

RESEARCH

Open Access



An extract of *Rosaceae*, *Solanaceae* and *Zingiberaceae* increases health span and mobility in *Caenorhabditis elegans*

Samantha Hughes^{1,2}, Nikki Kolsters¹, David van de Klashorst¹, Emanuel Kreuter³ and Karin Berger Bütler^{3*}

Zusammenfassung

Hintergrund: Den Mitgliedern der Familien Rosaceae, Solanaceae und Zingiberaceae, zu denen Früchte wie Kirschen, Tomaten und Ingwer gehören, werden gesundheitsfördernde Wirkungen nachgesagt. Es besteht ein wachsendes Interesse am Verzehr dieser "funktionellen Lebensmittel" als Mittel zur Förderung der Gesundheit und des gesunden Alterns. Viele Studien untersuchen jedoch die Wirkung dieser Lebensmittel isoliert und nicht als Mischung mehrerer funktioneller Lebensmittel.

Methoden: In dieser Studie wurde ein Extrakt aus den getrockneten Beeren, Früchten und Wurzeln von Mitgliedern dieser Familien hergestellt, den wir Bioact®180 nannten. Der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* wurde verwendet, um die Auswirkungen von Bioact®180 auf die Lebensspanne und gesundheitliche Endpunkte, einschließlich Muskel- und Mitochondrienstruktur und Fortbewegung, zu bewerten.

Ergebnisse: Die Exposition gegenüber dem 1000 µg/ml Bioact®180-Extrakt, der 4 % Gesamtphenole enthält, war gesünder, was sich in einer Erhöhung der mittleren Lebensspanne und einer kleinen, aber signifikanten Erhöhung der maximalen Lebensspanne zeigte. Nematoden, die Bioact®180 ausgesetzt waren, zeigten eine bessere Mobilität im mittleren Lebensstadium sowie eine verbesserte mitochondriale Morphologie, die eher mit den jüngeren Tieren vergleichbar war, was darauf hindeutet, dass diese Würmer bis zu einem gewissen Grad vor Sarkopenie geschützt sind.

Schlussfolgerungen: Zusammengefasst zeigen unsere Ergebnisse, dass Bioact®180, eine Mischung aus Früchten und Wurzeln von Mitgliedern der Familien Rosaceae, Solanaceae und Zingiberaceae, Anti-Aging-Effekte hat. Bioact®180 fördert die Gesundheit und die Verlängerung der Lebensspanne von *C. elegans*, was mit funktionellen Verbesserungen der Mobilität einhergeht.

Schlüsselwörter: *C. elegans*, Gesundheitsspanne, Pflanzenextrakt, Sarkopenie, Muskel, Mitochondrien

Einleitung

Mit zunehmendem Alter des Menschen kommt es zu einem fortschreitenden Verlust der physiologischen Integrität und einer Abnahme der Funktionen, wodurch das Risiko chronischer Krankheiten wie Diabetes, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs steigt [1]. In unserer alternden Gesellschaft achten immer mehr Menschen darauf, wie sie ihre Lebensqualität steigern können, und zwar durch den vermehrten Verzehr von frischem Obst und Gemüse. Eine Ernährung, die reich an Lebensmitteln mit einem hohen Gehalt an Antioxidantien und Polyphenolen ist, wie sie in frischem Obst und Beeren zu finden sind, wird dem Schutz vor Herz-Kreislauf-Erkrankungen [2, 3] und mit antimikrobiellen [4], entzündungshemmenden [5] und krebshemmenden [6] Eigenschaften.

*Korrespondenz: kberger@bb-international.ch

3 Bioactive Botanicals Swiss AG, Emelgarten 6, 8592 Uttwil, Schweiz Die vollständige Liste der Autoren finden Sie am Ende des Artikels

In letzter Zeit werden Nahrungsergänzungsmittel immer häufiger als Alternative zur Erhaltung der Gesundheit und zur Vorbeugung von Krankheiten eingesetzt [7]. Die Untersuchung der gesundheitsfördernden Wirkung von Nahrungsergänzungsmitteln ist eine Herausforderung, die jedoch mit Hilfe des 1 mm langen Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* überwunden werden kann. *C. elegans* ist ein nicht-parasitärer, genetisch vertretbarer Modellorganismus, der eine einfache physiologische Struktur und einen kurzen Lebenszyklus aufweist. Wenn Nematoden altern, zeigen sie eine Verringerung der Muskelmasse und -kraft (Sarkopenie), die mit der eines alternden Menschen vergleichbar ist [8]. Auch die Bewegungsfähigkeit nimmt ab, was auf die fortschreitende Desorganisation von Myofibrillen und Verlust von Myosinfilamenten zurückzuführen ist [8, 9].

Diese Eigenschaften machen *C. elegans* zu einem idealen Modell für die Untersuchung von Naturstoffen, die die Lebensspanne verlängern, und für die Erforschung ihrer positiven Auswirkungen auf die Gesundheit [10–15]. In der Tat gibt es eine ganze Reihe bioaktiver Pflanzenmoleküle, die nachweislich die Lebensspanne von *C. elegans* verlängern [16], und viele davon werden bereits entweder als Frucht oder als Nahrungsergänzungsmittel verzehrt. Auffallend ist, dass viele der Verbindungen, die sich positiv auf die Lebensspanne auswirken, auch eine positive Wirkung auf die Gesundheitsspanne haben, d. h. die physiologischen Funktionen verbessern [14, 17, 18].

