

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-3-2530>
<https://elibrary.ru/KEDBNI>

Оригинальная статья
<https://fptt.ru>

Влияние биологически активных веществ на тепловой и окислительный стресс модельных объектов *Caenorhabditis elegans*



А. С. Фролова*^{ORCID}, И. С. Миленьева^{ORCID}, А. М. Федорова^{ORCID},
Е. С. Миллер^{ORCID}, С. А. Лузянин^{ORCID}

Кемеровский государственный университет^{ROR}, Кемерово, Россия

Поступила в редакцию: 26.06.2024
Принята после рецензирования: 14.08.2024
Принята к публикации: 03.09.2024

*А. С. Фролова: frolova.anna.s@mail.ru,
<https://orcid.org/0000-0003-3988-8521>
И. С. Миленьева: <https://orcid.org/0000-0002-3536-562X>
А. М. Федорова: <https://orcid.org/0000-0002-8071-4411>
Е. С. Миллер: <https://orcid.org/0000-0002-7538-8076>
С. А. Лузянин: <https://orcid.org/0000-0001-9293-4377>

© А. С. Фролова, И. С. Миленьева, А. М. Федорова, Е. С. Миллер,
С. А. Лузянин, 2024



Аннотация.

Большой проблемой современной медицины является предотвращение заболеваний, связанных со старением. Окислительный стресс организма приводит к развитию и прогрессированию различных заболеваний. Активные формы кислорода играют важную роль в осуществлении жизненно важных физиологических процессов. Повышенный уровень активных форм кислорода приводит к стрессу и патологии, но их пониженный уровень способствует нормальному физиологическому состоянию. Исследования адаптогенов растительного происхождения показали многообещающие результаты в отношении стрессоустойчивости и улучшения гомеостаза. С фармакологической точки зрения растительное сырье является подходящим источником химических соединений для лечения различных заболеваний, в том числе вызванных окислительным стрессом.

Объектами исследования являлись биологически активные вещества, выделенные из экстрактов каллусных, суспензионных и корневых культур лекарственных растений: байкалин и транс-коричная кислота из *Scutellaria baicalensis*; урсоловая кислота из *Thymus vulgaris*. Провели оценку нейропротекторной активности биологически активных веществ. Изучили их влияние на экспрессию SOD-3 и HSP-16.2, на накопление карбонилированных белков в организме *Caenorhabditis elegans*. Проанализировали накопление липофусцина в *C. elegans* в присутствии данных биологически активных веществ. Нейропротекторная активность всех исследованных биологически активных веществ падала с уменьшением их концентрации от 200 до 10 мкмоль/л. *C. elegans* в большей степени устойчивы к температурному стрессу после предварительной обработки биологически активными веществами. Нематоды более активно экспрессировали SOD-3, по сравнению с HSP-16.2, в ответ на температурный стресс. Биологически активные вещества продемонстрировали снижение уровня карбонилированных белков при концентрациях 100 мкмоль/л. Наибольшее влияние на снижение уровня карбонилирования белков оказала урсоловая кислота. Наиболее эффективным в ингибировании накопления липофусцина оказалась урсоловая кислота в диапазоне всех испытанных концентраций.

Результаты свидетельствуют о том, что изученные биологически активные вещества способствуют снижению окислительного и теплового стресса. Поэтому целесообразно дальнейшее изучение свойств данных биоактивных соединений для использования в адаптогенных препаратах.

Ключевые слова. Биологически активные вещества, растительное сырье, *Caenorhabditis elegans*, тепловой стресс, окислительный стресс, байкалин, транс-коричная кислота, урсоловая кислота

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Разработка биологически активных добавок, состоящих из метаболитов растительных объектов *in vitro*, для защиты населения от преждевременного старения» (проект FZSR-2024-0008) с использованием оборудования ЦКП «Инструментальные методы анализа в области прикладной биотехнологии» на базе КемГУ^{ROR}.

Для цитирования: Влияние биологически активных веществ на тепловой и окислительный стресс модельных объектов *Caenorhabditis elegans* / А. С. Фролова [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 3. С. 571–584. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-3-2530>

Effect of Biologically Active Substances on Thermal and Oxidative Stress in *Caenorhabditis elegans* Models



Anna S. Frolova*^{ID}, Irina S. Milentyeva^{ID}, Anastasiya M. Fedorova^{ID},
Ekaterina S. Miller^{ID}, Sergey L. Luzyanin^{ID}

Kemerovo State University^{ROR}, Kemerovo, Russia

Received: 26.06.2024
Revised: 14.08.2024
Accepted: 03.09.2024

Anna S. Frolova: frolova.anna.s@mail.ru,
<https://orcid.org/0000-0003-3988-8521>
Irina S. Milentyeva: <https://orcid.org/0000-0002-3536-562X>
Anastasiya M. Fedorova: <https://orcid.org/0000-0002-8071-4411>
Ekaterina S. Miller: <https://orcid.org/0000-0002-7538-8076>
Sergey L. Luzyanin: <https://orcid.org/0000-0001-9293-4377>

© A.S. Frolova, I.S. Milentyeva, A.M. Fedorova, E.S. Miller, S.L. Luzyanin, 2024



Abstract.

Modern medicine strives to prevent age-related diseases. Oxidative stress is associated with development and progression of various diseases. Reactive oxygen species are part of vital physiological processes. High levels of reactive oxygen lead to stress and pathology whereas low ones are associated with healthy physiology. Plant-derived adaptogens demonstrate good results in stress tolerance and homeostasis. Plant materials are a pharmacologically optimal source of chemical compounds to treat various diseases, including those caused by oxidative stress.

The research featured biologically active substances isolated from extracts of callus, suspension, and root cultures of medicinal plants. Baicalin and trans-cinnamic acid were obtained from *Scutellaria baicalensis* while ursolic acid came from *Thymus vulgaris*. The biologically active substances were tested for neuroprotective properties, as well as for the impact on the expression of SOD-3 and HSP-16.2. *Caenorhabditis elegans* served as a model to study the accumulation of carbonylated proteins and lipofuscin.

The neuroprotective activity of all tested substances decreased as their concentration fell from 200 to 10 $\mu\text{mol/L}$. *C. elegans* proved more resistant to thermal stress if pretreated with the biologically active substances. In response to thermal stress, nematodes expressed SOD-3 more actively than HSP-16.2. At 100 $\mu\text{mol/L}$, the biologically active substances could reduce the level of carbonylated proteins. Ursolic acid was especially effective against protein carbonylation and lipofuscin accumulation in all concentrations.

Baicalin, trans-cinnamic acid, and ursolic acid made it possible to reduce oxidative and thermal stress, thus demonstrating good prospects for further studies as part of adaptogenic preparations.

Keywords. Biologically active substances, *Caenorhabditis elegans*, thermal stress, oxidative stress, baicalin, trans-cinnamic acid, ursolic acid

Funding. The research was part of State Assignment FZSR-2024-0008: Biologically active additives with plant metabolites against premature aging: *in vitro* studies. The experiments were conducted on the premises of the Applied Biotechnology Center for Collective Use, Kemerovo State University^{ROR}.

For citation: Frolova AS, Milentyeva IS, Fedorova AM, Miller ES, Luzyanin SL. Effect of Biologically Active Substances on Thermal and Oxidative Stress in *Caenorhabditis elegans* Models. Food Processing: Techniques and Technology. 2024; 54(3):571–584. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-3-2530>

Введение

Старение сопровождается нарушением регуляции адаптационных процессов. С одной стороны, механизмы физиологической адаптации, такие как обучение и память, пластичность иммунной системы и ремоделирование мышц в зависимости от физических упражнений, притупляются. С другой стороны, с возрастом проявляются заболевания соединитель-

ной ткани и усиливаются некоторые дезадаптивные процессы, включая рак, патологическое ремоделирование сердечно-сосудистой системы и метаболическую дисрегуляцию [1, 2].

Окислительный стресс является важным компонентом, участвующим в развитии и прогрессировании различных заболеваний. Активный кислород, хотя и жизненно важен для нашего организма, наносит

значительный ущерб основным компонентам клеточной системы и нарушает физиологически важные функции белков, липидов, ферментов и дезоксирибонуклеиновой кислоты, несущих генетический код. Окисление белков способствует модификации каталитической и структурной целостности различных важных белков, что приводит к формированию различных заболеваний, включая диабет, атеросклероз, муковисцидоз и язвенный колит [3].

