

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-4-2475>
<https://elibrary.ru/GGYCQG>

Оригинальная статья
<https://fptt.ru>

Биофункциональная активность *in vivo* хлорогеновой кислоты и биоханина А, выделенных из экстрактов каллусной культуры *Trifolium pratense* L.



И. С. Милентьева^{ID}, А. Д. Веснина^{*ID}, А. М. Федорова^{ID},
Е. В. Остапова^{ID}, Т. А. Ларичев^{ID}

Кемеровский государственный университет^{ROR}, Кемерово, Россия

Поступила в редакцию: 02.05.2023

Принята после рецензирования: 27.06.2023

Принята к публикации: 04.07.2023

*А. Д. Веснина: koledockop1@mail.ru,

<https://orcid.org/0000-0002-4552-7418>

И. С. Милентьева: <https://orcid.org/0000-0002-3536-562X>

А. М. Федорова: <https://orcid.org/0000-0002-8071-4411>

Е. В. Остапова: <https://orcid.org/0000-0002-4704-484X>

Т. А. Ларичев: <https://orcid.org/0000-0003-0166-2527>

© И. С. Милентьева, А. Д. Веснина,
А. М. Федорова, Е. В. Остапова, Т. А. Ларичев, 2023



Аннотация.

Полифенолы представляют интерес как потенциальные нейропротекторы, которые увеличивают продолжительность жизни и замедляют старение. Перспективным источником биологически активных веществ является клевер луговой (*Trifolium pratense* L.), в экстрактах которого присутствуют биоханин А и хлорогеновая кислота. Цель работы – установить наличие/отсутствие влияния полифенолов, выделенных из экстрактов каллусных культур *T. pratense* L. на экспрессию генов *SOD-3* и *HSP-16.2* и антиамилоидной активности с помощью модельных организмов – нематод *Caenorhabditis elegans*.

Объектами исследования являлись хлорогеновая кислота и биоханин А (200, 100, 50 и 10 мкМ) чистотой 95 %, которые выделили из экстрактов каллусов клевера лугового. Влияние полифенолов на экспрессию *SOD-3* и *HSP-16.2* оценивали при тепловом стрессе (35 °С) в течение 5 и 2 ч соответственно, используя *C. elegans* N2 Bristol. Нейропротекторную активность оценивали по количеству парализованных *C. elegans* CL4176 после 18, 40 и 62 ч инкубации.

Установлено, что дозависимый эффект между концентрацией биологически активных веществ и процентом парализованных нематод наблюдался при 18 ч культивирования. Максимальные результаты уменьшения фенотипа парализации наблюдались при добавлении растворов концентрацией 200 мкМ. Активность 200 мкМ биоханина А была в 1,18 раз выше 200 мкМ раствора хлорогеновой кислоты. Растворы биоханина А увеличивали экспрессию *SOD-3* только в 3,7 раз в сравнении с контролем.

Полученные результаты показали, что исследуемые биологически активные вещества проявляли относительную нейропротекторную активность и способность влиять на экспрессию гена антиоксидантной защиты организма, используя модельный объект *C. elegans*.

Ключевые слова. Старение, болезнь Альцгеймера, нейропротекторы, полифенолы, хлорогеновая кислота, биоханин А, *Caenorhabditis elegans*, β -амилоидный пептид

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Полифенолы растений СФО: оценка молекулярной и пространственной структуры веществ, характеристика биофункциональных свойств и токсикологических показателей безопасности на модельных системах *in vivo*» (проект FZSR-2023-0002) с использованием оборудования ЦКП «Инструментальные методы анализа в области прикладной биотехнологии» на базе Кемеровского государственного университета (КемГУ)^{ROR}.

Для цитирования: Биофункциональная активность *in vivo* хлорогеновой кислоты и биоханина А, выделенных из экстрактов каллусной культуры *Trifolium pratense* L. / И. С. Милентьева [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2023. Т. 53. № 4. С. 754–765. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-4-2475>

Chlorogenic Acid and Biochanin A from *Trifolium pratense* L. Callus Culture Extract: Functional Activity *In Vivo*



Irina S. Milentyeva^{ID}, Anna D. Vesnina^{*ID}, Anastasiya M. Fedorova^{ID},
Elena V. Ostapova^{ID}, Timothy A. Larichev^{ID}

Kemerovo State University^{ROR}, Kemerovo, Russia

Received: 02.05.2023
Revised: 27.06.2023
Accepted: 04.07.2023

*Anna D. Vesnina: koledockop1@mail.ru,
<https://orcid.org/0000-0002-4552-7418>
Irina S. Milentyeva: <https://orcid.org/0000-0002-3536-562X>
Anastasiya M. Fedorova: <https://orcid.org/0000-0002-8071-4411>
Elena V. Ostapova: <https://orcid.org/0000-0002-4704-484X>
Timothy A. Larichev: <https://orcid.org/0000-0003-0166-2527>

© I.S. Milentyeva, A.D. Vesnina, A.M. Fedorova,
E.V. Ostapova, T.A. Larichev, 2023



Abstract.

Polyphenols are potential neuroprotectors that increase lifespan and slow down aging. Red clover (*Trifolium pratense* L.) is a promising source of biologically active substances. Its extracts contain biochanin A and chlorogenic acid. This research used *Caenorhabditis elegans* to study the effect of polyphenols extracted from red clover callus cultures on *SOD-3* and *HSP-16.2* genes, as well as their anti-amyloid potential.

The chlorogenic acid and biochanin A (200, 100, 50, and 10 μ M) with a purity of 95% were isolated from callus extracts of *T. pratense* L. The effect of polyphenols on *SOD-3* and *HSP-16.2* was assessed after 5 and 2 h of heat stress (35°C), respectively, using *C. elegans* N2 Bristol as model organism. The neuroprotective potential was measured by counting paralyzed nematodes after 18, 40, and 62 h of incubation.

The research established a dose-dependent effect between the concentration of biologically active substances and the percentage of paralyzed nematodes after 18 h of cultivation. The lowest paralysis phenotype count occurred at a concentration of 200 μ M. The activity of 200 μ M biochanin A was 1.18 times as high as that of a 200 μ M chlorogenic acid solution. Biochanin A solutions increased *SOD-3* expression by 3.7 times, compared to the control.

The biologically active substances exhibited relative neuroprotective activity and affected the expression of antioxidant defense gene in *C. elegans*.

Keywords. Aging, Alzheimer's disease, neuroprotectors, polyphenols, chlorogenic acid, biochanin A, *Caenorhabditis elegans*, β -amyloid peptide

Funding. The research was part state task FZSR-2023-0002 “Polyphenols from Siberian Federal District plants: assessment of molecular and spatial structure, characterization of biofunctional properties, and toxicological safety indicators using *in vivo* model systems”. It involved the Shared Use Center for Instrumental Analysis in Applied Biotechnology, Kemerovo State University (KemSU)^{ROR}.

For citation: Milentyeva IS, Vesnina AD, Fedorova AM, Ostapova EV, Larichev TA. Chlorogenic Acid and Biochanin A from *Trifolium pratense* L. Callus Culture Extract: Functional Activity *In Vivo*. Food Processing: Techniques and Technology. 2023;53(4):754–765. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-4-2475>

Введение

Старение – это биологический, неизбежно возникающий и закономерный процесс снижения биологической функции организма. В результате данного процесса организм становится более восприимчивым к негативным внешним и внутренним факторам окружающей среды [1]. Старение сопровождается развитием хронических заболеваний: диабета 2 типа, онкологии, артрита, почечной дисфункции и т. п.