Diätetische Maßnahmen sind eine nicht-genetische Möglichkeit zur Beeinflussung der Gesundheit und der Lebensspanne, wobei viele natürliche bioaktive Substanzen über den Insulin-Signalweg wirken. Der hochkonservierte Insulinsignalweg ist für die Regulierung der Lebensspanne von wesentlicher Bedeutung, insbesondere der Transkriptionsfaktor FoxO [19], der nachweislich aktiv und im Zellkern lokalisiert ist, wo er den Energieabbau und die Stressresistenz fördert [20]. In *C. elegans* wird das einzige FoxO-Homolog, DAF-16, in den Zellkern verlagert, wenn die Nematoden funktionellen Nahrungsmitteln ausgesetzt werden, die die Lebensspanne erhöhen, darunter Granatapfel [12], reiner Weizen [21], Heidelbeeren [22] und Himbeeren [15].

Bislang wurden die gesundheitsfördernden Wirkungen so genannter funktioneller Lebensmittel nur isoliert untersucht. Es besteht jedoch ein wachsendes Interesse an der Herstellung von Nahrungsergänzungsmitteln aus Mischungen verschiedener funktioneller Lebensmittel [23, 24]. Ziel unserer Studie war es daher, die Wirkungen einer Mischung aus Extrakten von Früchten, Kräutern und Wurzeln von Pflanzen der Rosaceae, Solanaceae und Zingiberaceae zu untersuchen, die wir als Bioact®180 bezeichnet haben. Die Familie Rosaceae besteht aus über 3000 Arten, darunter Kirschen, Pflaumen, Erdbeeren und Brombeeren, die bekanntermaßen die besten Nahrungsquellen für bioaktive Substanzen darstellen [25]. Mitglieder dieser Familie haben gesundheitsfördernde Wirkungen bei *C. elegans* gezeigt, darunter Kirschen [10] und *Damnacanthus officinarum* [26]. In ähnlicher Weise haben die Mitglieder der Solanaceae-Familie auch eine positive Wirkung auf die Gesundheit, wenn sie an Nematoden getestet werden, insbesondere Tomaten [27]. Eines der berühmtesten Mitglieder der Familie der Zingiberaceae, das für seine gesundheitsfördernde Wirkung bekannt ist, ist vielleicht Ingwer. Wie andere Kräuter und Gewürze besitzt Ingwer antioxidative, entzündungshemmende und antikarzinogene Eigenschaften [17], wobei Ingwerextrakte bei *C. elegans* eine lebensverlängernde Wirkung haben [28].

Hier haben wir die biologische Wirkung von Bioact®180 bei *C. elegans* beobachtet und festgestellt, dass sich die Gesamtlebensdauer der Fadenwürmer zwar nur geringfügig, aber signifikant verlängert hat, wobei die Gesundheitsspanne deutlich und auffallend zunahm. Es gab keine

auffällige Aktivierung des Insulin-Signalwegs durch DAF-16, was darauf hindeutet, dass die Mischung über einen unabhängigen oder parallelen Weg wirkt. Wir beobachteten jedoch eine positive Wirkung auf die Mobilität und Erhaltung der Muskel- und Mitochondrienstruktur in *C. elegans*, wenn die Würmer in Gegenwart des Pflanzenextrakts gezüchtet wurden. Zusammengenommen deuten unsere Daten darauf hin, dass Bioact®180 positive gesundheitliche Vorteile für den Fadenwurm hat.

Materialien und Methoden

Herstellung des Bioact®180-Extrakts

Ein speziell formulierter Pflanzenextrakt (Bioact®180) wurde von der Bioactive Botanicals Swiss AG, Uttwil, Schweiz (BBS) zur Verfügung gestellt. Er wurde nach den Normen des Europäischen Arzneibuchs (Ph. Eur.) aus 50,42 g getrockneten Beeren, Früchten und Wurzeln von Mitgliedern der Familien Rosaceae, Solanaceae und Zingiberaceae in pharmazeutischer Qualität hergestellt. Diese wurden mit 40 % (m/m) Ethanol in einem Verhältnis von 9-11:1 extrahiert. Die erhaltene Mischung wurde 1 Stunde lang gerührt und anschließend bei 15–18 °C in einem luftdichten Behälter lichtgeschützt gelagert. Nach einer Woche wurden 50,0 g konzentrierter Fruchtsaft mit einem Feststoffgehalt von 51 % zugegeben, sorgfältig vermischt und erneut eine Woche gelagert. Dann wurde die Zubereitung über einen Tiefschicht-Zellulosefilter (AF 15 Filtrox) filtriert, wobei ein dunkelrotbrauner, klarer Flüssigextrakt entstand. Der filtrierte Flüssigextrakt wurde auf einem Rotationsverdampfer bei einer Badtemperatur von 40 °C unter vermindertem Druck zu einem zähflüssigen Spissum-Extrakt eingedampft und schließlich im Vakuumofen bei 40 °C und 25 mbar getrocknet. Der Kräuterextrakt ist durch ein Drogen-Extrakt-Verhältnis (DER) von 3-5:1 gekennzeichnet.

Quantifizierung des Gesamtphenolgehalts

Der Gesamtphenolgehalt von Bioact®180 wurde mit dem Folin-Ciocalteu-Reagenz unter Verwendung von Pyrogallol als Referenz bestimmt, entsprechend der im Europäischen Arzneibuch beschriebenen Methode zur Bestimmung von Tanninen in pflanzlichen Arzneimitteln. Der Extrakt wies einen Gesamtphenolgehalt von 4 % auf.

Caenorhabditis elegans-Stämme und Erhaltung der Würmer

Die in dieser Studie verwendeten *C. elegans*-Stämme wurden vom Caenorhabditis Genetics Centre (CGC) zur Verfügung gestellt. Alle Stämme wurden bei 20 °C auf Nematodenwachstumsmedium (NGM) gehalten, das mit einem Rasen aus *E. coli* OP50 nach Standardprotokollen [29] besät war.

