., Kumar P., Kumar A. Licofelone attenuates quinolinic acid induced Huntington like symptoms: possible behavioral, biochemical and cellular alterations // Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. - 2011. - Vol. 35. - № 2. - P. 607-615.

Kenyon, C. A pathway that links reproductive status to lifespan in *Caenorhabditis elegans* // Ann. N. Y. Acad. Sci. - 2010. - Vol. 1204. - № - P. 156-162.

Kim, H. J., Hawke N., Baldwin A. S. NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer // Cell Death Differ. - 2006. - Vol. 13. - № 5. - P. 738-747.

King, D., Yeomanson D., Bryant H. E. PI3King the Lock: Targeting the PI3K/Akt/mTOR Pathway as a Novel Therapeutic Strategy in Neuroblastoma // J Pediatr Hematol Oncol. - 2015. - Vol. 37. - № 4. - P. 245-251.

Kirkwood, T. B. Evolution of ageing // Nature. - 1977. - Vol. 270. - № 5635. - P. 301-304.

Kirkwood, T. B., Franceschi C. Is aging as complex as it would appear? New perspectives in aging research // Ann. N. Y. Acad. Sci. - 1992. - Vol. 663. - № - P. 412-417.

Kummer, J. L., Rao P. K., Heidenreich K. A. Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase // J. Biol. Chem. - 1997. - Vol. 272. - № 33. - P. 20490-20494.

Lahti, A., Kankaanranta H., Moilanen E. P38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 has a bi-directional effect on iNOS expression and NO production // Eur. J. Pharmacol. - 2002. - Vol. 454. - № 2-3. - P. 115-123.

Laplante, M., Sabatini D. M. mTOR signaling in growth control and disease // Cell. - 2012. - Vol. 149. - № 2. - P. 274-293.

Leroi, A. M. Molecular signals versus the *Loi de Balancement* // Trends Ecol. Evol. - 2001. - Vol. 16. - № 1. - P. 24-29.

Lifestyle factors of people with exceptional longevity / Rajpathak, S. N., Liu Y., Ben-David O. et al. // J. Am. Geriatr. Soc. - 2011. - Vol. 59. - № 8. - P. 1509-1512.

Liposomes as carriers of the lipid soluble antioxidant resveratrol: evaluation of amelioration of oxidative stress by additional antioxidant vitamin / Vanaja, K., Wahl M. A., Bukarica L. et al. // Life Sci. - 2013. - Vol. 93. - № 24. - P. 917-923.

Liu, S. F., Ye X., Malik A. B. Pyrrolidine dithiocarbamate prevents I-kappaB degradation and reduces microvascular injury induced by lipopolysaccharide in multiple organs // Mol. Pharmacol. - 1999a. - Vol. 55. - № 4. - P. 658-667.

Liu, S. F., Ye X., Malik A. B. Inhibition of NF-kappaB activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents *in vivo* expression of proinflammatory genes // Circulation. - 1999b. - Vol. 100. - № 12. - P. 1330-1337.

Long-term caloric restriction ameliorates the decline in diastolic function in humans / Meyer, T. E., Kovacs S. J., Ehsani A. A. et al. // J. Am. Coll. Cardiol. - 2006. - Vol. 47. - № 2. - P. 398-402.

The long lifespan of two bat species is correlated with resistance to protein oxidation and enhanced protein homeostasis / Salmon, A. B., Leonard S., Masamsetti V. et al. // FASEB J. - 2009. - Vol. 23. - № 7. - P. 2317-2326.

Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in Drosophila from ablation of cells making insulin-like ligands / Broughton, S. J., Piper M. D., Ikeya T. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2005. - Vol. 102. - № 8. - P. 3105-3110.

Longo, V. D. The Ras and Sch9 pathways regulate stress resistance and longevity // Exp. Gerontol. - 2003. - Vol. 38. - № 7. - P. 807-811.

Longo, V. D., Fabrizio P. Regulation of longevity and stress resistance: a molecular strategy conserved from yeast to humans? // Cell. Mol. Life Sci. - 2002. - Vol. 59. - № 6. - P. 903-908.