Особую роль играют когнитивные нарушения – нейродегенеративные заболевания (например, болезнь Альцгеймера) [2, 3].

Болезнь Альцгеймера – это многофакторное заболевание, которое характеризуется ухудшением интеллектуальных способностей организма (снижением памяти, мышления, обучения и понимания, дезориентацией, нарушением самообслуживания, изменением личности и т. п.). Данное заболевание

сопровождается накоплением белковых отложений (бета-амилоидов – $A\beta$) в виде амилоидных бляшек в головном мозге, постоянным окислительным стрессом, воспалительными процессами и т. д. [4, 5]. Система антиоксидантных ферментов является первой линией защиты организма от активных форм кислорода и окислительного стресса. Следовательно, активность ферментов антиоксидантной защиты, например, супероксиддисмутазы (SOD), является важной мишенью для профилактики болезни Альцгеймера [6].

Развитие хронических заболеваний в любом возрасте зависит как от генетических особенностей, так и от образа жизни, в частности питания. Питание как модифицируемый фактор окружающей среды и источник биологически активных веществ (БАВ) способно влиять на состояние организма потребителя. Употребление продуктов питания, содержащих ряд БАВ, способно предотвращать и замедлять развитие хронических заболеваний у людей пожилого и старческого возрастов [1, 7, 8]. Питание (диеты) способно влиять на здоровье потребителя, модулируя нейровоспалительные процессы, которые участвуют в патогенезе болезни Альцгеймера [9]. К нейропротекторным диетам относят средиземноморскую диету и DASH-диету (диетические подходы к остановке гипертензии), способные влиять на когнитивные процессы обусловлена содержанием в рационе полиненасыщенных жирных кислот, витаминов и полифенолов (рис. 1) [1, 10, 11].

Среди потенциальных нейропротекторов, которые увеличивают продолжительность жизни и замедляют старение, особый интерес представляют полифенолы. Полифенолы – это класс органических соединений, являющихся вторичными метаболитами высших растений, которые проявляют противо-

воспалительные, антиоксидантные, антимикробные и другие биологически активные свойства [6, 12]. Куркумин, ресвератрол, апигенин, байкалин, кемпферол, любеолин, эпикатехин, мирицетин, кверцетин, хлорогеновая кислота и прочие природные полифенолы проявляют антиоксидантное и нейропротекторное действие за счет ингибирования выработки $A\beta$, влияя на активность секретируемых ферментов, и/или ингибирования самосборки $A\beta$ в фибриллы [6, 13]. В исследовании L. Xin и др. установлено наличие ингибирующего действие на $A\beta$ метаболитов *Lycoris radiata* [14]. Y. Wu с соавторами доказали, что экстракт листьев *Ginkgo biloba* ингибирует паралич, вызванный $A\beta$ [15]. Следовательно, растения являются перспективным сырьем для извлечения веществ-кандидатов в нейропротекторы.

Среди растений одним из перспективных источников БАВ является клевер луговой (*Trifolium pratense* L.) [16]. Среди метаболитов, преобладающих в экстрактах данного растения, выделяют биоханин А и хлорогеновую кислоту [17, 18].

Хлорогеновая кислота – это полифенол растительного происхождения, который проявляет антиоксидантные, антибактериальные, антигистаминные, противовоспалительные, обезболивающие, гепатопротекторные, противораковые и нейропротекторные свойства. Это позволяет отнести кислоту к перспективным кандидатам в нейропротекторы [19–22]. В научной литературе представлена информация о том, что хлорогеновая кислота используется для борьбы с болезнями Альцгеймера и Паркинсона [23]. Работы S. F. Nabavi с соавторами и S. S. Singh с соавторами подтверждают наличие нейропротекторной активности (на моделях *in vitro* и *in vivo*) хлорогеновой кислоты [24, 25]. Молекулярные механизмы



Рисунок 1. Принцип биологической активности основных веществ-нейропротекторов

Figure 1. Biological activity of neuroprotective substances

нейропротекторного действия *T. pratense* L. сложны, но обусловлены антиоксидантной и противовоспалительной активностями хлорогеновой кислоты. В работе А. Amato и др. говорится о том, что хлорогеновая кислота способна защищать нейроны от апоптоза и ингибировать агрегацию Аβ [26].

Биоханин А (5,7-дигидроксид-4'-метокси-изофлавонол) представляет собой О-метилованный изофлавонол, который проявляет антиоксидантную, противовоспалительную, эстрогеноподобную и глюкозо-липидную модулирующую активности, а также профилактические и нейропротекторные эффекты [27]. В работе J. W. Tan и M. K. Kim представлены данные, которые доказывают наличие нейропротекторной активности биоханина А: способность к ингибированию Аβ и апоптоза (*in vitro* на клеточных моделях) [27]. В работе S. M. Biradar и др. представлены результаты, которые подтверждают наличие нейропротекторных свойств биоханина А, способного улучшать память у молодых и старых мышей [28]. В работе K. Youn и др. показано, что биоханин А ингибирует активность белка, предшествующего в образовании Аβ *in vitro* [29].

Цель работы – установить биофункциональное воздействие полифенолов (биоханина А и хлорогеновой кислоты), выделенных из экстрактов каллусных культур *T. pratense* L., на экспрессию генов *SOD-3* и *HSP-16.2* и антиамилоидной активности с помощью модельных организмов *Caenorhabditis elegans*.

В качестве модельных организмов выбраны нематоды *C. elegans*, которые обладают преимуществами в сравнении с другими модельными организмами: полностью секвенированный геном, в котором обнаружена генетическая основа старения; схожие с человеком изменения в поведении и физиологических показателях здоровья (стрессоустойчивость, дегенерация нервной системы, изменения в структуре мышечной ткани); небольшой размер (около 1 мм в длину для взрослых особей) и прозрачное тело; простота культивирования и размножения (большое производство потомства – около 300 особей за счет самооплодотворения); короткий жизненный цикл (около 21 дня для дикого типа) [30–33]. Данные модельные объекты используются в исследованиях, связанных с ожирением, старением и нейродегенеративными заболеваниями (например, болезнь Альцгеймера) [34].

Для изучения болезни Альцгеймера сконструированы трансгенные модели *C. elegans*, в которых экспрессируется белок Аβ человека в мышечных тканях либо нейронах [12, 34]. Примерами трансгенных штаммов, экспрессирующих Аβ, являются CL4176 и GMC101, которые вырабатывают Аβ в мышцах стенки тела при изменении (повышении) температуры с 15 до 25 °С. В результате этого происходит парализация, приводящая к болезни Альцгеймера. То есть антиамилоидная активность (или нейропротекторная активность) при использовании данных трансгенных штаммов выражается в отсутствии

или снижении числа парализованных нематод при их культивировании с повышением температуры до 25 °С [35–37]. В процессе старения экспрессия генов у *C. elegans* изменяется [38, 39]. У старых особей происходит снижение уровня мРНК генов, отвечающих за белки теплового шока (sHSP), и антиоксидантных ферментов (например, супероксиддисмутазы) [40]. Установлено, что сверхэкспрессия шаперонного белка *HSP-16.2* у нематод приводит к ингибированию токсичности Аβ человека [34].