Первоначально окислительный стресс определялся как нарушение равновесия между прооксидантами и антиоксидантами в биологических системах. Как только появляется этот дисбаланс, клеточные макромолекулы могут быть повреждены преобладающими свободными радикалами. Это приводит к окислительным модификациям генома, белков, структурных углеводов и липидов; в последнем случае происходит перекисное окисление липидов. Оно представляет собой процесс, связанный со свободными радикалами, который в биологических системах может происходить под ферментативным контролем, например, для образования медиаторов воспаления липидного происхождения, или неферментативный процесс. Эта более поздняя форма в основном связана с повреждением клеток в результате окислительного стресса, а при расщеплении гидропероксидов липидов в биологических системах образуется большое разнообразие альдегидов, таких как малоновый диальдегид и 4-гидроксиноненаль [4].

Активные формы кислорода играют роль в осуществлении жизненно важных физиологических процессов. Повышенные уровни активных форм кислорода приводят к стрессу и патологии, пониженные уровни активных форм кислорода связаны с нормальными физиологическими состояниями [5, 6]. Окисление клеток предотвращается антиоксидантами, которые присутствуют в организме и играют основную роль в защитном механизме [7]. Антиоксиданты подавляют реакции, вызванные свободными радикалами, и в конечном итоге предотвращают или задерживают повреждение клеток. Антиоксиданты прекращают окислительные цепные реакции, связываясь со свободными радикалами и отдавая им свои электроны, тем самым делая свободные радикалы недоступными для дальнейшей атаки. После отдачи своих электронов антиоксиданты достигают состояния свободных радикалов. Следовательно, они не являются вредными, поскольку обладают способностью адаптироваться к изменениям в электронах, не будучи при этом реактивными [8].

Токсичные активные формы кислорода образуются в результате поступления восстановленного электронами кислорода в митохондрии и способствуют развитию окислительного стресса [9]. Одним из важных белков, каталитически удаляющих O_2^- , является супероксиддисмутаза (СОД). Супероксиддисмутаза – это фермент, экспрессируемый геном *sod-1-5*, который участвует в преобразовании супе-

роксидного анион-радикала в кислород и пероксид водорода. Существует несколько форм супероксиддисмутазы: СОД-1 (CuZnSOD – гомодимер 32 кДа), СОД-2 (MnSOD – гомотетрамер 96 кДа) и СОД-3 (внеклеточная Cu-Zn – гомотетрамер 135 кДа) [10]. СОД-3 – это гликопротеин, который содержится во внеклеточном матриксе, а также присутствует на поверхности клеток сосудов и в эпителиальных клетках дыхательных путей. Белок закреплен на протеогликанах гепарина сульфата в гликокаликсе клеточных поверхностей. Экстракт апельсина, содержащий гесперидин, ванилиновые кислоты, рутин и другие вещества, проверяли на диком штамме *Caenorhabditis elegans* N2. После 5-дневного воздействия экстрактом в концентрации 200 и 400 мг/мл происходило увеличение уровня активности экспрессии супероксиддисмутаза в 1,7 и 2,9 раза соответственно. В результате транскрипционный анализ показал, что экстракт апельсина активировал экспрессию генов *age-1* и *daf-16* в пути IIS, генов *sek-1* и *skn-1* в пути MAPK и генов антиоксидантов, включая SOD-3 и *gst-4* [11]. Белок HSP-16.2 является полипептидом, молекулярная масса которого лежит в диапазоне от 12 до 43 кДа. HSP-16.2 относят к классу малых белков теплового шока (sHSP). Белки теплового шока помогают связать неправильно свернутые белки в определенный комплекс sHSP/субстрат. Данная функция помогает изолировать поврежденные белки от других макромолекул. Происходит защита субстрата от деградации. По сравнению с другими классами, при окислительном и тепловом стрессе в первую очередь экспрессируются белки sHSP [12]. В геноме червей *C. elegans* находится 16 генов, кодирующих 14 sHSP разного рода. Тепловой шок у *C. elegans* контролируется HSF и факторами транскрипции за счет активации гена HSP-16.2. Этот факт был выявлен в процессе исследования мутагенеза промотера HSP-16.2 [13].

Как продукт окислительного стресса, процесс карбонилирования белка, возникающий вследствие нуклеофильной атаки остатков гистидина, лизина и цистеина, является чувствительным к сигнальным механизмам, связанным с окислением и восстановлением. Окислительно-восстановительные сигнальные механизмы влияют на аутофагию, пролиферацию клеток, апоптоз и транскрипционный контроль [14]. Процесс является иницирующим фактором митохондриальной дисфункции и стресса, возникающего в эндоплазматическом ретикулуме, что показывает механистическую связь между метаболическими болезнями и окислительным стрессом. Процесс образования карбонилированных белков является одним из маркеров заболеваний, таких как расстройство Альцгеймера и Паркинсона, диабет, хронические заболевания легких, катарактогенез и других связанных с возрастом болезней [15]. Возникновение патологий происходит, когда увеличивается окислительный стресс и за счет карбонилирования белка накапливается и увеличи-

вается его гидрофобность. Данная физико-химическая модификация, а также неправильное сворачивание белка ведут к выработке агрегатов, имеющих пониженное свойство к деградации [16].

Адаптогены способны ускорять или замедлять ряд функций организма в зависимости от потребностей в данный момент. Исследования адаптогенов растительного происхождения показали многообещающие результаты в отношении стрессоустойчивости и улучшения гомеостаза. Их общими свойствами являются антиоксидантные, ноотропные (которые также известны как эффект улучшения когнитивных функций) и усиление физической выносливости [17]. Обширные исследования лекарственных растений в последние десятилетия предоставили все больше доказательств того, что они проявляют поливалентную неспецифическую фармакологическую активность, влияющую на многие физиологические функции и регуляторные системы человека [18]. Механизм действия адаптогенов связан с осью гипоталамус-гипофиз-надпочечники – функциональной частью нейроэндокринно-иммунного комплекса, известного под общим названием «система стресса». Она регулирует адаптивность, выживаемость и устойчивость организма к стрессу и прогрессированию возрастных нарушений, включая нейродегенеративные заболевания (болезнь Альцгеймера, Паркинсона), атеросклероз, сердечно-сосудистые заболевания, метаболические заболевания (диабет 2 типа, ожирение и гипертония), мышечная дегенерация (саркопения), дегенеративные заболевания суставов (остеоартрит), рак и др. [19].

С фармакологической точки зрения растительное сырье является подходящим источником химических соединений для лечения различных заболеваний, в том числе вызванных окислительным стрессом. Антиоксидантная активность растений связана с их химическим составом, а именно наличием биологически активных веществ (полифенолов, витаминов, органических кислот и т.д.). Изучение перспективных биологически активных веществ из растительного сырья актуально для использования при лечении наиболее серьезных заболеваний, в том числе для нормализации окислительно-восстановительного баланса в организме [20, 21].

Для изучения роли окислительного и теплового стресса *in vivo* использовали *C. elegans*. Животные *C. elegans* являются отличной моделью изучения механизмов биологической активности соединений при окислительном стрессе [22]. В организме червя консервированный сигнальный путь инсулин/инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1) контролирует различные метаболические процессы, устойчивость к окислительному стрессу [23]. Данный путь стал основной биологической мишенью при исследовании различных эффектов биологически активных веществ.

Целью данного исследования является изучение влияния биологически активных веществ, выделенных

из экстрактов каллусных, суспензионных и корневых культур лекарственных растений Сибирского федерального округа, на окислительный и тепловой стресс модельных объектов *C. elegans*.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования в работе являлись:

- Штамм почвенных трансгенных нематод *Caenorhabditis elegans* CL4176 (dvIs27[myo-3p:Aβ(1-42):let-851 3'UTR]+rol-6(su1006)], являющийся модельной системой изучения болезни Альцгеймера на нематодах и предоставленный лабораторией разработки инновационных лекарственных средств и агробιοтехнологий, «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» (Долгопрудный, Россия) [23].
- Штамм *Escherichia coli* OP50, предоставленный институтом молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН (Москва, Россия).
- Индивидуальные биологически активные вещества (степень очистки не менее 95 %), выделенные из экстрактов каллусных, суспензионных и корневых культур лекарственных растений Сибирского федерального округа, полученные на предыдущих этапах исследований: байкалин из шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis*); транс-коричная кислота из шлемника байкальского (*S. baicalensis*); урсоловая кислота из тимьяна обыкновенного (*Thymus vulgaris*) [25].