Um eine synchrone Wurm-Population zu erzeugen, wurden die graviden Würmer nach Standardprotokollen gebleicht [30]. Kurz gesagt wurden die graviden Würmer einer alkalischen Hypochloritlösung (4 mL 5% Natriumhypochlorit, 1 mL 4 M Natriumhydroxid, 5 mL dH₂O) ausgesetzt, um die befruchteten Embryonen freizusetzen. Die Hypochloritlösung wurde durch Waschen mit M9-Puffer entfernt. .

Die Eier wurden über Nacht bei 15 °C in M9-Puffer in Abwesenheit einer Nahrungsquelle zum Schlüpfen gebracht, wodurch eine Population synchronisierter L1-Larven entstand.

Herstellung von mit Bioact®180 supplementiertem NGM

Bioact®180 wurde von BBS als Trockenpulver zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden in einer DMSO-Wasser-Mischung gelöst und dann dem geschmolzenen NGM in der gewünschten Konzentration zugesetzt. In allen Fällen betrug die endgültige DMSO-Konzentration 0,2 %

Lokalisierung von DAF-16::GFP

Die intrazelluläre Lokalisierung von DAF-16 wurde mit dem Stamm TJ356 und auf der Grundlage der in Buchter et al. [31] beschriebenen Methode beobachtet. Synchronisierte L1-Tiere wurden auf OP50-besetzte Platten gesetzt, die mit Bioact®180 supplementiert wurden und sich bis L4 entwickeln konnten. Zu diesem Zeitpunkt wurden 100 Tiere auf die Verteilung von DAF-16::GFP entweder im Zytoplasma oder im Zellkern untersucht, wobei diejenigen Nematoden, die sowohl eine zytoplasmatische als auch eine nukleäre Lokalisierung von DAF-16::GFP aufwiesen, als "intermediär" eingestuft wurden. Dies geschah unter Verwendung eines Leica M165FC-Mikroskops (bei 460-495 nm Anregungs- und 510-550 nm Emissionswellenlänge) bei 20facher Vergrößerung. Parallel dazu wurden 5 L4-Würmer auf eine neu besetzte Platte mit Bioact®180 versetzt und zur Eiablage gebracht. Die nächste Generation (F1) von Nachkommen durfte sich zu L4 entwickeln, wenn die DAF-16::GFP-Lokalisierung bei 100 Tieren beobachtet wurde. In beiden Fällen werden die Daten als Prozentsatz der Population in jeder Kategorie angegeben.

Untersuchung der Lebensspanne

Für die Analyse der Lebensspanne bei 20 °C wurde der synchronisierte Wildtyp-Stamm N2 auf mit OP50 besetztem NGM zu L4 herangezogen. Die synchronisierten L4-Tiere wurden auf mit Bioact®180 besetzte NGM-Platten übertragen, was dem Tag 0 des Überlebensstests entspricht. Die Würmer wurden während der Reproduktionsphase täglich und danach alle 2 Tage übertragen. Die Würmer wurden jeden Tag visuell auf ihren Tod hin untersucht. Wenn sich der Wurm nicht bewegte, wurde er mit einem Platindraht sanft auf den Kopf geklopft. Der Wurm wurde als tot eingestuft, wenn er auf diese Berührung nicht reagierte. Es ist zu beachten, dass das Experiment zur Lebenserwartung nicht blind durchgeführt werden konnte, da Bioact®180 eine leichte Färbung des NGM verursacht. Überlebenskurven wurden mit GraphPad Prism v9 erstellt und mit OASIS2 (Online-Anwendung für Überlebensanalysen) analysiert [32, 33]. OASIS berechnet die prozentuale Alterssterblichkeit, wobei sich die 100%ige Sterblichkeit auf die maximale Lebensspanne bezieht und als signifikant angesehen wurde, wenn der Log-Rank-Test (Mantel-Cox-Test) verwendet wurde, so dass $p < 0,0055$ (Bonferroni-Korrekturen). Die mittlere Lebenserwartung (als eingeschränkter Mittelwert, der sich auf die Fläche unter der Überlebenskurve bezieht) kann mit dem exakten Test

Fisher weiter bewertet werden, wobei $p < 0,05$ bei 50 % signifikant ist. Es wurde eine biologische Wiederholung der Daten durchgeführt, nicht aber eine technische Wiederholung.

Morphologie der Muskeln

Zur Beurteilung der Muskelmorphologie wurden die Würmer des Stamms RW1596 auf die gleiche Weise wie die N2-Tiere für die Analyse der Lebensspanne vorbereitet. An den Tagen 4 und 8 wurden die Würmer zur Beobachtung und Mikroskopie geopfert ($n \geq 85$ für jede Bedingung). Die Tiere wurden auch eine weitere Woche bis zum Tag 15 nach L4 gehalten, bevor ihre Muskelmorphologie beobachtet wurde ($n \geq 19$). In allen Fällen wurden die Würmer über vier unabhängige Experimente beobachtet und die Daten kombiniert. Die Morphologie der Muskelfasern wurde nach Ryu et al. [18] so klassifiziert, dass "linear" auf gut organisierte Muskelfasern hinweist, die in parallelen Linien verlaufen, während die Klassifizierung "fragmentiert" gegeben wurde, wenn ein hohes Maß an Unterbrechung vorliegt und die Fasern nicht linear und verkürzt sind. Die Daten sind als Prozentsatz der Population in jeder Kategorie angegeben.