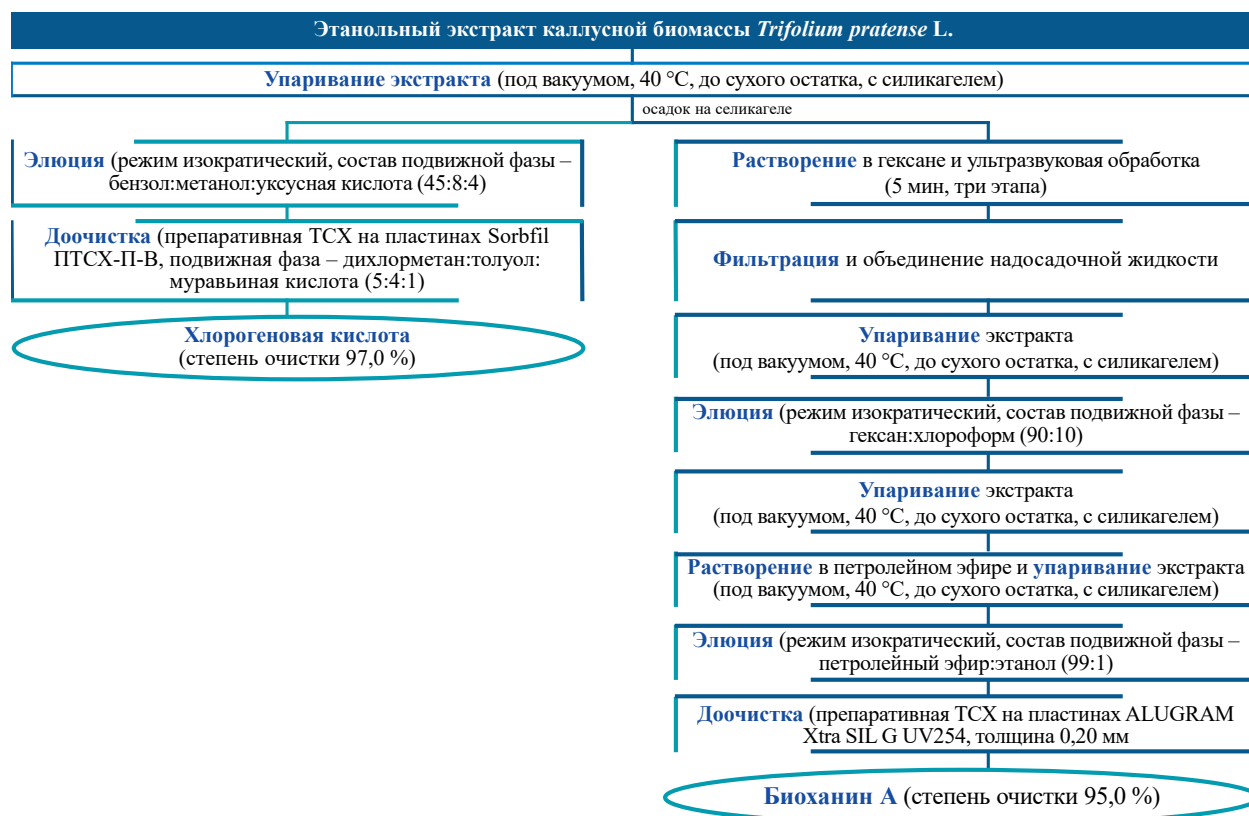
Каллусная культура в данном исследовании выбрана в качестве сырья для извлечения БАВ, т. к. биотехнологические методы культивирования *in vitro* позволяют получать богатое растительное сырье, независимо от климатических и сезонных условий, не изымая биообъект из сферы его обитания [41].

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись хлорогеновая кислота и биоханин А, выделенные из экстрактов каллусной культуры *Trifolium pratense* L. Подробно этапы получения каллусной культуры и экстрактов представлены в работе L. S. Dyshlyuk и др. [42]. Каллусы получены из поврежденных в стерильных условиях проростков (семена приобретены в коллекции Е. К. Сироткина, Россия), выращенных на агаризованной питательной среде Гамборга, модифицированной кинетином (2,00 мг/л), 6-БАП (0,10 мг/л), ИУК (2,00 мг/л) и 2,4-Д (2,00 мг/л) [43]. Экстракты каллусных культур получили при 6 ч экстракции с использованием обратного холодильника и водяной бани при 70,00 ± 5,00 °С; экстрагентом являлся 70,00 % водно-этанольный раствор.

Выделение хлорогеновой кислоты и биоханина А из экстракта каллусной культуры клевера лугового (*T. pratense* L.) описано в работе Е. R. Faskhutdinova с соавторами и G. R. Malca-Garcia с соавторами [44, 45]. Схема выделения представлена на рисунке 2. Степень очистки хлорогеновой кислоты и биоханина А составляла не менее 95,00 %.

Для оценки биологической активности целевых веществ использовали модельные организмы – дикий штамм *Caenorhabditis elegans* N2 Bristol (для изучения уровня экспрессии *SOD-3* и *HSP-16.2*) и трансгенный *C. elegans* CL4176 (dvIs27[myo-3p::Aβ(1-42)::let-851 3'UTR]+rol-6(su1006)] (для изучения болезни Альцгеймера). Модельные организмы предоставлены лабораторией разработки инновационных лекарственных средств и агробиотехнологий Московского физико-технического института (национальный исследовательский университет) (Долгопрудный, Россия) [46]. Для получения растворов БАВ различной концентрации готовили стоковые растворы в диметилсульфоксиде концентрацией 10 ммоль/л. Затем из стоков получали рабочие растворы с концентрациями 200, 100, 50 и 10 мкМ, добавляя дистиллированную воду.

Рисунок 2. Схема выделения целевых веществ из экстракта каллусной культуры *Trifolium pratense* L.Figure 2. Isolating target substances from *Trifolium pratense* L. callus extract

Протокол по выращиванию *C. elegans* CL4176 и исследования нейротекторной активности взят из работы V. Dostal и C. D. Link [47]. На начальных этапах осуществляли синхронизацию поколения родителей: помещали 20–30 беременных особей на чашки с агаризованной средой NGM (чашки Петри 60 мм), покрытой *Escherichia coli* OP50. Особей выдерживали в течение 2 ч при 16 °С (допустимая температура для CL4176), затем удаляли беременных взрослых особей, оставляя их потомство расти в течение 7 дней (до их взрослой и беременной стадии). Затем данных особей использовали для получения тестовых популяций: перемещали 10–12 беременных взрослых особей на NGM, покрытой *E. coli* OP50, и выдерживали их в течение 2 ч при 16 °С для кладки яиц. Затем взрослых особей удаляли и использовали в эксперименте их потомство (яйца).

Проведение эксперимента: за один день до начала анализа приготовили среды NGM с *E. coli* OP50 и с добавлением исследуемых растворов БАВ различной концентрации. Через 48 ч после окончания синхронизации кладки яиц (особи находятся на личиночной стадии – L3) повышали температуру чашек до 25 °С. Через 18–20 ч особи достигают стадии L4 и начинается подсчет количества парализованных нематод. Подсчет парализованных нематод осуществ-

лялся на 18, 40 и 62 ч культивирования для того, чтобы оценить продолжительность защиты парализованных особей от нейротоксичного действия Аβ после обработки БАВ. Продолжительность культивирования в 62 ч взята из работы E. R. Faskhutdinova и др., в которой в течение данного времени оценивали продолжительность жизни нематод [44]. Парализованными считаются нематоды, которые потеряли способность поступательно перемещаться в пространстве с характерной зигзагообразной подвижностью. Наблюдения за нематодами осуществляли с помощью микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss AG, Германия).