Требования к постановке эксперимента с нематодами. Эксперименты проводили в стандартных условиях, в соответствии с основными рекомендациями по работе с трансгенными нематодами [26]. Популяция взрослых особей *C. elegans* во всех экспериментах была синхронизирована. Щелочной лизис животных проводили при достижении ими половозрелой стадии развития L4, который в экспериментах составил 72 ч. Эксперименты ставили в 96-луночных планшетах (Эппендорф, США) в жидкой S-среде для культивирования нематод в объеме 150 мкл, при температуре 15 °С в климатической камере Binder (Германия). В качестве еды нематод использовали бактерии *E. coli* OP-50, которые вносили один раз в начале эксперимента до конечной концентрации 5 мг/мл.

Методика культивирования нематод в жидкой среде. К синхронизированным нематодам в стадии L1, находящимся в S-среде, добавляли ночную бактериальную культуру *E. coli* OP50, предварительно отмытую от LB-бульона и ресуспендированную в S-среде, до конечной концентрации бактерии 0,5 мг/мл. Вносили по 120 мкл суспензии нематод с бактерией в каждую ячейку 96-луночного планшета, заклеивали планшет пленкой и оставляли на 48 ч на инкубацию при 20 °С. По истечении 48 ч добавляли по 15 мкл 1,2 мМ 5-фтор-2-дезоксисуридин (FUDR) в каждую ячейку планшета для предотвращения репродуктивной функции червей и оставляли на 24 ч при температуре 20 °С до достижения червями стадии L4. Затем добавляли по 15 мкл

тестируемых химических соединений или растительного экстракта в ячейки к нематодам в соответствии со схемой постановки эксперимента.

Методика подготовки биологически активных веществ к работе. Индивидуальные биологически активные вещества растворили в DMSO (ЛенРеактив, Россия) до концентрации 10 ммоль/л. Затем провели титрование каждого биологически активного вещества путем разведения стокового раствора дистиллированной стерильной водой до стоковых концентраций биологически активных веществ 2000, 1000, 500 и 100 мкмоль/л. При изучении нейропротекторной активности биологически активных веществ добавляли по 15 мкл каждого стокового раствора к 135 мкл культивируемых нематод в каждую ячейку 96-луночного планшета в соответствии со схемой постановки эксперимента. Получали рабочую концентрацию тестируемого биологически активного вещества 200, 100, 50 и 10 мкмоль/л соответственно.

Нейропротекторная активность биологически активных веществ в организме *C. elegans*. Для оценки нейропротекторной активности биологически активных веществ готовили стоковые растворы рутин в диметилсульфоксиде, концентрация раствора составила 200, 100, 50 и 10 мкмоль/л. Нематод распределяли в ячейки планшета, затем добавляли в каждую ячейку по 15 мкл раствора БАВ. Выдерживали планшет 48 ч при температуре 15 °С до достижения нематодами стадии роста L3, затем переносили планшет для инкубирования в термостате при температуре 25 °С для индуцирования экспрессии бета-амилоида A β (1-42) в мышечных клетках нематод, вызывающих парализацию локомоторной подвижности животных. Проводили мониторинг физиологических изменений, произошедших с мутантными нематодами в условиях индуцирования парализации при температуре 25 °С. Подсчет количества парализованных нематод, вели через 18, 40 и 62 ч по методике J. Drake и соавторов [24]. Контрольные нематоды без добавления испытуемых образцов находились в тех же условиях, что и тестируемые соединения. Проводили эксперимент в шестикратной повторности для каждой тестируемой концентрации биологически активных веществ.

Методика оценки влияния индивидуальных БАВ на экспрессию SOD-3 и HSP-16.2 в организме *C. elegans*. Постановка эксперимента, серия «А» для оценки уровня экспрессии SOD-3 в нематодах. К синхронизированным нематодам в стадии L1, находящимся в S-среде, добавляли ночную бактериальную культуру *E. coli* OP50, предварительно отмытую от LB-бульона и ресуспендированную в S-среде, до конечной концентрации бактерий 0,5 мг/мл. Вносили по 900 мкл суспензии нематод стадии L1 с бактериями в каждую ячейку 24-луночного планшета, добавляли по 100 мкл каждого из тестируемых биологически активных веществ и экстрактов лекарственных расте-

ний в ячейку к нематодам, в соответствии со схемой постановки эксперимента, заклеивали планшет пленкой и оставляли на 72 ч при температуре 20 °С до достижения нематодами стадии развития L4, затем переставляли планшет в инкубатор на 35 °С на 5 ч. По истечении 5 ч остужали планшет на льду, переносили испытуемые нематоды в пробирку типа Эппендорф, центрифугировали при 1000 g в течение 2 мин., удаляли надосадочную жидкость и немедленно замораживали осадок нематод при температуре –86 °С до времени выделения РНК. Эксперимент проводился с 2-кратным повтором для каждого биологически активного вещества или экстракта с таким расчетом, чтобы получить не менее 1000 нематод для каждого тестируемого условия.

Постановка эксперимента, серия «Б» для оценки уровня экспрессии HSP-16.2 в нематодах. К синхронизированным нематодам в стадии L1, находящимся в S-среде, добавляли ночную бактериальную культуру *E. coli* OP50, предварительно отмытую от LB-бульона и ресуспендированную в S-среде, до конечной концентрации бактерии 0,5 мг/мл. Вносили по 900 мкл суспензии нематод с бактерией в каждую ячейку 24-луночного планшета и инкубировали 48 ч при температуре 20 °С до достижения нематодами стадии L4. По истечении 48 ч переставляли планшет в инкубатор на 35 °С на 2 ч. По истечении 2 ч остужали планшет до 20 °С, добавляли по 100 мкл биологически активных веществ или экстрактов лекарственных растений в соответствии со схемой постановки эксперимента, продолжали инкубацию нематод в течение 5 суток при температуре 20 °С. После этого переносили испытуемые нематоды в пробирку типа Эппендорф, центрифугировали при 1000 g в течение 2 мин., удаляли надосадочную жидкость и немедленно замораживали осадок нематод при температуре –86 °С до времени выделения РНК. Эксперимент проводили с 2-кратным повтором для каждого экстракта с таким расчетом, чтобы получить не менее 1000 нематод для каждого тестируемого условия.

Методика оценки влияния индивидуальных биологически активных веществ на накопление карбонилированных белков в организме *C. elegans*. Регистрацию количественных изменений в уровне содержания карбонилированных белков в организме нематод после 5 суток инкубации в присутствии биологически активных веществ проводили на высокопроизводительном, автоматизированном микроскопе ImageXpress Mico XL (Molecular Devices, США), широко используемом для мультипараметрического фенотипического скрининга и анализа цифровых изображений объектов в 96-луночных планшетах. Управление процессом съемки и анализа изображений на ImageXpress Mico XL осуществляется через единое программное обеспечение MetaXpress (Molecular Devices, США). Высокоскоростную съемку изображений проводили с использованием сухого объектива с 4-кратным

увеличением в проходящем видимом свете и на канале флуоресцентного красителя Су3-NHS (коэффициент экстинкции – 150 000 1/моль×см). Для анализа изображений использовали бесплатную программу Cell-Profiler 4.2.1 [27].

Методика измерения накопления липофусцина в присутствии биологически активных веществ. Для измерения накопления липофусцина в организме *C. elegans* выбран метод спектрофлуориметрического измерения и анализа. Измерения проводились на спектрофотометре BMG Clariostar при 340/420 нм. Автоматически экспортировали результаты измерений в программу Excel. Полученные спектрометрические данные обрабатывали с использованием программы GraphPad Prism, версия 9.0.0 (GraphPad Software, Inc., США) с целью получения среднего значения автофлуоресценции липофусцина для шести экспериментальных повторов, а также стандартного отклонения от среднего значения (\pm SEM). Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Нейропротекторная активность биологически активных веществ в организме *Caenorhabditis elegans*. Особенность трансгенного штамма *C. elegans* CL4176 состоит в том, что в геноме нематод дикого типа встроен температурно-чувствительный ген бета-амилоидного пептида $A\beta(1-42)$, экспрессия которого в мышечных клетках при температуре 25 °С вызывает парализацию нормальной локомоторной подвижности животных вследствие нейротоксического действия $A\beta(1-42)$ отложений в мышцах нематод. В ходе выполнения работы были поставлены задачи не только оценить нейропротекторную активность каждого биологически активного вещества в отдельности по сравнению с контрольными нематодами, но также изучить продолжительность защиты парализованных животных от нейротоксичного действия бета-амилоида $A\beta(1-42)$ после обработки биологически активных веществ. Результаты подсчета числа парализованных нематод представлены в таблицах 1–3.