Loss in oxidative stress tolerance with aging linked to reduced extracellular signal-regulated kinase and Akt kinase activities / Ikeyama, S., Kokkonen G., Shack S. et al. // FASEB J. - 2002. - Vol. 16. - № 1. - P. 114-116.

Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction / Michael, M. D., Kulkarni R. N., Postic C. et al. // Mol. Cell. - 2000. - Vol. 6. - № 1. - P. 87-97.

Low doses of paraquat and polyphenols prolong life span and locomotor activity in knock-down parkin *Drosophila melanogaster* exposed to oxidative stress stimuli: implication in autosomal recessive juvenile Parkinsonism / Bonilla-Ramirez, L., Jimenez-Del-Rio M., Velez-Pardo C. // Gene. - 2013. - Vol. 512. - № 2. - P. 355-363.

LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF-kappaB and STAT-1alpha in macrophages and microglia / Qin, H., Wilson C. A., Lee S. J. et al. // Blood. - 2005. - Vol. 106. - № 9. - P. 3114-3122.

LSP1 is the major substrate for mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in human neutrophils / Huang, C. K., Zhan L., Ai Y. et al. // J. Biol. Chem. - 1997. - Vol. 272. - № 1. - P. 17-19.

Ma, X. M., Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. - 2009. - Vol. 10. - № 5. - P. 307-318.

MacDougall, L. K., Domin J., Waterfield M. D. A family of phosphoinositide 3-kinases in *Drosophila* identifies a new mediator of signal transduction // Curr. Biol. - 1995. - Vol. 5. - № 12. - P. 1404-1415.

Maeda, T., Wurgler-Murphy S. M., Saito H. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast // Nature. - 1994. - Vol. 369. - № 6477. - P. 242-245.

Majid, S., Saini S., Dahiya R. Wnt signaling pathways in urological cancers: past decades and still growing // Mol Cancer. - 2012. - Vol. 11. - № - P. 7.

Mantel, N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration // Cancer Chemother Rep. - 1966. - Vol. 50. - № 3. - P. 163-170.

A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells / Han, J., Lee J. D., Bibbs L. et al. // Science. - 1994. - Vol. 265. - № 5173. - P. 808-811.

MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha / Ge, B., Gram H., Di Padova F. et al. // Science. - 2002. - Vol. 295. - № 5558. - P. 1291-1294.

Marks-Konczalik, J., Chu S. C., Moss J. Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein 1 and nuclear factor kappaB-binding sites // J. Biol. Chem. - 1998. - Vol. 273. - № 35. - P. 22201-22208.

McCarty, M. F. Longevity effect of chromium picolinate--'rejuvenation' of hypothalamic function? // Med. Hypotheses. - 1994. - Vol. 43. - № 4. - P. 253-265.

Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster* / Bjedov, I., Toivonen J. M., Kerr F. et al. // Cell Metab. - 2010. - Vol. 11. - № 1. - P. 35-46.

Mendoza, M. C., Er E. E., Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation // Trends Biochem. Sci. - 2011. - Vol. 36. - № 6. - P. 320-328.

Mercurio, F., Manning A. M. NF-kappaB as a primary regulator of the stress response // Oncogene. - 1999. - Vol. 18. - № 45. - P. 6163-6171.

Mihaylova, M. M., Shaw R. J. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism // Nat. Cell Biol. - 2011. - Vol. 13. - № 9. - P. 1016-1023.

Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2 / Waskiewicz, A. J., Flynn A., Proud C. G. et al. // EMBO J. - 1997. - Vol. 16. - № 8. - P. 1909-1920.

Mitogen-activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of tristetraprolin, a regulator of tumor necrosis factor alpha mRNA stability / Mahtani, K. R., Brook M., Dean J. L. et al. // Mol. Cell. Biol. - 2001. - Vol. 21. - № 19. - P. 6461-6469.

MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase *in vivo* / Sun, H., Charles C. H., Lau L. F. et al. // Cell. - 1993. - Vol. 75. - № 3. - P. 487-493.

Modified Kolmogorov-Smirnov test procedures with application to arbitrarily right-censored data / Fleming, T. R., O'Fallon J. R., O'Brien P. C. et al. // Biometrics. - 1980. - Vol. 36. - № 4. - P. 607-625.