Контрольные образцы – нематоды, культивируемые в представленных выше условиях, но без добавления растворов БАВ различной концентрации.

Штамм *E. coli* OP50, который использовался в качестве пищи для нематод, предоставлен институтом молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН (Москва, Россия). Для получения стартовой культуры штамма *E. coli* OP50 одну колонию выращивали в 5 мл среды LB в течение ночи ($12,0 \pm 0,5$ ч) при 37 °С при интенсивном перемешивании.

Состав сред NGM, S-среды и LB представлен в работе [48].

Протокол по выращиванию *C. elegans* N2 Bristol представлен в работе R. R. Sonani и др. [49]. На

начальных этапах получали синхронизированные личинки по возрасту: 5–10 беременных взрослых особей перемещали на агаризованную среду NGM (чашки Петри 60 мм), покрытую *E. coli* OP50. Особям давали откладывать яйца в течение 3 ч при температуре 20 °С с последующим удалением взрослых особей. Чашки с изолированными яйцами обрабатывали водным раствором NaClO (соотношение соль:вода 1:5) для разрушения кутикулы червей. Через 12–14 ч из изолированных яиц вылупляются личинки L1.

Для анализа экспрессии гена *SOD-3* в каждую ячейку 24-луночного планшета вносили 900 мкл суспензии нематод стадии L1 (находящихся в S-среде), смешанную с *E. coli* OP50, и по 100 мкл каждого из тестируемых БАВ различной концентрации. Планшет заклеивали пленкой и оставляли на 72 ч при температуре 20 °С до достижения нематодами стадии развития L4. Затем планшет помещали в термостат (камера KBF-S ECO Solid.Line (Binder GmbH, Германия)) на 35 °С в течение 5 ч (создание теплового стресса) [50].

Для анализа экспрессии гена *HSP-16.2* в каждую ячейку 24-луночного планшета вносили по 900 мкл суспензии нематод стадии L1 (находящихся в S-среде), смешанную с *E. coli* OP50. Планшет заклеивали пленкой и инкубировали 48 ч при температуре 20 °С до достижения нематодами стадии L4. По истечении 48 ч планшет помещали в инкубатор при 35 °С на 2 ч (создание теплового стресса). По истечении 2 ч планшет охлаждали до 20 °С и в лунки добавляли 100 мкл исследуемых БАВ различной концентрации. Затем продолжили инкубацию нематод в течение 5 дней при 20 °С.

Эксперимент проводили с 2-кратным повтором для каждого экстракта с таким расчетом, чтобы получить не менее 1000 нематод для каждого тестируемого условия. По истечении 5 и 20 ч для объектов, отобранных на исследование экспрессии *SOD-3* и *HSP-16.2* соответственно, нематоды переносили в пробирку типа Эппендорф, которую подвергали центрифугированию при 1000 g в течение 2 мин.

В соответствии с инструкциями производителей мы выделяли РНК из осадка нематод с использованием набора ExtractRNA (BC032, ЗАО «Евроген», Москва); определяли количество РНК, выделенной из нематод, на приборе Nanodrop 2000C (Thermo Scientific, США); проводили синтез первой цепи кДНК с использованием набора реактивов MMLV RT kit (SK021, ЗАО «Евроген», Москва). Амплификацию РНК проводили на приборе CFX96 RealTime System («Bio-Rad Laboratories», США) на основе одноэтапного подхода с использованием реакционной смеси 5X qPCRmix-HS SYBR (PK147S, ЗАО «Евроген», Москва), предназначенной для ПЦР в режиме реального времени с интеркалирующим красителем SYBER Green I. Определение уровня экспрессии генов *SOD-3* и *HSP-16.2* в нематодах, обработанных хлорогеновой

кислотой и биоханином А, проводили в сравнении с экспрессией этих генов в контрольных образцах. Количественные значения экспрессии генов нормализовали по отношению к уровню экспрессии референтных генов *AMA* или *ACT*, которые определяли в тех же условиях амплификации в режиме реального времени и с тем же количеством тестируемой кДНК.

Относительную экспрессию генов (*RE*) рассчитывали по уравнению (1) по методу Дельта-Дельта [51]

$$RE = E^{-\Delta\Delta Ct} \quad (1)$$

где *E* – эффективность амплификации (равна 2,0).

Нормализация по среднему референсных генов представлена в уравнении (2)

$$\Delta C(t) = C(t)_{\text{target}} - C(t)_{\text{reference}} \quad (2)$$

где $C(t)_{\text{reference}}$ – среднее геометрическое $C(t)$ референсных генов (для мРНК); $C(t)_{\text{target}} - C(t)$ генов-мишеней.

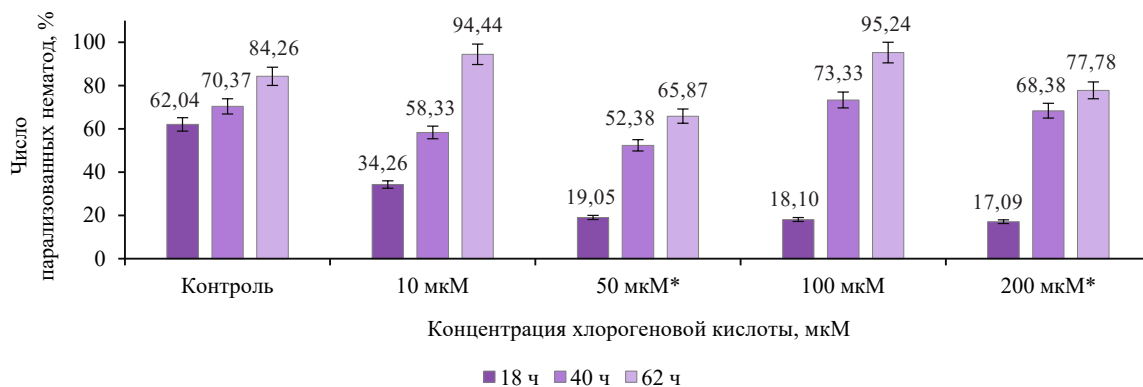
Более подробно расчет *RE* представлен в работах [51, 52].

Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Результаты выражали в виде среднего значения ± стандартное отклонение. В таблицах и рисунках представлены значения с «*» – это значения, отличающиеся от других ($p < 0,05$). Для обработки данных по оценке нейротекторной активности использовали график выживания Каплана – Мейера в сочетании с критерием логарифмического ранга (Мантела – Кокса). Оценку осуществляли с помощью онлайн-приложения OASIS (<https://sbi.postech.ac.kr/oasis2>). Для обработки данных по влиянию БАВ на экспрессию *SOD-3* и *HSP-16.2* использовали оценку по *post hoc* критерию Тьюки. Для анализа использовали программу Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., США).

Результаты и их обсуждения

Влияние растворов хлорогеновой кислоты и биоханина А, выделенных из экстракта каллусной культуры клевера лугового *Trifolium pratense* L., различной концентрации на парализацию нематод *Caenorhabditis elegans* CL4176 представлено на рисунках 3 и 4.