Таблица 1. Среднее число парализованных нематод, шт., в эксперименте по изучению нейропротекторной активности байкалина из *Scutellaria baicalensis* в организме *Caenorhabditis elegans*

Table 1. Neuroprotective activity of baicalin from *Scutellaria baicalensis* in *Caenorhabditis elegans*: average count of paralyzed nematodes

Время выдержки, ч	Концентрация биологически активных веществ, мкмоль/л				Контроль
	200	100	50	10	
0	11,5 ± 0,3	19,8 ± 0,5	21,0 ± 0,6	18,0 ± 0,5	18,0 ± 0,5
18	0,5 ± 0,1	1,2 ± 0,1	6,0 ± 0,2	5,2 ± 0,2	11,2 ± 0,3
40	0,7 ± 0,1	1,2 ± 0,1	14,5 ± 0,4	3,6 ± 0,1	12,7 ± 0,3
62	2,5 ± 0,1	3,3 ± 0,1	17,5 ± 0,5	2,9 ± 0,1	15,2 ± 0,4

Таблица 2. Среднее число парализованных нематод, шт., в эксперименте по изучению нейропротекторной активности транс-коричной кислоты из *Scutellaria baicalensis* в организме *Caenorhabditis elegans*

Table 2. Neuroprotective activity of trans-cinnamic acid from *Scutellaria baicalensis* in *Caenorhabditis elegans*: average count of paralyzed nematodes

Время выдержки, ч	Концентрация биологически активных веществ, мкмоль/л				Контроль
	200	100	50	10	
0	17,0 ± 0,4	17,2 ± 0,4	21,5 ± 0,4	14,8 ± 0,3	18,0 ± 0,5
18	2,2 ± 0,1	4,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	5,8 ± 0,1	11,2 ± 0,3
40	7,5 ± 0,2	7,7 ± 0,2	4,7 ± 0,1	5,5 ± 0,1	12,7 ± 0,3
62	9,5 ± 0,4	10,5 ± 0,2	10,2 ± 0,2	7,0 ± 0,1	15,2 ± 0,4

Таблица 3. Среднее число парализованных нематод, шт., в эксперименте по изучению нейропротекторной активности урсоловой кислоты из *Thymus vulgaris* в организме *Caenorhabditis elegans*

Table 3. Neuroprotective activity of ursolic acid from *Thymus vulgaris* in *Caenorhabditis elegans*: average count of paralyzed nematodes

Время выдержки, ч	Концентрация биологически активных веществ, мкмоль/л				Контроль
	200	100	50	10	
0	17,5 ± 0,4	20,5 ± 0,4	21,5 ± 0,4	23,8 ± 0,5	18,0 ± 0,5
18	0	0,3 ± 0,1	0,8 ± 0,1	4,8 ± 0,1	11,2 ± 0,3
40	1,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1	4,7 ± 0,1	10,0 ± 0,2	12,7 ± 0,3
62	4,0 ± 0,1	3,8 ± 0,1	10,2 ± 0,2	19,3 ± 0,4	15,2 ± 0,4

По окончании эксперимента подсчитывали процент парализованных нематод относительно общего числа животных для каждого тестируемого биологически активного вещества в концентрациях 10, 50, 100 и 200 мкмоль/л и сравнивали его с процентом парализованных контрольных нематод, не обработанных биологически активными веществами. Результаты представлены на рисунках 1–3.

Нейропротекторная активность всех испытанных биологически активных веществ является концентрационно зависимой. Она падает с уменьшением концентрации биологически активных веществ от 200 до 10 мкмоль/л. Показана зависимость продолжительности защиты парализованных нематод в результате нейротоксического действия бэ́та-амилоида $A\beta(1-42)$ от длительности инкубации животных в присутствии биологически активных веществ при более высокой температуре 25 °С. Для всех биологически активных веществ нейропротекторная активность снижается при увеличении длительности экспозиции в диапазоне от 18 до 62 часов инкубации.

Наибольшая нейропротекторная активность показана для урсоловой кислоты из *T. vulgaris*, как для всего диапазона концентраций от 200 до 10 мкмоль/л, так и при выдерживании от 18 до 62 часов при 25 °С. Урсоловая кислота, единственная из всех испытанных биологически активных веществ, которая при концентрации 200 мкмоль/л полностью ингибирует парализацию нематод при 18-часовой инкубации при температуре 25 °С. Урсоловая кислота единственная из всех испытанных биологически активных веществ проявляет нейропротекторную активность при самой

низкой концентрации 10 мкмоль/л, при которой процент парализованных нематод был в 1,6 раз ниже после 40 ч инкубации при температуре 2 °С, по сравнению с контрольными животными.

Байкалин из *S. baicalensis* по нейропротекторной активности лишь незначительно уступает урсоловой кислоте по количественным показателям значений

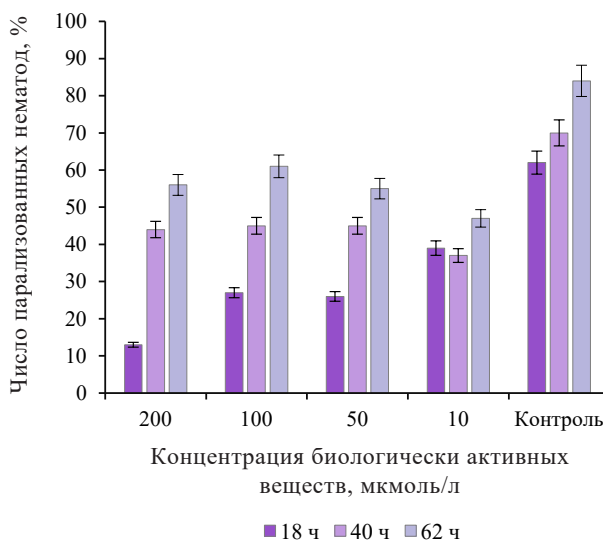


Рисунок 2. Нейропротекторная активность транс-коричной кислоты из *Scutellaria baicalensis* в организме *Caenorhabditis elegans*

Figure 2. Neuroprotective activity of trans-cinnamic acid from *Scutellaria baicalensis* in *Caenorhabditis elegans*

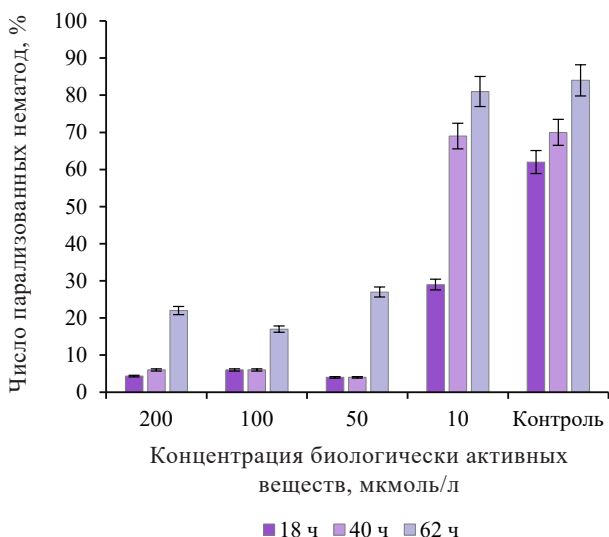


Рисунок 1. Нейропротекторная активность байкалина из *Scutellaria baicalensis* в организме *Caenorhabditis elegans*

Figure 1. Neuroprotective activity of baicalin from *Scutellaria baicalensis* in *Caenorhabditis elegans*

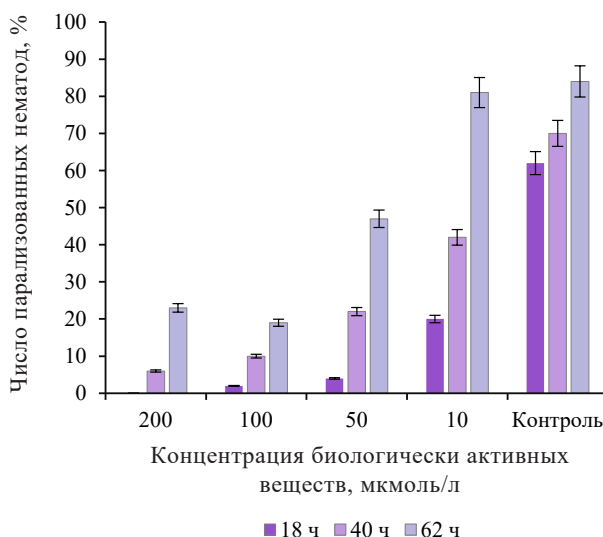


Рисунок 3. Нейропротекторная активность урсоловой кислоты из *Thymus vulgaris* в организме *Caenorhabditis elegans*

Figure 3. Neuroprotective activity of ursolic acid from *Thymus vulgaris* in *Caenorhabditis elegans*

процентного содержания парализованных нематод в диапазоне концентраций от 200 до 50 мкмоль/л за короткий период инкубации. Байкалин существенно превосходит все испытанные биологически активные вещества по продолжительности защиты от нейротоксического действия $A\beta(1-42)$, включая 62-часовую инкубацию.

