

**ДАНИЛОВ**

**Антон Александрович**

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

03.02.08 – экология (биология)

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Работа выполнена в отделе радиоэкологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук

<b>Научный руководитель:</b>	<b>Шапошников Михаил Вячеславович</b> , кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной радиобиологии и геронтологии отдела радиоэкологии ФГБУН Института биологии Коми научного центра Российской академии наук
<b>Официальные оппоненты:</b>	<b>Осипов Андреян Николаевич</b> , доктор биологических наук, заведующий лабораторией радиационной биофизики Государственного научного центра Российской Федерации - Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна, г. Москва
	<b>Мыльников Сергей Владимирович</b> , кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики и селекции ФГБОУ ВПО Санкт-Петербургского государственного университета, г. Санкт-Петербург
<b>Ведущая организация:</b>	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт экологии растений и животных УрО РАН, г. Екатеринбург

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г. в часов на заседании диссертационного совета Д004.007.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН по адресу: 167982, г. Сыктывкар, ГСП-2, ул. Коммунистическая, 28  
e-mail: dissovet@ib.komisc.ru

Сайт института: [www.ib.komisc.ru](http://www.ib.komisc.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Коми научного центра Уральского отделения РАН по адресу: 167982, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 24.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Алевтина Григорьевна Кудяшева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**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). Стресс-факторы способны не только оказывать повреждающее действие на организм, но также активировать защитные механизмы (Feder, 1999; Osipov, 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 (ПЖ), 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; Moskaev, Shaposhnikov, 2011; Diacylglycerol lipase regulates..., 2014). Мутации в генах, кодирующих ферменты IGF-I/PI3K/AKT/TOR-каскада, вызывают увеличение ПЖ 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 приводит к хроническому воспалению и снижает ПЖ 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 ПЖ модельных животных (PI3-kinase inhibition..., 1999; Regulation of lifespan..., 2004; Insulin-like growth factor..., 2005; Шапошников и др., 2010; Mechanisms of life span..., 2010; Moskaev, 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 ПЖ, и не окажет отрицательного эффекта на фертильность и локомоторную активность дрозофил.

**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 melanogaster*. 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/upk1/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/АКТ/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, САУ10404, 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 радиозологии 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*, *Brc2*, *Cyp4e2*) и ингибирования активности ферментов старение-ассоциированных сигнальных каскадов (NF-κB, 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.В37.21.0198 «Влияние ингибиторов внутриклеточных ассоциированных со старением сигнальных путей (PI3K, TOR, NF-κB 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.** 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 введения, 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.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе рассмотрены данные литературы, свидетельствующие о взаимосвязи стрессоустойчивости организма и его продолжительности жизни. Особое внимание уделяется рассмотрению основных внутриклеточных механизмов, контролирующих стрессоустойчивость, скорость старения и жизнеспособность организма (Инсулин/IGF-1, PI3K/Akt, TOR, p38/MAPK-опосредованные сигнальные пути, транскрипционный фактор NF-κB, индуцибельная синтаза оксида азота iNOS). Обсуждаются методы фармакологической коррекции стрессоустойчивости и продолжительности жизни.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### **Линии *Drosophila melanogaster*.**

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 линии с нокаутом *tat-2/CG14741*; линии с РНК-интерференцией: *Pkh2/Pdk1RNAi*, *ypk1/S6kRNAi#1*, *ypk1/S6kRNAi#2*, *lem3/CG8679RNAi*; линия Act-GS с мифепристон-индуцируемым драйвером GAL4. Для индукции РНК-интерференции использовали мифепристон-индуцируемый драйвер GAL4. Дрозофил содержали в стандартных условиях: при 25°C, 12-часовом режиме освещения, на стандартной агарно-дрожжевой питательной среде (Ashburner, 1989).