Mitochondriale Morphologie

Der Stamm SD1347 wurde verwendet, um das mitochondriale Netzwerk in Würmern zu beobachten, die Bioact®180 ausgesetzt waren. Das Experiment wurde auf die gleiche Weise vorbereitet wie die Analyse der Lebensspanne und der Muskelmorphologie. An den Tagen 4 und 8 wurden die Würmer für die Beobachtung und Mikroskopie in 2 unabhängigen Experimenten ($n \geq 39$ für jede Bedingung) geopfert. Die Morphologie der Mitochondrien wurde bestimmt als linear, intermediär und fragmentiert [34, 35]. Die Mitochondrien waren "linear", wenn die Mitochondrienetze lang und zusammenhängend waren, aber wenn das Netz stark unterbrochen war und die Mitochondrien als geschwollene kurze Fasern erschienen, wurde dies als "fragmentiert" beschrieben. Eine "intermediäre" Klassifizierung wurde vorgenommen, wenn in ein und derselben Zelle eine Mischung aus langen, zusammenhängenden Netzen und einer gewissen Fragmentierung vorlag. Die Daten sind als Prozentsatz der Population in jeder Kategorie angegeben.

Körperbiegeversuch

Die Würmer wurden bei Raumtemperatur in einem Tropfen M9-Puffer auf eine unbesiedelte NGM-Platte gelegt. Filme von strampelnden Würmern wurden mit einem Leica S8aPO Stereomikroskop mit Leica DMC2900 Kamera und der LAS v4.12 Software für 90 s aufgenommen. Die Biegungen pro Minute wurden mit dem Worm Tracker Plugin (wrMTrck) der ImageJ Software [36] ermittelt. Die Diagramme wurden mit GraphPad Prism v9 erstellt. Die Daten wurden in einer biologischen Wiederholung

erhoben, mit $n \geq 15$ an Tag 4 und $n \geq 10$ an Tag 8.

Mikroskopie

Die Würmer wurden auf 2%ige Agarosepads in 0,1%igem Natriumazid montiert. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem Zeiss Imager.M2 Mikroskop durchgeführt, und die Fotomikrografien wurden mit einem $\times 63$ Objektiv (Zeiss) und der Zeiss Zen 2012 Blue Software aufgenommen. Die Bilder von DAF-16::GFP wurden mit einem Leica DMI8 und der LASx-Software aufgenommen. Repräsentative Bilder von allen Tieren wurden mit Adobe Photoshop 7.0 und Adobe Illustrator zusammengestellt.

Ergebnisse

Bioact®180 verlängert die mittlere und gesamte Lebensspanne von *C. elegans*.

Das Interesse an den gesundheitsfördernden Vorteilen von Nahrungsergänzungsmitteln wächst, insbesondere an solchen, die die Gesundheit in der mittleren bis späten Lebensphase erhalten [8]. Ziel unserer Studie war es daher, die Wirkung des Präparats Bioact®180, das getrocknete Beeren, Früchte und Wurzeln von Pflanzenspezies der Familien Rosaceae, Solanaceae und Zingiberaceae enthält, auf verschiedene Aspekte der Gesundheit zu untersuchen, wobei *C. elegans* als Modellorganismus diente. Wir fanden heraus, dass Wildtyp-Würmer eine maximale Lebensdauer von 27 Tagen nach L4 hatten, während die Tiere, die NGM mit 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Bioact®180 ausgesetzt waren, eine leichte Reduzierung der maximalen Lebensdauer aufwiesen. Umgekehrt wurde bei den Nematoden, die erhöhten Konzentrationen von Bioact®180 (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ausgesetzt waren, eine kleine, 11%ige, aber signifikante Erhöhung der maximalen Lebensspanne festgestellt, die maximal 30 Tage betrug (Abb. 1a und Tabelle 1). Die begrenzte mittlere Lebensdauer der Kontrolltiere betrug 11 Tage, die sich signifikant auf 15 Tage erhöhte, wenn die Würmer 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Bioact®180 ausgesetzt wurden (Abb. 1b, Tabelle 1). Diese 39%ige Verlängerung der mittleren Lebenserwartung deutet darauf hin, dass Bioact®180 in hohen Dosen einen gesundheitsfördernden Nutzen hat. Da Bioact®180 bei 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ den signifikantesten Effekt auf die Lebensspanne hatte, haben wir uns entschieden, diese Dosis genauer zu untersuchen. Die Rohdaten zur Lebensspanne wurden mit der OASIS-Software [32, 33] analysiert, die den eingeschränkten Mittelwert der Lebensspanne (die aus der Fläche unter der Kurve ermittelte durchschnittliche Überlebenszeit) mit Standardfehler und 95 % Konfidenzintervall (C.I.) sowie die beobachteten Tage, an denen 50 % und 100 % Mortalität auftraten, liefert. Die maximale Lebensdauer der Kontrolltiere betrug 27 Tage nach L4, und nur die höchste Konzentration von Bioact®180 verlängerte diese signifikant auf 30 Tage. Die eingeschränkte mittlere Lebensdauer betrug 11 Tage bei den Kontrolltieren im Vergleich zu 15 Tagen bei Tieren, die in Gegenwart von 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Bioact®180 gezüchtet wurden. Die Bonferroni-Korrektur wurde angewandt, um zu zeigen, wo die Veränderungen der Lebensspanne am signifikantesten waren. Diagramme zur Lebensspanne, siehe Abb. 1