Испытания транс-коричной кислоты из *S. baicalensis* продемонстрировали их нейропротекторную активность, по сравнению с контрольными нематодами. Процент парализованных нематод в присутствии этого биологически активного вещества существенно ниже, чем у контрольных животных, как в диапазоне концентраций 200–50 мкмоль/л, так во всем диапазоне времени 18–62-часовой инкубации. При 10 мкмоль/л концентрации биологически активных веществ нейропротекция наблюдалась лишь при 18-часовой инкубации.

При исследовании влияния на продолжительность жизни природного тритерпеноида, урсоловой кислоты на *C. Elegans*, H. Negi и соавторы определили, что максимальная продолжительность жизни наблюдается у нематод при концентрации биологически активных веществ 25 мкмоль [28]. Z. Yue и соавторы получили экстракт *Cornus officinalis*, богатый урсоловой кислотой [29]. Данный экстракт исследовали на модельном объекте *C. elegans*. Результаты показали, что экстракт *C. officinalis* может увеличить продолжительность жизни и усилить антиоксидантную ферментативную активность *C. elegans*, подвергшихся воздействию ультрафиолета В, при одновременном снижении уровня активных форм кислорода. Экстракт *C. officinalis* в основном смягчает окислительный стресс, вызванный УФ-В у *C. elegans* через путь SKN-1/Nrf2.

Х.-К. Tu и др. установили, что байкалин из *S. baicalensis* Georgi обладает нейропротекторной активностью за счет антиапоптотических и противовоспалительных свойств [30]. Байкалин значительно снизил ферментативную активность миелопероксидазы и экспрессию мРНК индуцибельной синтазы оксида азота и мРНК циклооксигеназы-2 в мозге крысы, он также значительно ингибировал нейрональный апоптоз и экспрессию расщепленного белка каспазы-3 после постоянной окклюзии средней мозговой артерии.

Анализ влияния индивидуальных биологически активных веществ на экспрессию белков SOD-3 и HSP-16.2 в нематодах. Экспрессия гена SOD-3 в нематодах, обработанных биологически активными веществами в течение 72 ч до приведения животных в состояние стресса. Продукты амплификации генов в полимеразной цепной реакции в режиме реального времени составили 175 нп. Подход представляет собой оценку профилактического действия тестируемых биологически активных веществ, когда нематоды предварительно инкубировались с веществами в течение 72 ч, и только после этого подвергались стрессу путем поднятия температуры до 35 °С в течение 5 ч. Результаты подсчета уровня экспрессии гена SOD-3 в нематодах представлены на рисунке 4.

Экспрессия гена HSP-16.2 в нематодах, обработанных биологически активными веществами в течение 5 суток после приведения животных в состояние стресса. Продукты амплификации генов в полимеразной цепной реакции в режиме реального времени составили 127 нп. Подход представляет собой оценку терапевтического действия тестируемых биологически активных веществ, при котором нематоды первоначально подвергались стрессу путем поднятия температуры до 35 °С в течение 2 ч, и только после этого они инкубировались с биологически активными веществами в течение 5 суток. Результаты подсчета уровня экспрессии гена HSP-16.2 в нематодах представлены на рисунке 5.

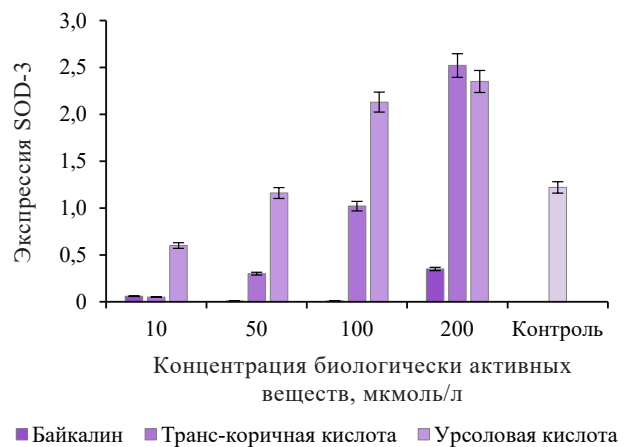


Рисунок 4. Влияние индивидуальных биологически активных веществ на экспрессию белка SOD-3 у *Caenorhabditis elegans*

Figure 4. Effect of biologically active substances on SOD-3 protein in *Caenorhabditis elegans*

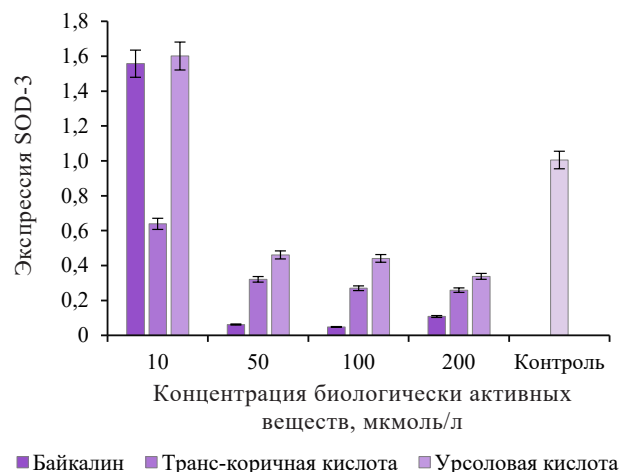


Рисунок 5. Влияние биологически активных веществ на экспрессию белка HSP-16.2 у *Caenorhabditis elegans*

Figure 5. Effect of biologically active substances on HSP-16.2 protein in *Caenorhabditis elegans*

В ходе проведенных испытаний по изучению влияния индивидуальных биологически активных веществ в концентрациях 10, 50, 100 и 200 мкмоль/л на экспрессию SOD-3 и HSP-16.2 в организме *C. elegans* установили, что нематоды в большей степени устойчивы к температурному стрессу, если они предварительно обработаны биологически активными веществами. Обнаружено значительно меньшее количество умерших животных, в этом случае, к концу эксперимента, по сравнению с даже более длительной инкубацией нематод в присутствии биологически активных веществ, обработанных после повышения температуры.

Нематоды более активно экспрессируют SOD-3, по сравнению с HSP-16.2, в ответ на температурный стресс, увеличивая уровень экспрессии SOD-3 с 1,7- и до 2,1- кратных размеров, по сравнению с увеличением экспрессии HSP-16.2 от 1,5 до 1,6 раз.

Урсоловая кислота в 1,75–1,93 раза увеличивает концентрацию SOD-3 при 100 и 200 мкмоль/л соответственно. Транс-коричная кислота в 2 раза увеличивает концентрацию SOD-3 при 200 мкмоль/л. Байкалин не влиял на экспрессию SOD-3 ни при каких испытываемых концентрациях.

Урсоловая кислота увеличила экспрессию HSP-16.2 при 10 мкмоль/мл в 1,6 раз, по сравнению с контролем. Байкалин при 10 мкмоль/мл увеличили экспрессию HSP-16.2 в 1,5 раза. Транс-коричная кислота не влияла на экспрессию HSP-16.2 ни при каких испытываемых концентрациях.

Н. Li и соавторы определили, что тепловой стресс (41 °C) вызывает макроскопические изменения в ткани матки мышей, изменяет активность антиоксидантных ферментов и факторы пути Keap1/Nrf2 [31]. Байкалин уменьшает макроскопические изменения, меняет активность антиоксидантных ферментов и факторы в пути Keap1/Nrf2. Защищает ткань матки от окисли-

тельных повреждений/апоптоза, вызванных тепловым стрессом, через путь Keap1/Nrf2.

В работе Yi. Yang и соавторы установили, что предварительная обработка урсоловой кислотой защищает легочные ткани от повреждения, вызванного тепловым стрессом, путем регулирования воспалительных цитокинов и развернутого ответа белка у мышей [32]. Добавление урсоловой кислоты может стать терапевтической стратегией для смягчения повреждений легких, вызванных высокой температурой, у людей и животных.