**Исследуемые препараты.** Изучаемые фармакологические препараты наносили на поверхность питательной среды в составе гидролизата дрожжей. Имаго дрозофил обрабатывали на протяжении всей жизни следующими веществами в указанных концентрациях: рапамицин – ингибитор TOR, 0.005 мкМ; вортманнин – ингибитор PI3K, 0.005 и 5 мкМ; PDTC – ингибитор NF-κB 1.25; 12.5; 125мкМ; QNZ – ингибитор NF-κB, 0.03, 0.3, 3 мкМ; 1400W– ингибитор iNOS 0.03, 0.3, 3 мкМ; смесь рапамицина 5 мкМ + вортманнина 5 мкМ; смесь PDTC 125мкМ + рапамицина 0.005 мкМ; смесь PDTC 125мкМ + вортманнина 0.005 мкМ. Также использовали нестероидные противовоспалительные препараты: аспирин 0.05, 0.5, 1 μМ; валерил-салицилат 0.05, 0.5, 1 μМ; транс-ресвератрол 0.05, 0.5, 1 μМ; SC-560 0.05, 0.5, 1 μМ; APHS 0.05, 0.5, 1 μМ; NS-398 0.05, 0.5, 1 μМ; SC-58125 0.05, 0.5, 1 μМ; вальдекоксиб 0.05, 0.5, 1 μМ; САУ10404 0.05, 0.5, 1 μМ; ликофелон 0.05, 0.5, 1 μМ.

**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. Спонтанную локомоторную активность измеряли в течение трех мин, далее вычисляли средний уровень активности на одну муху. Каждое измерение активности в тесте на отрицательный геотаксис проводили в трех последовательных повторностях с интервалом 20 сек. Далее также вычисляли средний уровень активности

на одну муху. Объем выборки для каждого измерения спонтанной локомоторной активности и активности в тесте на отрицательный геотаксис составлял 30 особей.

**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.

**Анализ стрессоустойчивости.** Перед анализом стрессоустойчивости мух в течение 10 сут обрабатывали исследуемыми веществами. Для исследования влияния теплового шока на выживаемость мух помещали в термостат при 35 °С. Для исследования влияния окислительного стресса мух помещали в емкости с фильтровальной бумагой пропитанной 20 мМ раствором паракуата в 5 % сахарозе. Для исследования влияния голодания мух рассаживали в емкости с фильтровальной бумагой, пропитанной дистиллированной воды и помещали в термостат, где поддерживались стандартные условия. Стрессоустойчивость анализировали в трех биологических повторностях.

#### **Анализ продолжительности жизни**

Для анализа ПЖ отбирали одновозрастных имаго каждого пола. Мух содержали в стандартных условиях. Оценивали медианную ПЖ и возраст гибели 90% особей выборки, а также строили кривые дожития. ПЖ анализировали в трех биологических повторностях.

**Статистическая обработка данных.** Функции дожития оценивали с помощью процедуры Каплана-Мейера и представляли в виде кривых дожития. Рассчитывали медианную ПЖ и возраст гибели 90 % особей. При сравнении функций дожития использовали модифицированный критерий Колмогорова-Смирнова (Modified Kolmogorov-Smirnov..., 1980). Для оценки достоверности различий по медианной ПЖ 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..., 2004). Построение кривых Каплана-Мейера осуществляли с помощью программы Statistica, версия 6.1 (StatSoft, Inc.).

Для оценки стрессоустойчивости использовали F-критерий Фишера (Fisher, 1922; OASIS: Online Application..., 2011). Статистическую обработку 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, USA).

### **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ**

Воздействие рапамицином (0.005 мкМ) привело к статистически значимому ( $p < 0.01$ ) увеличению медианой продолжительность жизни у самцов (на 14%) и самок (на 12%) (табл. 1). 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. 1). При воздействии рапамицином наблюдали изменение локомоторной активности в зависимости от периода измерений (табл. 1). Вортманнин и рапамицин не оказывали отрицательного влияния на фертильность самок дрозофил. Отмечено 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 (табл. 2).