The molecule role ontology: an ontology for annotation of signal transduction pathway molecules in the scientific literature / Yamamoto, S., Asanuma T., Takagi T. et al. // Comp. Funct. Genomics. - 2004. - Vol. 5. - № 6-7. - P. 528-536.

Moncada, S., Higgs E. A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance // Eur J Clin Invest. - 1991. - Vol. 21. - № 4. - P. 361-374.

Morgensztern, D., McLeod H. L. PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy // Anticancer Drugs. - 2005. - Vol. 16. - № 8. - P. 797-803.

Moskalev, A. A., Shaposhnikov M. V. Pharmacological inhibition of phosphoinositide 3 and TOR kinases improves survival of *Drosophila melanogaster* // Rejuvenation Res. - 2010. - Vol. 13. - № 2-3. - P. 246-247.

Moskalev, A., Shaposhnikov M. Pharmacological inhibition of NF-κB prolongs lifespan of *Drosophila melanogaster* // Aging (Albany NY). - 2011. - Vol. 3. - № 4. - P. 391-394.

A mouse model of ATR-Seckel shows embryonic replicative stress and accelerated aging / Murga, M., Bunting S., Montana M. F. et al. // Nat. Genet. - 2009. - Vol. 41. - № 8. - P. 891-898.

A mouse model of accelerated liver aging caused by a defect in DNA repair / Gregg, S. Q., Gutierrez V., Robinson A. R. et al. // Hepatology. - 2012. - Vol. 55. - № 2. - P. 609-621.

mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s / Frias, M. A., Thoreen C. C., Jaffe J. D. et al. // Curr. Biol. - 2006. - Vol. 16. - № 18. - P. 1865-1870.

mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery / Kim, D. H., Sarbassov D. D., Ali S. M. et al. // Cell. - 2002. - Vol. 110. - № 2. - P. 163-175.

mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells / Murakami, M., Ichisaka T., Maeda M. et al. // Mol. Cell. Biol. - 2004. - Vol. 24. - № 15. - P. 6710-6718.

Murakami, S. *Caenorhabditis elegans* as a model system to study aging of learning and memory // Mol. Neurobiol. - 2007. - Vol. 35. - № 1. - P. 85-94.

Murakami, S., Johnson T. E. Life extension and stress resistance in *Caenorhabditis elegans* modulated by the tkr-1 gene // Curr. Biol. - 1998. - Vol. 8. - № 19. - P. 1091-1094.

A muscle-specific p38 MAPK/Mef2/MnSOD pathway regulates stress, motor function, and life span in *Drosophila* / Vrailas-Mortimer, A., del Rivero T., Mukherjee S. et al. // Dev. Cell. - 2011. - Vol. 21. - № 4. - P. 783-795.

A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function / Tatar, M., Kopelman A., Epstein D. et al. // Science. - 2001. - Vol. 292. - № 5514. - P. 107-110.

Mutational analysis of the traffic ATPase (ABC) transporters involved in uptake of eye pigment precursors in *Drosophila melanogaster*. Implications for structure-function relationships / Ewart, G. D., Cannell D., Cox G. B. et al. // J. Biol. Chem. - 1994. - Vol. 269. - № 14. - P. 10370-10377.

Nässel, D. R., Liu Y., Luo J. Insulin/IGF signaling and its regulation in *Drosophila* // Gen. Comp. Endocrinol. - 2015. - Vol. - № - P.

Negative regulation by phosphatidylinositol 3-kinase of inducible nitric oxide synthase expression in macrophages / Diaz-Guerra, M. J., Castrillo A., Martin-Sanz P. et al. // J. Immunol. - 1999. - Vol. 162. - № 10. - P. 6184-6190.

Neuroprotection by the selective iNOS inhibitor GW274150 in a model of Parkinson disease / Broom, L., Marinova-Mutafchieva L., Sadeghian M. et al. // Free Radic. Biol. Med. - 2011. - Vol. 50. - № 5. - P. 633-640.

NF-kappaB directly regulates Fas transcription to modulate Fas-mediated apoptosis and tumor suppression / Liu, F., Bardhan K., Yang D. et al. // J. Biol. Chem. - 2012. - Vol. 287. - № 30. - P. 25530-25540.