Влияние индивидуальных биологически активных веществ на накопление карбонилированных белков в организме *C. elegans*. После облучения нематод в 24-луночных планшетах в течение 5 мин. ультрафиолетовым светом при длине волны 314 нм планшет с нематодами перенесли в инкубатор на 1 ч при 20 °C. В ходе наблюдения за нематодами под микроскопом по истечении 1 ч обнаружено, что локомоторная подвижность нематод существенно снизилась, однако при этом большинство *C. elegans* оставались живыми. С окрашенных нематод в 96-луночном планшете сделаны снимки, для количественной оценки флуоресценции карбонилированных белков в их организме взяты не все нематоды. После предварительной обработки изображений с помощью программы CellProfiler 4.2.1 проведена корректировка их количества. Затем проведены преобразования изображений нематод в цифровые значения медианной интенсивности флуоресценции карбонилированных белков. На основании полученных данных, построены гистограммы медианной интенсивности карбонилированных белков в организме нематод при каждом тестируемом условии испытания, в сравнении с контролем. Данные представлены на рисунке 6.

В ходе проведенных испытаний по изучению влияния индивидуальных биологически активных веществ

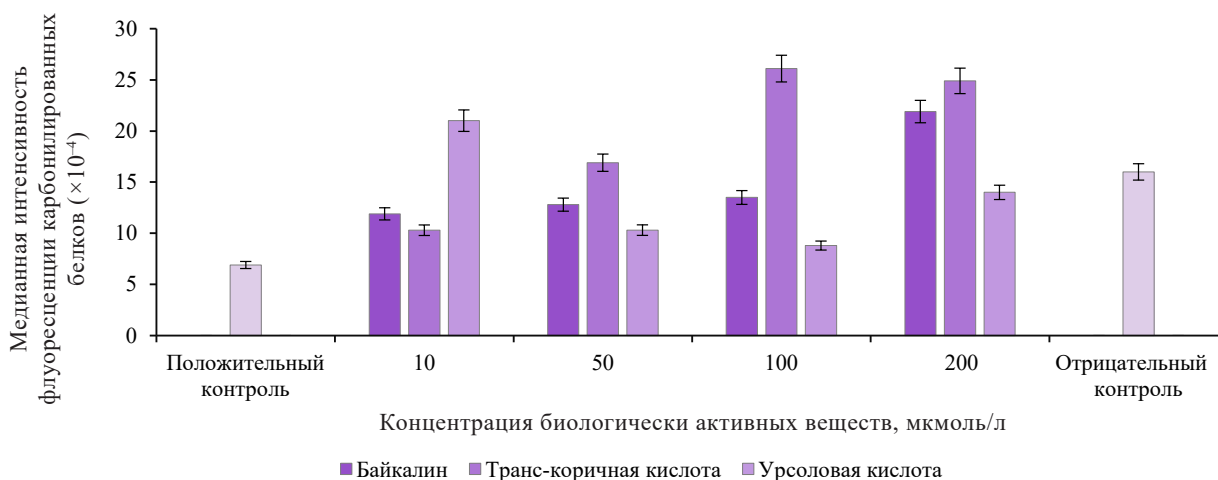


Рисунок 6. Влияние биологически активных веществ на накопление карбонилированных белков в организме *Caenorhabditis elegans*

Figure 6. Effect of biologically active substances on carbonylated proteins in *Caenorhabditis elegans*

в концентрациях 10, 50, 100 и 200 мкмоль/л на накопление карбонилированных белков в организме *C. elegans* установлено, что активность всех испытанных биологически активных веществ является концентрационно зависимой, при этом для всех биологически активных веществ она различна. Все протестированные биологически активные вещества продемонстрировали снижение уровня карбонилированных белков при концентрациях 100 мкмоль/л.

Наибольшее влияние на снижение уровня карбонилирования белков в теле нематод, по сравнению с контролем оказала урсоловая кислота. Она снижала уровень карбонилированных белков в 1,6 (50 мкмоль/л) и 1,8 (100 мкмоль/л) раза. Это единственные биологически активные вещества, которые влияют на снижение уровня карбонилирования белков при концентрации 200 мкмоль/л (в 1,1 раза). При концентрации 10 мкмоль/л наибольшее влияние оказала транс-коричная кислота (снижение уровня в 1,6 раза). Байкалин продемонстрировал умеренное снижение уровня карбонилированных белков, не превышающее в 1,3 раз уровня в контрольных нематодах. При этом биологически активные вещества проявляли свою активность в диапазоне концентраций от 10 до 100 мкмоль/л.

Уровень снижения карбонилированных белков под влиянием урсоловой кислоты в концентрации 100 мкмоль/л сравним с уровнем блокирования реакции карбонилирования белков в присутствии положительного контроля – 0,2 М борогидрида натрия (NaBH_4), который специфически связывается только с карбонильной группой у белков, демонстрируя высокую избирательность взаимодействия урсоловой кислоты с карбонилированными белками в теле нематод.

В работе Р. М. Abilov с соавторами установили, что при введении внутривенно крысам в дозе 15 мг/кг массы тела байкалин повышает содержание восстановленного глутатиона в печени здоровых животных и активность глутатионсинтетазы и глюкозо-6-фосфогидрогеназы в печени и почках в условиях окислительного стресса под действием различных токсикантов [33].

Нейропротекторное действие урсоловой кислоты против окислительного повреждения исследовали на изолированном мозге крысы учеными V. F. Salau и др. [34]. Исследования молекулярной стыковки выявили сильные молекулярные взаимодействия между урсоловой кислотой, каталазой и АТФазой. Эти результаты указывают на нейропротекторный эффект урсоловой кислоты против окислительного повреждения изолированного мозга крыс, что подтверждается ее способностью смягчать окислительный стресс, пуриnergические и холиnergические дисфункции с сопутствующим подавлением протеолитической активности.

Влияние индивидуальных биологически активных веществ в концентрациях 10, 50, 100 и 200 мкмоль/л на накопление липофусцина в организме *C. elegans*. В ходе выполнения исследования

поставлены задачи не только оценить влияние каждого отдельно взятого биологически активного вещества по сравнению с контрольными нематодами на накопление липофусцина в организме нематод, но также изучить эффективность этого влияния в течение продолжительной 15-дневной инкубации с биологически активными веществами. Выбраны 5-дневные интервалы спектрометрических измерений липофусцина. Перед началом спектрометрических измерений подсчитывали общее количество животных в каждой ячейке 96-луночного планшета. Полученные спектрометрические данные обрабатывали с использованием программы GraphPad Prism с целью получения среднего значения автофлуоресценции липофусцина для шести экспериментальных повторов.

На основании исходных данных автофлуоресценции в теле нематод проводился подсчет разницы флуоресценции в каждый конкретный день спектрометрических измерений за вычетом значений флуоресценции на первый день измерений в тех же условиях. На основании полученных расчетных данных с использованием программы Microsoft Excel LTSC 2021 строились графики разницы в накоплении липофусцина в зависимости от продолжительности эксперимента, которые представлены на рисунках 7–9.

В ходе проведенных испытаний по изучению влияния индивидуальных биологически активных веществ в концентрациях 10, 50, 100 и 200 мкмоль/л на накопление липофусцина в организме *C. elegans* установлено, что накопление липофусцина под влиянием всех испытанных биологически активных веществ

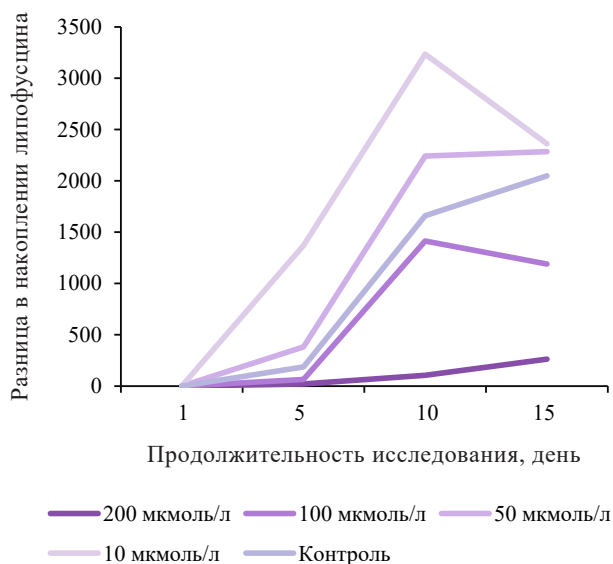


Рисунок 7. Разница в накоплении липофусцина в организме *Caenorhabditis elegans* под действием байкалина на протяжении эксперимента по отношению к первому дню измерений

Figure 7. Lipofuscin accumulation in *Caenorhabditis elegans* during baicalin treatment: experiment days 1–15