Воздействие ингибитором NF-κB PDTC в каждой концентрации приводило к статистически значимому увеличению медианой продолжительность жизни самцов на 6-10%, а также к увеличению возраста гибели 90% особей выборки в концентрациях 1.25 мкМ и 12.5 мкМ (табл. 1). При воздействии PDTC в концентрации 125 мкМ на самок, их медианная продолжительность жизни достоверно увеличивалась на 12% (табл. 1). Применение PDTC оказывало влияние на локомоторную активность в зависимости от периода измерений. PDTC оказывал положительное влияние на фертильность самок (табл. 1). PDTC в концентрациях 1.25, 12.5 и 125 мкМ увеличивал устойчивость самок к тепловому шоку и голоданию. PDTC в концентрации 1.25 мкМ снижал устойчивость самцов к окислительному стрессу (табл. 2).

При воздействии ингибитором iNOS 1400W в концентрациях 3 и 0.03 мкМ на самцов происходило статистически значимое увеличение медианной продолжительности жизни (на 7% и 3% соответственно) и возраста гибели 90% особей выборки (на 5% и 13% соответственно). У самок при воздействии 1400W в каждой из концентраций наблюдалось достоверное уменьшение медианой продолжительности жизни (на 2-5%) и возраст гибели 90% особей выборки (на 4-5%) (табл. 1). В концентрации 0.03 мкМ 1400W снижал активность самок. При воздействии 1400W в концентрации 3 мкМ увеличивалась спонтанная активность самцов. 1400W не оказывал значительного влияния на фертильность самок. При воздействии 1400W в концентрации 3 мкМ мы наблюдали снижение устойчивости к окислительному стрессу у самцов и повышение этого параметра у самок (табл. 2).

В работе анализировали два типа смесей: 1) смесь 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) медианной продолжительность жизни увеличилась на 14.6%, а возраст гибели 90% особей выборки на 23.4% у самок. Медианная

продолжительность жизни самцов увеличивалась на 2.4% (табл. 1). 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 наблюдалось увеличение возраста гибели 90% особей выборки у самок на 11.3% и 8.1% соответственно (табл. 1).

При воздействии смесями PDTC (125 мкМ) и вортманнина (5 мкМ), и PDTC (125 мкМ) и рапамицина (5 мкМ) показатели локомоторной активности менялись в зависимости от периода измерений (табл. 1). При исследовании возрастной динамики фертильности самок не выявлено отрицательного влияния смеси PDTC (125 мкМ) и рапамицина (5 мкМ), PDTC (125 мкМ) и вортманнина (5 мкМ) (табл. 1). Воздействие исследуемыми смесями препаратов повышало устойчивость самцов к тепловому шоку и голоданию, но снижало устойчивости к окислительному стрессу. При совместном воздействии рапамицина и вортманнина повышалась устойчивость самок к голоданию (табл. 2).

Воздействие аспирином увеличивало медианную продолжительность жизни у самцов, на 6.8%, и самок, на 32.7%. Возраст 90% смертности также увеличивалось на 7.8% у самцов и на 13.7% у самок (табл. 1). Показатели локомоторной активности и фертильности менялись в зависимости от периода измерений. NS-398 в концентрации 1 мкМ увеличивал медианную продолжительность жизни самцов на 10.2 % и самок на 13.5%, а также возраст 90% смертности самцов на 3.9 %, и самок в каждой концентрации на 5.5% (табл. 1). Показатели локомоторной активности и фертильности менялись в зависимости от периода измерений. Вальдекоксиб в концентрации 1 мкМ, увеличивал медианную продолжительность жизни самцов на 7.5% и 15.4%. Отмечено увеличение возраста 90% смертности у самок на 5.5% (табл. 1). Показатели локомоторной активности самцов и фертильности самок менялись в зависимости от периода измерений. Вальдекоксиб оказывал положительное влияние на активность самок.