NF-kappaB inhibition delays DNA damage-induced senescence and aging in mice / Tilstra, J. S., Robinson A. R., Wang J. et al. // J. Clin. Invest. - 2012. - Vol. 122. - № 7. - P. 2601-2612.

NFkappaB promotes inflammation, coagulation, and fibrosis in the aging glomerulus / Wiggins, J. E., Patel S. R., Shedden K. A. et al. // J. Am. Soc. Nephrol. - 2010. - Vol. 21. - № 4. - P. 587-597.

Nitric oxide regulation of free radical- and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation / Bloodsworth, A., O'Donnell V. B., Freeman B. A. // Arterioscler Thromb Vasc Biol. - 2000. - Vol. 20. - № 7. - P. 1707-1715.

Nitric oxide synthases and cardiovascular diseases: insights from genetically modified mice / Tsutsui, M., Shimokawa H., Otsuji Y. et al. // Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society. - 2009. - Vol. 73. - № 6. - P. 986-993.

Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition / Alderton, W. K., Cooper C. E., Knowles R. G. // Biochem. J. - 2001. - Vol. 357. - № Pt 3. - P. 593-615.

Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens / Green, S. J., Scheller L. F., Marletta M. A. et al. // Immunol. Lett. - 1994. - Vol. 43. - № 1-2. - P. 87-94.

Nordihydroguaiaretic acid and aspirin increase lifespan of genetically heterogeneous male mice / Strong, R., Miller R. A., Astle C. M. et al. // Aging Cell. - 2008. - Vol. 7. - № 5. - P. 641-650.

The novel hydroxylamine derivative NG-094 suppresses polyglutamine protein toxicity in *Caenorhabditis elegans* / Haldimann, P., Muriset M., Vigh L. et al. // J. Biol. Chem. - 2011. - Vol. 286. - № 21. - P. 18784-18794.

A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins / Rouse, J., Cohen P., Trigon S. et al. // Cell. - 1994. - Vol. 78. - № 6. - P. 1027-1037.

Novel protein kinase signaling systems regulating lifespan identified by small molecule library screening using *Drosophila* / Spindler, S. R., Li R., Dhahbi J. M. et al. // PLoS ONE. - 2012. - Vol. 7. - № 2. - P. e29782.

OASIS: Online Application for the Survival Analysis of Lifespan Assays Performed in Aging Research / Yang, J.-S., Nam H.-J., Seo M. et al. // PLoS ONE. - 2011. - Vol. 6. - № 8. - P. e23525.

Oeckinghaus, A., Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation // Cold Spring Harb Perspect Biol. - 2009. - Vol. 1. - № 4. - P. a000034.

Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis / Xia, Z., Dickens M., Raingeaud J. et al. // Science. - 1995. - Vol. 270. - № 5240. - P. 1326-1331.

Orhan, H., Sahin G. In vitro effects of NSAIDS and paracetamol on oxidative stress-related parameters of human erythrocytes // Exp. Toxicol. Pathol. - 2001. - Vol. 53. - № 2-3. - P. 133-140.

Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression / Nelson, D. E., Ihekwaba A. E., Elliott M. et al. // Science. - 2004. - Vol. 306. - № 5696. - P. 704-708.

Overexpression of Mn superoxide dismutase does not increase life span in mice / Jang, Y. C., Perez V. I., Song W. et al. // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. - 2009. - Vol. 64. - № 11. - P. 1114-1125.

p38 Kinase is a negative regulator of angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle cells: effects on Na+/H+ exchange and ERK1/2 / Kusuhara, M., Takahashi E., Peterson T. E. et al. // Circ Res. - 1998. - Vol. 83. - № 8. - P. 824-831.

p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389 / Huang, C., Ma W. Y., Maxiner A. et al. // J. Biol. Chem. - 1999. - Vol. 274. - № 18. - P. 12229-12235.

p38 MAPK is required for CD40-induced gene expression and proliferation in B lymphocytes / Craxton, A., Shu G., Graves J. D. et al. // J. Immunol. - 1998. - Vol. 161. - № 7. - P. 3225-3236.

p38/RK is essential for stress-induced nuclear responses: JNK/SAPKs and c-Jun/ATF-2 phosphorylation are insufficient / Hazzalin, C. A., Cano E., Cuenda A. et al. // Curr. Biol. - 1996. - Vol. 6. - № 8. - P. 1028-1031.