Die Lokalisierung von DAF-16::GFP wird durch Bioact®180 nicht gestört

Die Lebensspanne wird bei Menschen, Nagern, Fliegen und Würmern unter anderem durch den konservierten Transkriptionsfaktor FoxO reguliert [19]. Wir untersuchten die Wirkung von Bioact®180 auf die Kerntranslokation von DAF-16, dem Nematoden-Homolog von FoxO, als Proxy für den positiven Einfluss von DAF-16 auf die Verlängerung der Lebensspanne. Durch die Verwendung eines transgenen Stammes, der das Fusionsprotein DAF-16::GFP exprimiert, konnte Fluoreszenz im Zytoplasma oder im Zellkern nachgewiesen werden (Abb. 2a), wobei die Lokalisierung im Zellkern auf eine Aktivierung des Insulinsignals hinweist [31]. Wie erwartet, befindet sich der Großteil der DAF-16::GFP-Expression unter normalen Bedingungen im Zytoplasma, und wenn *C. elegans* 2 % DMSO (die Positivkontrolle) ausgesetzt werden, zeigen 80 % der Tiere eine nukleäre Lokalisierung von DAF-16::GFP. Wenn *C. elegans* von L1 bis L4 in Anwesenheit von Bioact®180 gezüchtet werden, weist kein Tier eine nukleäre

Die Mehrheit der Tiere weist eine zytoplasmatische Lokalisierung von DAF-16::GFP auf und 10 % zeigen ein intermediäres Lokalisierungsmuster, d. h. DAF-16::GFP wird sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma beobachtet (Abb. 2b). In der nächsten Tiergeneration (Abb. 2c) zeigt sich ein Trend zur nukleären Expression, wobei 1 % der mit Bioact®180 exponierten Tiere eine nukleäre Lokalisierung und 21 % der Tiere eine intermediäre Lokalisierung des Transkriptionsfaktors aufweisen.

Würmer sind mobiler, wenn sie Bioact®180 ausgesetzt sind, wahrscheinlich aufgrund einer besseren Mitochondrienfunktion

Die Gesundheitsspanne ist der Zeitraum im Erwachsenenalter ohne körperliche Beeinträchtigung, der dem Alterungsprozess vorausgeht [8] und ist der Zeitraum, in dem ein Individuum bei guter Gesundheit und frei von Krankheiten ist [37]. Die Mobilität ist ein aussagekräftiger Indikator für die Gesundheit, da sich Würmer mit zunehmendem Alter weniger bewegen, ähnlich wie Menschen [38]. Da die mittlere und maximale Lebensspanne bei Würmern, die 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Bioact®180 ausgesetzt waren, erhöht war, wollten wir die positiven Auswirkungen der Exposition gegenüber Bioact®180 auf die Gesundheit anhand der Beobachtung der Mobilität untersuchen. Zu diesem Zweck wurde die Anzahl der Kopf-zu-Schwanz-Körperbiegungen (Thrashing) bei Wildtyp-Würmern (Stamm N2) an Tag 4 und 8 post-L4 ermittelt. Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der Körperbiegungen am Tag 4 zwischen der Kontrolle und den mit Bioact®180 exponierten Tieren, wobei die Würmer unter allen Bedingungen 46 Körperbiegungen pro Minute (BBPM) aufwiesen (Abb. 3). Im Gegensatz dazu wurden an Tag 8 signifikante Unterschiede beobachtet. Die Kontrolle ohne Wirkstoff wies an Tag 8 eine BBPM von 37 auf, eine signifikante Reduktion ($p = 0,001$) im Vergleich zu den Würmern an Tag 4. Interessanterweise hatte die DMSO-Kontrolle eine ähnliche Thrash-Rate wie die Kontrollwürmer an Tag 4 (47 BBPM), die an Tag 8 signifikant auf 41 BBPM ($p = 0,03$) reduziert war, was darauf hindeutet, dass DMSO allein die Fähigkeit hat, die Mobilität zu verbessern.