Таблица 1

Влияние ингибиторов IGF-I/PI3K/АКТ/TOR и NF-κB сигнальных путей на показатели жизнеспособности особей *Drosophila melanogaster*

Вещество (концентрация)	Мишень	Продолжительность жизни						ЛА			Φ
		♂			♀			♂	♀	♀	
		М	90%	n	М	90%	n	♂	♀	♀	
Рапамицин(0.005 мкМ)	TOR	+14%**	+4.7%	344	+12%**	+4.8%	363	↓↑	↓↑	=	
Вортманнин(0.005 мкМ)	PI3K	+8%	+4.7%	312	+8%	+4.8%	355	↓↑	↓↑	=	
Вортманнин(5 мкМ)	PI3K	+5%*	+2%	259	-8.2%*	-1.7%	252	↓↑	↓↑	=	
PDTC (1.25 мкМ)	NF-κB	+6%*	+2%	437	-2%*	-5%*	451	↓↑	↓↑	↑	
PDTC (12.5 мкМ)	NF-κB	+7%**	+6%**	448	-2%*	0%	433	↓↑	↓↑	↑	
PDTC (125 мкМ)	NF-κB	+10%*	-3.1%*	322	+12%*	+4.8%	361	↓↑	↓↑	↑	
1400W (0.03 мкМ)	iNOS	+3%**	+13%**	396	-5%**	-5%**	437	↓↑	↓	↑	
1400W (3 мкМ)	iNOS	+7%**	+5%*	428	-2%**	-4%**	449	↑	↓↑	=	
Рапамицин(5 мкМ) + Вортманнин (5 мкМ)	TOR + PI3K	+2.4%*	+8%	372	+14.6%*	+23.4%*	400	-	-	-	

PDTC (125 мкМ) + Рапамицин (0.005 мкМ)	NF-κB + TOR	+10%**	-3.1%	305	+10%*	+11.3%**	370	↓↑	↓↑	=
PDTC (125 мкМ) + Вортманнин (0.005 мкМ)	NF-κB + PI3K	+10%*	+4.7%	304	+12%*	+8.1%*	342	↓↑	↓↑	=
Аспирин(1 мкМ)	Pkh-1	+6.8 %*	+7.8%*	286	+32.7 %*	+13.7 %*	284	↓↑	↓↑	↓↑
NS-398 (1 мкМ)	Pkh-1	+10.2%***	+3.9 %*	305	+13.5 %*	+5.5 %*	308	↓↑	↓↑	↓↑
Вальдекоксиб (1 мкМ)	Pkh-1	+7.5 %***	0%	291	+15.4 %*	+5.5 %*	294	↓↑	↑	↓↑

Примечания: М – медианная продолжительность жизни, 90% - возраст гибели 90% особей выборки, ЛА – локомоторная активность, Ф- фертильность самок; белки- мишени: исследуемые компоненты сигнальных путей.

Различия достоверны по сравнению с контролем при: \* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.05$  по критерию Гехана-Бреслоу-Вилкоксона и Мантеля-Кокса для изменения медианой ПЖ, по критерию Ванг-Алиссона для изменения возраста гибели 90% особей выборки.

«↑» - увеличение параметра, «↓» - уменьшение параметра, «↓↑» - разнонаправленные изменения параметра в течение периода измерений ( $p < 0.05$  по критерию  $\chi^2$ ), «↔» - не выявлено достоверного изменения параметра.

Таблица 2

Влияние ингибиторов IGF-I/PI3K/АКТ/TOR и NF-κB сигнальных путей на стрессоустойчивость особей *Drosophila melanogaster*

Вещество (концентрация)	Мишень	Тепловой шок (35°C)		Голодание		Окислительный стресс (паракуват 20 мМ)	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀
Рапамицин (0.005 мкМ)	TOR	-2%	+59%*	+18%	+30%*	+2%*	+9%*
Вортманнин (0.005 мкМ)	PI3K	-2%	+2%	0	+30%*	-7%	-6%
Вортманнин (5 мкМ)	PI3K	0	-3%	+5%	+12%*	+6%*	0
PDTC 1.25 мкМ	NF-κB	-1%	+13%*	+7%	+26%*	-21%*	+3%
PDTC 12.5 мкМ	NF-κB	-2%	+10%*	+11%	+16%*	+2%	+1%
PDTC 125 мкМ	NF-κB	-1%	+22%*	+4%	+30%*	0	+3%
1400W 0.03 мкМ	iNOS	+1%	-3%	+1%	-2%	+2%	-3%
1400W 3 мкМ	iNOS	+7%	-3%	-2%	+4%	-15%**	+5%*
вортманнин (0.005 мкМ)+рапамицин (0.005 мкМ)	TOR + PI3K	+81%*	-3%***	+10%***	+32%***	-1%	+1%
Аспирин (1 мкМ)	Pkh-1	+29%*	+8%	+0.2%	-8%**	-2%*	-10%
NS-398 (1 мкМ)	Pkh-1	+16%**	-4%	+0.1%	-2%	+14%*	+1%
Вальдекоксиб (1 мкМ)	Pkh-1	+14%**	+14%*	-1%	+2%	+7%	-2%