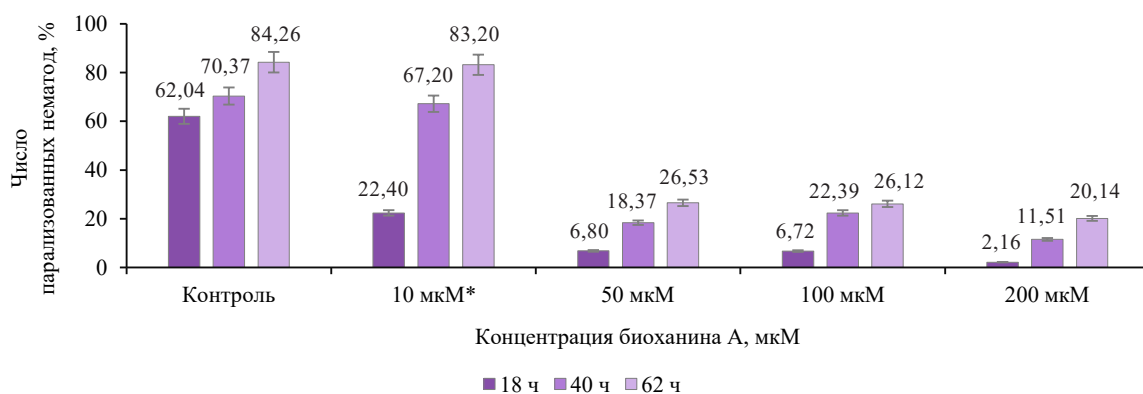
На 18 ч культивирования все растворы БАВ с добавлением растворов хлорогеновой кислоты снижали количество парализованных особей. Нейротекторная активность растворов зависела от концентрации раствора, т. е. наблюдался дозозависимый эффект: с уменьшением концентрации увеличивалось число парализованных нематод. Соответственно, при добавлении раствора концентрацией 200 мкМ процент парализованных особей был ниже в 3,63 %, чем у контроля. На 40 и 62 ч культивирования дозозависимого эффекта не наблюдалось: наименьший процент парализованных особей достигался при добавлении 50 мкМ раствора хлорогеновой кислоты.



«*» – достоверные различия с помощью логарифмического рангового критерия ($p < 0,05$)

Рисунок 3. Процент парализованных *Caenorhabditis elegans* CL4176, культивируемых при 25 °C и добавлении растворов хлорогеновой кислоты различной концентрации

Figure 3. Paralyzed *Caenorhabditis elegans* CL4176 at 25°C in different chlorogenic acid concentrations



«*» – достоверные различия с помощью логарифмического рангового критерия ($p < 0,05$)

Рисунок 4. Процент парализованных *Caenorhabditis elegans* CL4176, культивируемых при 25 °C и добавлении растворов биоханина А различной концентрации

Figure 4. Paralyzed *Caenorhabditis elegans* CL4176 at 25°C in different biochanin A concentrations

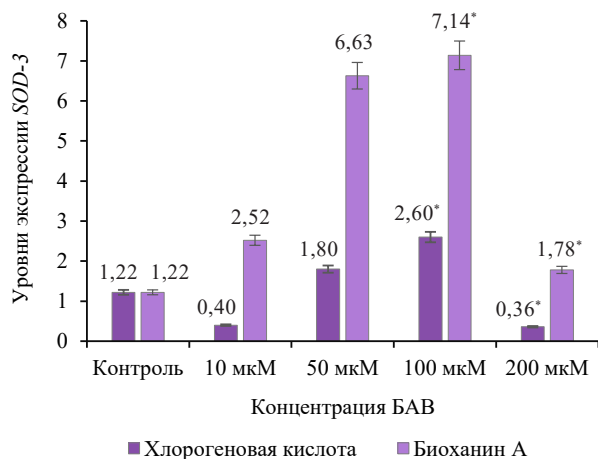
При добавлении растворов биоханина А доза-зависимый эффект наблюдался на 18 ч культивирования: процент парализованных нематод был в 3,03 раза ниже в сравнении с контролем. Также доза-зависимый эффект наблюдался на 62 ч культивирования, но различия между добавлением 50 и 100 мкМ раствора незначительны. Нейропротекторная активность на 18 ч была максимальна при добавлении 200 мкМ раствора биоханина А (процент парализованных нематод был ниже на 59,88 % в сравнении с контролем).

При оценке динамики парализации нематод в течение 62 ч установлено, что наличие растворов хлорогеновой кислоты и биоханина А различной концентрации не способствовало уменьшению числа парализованных особей.

При сравнении влияния растворов БАВ на 18 ч культивирования установили, что растворы биоханина А проявляли в 1,16 раз большую нейропротекторную активность, чем растворы с хлорогеновой кислотой. Фенотип парализации максимально уменьшался при использовании 200 мкМ раствора биоханина А (процент непарализованных нематод был в 1,18 раз выше, чем при влиянии 200 мкМ раствора хлорогеновой кислоты).

Отсутствие значительных изменений влияния растворов БАВ с 40 до 62 ч связано с нецелесообразностью культивирования *C. elegans* CL4176 в течение 62 ч. В ряде работ влияние БАВ на парализацию оценивают в течение 30–40 ч с интервалом в 2 ч [47, 53, 54].

Результаты оценки влияния растворов хлорогеновой кислоты и биоханина А на уровни экспрессии гена *SOD-3* в нематодах представлены на рисунке 5 и выражены в относительных единицах уровня экспрессии целевых генов *SOD-3* и *HSP-16.2* в испытуемых образцах.



Примечание. Значения для растворов хлорогеновой кислоты концентраций 10–100 мкМ представлены в 10^{-1} («*») – значения отличаются от других ($p < 0,05$), оценка по *post hoc* критерию Тьюки)

Рисунок 5. Влияние растворов БАВ на экспрессию *SOD-3* у *Caenorhabditis elegans* N2 Bristol

Figure 5. Effect of biologically active substances on *SOD-3* in *Caenorhabditis elegans* N2 Bristol

Результаты анализа экспрессии гена *SOD-3* у *C. elegans* N2 Bristol на тепловой стресс показали, что наличие хлорогеновой кислоты в концентрациях 10 и 200 мкМ не привело к значительному увеличению экспрессии гена в сравнении с контролем. Добавление БАВ в концентрации 50 и 100 мкМ приводило к увеличению экспрессии гена в среднем в 1,8 раз.

По сравнению с контролем наличие биоханина А увеличивало экспрессию *SOD-3* в среднем в 3,7 раз. Дозазависимый эффект наблюдался при добавлении биоханина А концентраций от 10 до 100 мкМ. При добавлении 100 мкМ раствора уровень экспрессии был выше в 5,85 раз.

Результаты оценки влияния растворов хлорогеновой кислоты и биоханина А различной концентрации на уровни экспрессии гена *HSP-16.2* в нематодах представлены на рисунке 6.

Результаты анализа экспрессии гена *HSP-16.2* у *C. elegans* N2 Bristol на тепловой стресс показали, что добавление хлорогеновой кислоты в процессе культивирования не привело к увеличению экспрессии *HSP-16.2* в сравнении с контролем. Исключение составила хлорогеновая кислота концентрацией 200 мкМ, добавление которой вызвало незначительное увеличение уровня экспрессии гена в 1,48 раз. Наличие биоханина А не привело к увеличению экспрессии гена. Исключение составил раствор биоханина А концентрацией 10 мкМ, добавление которого увеличило уровень экспрессии гена в 1,58 раз.