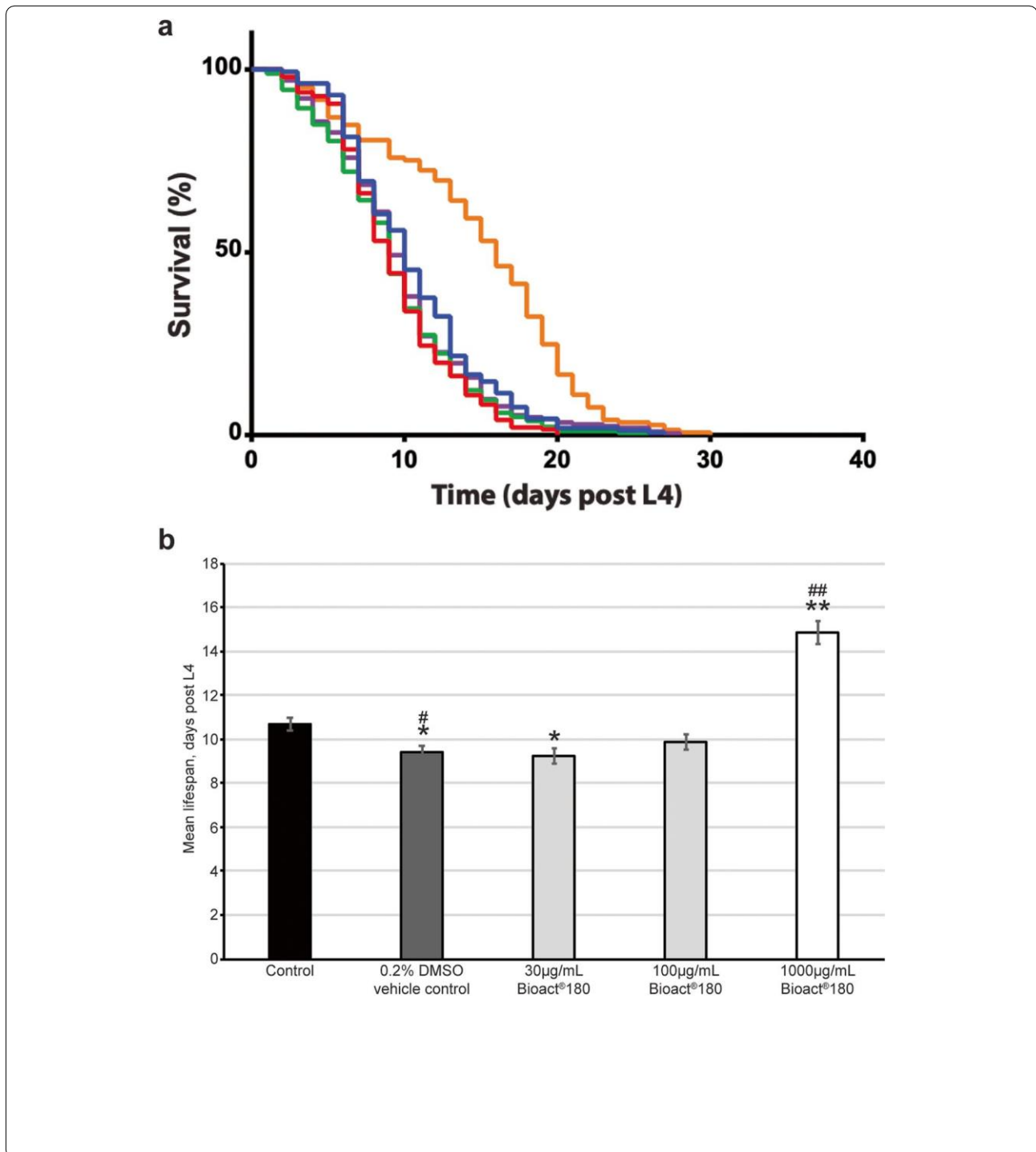


Fig. 1 Die Lebenserwartung verlängert sich, wenn die Würmer 1000 µg/mL Bioact®180 ausgesetzt werden. (a) Überlebenskurven von Wildtyp-Tieren (Stamm, N2), die mit Bioact®180 supplementiertem NGM exponiert wurden. Die Tiere unter Kontrollbedingungen (blaue Linie; n = 276) zeigen eine ähnliche Kurve wie die Tiere, die der Vehikelkontrolle (0,2% DMSO; rote Linie; n = 192), 30 µg/mL Bioact®180 (grüne Linie; n = 178) und 100 µg/mL Bioact®180 (violette Linie; n = 203) ausgesetzt waren. Die Exposition mit 1000 µg/mL Bioact®180 (orangefarbene Linie; n = 145) verschiebt die Kurve nach rechts und zeigt einen Anstieg der Gesundheitsspanne sowie einen leichten Anstieg der maximalen Lebensspanne. (b) Die eingeschränkte mittlere Lebensspanne wird aus den Überlebenskurven [32, 33] berechnet und hier dargestellt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts (s.e.m.) dar, und die statistischen Unterschiede wurden mit Hilfe des exakten Fisher-Tests bei 50 % Sterblichkeit mit der Kontrolle verglichen, wobei */##p < 0,05 und

**/##p < 0,001 und * vergleicht die Daten mit der Kontrolle ohne Wirkstoff und # mit der DMSO-Vehikelkontrolle. Alle Daten sind in Tabelle 1 näher beschrieben.

Tabelle 1 Bioact® 180 verbessert signifikant Gesundheit und Lebensdauer

Bioact®180 Konzentration	Anzahl Würmer	Alter in Tagen 100% Mortalität	Restricted mean			Bonferroni p Wert	
			Tage	Std. Fehler	95% C.I	To 0 µg/ml	To DMSO
0 µg/mL	276	27	11	0.28	10.13~11.23	-	0.0024
DMSO (0.2%)	192	20	9	0.27	8.87~9.93	0.0024	-
30 µg/mL Bioact®180	178	24	9	0.33	8.58~9.87	0.0071	1.000
100 µg/mL Bioact®180	203	28	10	0.34	9.18~10.52	0.4906	0.5754
1000 µg/mL Bioact®180	145	30	15	0.53	13.81~15.87	0.0000	0.0000

Auffallend ist, dass die Tiere, die 1000 µg/mL Bioact®180 ausgesetzt waren, keine Beeinträchtigung der Bewegung zeigten, wobei die Würmer an Tag 4 und an Tag 8 45 BBPM aufwiesen ($p = 0,854$). Dies ist ein weiterer Beleg dafür, dass Bioact®180 die Gesundheit der Nematoden verbessert. Als nächstes untersuchten wir die Sarkomerstruktur der mit Bioact®180 behandelten Tiere, um festzustellen, ob die Unterschiede in der Mobilität auf Veränderungen der Muskelstruktur zurückzuführen sind. Mit zunehmendem Alter der Würmer kommt es zu einer Sarkopenie, bei der sich die Muskelfaserorganisation verschlechtert und weniger parallel und stärker fragmentiert ist (Abb. 4a) [8, 9]. Mit einem Stamm, der einen *myo-3p::GFP*-Fluoreszenzreporter (RW1596) exprimiert, beobachteten wir das Aussehen der Muskelfasern am Tag 4, 8 und 15 der Exposition gegenüber Bioact®180. Unter Kontrollbedingungen (kein Wirkstoff und 0,2 % DMSO als Vehikelkontrolle) hatte die Mehrzahl der Muskelfasern ein regelmäßiges, glattes Aussehen, das mit zunehmendem Alter der Würmer fragmentierter wurde (Abb. 4b). Im Gegensatz dazu wiesen die Würmer, die mit 1000 µg/mL Bioact®180 exponiert wurden, an den Tagen 4 und 8 eine ähnliche Anzahl von Würmern mit regelmäßigen und unregelmäßigen Muskelfasern auf, während am Tag 15 kein Unterschied in der Muskelmorphologie zwischen exponierten und nicht exponierten Würmern zu erkennen war. Insgesamt zeigen unsere Daten, dass die erhöhte Thrash-Rate der Würmer auf dem Extrakt wahrscheinlich das Ergebnis eines anderen Mechanismus als der verbesserten Muskelfaser ist, wie z.B. eine verbesserte mitochondriale Funktion.