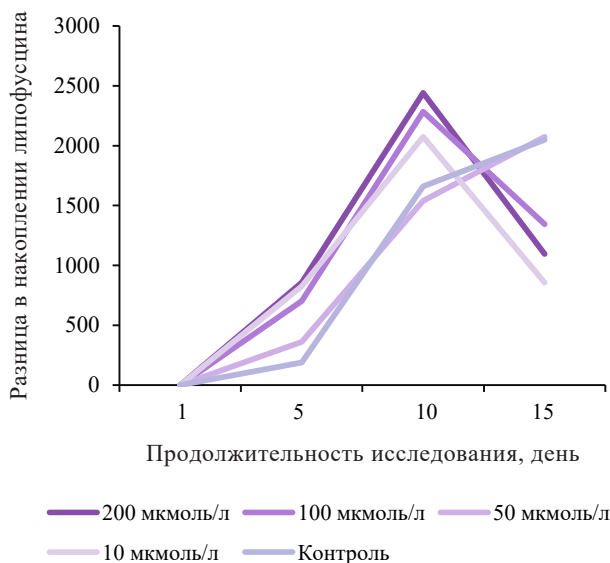


Рисунок 8. Разница в накоплении липофусцина в организме *Caenorhabditis elegans* под действием транс-коричной кислоты на протяжении эксперимента по отношению к первому дню измерений

Figure 8. Lipofuscin accumulation in *Caenorhabditis elegans* during treatment with trans-cinnamic acid: experiment days 1–15

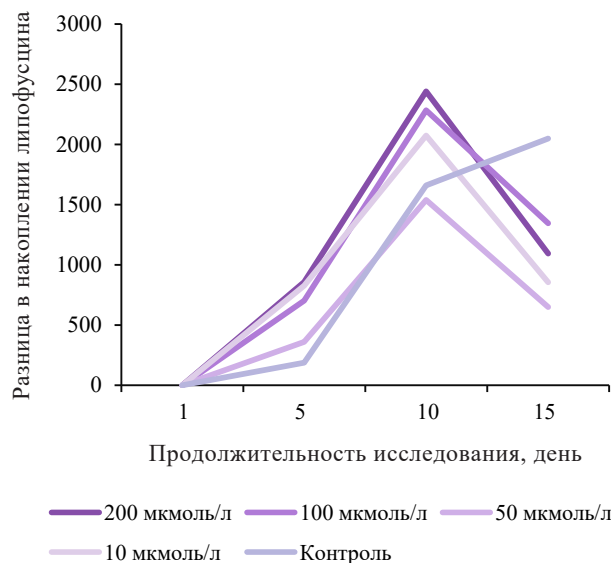


Рисунок 9. Разница в накоплении липофусцина в организме *Caenorhabditis elegans* под действием урсоловой кислоты на протяжении эксперимента по отношению к первому дню измерений

Figure 9. Lipofuscin accumulation in *Caenorhabditis elegans* during treatment with ursolic acid: experiment days 1–15

является концентрационно зависимым. Байкалин (100 и 200 мкмоль/л) продемонстрировал уменьшение накопления липофусцина уже на 5-й день после добавления к нематодам. Биологически активные вещества стабильно сдерживали накопление липофусцина в нематодах до конца 15-дневного эксперимента. Транс-коричная кислота наиболее эффективно снижает накопление липофусцина при низких концентрациях, а именно на 68,3 % при 50 мкмоль/л и на 58,2 % при 10 мкмоль/л на 15-й день измерений флуоресценции. Наиболее эффективным в ингибировании накопления липофусцина оказалась урсоловая кислота как на протяжении всего 15-дневного эксперимента, так и в диапазоне всех испытанных концентраций. Наибольшие значения в разнице накопления липофусцина по отношению к начальным значениям через 1 день после обработки биологически активными веществами показаны для его концентрации 50 мкмоль/л. Урсоловая кислота в теле нематод приводит к уменьшению накопления жира и уменьшению количества активных форм кислорода, независимо от активации супероксиддисмутазы.

В работе В. Г. Банзаракшеева исследовали комплексное фитосредство на показатели перекисного окисления липидов [35]. Данное фитосредство включает: цветки *Calendula officinalis* L., плоды *Crataegus sanguinea* Pall., корни *Scutellaria baicalensis* Georgi, плоды *Malus baccata* (L.) Borkh., корневища *Glycyrrhiza glabra* L., цветки и плоды *Rosa* sp., слоевище *Cetraria islandica* (L.) Ach. и др. Фитосредство на фоне введения адреналина, вызывающего расстройство уг-

леводного и липидного метаболизма, ингибирует процессы перекисного окисления липидов и повышает эндогенные резервы антиоксидантной защиты у крыс.

S. Tang и соавторы изучали эффект урсоловой кислоты против ожирения у крыс [36]. Для этого перорально вводили дозу урсоловой кислоты (2,5, 5 и 10 мг/кг) крысам с гипергликемией в течение 8 недель и оценивали уровень глюкозы в крови через различные промежутки времени. У крыс, получавших урсоловую кислоту, наблюдалось снижение окислительного стресса в обработанной ткани поджелудочной железы за счет восстановления эффекта удаления свободных радикалов.

Выводы

Нейропротекторная активность всех испытанных биологически активных веществ падала с уменьшением их концентрации от 200 до 10 мкмоль/л. Показана зависимость продолжительности защиты парализованных нематод в результате нейротоксического действия бета-амилоида Aβ(1–42) от длительности инкубации животных в присутствии биологически активных веществ при более высокой температуре 25 °С. Для всех изученных биологически активных веществ она уменьшалась при увеличении длительности экспозиции в диапазоне от 18 до 62 часов инкубации.

Caenorhabditis elegans в большей степени устойчивы к температурному стрессу, если они предварительно обработаны биологически активными веществами. Обнаружено значительно меньшее количество умерших животных, в этом случае, к концу экспери-

мента, по сравнению с длительной инкубацией нематод в присутствии биологически активных веществ, обработанных после повышения температуры. Нематоды более активно экспрессируют SOD-3, по сравнению с HSP-16.2, в ответ на температурный стресс, увеличивая уровень экспрессии SOD-3 с 1,7- и до 2,1-кратных размеров, по сравнению с увеличением экспрессии HSP-16.2 от 1,5 до 1,6 раз.

Все протестированные биологически активные вещества продемонстрировали снижение уровня карбонилированных белков при концентрациях 100 мкмоль/л. Наибольшее влияние на снижение уровня карбонилирования белков в теле нематод, по сравнению с контролем оказала урсоловая кислота. Уровень снижения карбонилированных белков под влиянием урсоловой кислоты в концентрации 100 мкмоль/л сравним с уровнем блокирования реакции карбонилирования белков в присутствии положительного контроля – 0,2 М борогидрида натрия (NaBH_4), который специфически связывается только с карбонильной группой у белков, демонстрируя высокую избирательность взаимодействия урсоловой кислоты с карбонилированными белками в теле нематод.

Накопление липофусцина под влиянием всех испытанных биологически активных веществ, выделенных

из лекарственных растений, является концентрационно зависимым. Байкалин продемонстрировал уменьшение накопления липофусцина уже на 5-й день после добавления к нематодам. Наиболее эффективным в ингибировании накопления липофусцина оказалась урсоловая кислота как на протяжении всего 15-дневного эксперимента, так и в диапазоне всех испытанных концентраций.

Критерии авторства

Все авторы внесли равный вклад в исследование и несут равную ответственность за информацию, опубликованную в данной статье.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

All authors have contributed equally to the study and are equally responsible for the information published in this article.