Различия достоверны по сравнению с контролем при: \*  $p < 0.05$  по F-критерию Фишера.

Обнаружено снижение продолжительности жизни у мух с РНК интерференцией генов *upk1/S6K*, *Pkh2/PDK1* и *lem3/CG8679* при воздействии аспирина в концентрации 1 мкМ. У самок линии ActGS>lem/CG8679RNAi также установлено увеличение продолжительность жизни. Воздействие аспирином на мух линии *tat2/CG14741* снижало продолжительность жизни самцов, но увеличивало ее у самок (рис.).

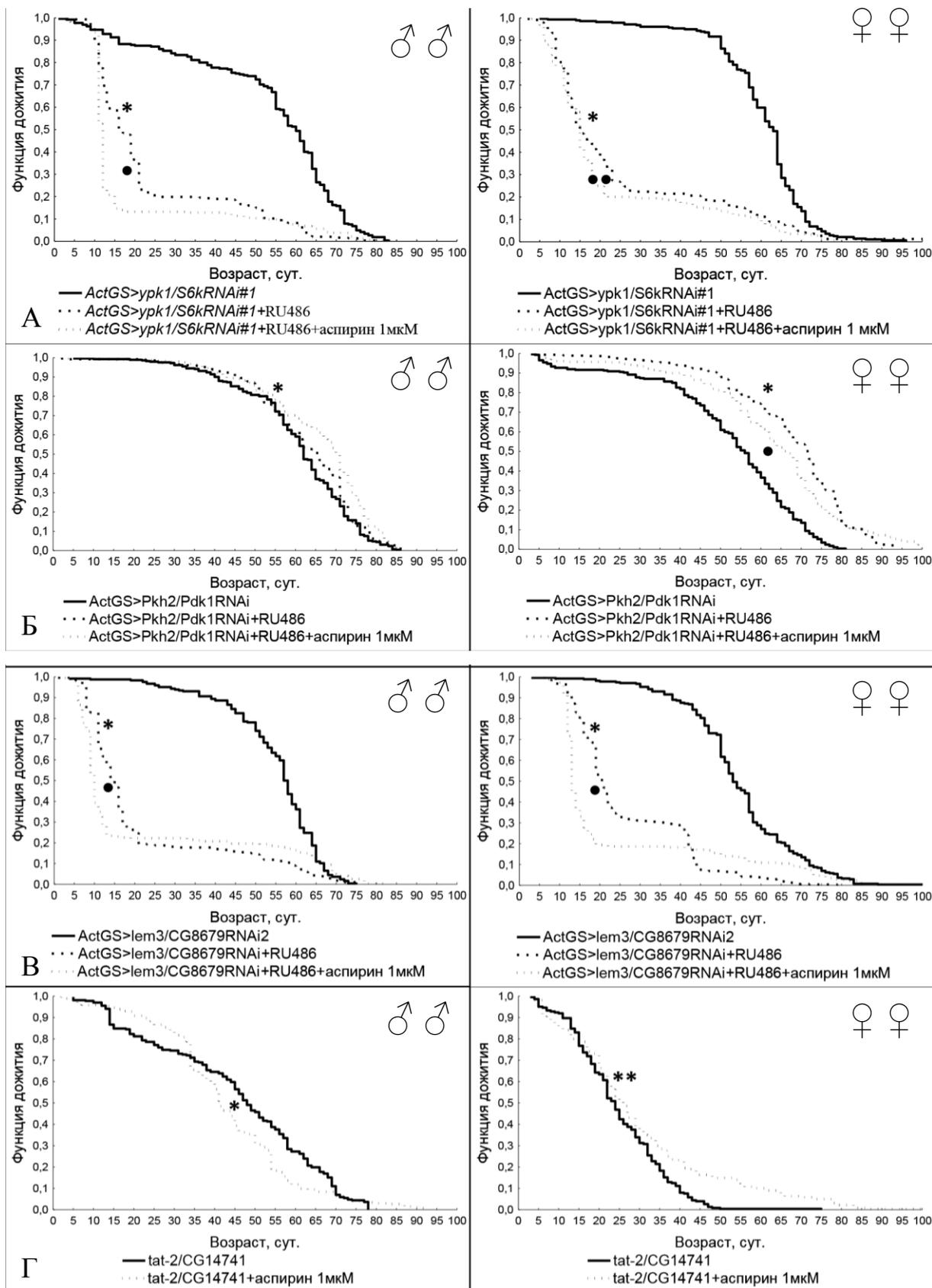


Рисунок. Влияние аспирина (1мкМ) на продолжительность жизни дрозофил со сниженной активностью компонентов Pkh2/ypk1/lem3/tat2 сигнального пути.

Примечания: А – мухи с RNAi конструкцией для подавления экспрессии гена *ypk1/S6k*, активируемой при воздействии вещества RU486; Б - мухи с RNAi конструкцией для подавления экспрессии гена *Pkh2/Pdk1*, активируемой при воздействии вещества RU486; В - мухи с RNAi конструкцией для подавления

экспрессии гена *lem3/CG8679*, активируемой при воздействии вещества RU486; Г - мухи с нокаут мутацией в гене триптофановой пермеазы *tat2/CG14741*. Различия достоверны при: \* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.05$  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+аспирина 1 мкМ, согласно тесту Колмогорова-Смирнова.

#### ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

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- $\kappa$ B, а также НСПВП.

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. В связи с этим мы исследовали адаптогенные свойства специфических фармакологических ингибиторов продуктов генов *PI3K*, *TOR*, *NF- $\kappa$ B*, *iNOS*, ассоциированных со старением, и НСПВП.