Положительное влияния на парализацию нематод с одновременным отсутствием влияния на экспрессию *HSP-16.2* возможно, т. к. в ответе на стрессовые условия, помимо HSP, принимают участие другие гены

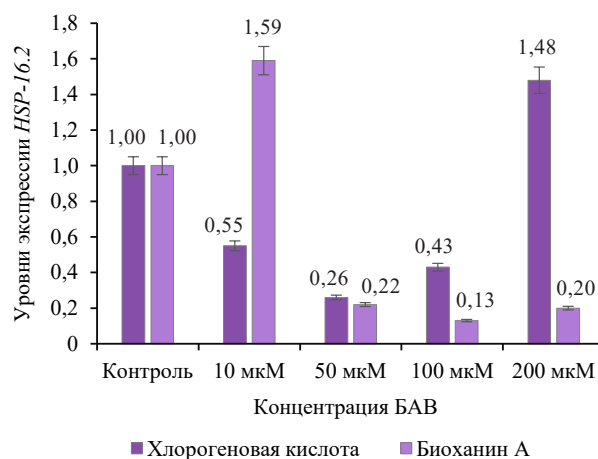


Рисунок 6. Влияние растворов БАВ различной концентрации на экспрессию гена *HSP-16.2* у *Caenorhabditis elegans* N2 Bristol

Figure 6. Effect of biologically active substances on *HSP-16.2* in *Caenorhabditis elegans* N2 Bristol

стрессоустойчивости – *HSF-1*, *DAF-16* и т. д. [55]. В ходе данного исследования выбран не тот маркер (целевой ген, влияющий на белки теплового шока).

В ходе проведенного авторами обзора научной литературы установлено отсутствие публикаций, в которых осуществлялись исследования по оценке наличия/отсутствия у биоханина А и хлорогеновой кислоты нейропротекторной активности на модельных объектах *C. elegans*. Однако имеется исследование, направленное на изучение влияния кофейной кислоты (хлорогеновая кислота является производной данного соединения) на стрессоустойчивость и экспрессию ряда генов, в частности *SOD-3* у *C. elegans* [55]. В данном исследовании установлено, что кофейная кислота (200 мкМ) положительно влияет на выживаемость нематод в условиях стресса, а также способна увеличивать экспрессию *SOD-3*.

В ходе литературного обзора установлено, что биоханин А является перспективным веществом с высокой антиоксидантной защитой клеток за счет регуляции экспрессии генов, участвующих в антиоксидантной защите организма. Например, *SOD-3*. В исследовании В. Haridevamuthu и др. доказано, что биоханин А способен восстанавливать антиоксидантную защиту в модельном объекте – *Danio rerio* [56]. В исследовании Y. Zhou и др. показано, что биоханин А способен повышать активность внутриклеточных антиоксидантных ферментов, в том числе *SOD-3* у крыс [57]. Однако нейропротекторное действие данного вещества до сих пор не установлено. Предположительно наличие нейропротекторной активности за счет снижения уровня оксидантов и медиаторов воспаления [58].

Несмотря на то что в данном исследовании часть растворов хлорогеновой кислоты проявляла способность влиять на экспрессию генов и сокращать число парализованных нематод, в научной литературе представлены данные, которые подтверждают нейропротекторную активность данного вещества. В обзорном исследовании K. Socała и др. представлены данные, которые доказывают способность хлорогеновой кислоты повышать активность *SOD-3*, уменьшать окислительный стресс и нейровоспаление, проявлять антиамилоидогенное действие и ингибировать активность фермента ацетилхолинэстеразы, участвующего в развитии болезни Альцгеймера на грызунах [59].

Выводы

В связи с увеличением количества людей пожилого возраста, страдающих от болезни Альцгеймера, эффективными являются направления по поиску новых или совершенствованию существующих лекарств, профилактических средств и т. п. Правильно подобранная диета (дополнительный систематический прием биологически активных добавок и функциональных продуктов на их основе) является эффективным средством профилактики социально значимых заболеваний, в частности болезни Альцгеймера.

В данной работе изучали нейропротекторную активность (ингибирующее действие $A\beta$, влияние на экспрессию ряда генов) метаболитов каллусной культуры клевера лугового *Trifolium pratense* L. (хлорогеновой кислоты и биоханина А) на модельных объектах *Caenorhabditis elegans* с перспективой их дальнейшего использования в качестве функциональных пищевых ингредиентов профилактической направленности.

Для всех исследуемых растворов биоханина А и хлорогеновой кислоты установлено, что с увеличением продолжительности культивирования повышается количество парализованных нематод, т. е. уменьшается защита от парализации. Все объекты исследования в концентрации 200 мкМ ингибиро-

вали активность $A\beta$, влияя на паралич *C. elegans* CL4176, культивируемых в течение 18 ч при повышении температуры до 25 °С. Однако биоханин А проявлял высокую активность по ингибированию паралича в сравнение с хлорогеновой кислотой. Результаты по оценке влияния растворов БАВ на экспрессию *SOD-3* у *C. elegans* N2 Bristol показали, что биоханин А проявил более выраженное воздействие на экспрессию в ответ на температурный стресс. Следовательно, по данным *in vivo* целевые БАВ, выделенные из экстрактов каллусной культуры клевера лугового, можно использовать в качестве потенциальных нейропротекторов. Например, в виде биологически активных или пищевых добавок.

Перспективными являются исследования, направленные на оценку наличия/отсутствия влияния смесей данных БАВ в различном соотношении на наличие нейропротекторного воздействия на нематоды, с использованием дополнительных маркеров риска развития болезни Альцгеймера. Например, генов *DAF-16*, *DAF-18*, *SKN-1*, *CTL-1*, *HSF-1* и *SIR-2.1*.

Критерии авторства

Все авторы внесли равный вклад в создание исследования, обработку и анализ полученных результатов, а также в оформлении статьи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

All authors equally contributed to the research development, processing, data analysis, and the manuscript design.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

References/Список литературы

1. Abate G, Marziano M, Rungratanawanich W, Memo M, Uberty D. Nutrition and AGE-ing: Focusing on Alzheimer's disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017;2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7039816>
2. Gonzalez-Freire M, Diaz-Ruiz A, Hauser D, Martinez-Romero J, Ferrucci L, Bernier M, et al. The road ahead for health and lifespan interventions. *Ageing Research Reviews*. 2020;59. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101037>
3. Bitto A, Wang AM, Bennett CF, Kaeblerlein M. Biochemical genetic pathways that modulate aging in multiple species. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2015;5. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025114>
4. Rusek M, Pluta R, Ułamek-Kozioł M, Czuczwar SJ. Ketogenic diet in Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(16). <https://doi.org/10.3390/ijms20163892>
5. Collins AE, Saleh TM, Kalisch BE. Naturally occurring antioxidant therapy in Alzheimer's disease. *Antioxidants*. 2022;11(2). <https://doi.org/10.3390/antiox11020213>
6. Wang Y, Wang K, Yan J, Zhou Q, Wang X. Recent progress in research on mechanisms of action of natural products against Alzheimer's disease: Dietary plant polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(22). <https://doi.org/10.3390/ijms232213886>