PC4 coactivates MyoD by relieving the histone deacetylase 4-mediated inhibition of myocyte enhancer factor 2C / Micheli, L., Leonardi L., Conti F. et al. // Mol. Cell. Biol. - 2005. - Vol. 25. - № 6. - P. 2242-2259.

Peltier, J., O'Neill A., Schaffer D. V. PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation // Dev Neurobiol. - 2007. - Vol. 67. - № 10. - P. 1348-1361.

Pereira, R. C., Delany A. M., Canalis E. CCAAT/enhancer binding protein homologous protein (DDIT3) induces osteoblastic cell differentiation // Endocrinology. - 2004. - Vol. 145. - № 4. - P. 1952-1960.

Perkins, N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. - 2007. - Vol. 8. - № 1. - P. 49-62.

Pervanadate-mediated tyrosine phosphorylation of keratins 8 and 19 via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway / Feng, L., Zhou X., Liao J. et al. // J. Cell Sci. - 1999. - Vol. 112 (Pt 13). - - P. 2081-2090.

A pharmacological network for lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* / Ye, X., Linton J. M., Schork N. J. et al. // Aging Cell. - 2014. - Vol. 13. - № 2. - P. 206-215.

Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling / Fang, Y., Vilella-Bach M., Bachmann R. et al. // Science. - 2001. - Vol. 294. - № 5548. - P. 1942-1945.

Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting / Schu, P. V., Takegawa K., Fry M. J. et al. // Science. - 1993. - Vol. 260. - № 5104. - P. 88-91.

Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis / Ma, L., Chen Z., Erdjument-Bromage H. et al. // Cell. - 2005. - Vol. 121. - № 2. - P. 179-193.

Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex / Sarbassov, D. D., Guertin D. A., Ali S. M. et al. // Science. - 2005. - Vol. 307. - № 5712. - P. 1098-1101.

PI3-kinase inhibition induces dauer formation, thermotolerance and longevity in *C. elegans* / Babar, P., Adamson C., Walker G. A. et al. // Neurobiol. Aging. - 1999. - Vol. 20. - № 5. - P. 513-519.

Potentiation of the antitumor effects of both selective cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 inhibitors in human hepatic cancer cells by inhibition of the MEK/ERK pathway / Cusimano, A., Fodera D., D'Alessandro N. et al. // Cancer Biol. Ther. - 2007. - Vol. 6. - № 9. - P. 1461-1468.

Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine / Raingeaud, J., Gupta S., Rogers J. S. et al. // J. Biol. Chem. - 1995. - Vol. 270. - № 13. - P. 7420-7426.

Prolongation of the life-span in mice adapted to large amounts of L-dopa / Cotzias, G. C., Miller S. T., Nicholson A. R., Jr. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1974. - Vol. 71. - № 6. - P. 2466-2469.

Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB / Sarbassov, D. D., Ali S. M., Sengupta S. et al. // Mol. Cell. - 2006. - Vol. 22. - № 2. - P. 159-168.

Protective effect of resveratrol against naphthalene-induced oxidative stress in mice / Sehirli, O., Tozan A., Omurtag G. Z. et al. // Ecotoxicol. Environ. Saf. - 2008. - Vol. 71. - № 1. - P. 301-308.

A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis / Lee, J. C., Laydon J. T., McDonnell P. C. et al. // Nature. - 1994. - Vol. 372. - № 6508. - P. 739-746.

Pyridinyl imidazoles inhibit IL-1 and TNF production at the protein level / Young, P., McDonnell P., Dunnington D. et al. // Agents Actions. - 1993. - Vol. 39 Spec No. - - P. C67-69.

Qadri, S. M., Foller M., Lang F. Inhibition of suicidal erythrocyte death by resveratrol // Life Sci. - 2009. - Vol. 85. - № 1-2. - P. 33-38.

RCoreTeam. R: A Language and Environment for Statistical Computing, 2014. URL: http://www.R-project.org.

RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases / Baud'huin, M., Lamoureux F., Duplomb L. et al. // Cell. Mol. Life Sci. - 2007. - Vol. 64. - № 18. - P. 2334-2350.

Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice / Harrison, D. E., Strong R., Sharp Z. D. et al. // Nature. - 2009. - Vol. 460. - № 7253. - P. 392-395.

Rapamycin, but not resveratrol or simvastatin, extends life span of genetically heterogeneous mice / Miller, R. A., Harrison D. E., Astle C. M. et al. // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. - 2011. - Vol. 66. - № 2. - P. 191-201.

Reactivating kinase/p38 phosphorylates tau protein *in vitro* / Reynolds, C. H., Nebreda A. R., Gibb G. M. et al. // J. Neurochem. - 1997. - Vol. 69. - № 1. - P. 191-198.

Regulation of *C. elegans* life-span by insulinlike signaling in the nervous system / Wolkow, C. A., Kimura K. D., Lee M. S. et al. // Science. - 2000. - Vol. 290. - № 5489. - P. 147-150.

Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin dTOR / Zhang, H., Stallock J. P., Ng J. C. et al. // Genes Dev. - 2000. - Vol. 14. - № 21. - P. 2712-2724.

Regulation of *Drosophila* life span by olfaction and food-derived odors / Libert, S., Zwiener J., Chu X. et al. // Science. - 2007. - Vol. 315. - № 5815. - P. 1133-1137.

Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway / Kapahi, P., Zid B. M., Harper T. et al. // Curr. Biol. - 2004. - Vol. 14. - № 10. - P. 885-890.

Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast / Fabrizio, P., Pozza F., Pletcher S. D. et al. // Science. - 2001. - Vol. 292. - № 5515. - P. 288-290.

Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex / Brugarolas, J., Lei K., Hurley R. L. et al. // Genes Dev. - 2004. - Vol. 18. - № 23. - P. 2893-2904.

Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38 / Zhao, M., New L., Kravchenko V. V. et al. // Mol. Cell. Biol. - 1999. - Vol. 19. - № 1. - P. 21-30.

Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG1 mitogen-activated protein kinase by the PTP2 and PTP3 protein tyrosine phosphatases / Wurgler-Murphy, S. M., Maeda T., Witten E. A. et al. // Mol. Cell. Biol. - 1997. - Vol. 17. - № 3. - P. 1289-1297.

Remarkable longevity and stress resistance of nematode PI3K-null mutants / Ayyadevara, S., Alla R., Thaden J. J. et al. // Aging Cell. - 2008. - Vol. 7. - № 1. - P. 13-22.

Reserpine can confer stress tolerance and lifespan extension in the nematode *C. elegans* / Srivastava, D., Arya U., SoundaraRajan T. et al. // Biogerontology. - 2008. - Vol. 9. - № 5. - P. 309-316.

Reversal of aging by NFkappaB blockade / Adler, A. S., Kawahara T. L., Segal E. et al. // Cell Cycle. - 2008. - Vol. 7. - № 5. - P. 556-559.

Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton / Sarbassov, D. D., Ali S. M., Kim D. H. et al. // Curr. Biol. - 2004. - Vol. 14. - № 14. - P. 1296-1302.

A role for the p38 MAP kinase pathway in the nuclear shuttling of NFATp / Gomez del Arco, P., Martinez-Martinez S., Maldonado J. L. et al. // J. Biol. Chem. - 2000. - Vol. 275. - № 18. - P. 13872-13878.

Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks / Alers, S., Loffler A. S., Wesselborg S. et al. // Mol. Cell. Biol. - 2012. - Vol. 32. - № 1. - P. 2-11.

The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria / Moskalev, A. A., Shaposhnikov M. V., Plyusnina E. N. et al. // Ageing Res. Rev. - 2013. - Vol. 12. - № 2. - P. 661-684.

Role of insulin/insulin-like growth factor 1 signaling pathway in longevity / Cheng, C. L., Gao T. Q., Wang Z. et al. // World J Gastroenterol. - 2005. - Vol. 11. - № 13. - P. 1891-1895.

Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin / Chandel, N. S., Trzyna W. C., McClintock D. S. et al. // J. Immunol. - 2000. - Vol. 165. - № 2. - P. 1013-1021.

Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors / Whitmarsh, A. J., Yang S. H., Su M. S. et al. // Mol. Cell. Biol. - 1997. - Vol. 17. - № 5. - P. 2360-2371.

Roy, S. K., Srivastava R. K., Shankar S. Inhibition of PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways causes activation of FOXO transcription factor, leading to cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer // J. Mol. Signal. - 2010. - Vol. 5. - № - P. 10.

Sarkar, S., Rubinsztein D. C. Small molecule enhancers of autophagy for neurodegenerative diseases // Mol Biosyst. - 2008. - Vol. 4. - № 9. - P. 895-901.

Search for dilepton resonances in pp collisions at radicals=7 TeV with the ATLAS detector / Aad, G., Abbott B., Abdallah J. et al. // Phys Rev Lett. - 2011. - Vol. 107. - № 27. - P. 272002.

Selective anticancer agents suppress aging in *Drosophila* / Danilov, A., Shaposhnikov M., Plyusnina E. et al. // Oncotarget. - 2013. - Vol. 4. - № 9. - P. 1527-1546.

Selkoe, D. J. Folding proteins in fatal ways // Nature. - 2003. - Vol. 426. - № 6968. - P. 900-904.

Sengottuvelan, M., Deeptha K., Nalini N. Resveratrol ameliorates DNA damage, prooxidant and antioxidant imbalance in 1,2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis // Chem Biol Interact. - 2009. - Vol. 181. - № 2. - P. 193-201.

Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence / Wang, W., Chen J. X., Liao R. et al. // Mol. Cell. Biol. - 2002. - Vol. 22. - № 10. - P. 3389-3403.

Simmonds, R. E., Foxwell B. M. Signalling, inflammation and arthritis: NF-kappaB and its relevance to arthritis and inflammation // Rheumatology (Oxford). - 2008. - Vol. 47. - № 5. - P. 584-590.

SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span / Kawahara, T. L., Michishita E., Adler A. S. et al. // Cell. - 2009. - Vol. 136. - № 1. - P. 62-74.

Sohal, R. S., Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging // Science. - 1996. - Vol. 273. - № 5271. - P. 59-63.

Statistical methods for testing effects on "maximum lifespan" / Wang, C., Li Q., Redden D. T. et al. // Mech. Ageing Dev. - 2004. - Vol. 125. - № 9. - P. 629-632.

Stearns, S. C. The evolution of life histories. — Oxford ; New York: Oxford University Press, 1992. — 249 p.

Stress resistance and longevity in selected lines of *Drosophila melanogaster* / Harshman, L. G., Moore K. M., Sty M. A. et al. // Neurobiol. Aging. - 1999. - Vol. 20. - № 5. - P. 521-529.

The structure of a human p110alpha/p85alpha complex elucidates the effects of oncogenic PI3Kalpha mutations / Huang, C. H., Mandelker D., Schmidt-Kittler O. et al. // Science. - 2007. - Vol. 318. - № 5857. - P. 1744-1748.

Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition / Yip, C. K., Murata K., Walz T. et al. // Mol. Cell. - 2010. - Vol. 38. - № 5. - P. 768-774.

Sweeney, S. E., Firestein G. S. Signal transduction in rheumatoid arthritis // Curr. Opin. Rheumatol. - 2004. - Vol. 16. - № 3. - P. 231-237.

Takekawa, M., Maeda T., Saito H. Protein phosphatase 2Calpha inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways // EMBO J. - 1998. - Vol. 17. - № 16. - P. 4744-4752.

Takenaka, K., Moriguchi T., Nishida E. Activation of the protein kinase p38 in the spindle assembly checkpoint and mitotic arrest // Science. - 1998. - Vol. 280. - № 5363. - P. 599-602.

Tang, C. H., Wei W., Liu L. Regulation of DNA repair by S-nitrosylation // Biochim Biophys Acta. - 2012. - Vol. 1820. - № 6. - P. 730-735.

Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression / Kunz, J., Henriquez R., Schneider U. et al. // Cell. - 1993. - Vol. 73. - № 3. - P. 585-596.

Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against aging, S-nitrosation, and insulin resistance in muscle of male mice / Ropelle, E. R., Pauli J. R., Cintra D. E. et al. // Diabetes. - 2013. - Vol. 62. - № 2. - P. 466-470.