На сегодняшний день у *Drosophila melanogaster* описаны гомологи TOR (Genetic and biochemical..., 2000), PI3K (MacDougall et al., 1995), NF- $\kappa$ B (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 CA10404..., 2009; Demidenko, Blagosklonny, 2009; Celecoxib extends..., 2011; Enhanced longevity by..., 2014).

Мы показали, что рапамицин обладает старение-супресорным эффектом даже в низкой, наномолярной концентрации (0.005 мкМ), при которой он значительно увеличивает медианную ПЖ 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 ПЖ 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). Увеличение ПЖ 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 ПЖ 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 Р1ЗК вортманнином в концентрации 0.005 мкМ не привело к статистически значимым эффектам на ПЖ. Вортманнин в концентрации 5 мкМ вызвал увеличение медианной ПЖ 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 ПЖ как у самцов, так и у самок (Москалев, Шапошников, 2008; Moskalev, Shaposhnikov, 2010). Таким образом, эффект ингибирования Р1ЗК зависит от концентрации ингибитора и по-видимому определяется вовлеченностью данного фермента в поддержание тонкого баланса между развитием/репродукцией с одной стороны и стрессоустойчивостью/ПЖ с другой.

Во всех вариантах обработки ингибитором активности NF-κB PDTC (1.25, 12.5, 125 мкМ) ПЖ самцов увеличивалась (до 7%). ПЖ самок, при воздействии PDTC в концентрациях 1.25 и 12.5 мкМ уменьшалась (на 2%). Известно, что транскрипционный фактор NF-κB контролирует возраст-зависимые изменения в экспрессии генов воспаления. Фармакологическое ингибирование of 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-κB inhibition..., 2012). Также, ранее в наших исследованиях было показано увеличение ПЖ дрозофил при воздействии PDTC в концентрации 125 мкМ (Moskalev, Shaposhnikov, 2011).