7. Prosekov AYu, Ostroumov LA. Innovation management biotechnology of starter cultures. Food Processing: Techniques and Technology. 2016;43(4):64–69. (In Russ.). [Просеков А. Ю., Остроумов Л. А. Инновационный менеджмент биотехнологий заквасочных культур // Техника и технология пищевых производств. 2016. Т. 43. № 4. С. 64–69.]. <https://www.elibrary.ru/XELELB>
8. Kharitonov DV, Kharitonova IV, Prosekov AYu. The concept of synbiotics and synbiotic dairy products development. Food Processing: Techniques and Technology. 2013;31(4):91–94. (In Russ.). [Харитонов Д. В., Харитонова И. В., Просеков А. Ю. Разработка концепции создания синбиотиков и синбиотических молочных продуктов // Техника и технология пищевых производств. 2013. Т. 31. № 4. С. 91–94.]. <https://www.elibrary.ru/RNIEON>
9. Vesnina A, Prosekov A, Atuchin V, Minina V, Ponasenko A. Tackling atherosclerosis via selected nutrition. International Journal of Molecular Sciences. 2022;23(15). <https://doi.org/10.3390/ijms23158233>
10. McGrattan AM, McGuinness B, McKinley MC, Kee F, Passmore P, Woodside JV, *et al.* Diet and inflammation in cognitive ageing and Alzheimer's disease. Current Nutrition Reports. 2019;8:53–65. <https://doi.org/10.1007/s13668-019-0271-4>
11. Hu N, Yu J-T, Tan L, Wang Y-L, Sun L, Tan L. Nutrition and the risk of Alzheimer's disease. BioMed Research International. 2013;2013. <https://doi.org/10.1155/2013/524820>
12. Shen N, Wang T, Gan Q, Liu S, Wang L, Jin B. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. Food Chemistry. 2022;383. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132531>
13. Dhakal S, Kushairi N, Phan CW, Adhikari B, Sabaratnam V, Macreadie I. Dietary polyphenols: A multifactorial strategy to target Alzheimer's disease. International Journal of Molecular Sciences. 2019;20(20). <https://doi.org/10.3390/ijms20205090>
14. Xin L, Yamujala R, Wang Y, Huan W, Wu W-H, Lawton MA, *et al.* Acetylcholinesterase-inhibiting alkaloids from *Lycoris radiata* delay paralysis of amyloid beta-expressing transgenic *C. elegans* CL4176. PloS ONE. 2013;8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063874>
15. Wu Y, Wu Z, Butko P, Christen Y, Lambert MP, Klein WL, *et al.* Amyloid-beta-induced pathological behaviors are suppressed by *Ginkgo biloba* extract EGb 761 and ginkgolides in transgenic *Caenorhabditis elegans*. Journal of Neuroscience. 2006;26(50):13102–13113. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3448-06.2006>
16. Nguyen TS, Alekseeva GM, Generalova YuE, Kaukhova IE, Sorokin VV. Determination of isoflavone content by HPLC in dried extract of *Trifolium pratense* L. Journal of Pharmaceuticals Quality Assurance Issue. 2020;27(1):48–53. (In Russ.). <https://doi.org/10.34907/JPQAI.2020.60.61.006>
17. Dyshlyuk LS, Osintseva MA, Kozlova OV, Fotina NV, Prosekov AYu. Antiradical and oxidative stress release properties of *Trifolium pratense* L. extract. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences. 2022;10(4):852–860. [https://doi.org/10.18006/2022.10\(4\).852.860](https://doi.org/10.18006/2022.10(4).852.860)
18. Temerdashev ZA, Chubukina TK, Vinitskaya EA, Nagalevskii MV, Kiseleva NV. Assessment of the concentrations of isoflavonoids in red clover (*Trifolium pratense* L.) of the *Fabaceae* family using extraction by different methods. Journal of Analytical Chemistry. 2021;76(9):819–831. (In Russ.). <https://doi.org/10.31857/S0044450221090115>
19. Bijttebier S, van der Auwera A, Voorspoels S, Noten B, Hermans N, Pieters L, *et al.* A first step in the quest for the active constituents in *Filipendula ulmaria* (meadowsweet): Comprehensive phytochemical identification by liquid chromatography coupled to quadrupole-orbitrap mass spectrometry. Planta Medica. 2016;82(6):559–572. <https://doi.org/10.1055/s-0042-101943>
20. Kapil A, Koul IB, Suri OP. Antihepatotoxic effects of chlorogenic acid from *Anthocephalus cadamba*. Phytotherapy Research. 1995;9(3):189–193. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650090307>
21. Rashidi R, Rezaee R, Shakeri A, Wallace Hayes A, Karimi G. A review of the protective effects of chlorogenic acid against different chemicals. Journal of Food Biochemistry. 2022;46(9). <https://doi.org/10.1111/jfbc.14254>
22. Dmitrieva A, Vesnina A, Dyshlyuk L. Antioxidant and antimicrobial properties of squalene from *Symphytum officinale* and chlorogenic acid from *trifolium pratense*. AIP Conference Proceedings. 2022;2636(1). <https://doi.org/10.1063/5.0104513>
23. Ishida K, Yamamoto M, Misawa K, Nishimura H, Misawa K, Ota N, *et al.* Coffee polyphenols prevent cognitive dysfunction and suppress amyloid β plaques in APP/PS2 transgenic mouse. Neuroscience Research. 2020;154:35–44. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2019.05.001>
24. Nabavi SF, Tejada S, Setzer WN, Gortzi O, Sureda A, Braidy N, *et al.* Chlorogenic acid and mental diseases: From chemistry to medicine. Current Neuropharmacology. 2017;15(4):471–479. <https://doi.org/10.2174/1570159X14666160325120625>
25. Singh SS, Rai SN, Birla H, Zahra W, Kumar G, Gedda MR, *et al.* Effect of chlorogenic acid supplementation in MPTP-intoxicated mouse. Frontiers in Pharmacology. 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00757>
26. Amato A, Terzo S, Mulè F. Natural compounds as beneficial antioxidant agents in neurodegenerative disorders: A focus on Alzheimer's disease. Antioxidants. 2019;8(12). <https://doi.org/10.3390/antiox8120608>
27. Tan JW, Kim MK. Neuroprotective effects of biochanin A against β -amyloid-induced neurotoxicity in PC12 cells via a mitochondrial-dependent apoptosis pathway. Molecules. 2016;21(5). <https://doi.org/10.3390/molecules21050548>