Die Morphologie der Mitochondrien wurde beobachtet, um einen Einblick in ihre Funktion zu erhalten. Während des Alterungsprozesses fragmentiert sich das mitochondriale Netzwerk als Folge des Alterungsprozesses [35]. Unter Bedingungen, die die Lebenserwartung erhöhen, verlangsamt sich der Alterungsprozess, so dass die Fragmentierung der

Mitochondrien langsamer erfolgt [35]. Würmer, die ein auf die Mitochondrien ausgerichtetes GFP in den Körperwandmuskelzellen exprimieren (Stamm SD1347), wurden mit 1000 µg/mL Bioact®180 ab dem L4-Stadium ausgesetzt, und die mitochondriale Morphologie an den Tagen 4 und 8 beobachtet. Die Morphologie der Mitochondrien wurde gemäß Regmi et al. [35] und Momma et al. [34] definiert, mit leichten Modifikationen: lange lineare Netzwerke wurden als linear klassifiziert, und eine fragmentierte Klassifizierung wurde den Netzwerken gegeben, bei denen die Mitochondrien kurz, runder und stark vom Netzwerk getrennt waren (Abb. 5a). Die Tiere, die weder vollständig linear noch vollständig fragmentiert waren, wurden als intermediär eingestuft.

Im L4-Stadium zeigen die Würmer eine lineare Organisation des mitochondrialen Netzwerks. Mit zunehmendem Alter der Würmer beginnt das Netzwerk zu fragmentieren, wobei nur 35 % der Kontrolltiere am 4. Tag lineare Mitochondrien aufwiesen, wobei die DMSO-Vehikelkontrolle und die mit 1000 µg/mL Bioact®180 exponierten Würmer eine ähnliche Morphologie aufwiesen (Abb. 5b). Eine kleine Anzahl von Tieren (2-5 %) zeigte an Tag 4 ein fragmentiertes Mitochondriennetzwerk. Wir beobachteten auch Würmer an Tag 8, wo es deutliche Unterschiede zwischen den exponierten zu Bioact®180 (Abb. 5c). Sowohl bei der Negativkontrolle als auch bei der DMSO-Kontrolle wiesen die meisten Tiere ein defektes mitochondriales Netzwerk auf, wobei 20 % der Würmer ein fragmentiertes Netzwerk hatten. Im Gegensatz dazu wiesen unter Bioact®180 nur 8 % der Würmer ein fragmentiertes mitochondriales Netzwerk auf, während 25 % der Würmer eine lineare mitochondriale Morphologie aufwiesen, was darauf hindeutet, dass diese Würmer eher in der Lage sind, normal zu funktionieren.