Отмеченное нами увеличение ПЖ самцов и ее уменьшение у самок при ингибировании iNOS с помощью 1400W 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 ПЖ, 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).

Поскольку жизнеспособность является сложным процессом, в который вовлечены многие внутриклеточные сигнальные пути, мы сделали предположение, что наиболее выраженный эффект на ПЖ 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 ПЖ

самок. У самцов сочетанное действие препаратов не приводит к увеличению ПЖ 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 ПЖ нематод (Amyloid-binding compounds..., 2011).

Нами было показано, что практически все исследуемые НСПВП способны увеличивать медианную ПЖ дрозофил (на 4-19% у самцов и на 2-33% у самок), а также увеличивать возраст гибели 90% особей выборки (на 2-20% у самцов и на 2-13% у самок). Наибольшие эффекты на ПЖ 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 ПЖ 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).

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 CAУ10404..., 2009; Celecoxib extends..., 2011).

Согласно недавно опубликованным данным, увеличение ПЖ нематоды после обработки целекоксибом обусловлено ингибированием фосфоинозитид-зависимой протеинкиназы-1 (PDK-1), ключевого компонента инсулинового/ИФР-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 ПЖ самок дрозофил. Наши данные согласуются с эффектами фармакологических

ингибирование Pkh2/PDK-1 у нематод (*Celexoxib extends...*, 2011). Возможно, одновременное воздействие НСПВП снижает положительный эффект РНК-интерференции у самок. Следует отметить, что воздействие НСПВП на мух со сниженной активностью других компонентов Pkh2/upk1/lem3/tat2 сигнального пути также снижало ПЖ. Таким образом, увеличение ПЖ при воздействии НСПВП опосредуется элементами Pkh2/upk1/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 ПЖ модельных животных, а также повышать устойчивость к воздействию стрессовых факторов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

В настоящее время накапливаются экспериментальные факты, свидетельствующие о том, 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 старение-ассоциированных сигнальных путей IGF-I/PI3K/AKT/TOR и NF-κB/iNOS. При этом увеличение стрессоустойчивости и ПЖ не сопровождается перераспределением ресурсов организма в ущерб локомоторной активности и фертильности.

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.

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-1/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. 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-1/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 дрозophil 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 дрозophil к окислительному стрессу, а в концентрации 1 мкМ – к тепловому шоку. Для других исследуемых препаратов концентрационных зависимостей не выявлено.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

*Работы, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:*

1. Шапошников М.В., Данилов А.А., Москалев А.А. Фармакологические ингибиторы PI3K-киназы оказывают радиопротекторное действие на имаго *Drosophila melanogaster* // Радиационная биология. Радиоэкология. 2010. Т. 50, № 6. С. 649–655.

2. The effects of pectins on life span and stress resistance in *Drosophila melanogaster* / M. Shaposhnikov, D. Latkin, E. Plyusnina, L. Shilova, **A. Danilov** et al. // Biogerontology. 2014. Vol. 15. I. 2. P. 113–127.

3. Selective anticancer agents suppress aging in *Drosophila* / **A. Danilov**, M. Shaposhnikov, E. Plyusnina et al. // Oncotarget. 2013. Vol.4. No 9. P. 1507-1526.

4. Influence of non-steroidal anti-inflammatory drugs on *Drosophila melanogaster* longevity / **A. Danilov**, M. Shaposhnikov, O. Shevchenko et al. / Oncotarget. 2015. Vol. 6. No 23. P. 19428- 19444.

*В прочих изданиях:*

1. Effect of Low Doses (5-40 cGy) of Gamma-irradiation on Lifespan and Stress-related Genes Expression Profile in *Drosophila melanogaster* / S. Zhikrevetskaya, D. Peregudova, **A. Danilov** et al. // PLOS ONE. 2015. Vol.10. No 8. P. e0133840.