Targeting oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neuroinflammatory signaling by selective cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors mitigates MPTP-induced neurotoxicity in mice / Gupta, A., Kumar A., Kulkarni S. K. // Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. - 2011. - Vol. 35. - № 4. - P. 974-981.

Targeting the translational apparatus to improve leukemia therapy: roles of the PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathway / Martelli, A. M., Evangelisti C., Chappell W. et al. // Leukemia. - 2011. - Vol. 25. - № 7. - P. 1064-1079.

Tatar, M., Bartke A., Antebi A. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals // Science. - 2003. - Vol. 299. - № 5611. - P. 1346-1351.

Thomas, G., Haavik J., Cohen P. Participation of a stress-activated protein kinase cascade in the activation of tyrosine hydroxylase in chromaffin cells // Eur. J. Biochem. - 1997. - Vol. 247. - № 3. - P. 1180-1189.

Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2 / Kido, Y., Burks D. J., Withers D. et al. // J. Clin. Invest. - 2000. - Vol. 105. - № 2. - P. 199-205.

Tootle, T. L., Spradling A. C. *Drosophila* Pxt: a cyclooxygenase-like facilitator of follicle maturation // Development. - 2008. - Vol. 135. - № 5. - P. 839-847.

Trade-offs between longevity and pathogen resistance in *Drosophila melanogaster* are mediated by NFκB signaling / Libert, S., Chao Y., Chu X. et al. // Aging Cell. - 2006. - Vol. 5. - № 6. - P. 533-543.

The transcription factor nuclear factor-kappa B and cancer / Escarcega, R. O., Fuentes-Alexandro S., Garcia-Carrasco M. et al. // Clin Oncol (R Coll Radiol). - 2007. - Vol. 19. - № 2. - P. 154-161.

The transcriptome of the bowhead whale *Balaena mysticetus* reveals adaptations of the longest-lived mammal / Seim, I., Ma S., Zhou X. et al. // Aging (Albany NY). - 2014. - Vol. 6. - № 10. - P. 879-899.

Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases nuclear factor kappaB (NFkappaB) activity in and interleukin-8 (IL-8) release from bovine mammary epithelial cells / Fitzgerald, D. C., Meade K. G., McEvoy A. N. et al. // Vet. Immunol. Immunopathol. - 2007. - Vol. 116. - № 1-2. - P. 59-68.

The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced Tyrosinase expression / Galibert, M. D., Carreira S., Goding C. R. // EMBO J. - 2001. - Vol. 20. - № 17. - P. 5022-5031.

Vermeulen, C. J., Loeschcke V. Longevity and the stress response in *Drosophila* // Exp. Gerontol. - 2007. - Vol. 42. - № 3. - P. 153-159.

Wang, B. S., Lin J. K., Lin-Shiau S. Y. Role of tyrosine kinase activity in 2,2',2''-tripyridine-induced nitricoxide generation in macrophages // Biochem. Pharmacol. - 1999. - Vol. 57. - № 12. - P. 1367-1373.

Wang, L., Karpac J., Jasper H. Promoting longevity by maintaining metabolic and proliferative homeostasis // J. Exp. Biol. - 2014. - Vol. 217. - № Pt 1. - P. 109-118.

Wang, X. Z., Ron D. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase // Science. - 1996. - Vol. 272. - № 5266. - P. 1347-1349.

Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase / Powis, G., Bonjouklian R., Berggren M. M. et al. // Cancer Res. - 1994. - Vol. 54. - № 9. - P. 2419-2423.

Ye, J. Mechanisms of insulin resistance in obesity // Front Med. - 2013. - Vol. 7. - № 1. - P. 14-24.

Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor / Posas, F., Wurgler-Murphy S. M., Maeda T. et al. // Cell. - 1996. - Vol. 86. - № 6. - P. 865-875.

Zhao, L., Vogt P. K. Helical domain and kinase domain mutations in p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2008. - Vol. 105. - № 7. - P. 2652-2657.

Activation of homologous recombination DNA repair in human skin fibroblasts continuously exposed to X-ray radiation / Osipov, A. N., Grekhova A., Pustovalova M. et al. // Oncotarget. - 2015. -