Conflict of interest

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

References/Список литературы

1. Lissek T. Aging, adaptation and maladaptation. *Frontiers in Aging*. 2023;4:1256844. <https://doi.org/10.3389%2Ffrontiers.2023.1256844>
2. Sukhikh S, Babich O, Prosekov A, Patyukov N, Ivanova S. Future of Chondroprotectors in the Treatment of Degenerative Processes of Connective Tissue. *Pharmaceuticals*. 2020;13(9):220. <https://doi.org/10.3390/ph13090220>
3. Milentyeva IS, Le VM, Kozlova OV, Velichkovich NS, Fedorova AM, Loseva AI, et al. Secondary metabolites in vitro cultures of Siberian medicinal plants: Content, antioxidant properties, and antimicrobial characteristics. *Foods and Raw Materials*. 2021;9(1):153–163. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2021-1-153-163>; <https://elibrary.ru/ORGCXI>
4. Chakraborty A, Chowdhury S, Bhattacharyya M. Effect of metformin on oxidative stress, nitrosative stress and inflammatory biomarkers in type 2 diabetes patients. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2011;93(1):56–62. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2010.11.030>
5. Danyo EK, Ivantsova MN, Selezneva IS. Ionizing radiation effects on microorganisms and its applications in the food industry. *Foods and Raw Materials*. 2024;12(1):1–12. <http://doi.org/10.21603/2308-4057-2024-1-583>; <https://elibrary.ru/XICYHK>
6. Bodega G, Alique M, Puebla L, Carracedo J, Ramirez R. Microvesicles: ROS scavengers and ROS producers. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2019;8(1):1626654. <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1626654>
7. Suleman M, Khan A, Baqi A, Kakar MS, Samiullah, Ayub M. Antioxidants, its role in preventing free radicals and infectious diseases in human body. *Pure and Applied Biology*. 2019;8(1):380–388. <http://doi.org/10.19045/bspab.2018.700197>
8. Okpoghono J, Ukperegbulem JK, Igue UB. Anti-lipidemic and protein restoration potential of *Monodora myristica* (Gaertn.) in rats fed with cassava containing crude oil. *Foods and Raw Materials*. 2024;12(2):249–255. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2024-2-602>; <https://elibrary.ru/LDHZWE>
9. Yanase S, Yasuda K, Ishii N. Interaction between the ins/IGF-1 and p38 MAPK signaling pathways in molecular compensation of sod genes and modulation related to intracellular ROS levels in *C. elegans*. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2020;23:100796. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2020.100796>
10. Thimraj TA, George L, Asrafuzzaman S, Upadhyay S, Ganguly K. Oxidative signaling in chronic obstructive airway diseases. In: Chatterjee S, Jungraithmayr W, Bagchi D, editors. *Immunity and Inflammation in Health and Disease*. Academic Press; 2018. pp. 79–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805417-8.00007-X>

11. Wang J, Deng N, Wang H, Li T, Chen L, Zheng B, *et al.* Effects of orange extracts on longevity, healthspan, and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Molecules*. 2020;25(2):351. <https://doi.org/10.3390/molecules25020351>
12. Milentyeva IS, Vesnina AD, Fedorova AM, Ostapova EV, Larichev TA. Chlorogenic Acid and Biohanin 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>; <https://elibrary.ru/GGYCQG>
13. Funikov SYu, Garbuz DG, Zatsepina OG. Kinetics of heat-shock response upon dysfunction of general transcription factor (HSF). *Molecular Biology*. 2014;48(2):263–269. <https://doi.org/10.1134/S0026893314020058>
14. Malik P, Mukherjee TK. Immunological methods for the determination of AGE-RAGE axis generated glutathionylated and carbonylated proteins as oxidative stress markers. *Methods*. 2022;203:354–363. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2022.01.011>
15. Kuzmic M, Javot H, Bonzom J-M, Lecomte-Pradines C, Radman M, Garnier-Laplace J, *et al.* *In situ* visualization of carbonylation and its co-localization with proteins, lipids, DNA and RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical Biology and Medicine*. 2016;101:465–474. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.004>
16. Chondrogianni N, Georgila K, Kourtis N, Tavernarakis N, Efstathios SG. Enhanced proteasome degradation extends *Caenorhabditis elegans* lifespan and alleviates aggregation-related pathologies. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014;75:S18. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.632>
17. Amir M, Vohra M, Raj RG, Osoro I, Sharma A. Adaptogenic herbs: A natural way to improve athletic performance. *Health Sciences Review*. 2023;7:100092. <https://doi.org/10.1016/j.hsr.2023.100092>
18. Kumar S, Singh B, Bajpai V. *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees: Traditional uses, phytochemistry, pharmacological properties and quality control/quality assurance. *Journal of Ethnopharmacology*. 2021;275:114054. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114054>
19. Yoon SJ, Kim SK, Lee NYo, Choi YeR, Kim HS, Gupta H, *et al.* Effect of Korean Red Ginseng on metabolic syndrome. *Journal of Ginseng Research*. 2021;45(3):380–389. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2020.11.002>
20. Babich O, Sukhikh S, Pungin A, Ivanova S, Asyakina L, Prosekov A. Modern Trends in the In Vitro Production and Use of Callus, Suspension Cells and Root Cultures of Medicinal Plants. *Molecules*. 2020;25(24):5805. <https://doi.org/10.3390/molecules25245805>
21. Sergeeva IY, Permyakova LV, Mukhlynina EA, Anshukov AV. Influence of Trypsin Hydrolysate of Yeast, Activated with *Atriplex sibirica* L. Extract, on Cytotoxicity and Accumulation of Vitamin D. *Biotekhnologiya*. 2023;39(6):108–118. <https://doi.org/10.56304/S0234275823060091>; <https://elibrary.ru/YUBXLW>
22. 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. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-3-2388>
23. Altintas O, Park S, Lee S-JV. The role of insulin/IGF-1 signaling in the longevity of model invertebrates, *C. elegans* and *D. melanogaster*. *BMB reports*. 2016;49(2):81–92. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2016.49.2.261>
24. 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)
25. 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>; <https://elibrary.ru/ZVCUW>
26. Meneely PM, Dahlberg CL, Rose JK. Working with worms: *Caenorhabditis elegans* as a model organism. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. 2019;19(1):e35. <https://doi.org/10.1002/cpet.35>
27. Tseverelakis GJ, Megalou EV, Filippidis G, Petanidou B, Fotakis C, Tavernarakis N. Label-free imaging of lipids depositions in *C. elegans* using third-harmonic generation microscopy. *PLOS One*. 2014;9(1):e84431. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084431>
28. Negi H, Saikia SK, Pandey R. 3 β -Hydroxy-urs-12-en-28-oic Acid Modulates Dietary Restriction Mediated Longevity and Ameliorates Toxic Protein Aggregation in *C. elegans*. *The Journals of Gerontology: Series A*. 2017;72(12):1614–1619. <https://doi.org/10.1093/gerona/glx118>
29. Yue Z, Liu H, Liu M, Wang N, Ye L, Guo C, *et al.* *Cornus officinalis* Extract Enriched with Ursolic Acid Ameliorates UVB-Induced Photoaging in *Caenorhabditis elegans*. *Molecules*. 2024;29(12):2718. <https://doi.org/10.3390/molecules29122718>
30. Tu X-k, Yang W-z, Shi S-s, Wang C-h, Chen C-m. Neuroprotective effect of baicalin in a rat model of permanent focal cerebral ischemia. *Neurochemical Research*. 2009;34:1626–1634. <https://doi.org/10.1007/s11064-009-9953-4>
31. Li H, Cong X, Yu W, Jiang Z, Fu K, Cao R, *et al.* Baicalin inhibits oxidative injures of mouse uterine tissue induced by acute heat stress through activating the Keap1/Nrf2 signaling pathway. *Research in Veterinary Science*. 2022;152:717–725. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.10.005>

32. Yang Yi, Li C, Liu N, Wang M, Zhou X, Kim IH, et al. Ursolic acid alleviates heat stress-induced lung injury by regulating endoplasmic reticulum stress signaling in mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2021;89:108557. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108557>
33. Abilov PM, Iriskulov BU, Boboeva ZN, Saydalikhodjaeva OZ. Analysis of the effectiveness of the use of a new drug based on *Ganoderma lucidum* and *Alkhadai* in the treatment of coronavirus infection caused by COVID-19. *Journal of Hunan University (Natural Sciences)*. 2022;49(3):604–611.
34. Salau VF, Erukainure OL, Ayeni G, Ibeji CU, Islam MdS. Modulatory effect of ursolic acid on neurodegenerative activities in oxidative brain injury: An *ex vivo* study. *Journal of Food Biochemistry*. 2021;45:e13597. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13597>
35. Banzarakshiev VG. The influence of the complex phytoremedy on the indicators of lipid peroxidation and anti-oxidant protection in adrenalin-induced dyslipoproteinemias. *Bashkortostan Medical Journal*. 2012;7(5):72–74. (In Russ.). [Банзarakshiev В. Г. Влияние комплексного фитосредства на показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты при адреналиновой дислипидопроteinемии // Медицинский вестник Башкортостана. 2012. Т. 7. № 5. С. 72–74.]. <https://elibrary.ru/PLLIPJ>
36. Tang S, Fang C, Liu Yu, Tang L, Xu Yu. Anti-obesity and Anti-diabetic Effect of Ursolic Acid against Streptozotocin/High Fat Induced Obese in Diabetic Rats. *Journal of Oleo Science*. 2022;71(2):289–300. <https://doi.org/10.5650/jos.ess21258>