2. Данилов А.А., Москалев А.А. Исследование геропротекторных свойств специфического ингибитора фосфоинозитол-3-киназы LY-294002 // Тез. докл. VIII молодежной научной конференции Института физиологии Коми НЦ УрО РАН (Сыктывкар, 14-16 апреля 2009 г.). С. 62-66.

3. Данилов А.А., Москалев А.А. Исследование геропротекторных свойств специфических ингибиторов PI3K- и TOR- киназ // Матер. докладов IX всероссийской молодежной научной конференции Института физиологии Коми НЦ УрО РАН (Сыктывкар, 14-16 апреля 2010 г.). С. 41-46.

4. Данилов А.А., Москалев А.А. Исследование геропротекторных свойств специфических ингибиторов PI3K- и TOR- киназ и транскрипционного фактора NF-κB // Матер. докладов X Всероссийская молодежная научная конференция Института физиологии Коми НЦ УрО РАН (Сыктывкар, 19-21 апреля 2011 г.). С. 65-70.

5. Влияние специфического ингибитора транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B на продолжительность жизни, нервно-мышечную активность и плодовитость особей *Drosophila melanogaster* / А.А. Данилов, М.В. Шапошников, Е.Н. Плюснина, А.А. Москалев // Матер. докладов XIX Всероссийской молодежной научной конференции Института биологии Коми НЦ УрО РАН (Сыктывкар, 2-6 апреля, 2012). С. 189-193.

6. Danilov A.A., Shaposhnikov M.V., Moskalev A.A. Investigation of geroprotective properties of p38 kinase and NF- $\kappa$ B transcription factor specific inhibitors // Genetics of aging and longevity: Abstract of reports of 2<sup>nd</sup> international conference. (Moscow, 22-25 April 2012). P.19.

7. *Drosophila melanogaster* life extension by overexpression of growth arrest and DNA damage 45 gene/ А.А. Москалев, М.В. Шапошников, Е.Н. Плюснина, I.O. Velegzhaninov, O.A. Shostal, E.V. Romanova, A.A. Danilov, D.O. Chernyshova, V.N. Mezentzeva // Genetics of aging and longevity: Abstract of reports of 2<sup>nd</sup> international conference. (Moscow, 22-25 April 2012). P.62.

8. Данилов А.А., Шапошников М.В., Москалев А.А. Исследование геропротекторных свойств специфических ингибиторов PI3K- и TOR-киназ и транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B// Материалы докладов II всероссийской (XVII) молодежной научной конференции «молодежь и наука на севере». Сыктывкар 22-26 апреля 2013 г. С. 33-34.

9. Данилов А.А., Шапошников М.В., Москалев А.А. Изучение влияния ингибиторов ферментов внутриклеточных сигнальных каскадов на продолжительность жизни и возрастную динамику плодовитости и локомоторной активности *Drosophila melanogaster* // Сборник тезисов 17-й Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пушкино, 21 – 26 апреля 2013 г. С. 411.

10. Изучение геропротекторных свойств ингибиторов циклооксигеназы/ А.А. Данилов, М.В. Шапошников, О.Г. Шевченко, А.А. Москалев // Материалы 18-й Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пушкино, 21 – 25 апреля 2014 г. С. 329.

11. Danilov A.A., Shaposhnikov M.V., Moskalev A.A. Aging-suppressive properties of inhibitors of PI3K, TOR, iNOS, NF- $\kappa$ B and COX // Genetics of aging and longevity: Abstract of reports of 3<sup>rd</sup> international conference. (Sochi, April 2014). P.63.

12. Ингибиторы циклооксигеназы увеличивают продолжительность жизни особей *Drosophila melanogaster*/ А.А. Данилов, М.В. Шапошников, О.Г. Шевченко, Л.В. Омелянчук, А.А. Москалев //Тезисы докладов. VI съезд Вавиловского Общества Генетиков и Селекционеров и ассоциированные генетические симпозиумы. Ростов-на-Дону, 2014. С. 90-91.