28. Biradar SM, Joshi H, Chheda TK. Biochanin-A ameliorates behavioural and neurochemical derangements in cognitive-deficit mice for the betterment of Alzheimer's disease. *Human and Experimental Toxicology*. 2014;33(4):369–382. <https://doi.org/10.1177/0960327113497772>
29. Youn K, Park J-H, Lee J, Jeong W-S, Ho C-T, Jun M. The identification of biochanin A as a potent and selective β -site app-cleaving enzyme 1 (BACE1) inhibitor. *Nutrients*. 2016;8(10). <https://doi.org/10.3390/nu8100637>
30. Park H-EH, Jung Y, Lee S-JV. Survival assays using *Caenorhabditis elegans*. *Molecules and Cells*. 2017;40(2):90–99. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0017>
31. Amrit FRG, Ratnappan R, Keith SA, Ghazi A. The *C. elegans* lifespan assay toolkit. *Methods*. 2014;68(3):465–475. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.04.002>
32. Nigon VM, Félix M-A. History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms. *WormBook*. 2017. pp. 1–84. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.181.1>
33. Vesnina AD, Dolganyuk VF, Dmitrieva AI, Loseva AI, Milentyeva IS. Evaluation of the geroprotective effect of squalene on the *Caenorhabditis elegans* model. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*. 2022;14(6):51–69. (In Russ.). <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2022-14-6-51-69>
34. Shen P, Yue Y, Zheng Jo, Park Y. *Caenorhabditis elegans*: A convenient in vivo model for assessing the impact of food bioactive compounds on obesity, aging, and Alzheimer's disease. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2018;9:1–22. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012709>
35. Krishnan N, Konidaris KF, Gasser G, Tonks NK. A potent, selective, and orally bioavailable inhibitor of the protein-tyrosine phosphatase PTP1B improves insulin and leptin signaling in animal models. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;293(5):1517–1525. <https://doi.org/10.1074/jbc.C117.819110>
36. Zhu Z, Yang T, Zhang L, Liu L, Yin E, Zhang C, et al. Inhibiting A β toxicity in Alzheimer's disease by a pyridine amine derivative. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019;168:330–339. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.02.052>
37. Limbocker R, Chia S, Ruggeri FS, Perni M, Cascella R, Heller GT, et al. Trodusquemine enhances A β ₄₂ aggregation but suppresses its toxicity by displacing oligomers from cell membranes. *Nature Communications*. 2019;10. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07699-5>
38. Kato M, Chen X, Inukai S, Zhao H, Slack FJ. Age-associated changes in expression of small, noncoding RNAs, including microRNAs, in *C. elegans*. *RNA*. 2011;17:1804–1820. <https://doi.org/10.1261/rna.2714411>
39. Rangaraju S, Solis GM, Thompson RC, Gomez-Amaro RL, Kurian L, Encalada SE, et al. Suppression of transcriptional drift extends *C. elegans* lifespan by postponing the onset of mortality. *eLife*. 2015;4. <https://doi.org/10.7554/eLife.08833.001>
40. Gu J, Li Q, Liu J, Ye Z, Feng T, Wang G, et al. Ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Auricularia auricula* and effects of its acid hydrolysate on the biological function of *Caenorhabditis elegans*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;167:423–433. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.160>
41. Karpushina MV, Suprun II, Lobodina EV. Application of biotechnological methods in the nursery industry. *Fruit Growing and Viticulture of South Russia*. 2021;(71):116–130. (In Russ.). <https://doi.org/10.30679/2219-5335-2021-5-71-116-130>
42. Dyshlyuk LS, Fedorova AM, Loseva AI, Ereemeeva NI. Callus cultures of *Thymus vulgaris* and *Trifolium pratense* as a source of geroprotectors. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2021;51(2):423–432. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-2-423-432>
43. Gamborg OL, Miller RA, Ojima O. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*. 1968;50(1):151–158. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5)
44. Faskhutdinova ER, Sukhikh AS, Le VM, Minina VI, Khelef MEA, Loseva AI. Effects of bioactive substances isolated from Siberian medicinal plants on the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Foods and Raw Materials*. 2022;10(2):340–352. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2022-2-544>
45. Malca-Garcia GR, Liu Y, Nikolić D, Friesen JB, Lankin DC, McAlpine JB, et al. Investigation of red clover (*Trifolium pratense*) isoflavonoid residual complexity by off-line CCS-qHNMR. *Fitoterapia*. 2022;156. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2021.105016>
46. Drake J, Link CD, Butterfield DA. Oxidative stress precedes fibrillar deposition of Alzheimer's disease amyloid beta-peptide (1-42) in a transgenic *Caenorhabditis elegans* model. *Neurobiology of Aging*. 2003;24(3):415–420. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00225-7](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00225-7)
47. Dostal V, Link CD. Assaying β -amyloid toxicity using a transgenic *C. elegans* model. *Journal of Visualized Experiment*. 2010;44. <https://doi.org/10.3791/2252>
48. Fedorova AM, Dyshlyuk LS, Milentyeva IS, Loseva AI, Neverova OA, Khelef MEA. Geroprotective activity of trans-cinnamic acid isolated from the Baikal skullcap (*Scutellaria baicalensis*). *Food Processing: Techniques and Technology*. 2022;52(3):582–591. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-3-2388>
49. Sonani RR, Singh NK, Awasthi A, Prasad B, Kumar J, Madamwar D. Phycoerythrin extends life span and health span of *Caenorhabditis elegans*. *AGE*. 2014;36. <https://doi.org/10.1007/s11357-014-9717-1>

50. Leite NR, de Araújo LCA, da Rocha PS, Agarrayua DA, Ávila DS, Carollo CA, *et al.* Baru Pulp (*Dipteryx alata* Vogel): Fruit from the Brazilian savanna protects against oxidative stress and increases the life expectancy of *Caenorhabditis elegans* via SOD-3 and DAF-16. *Biomolecules*. 2020;10(8). <https://doi.org/10.3390/biom10081106>
51. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*. 2001;25(4):402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
52. Dimitriadi TA, Burtsev DV, Dzhenkova EA, Kutilin DS. Differential expression of microRNAs and their target genes in cervical intraepithelial neoplasias of varying severity. *Advances in Molecular Oncology*. 2020;7(2):47–61. (In Russ.). <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2020-7-2-47-61>
53. Martorell P, Llopis S, Gonzalez N, Ramón D, Serrano G, Torrens A, *et al.* A nutritional supplement containing lactoferrin stimulates the immune system, extends lifespan, and reduces amyloid β peptide toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Food Science and Nutrition*. 2016;5(2):255–265. <https://doi.org/10.1002/fsn3.388>
54. Qin Y, Chen F, Tang Z, Ren H, Wang Q, Shen N, *et al.* *Ligusticum chuanxiong* Hort as a medicinal and edible plant foods: Antioxidant, anti-aging and neuroprotective properties in *Caenorhabditis elegans*. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1049890>
55. Gutierrez-Zetina SM, González-Manzano S, Ayuda-Durán B, Santos-Buelga C, González-Paramás AM. Caffeic and dihydrocaffeic acids promote longevity and increase stress resistance in *Caenorhabditis elegans* by modulating expression of stress-related genes. *Molecules*. 2021;26(6). <https://doi.org/10.3390/molecules26061517>
56. Haridevamuthu B, Guru A, Murugan R, Sudhakaran G, Pachaiappan R, Almutairi MH, *et al.* Neuroprotective effect of Biochanin A against Bisphenol A-induced prenatal neurotoxicity in zebrafish by modulating oxidative stress and locomotory defects. *Neuroscience Letters*. 2022;790. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2022.136889>
57. Zhou Y, Xu B, Yu H, Zhao W, Song X, Liu Y, *et al.* Biochanin A attenuates ovariectomy-induced cognition deficit via antioxidant effects in female rats. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.603316>
58. Singh L, Kaur N, Bhatti R. Neuroprotective potential of biochanin-A and review of the molecular mechanisms involved. *Molecular Biology Reports*. 2023;50:5369–5378. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08397-2>
59. Socała K, Szopa A, Serefko A, Poleszak E, Wlaź P. Neuroprotective effects of coffee bioactive compounds: A review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(1). <https://doi.org/10.3390/ijms22010107>