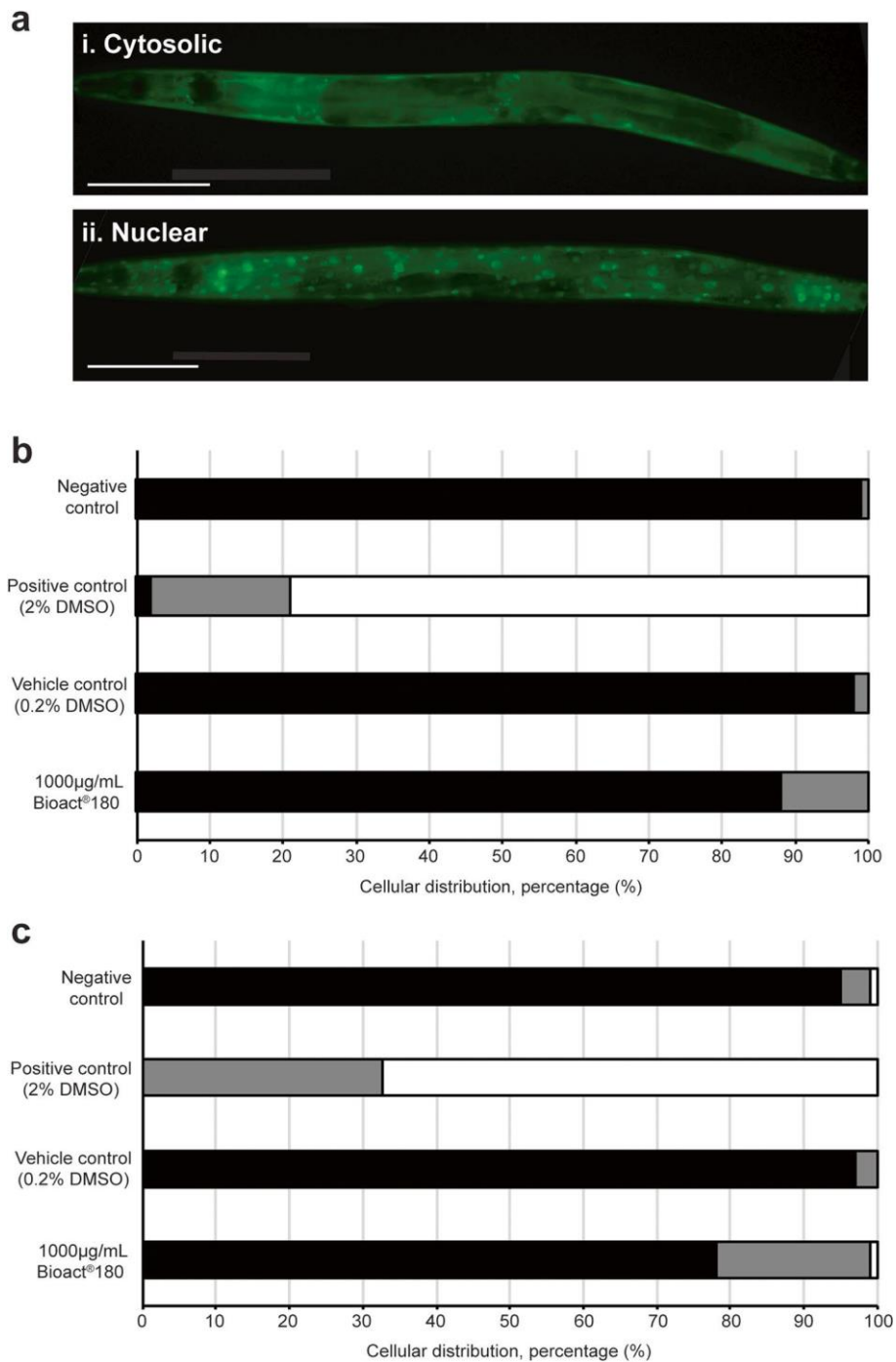
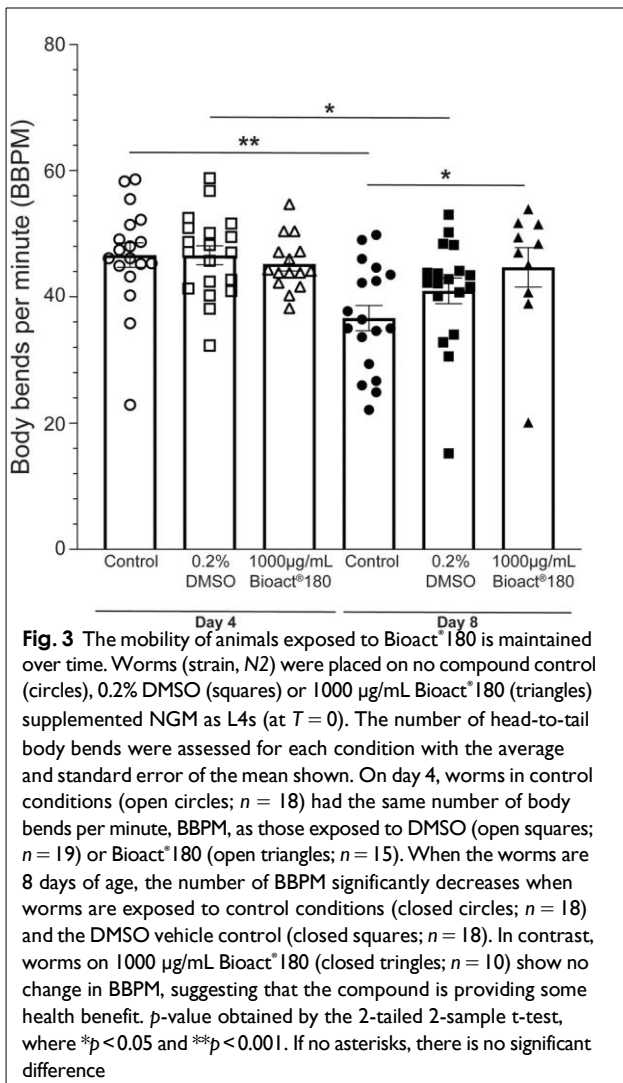


Fig. 2 Bioact® I80 does not affect the nuclear localisation of DAF-I6::GFP. **(a)** Representative images of worms that have (i) cytoplasmic and (ii) nuclear DAF-I6::GFP localisation. Scale bars are 100 µm. **(b)** Worms were placed onto Bioact® I80 supplemented NGM as L1s and the localisation of DAF-I6::GFP observed at the L4 stage. **(c)** From these, 5 random L4 animals were transferred to a fresh Bioact® I80 supplemented NGM plate and allowed to lay eggs and then removed. When these progeny were L4, DAF-I6::GFP localisation was recorded. Black bars indicate cytoplasmic localisation and white bars show DAF-I6::GFP located in the nucleus where it is able to activate the insulin signalling pathway. Grey bars show an intermediate localisation, whereby DAF-I6::GFP is found in both the nucleus and cytoplasm. The negative control was NGM, a 0.2% DMSO vehicle control was included together with a 2% DMSO positive control. Strain, *TJ356*; *n* = 100 for all conditions



Diskussion

Es besteht ein wachsendes Interesse an den gesundheitsfördernden Vorteilen von Nahrungsergänzungsmitteln, insbesondere an solchen, die die Gesundheit in der mittleren bis späten Lebensphase erhalten [8]. Bioact®180 ist eine Mischung von Extrakten aus den Früchten, Kräutern und Wurzeln von Pflanzen der Familien Rosaceae, Solanaceae und Zingiberaceae und ist eine reichhaltige Quelle von Polyphenolen. Ziel unserer Studie war es, die Auswirkungen von Bioact®180 auf verschiedene Aspekte der Gesundheit an *C. elegans* als Modellorganismus zu untersuchen. *C. elegans* ist aufgrund seiner kurzen Lebensdauer von 3 Wochen eines der wichtigsten Modelle zur Untersuchung des Alterns. Da der Fadenwurm auf ähnliche Weise altert wie der Mensch, kann er zur Definition von Maßnahmen verwendet werden, die ein langes und gesundes Leben fördern.

Bioact®180 hatte eine kleine, aber signifikante Auswirkung auf die maximale Lebensdauer; bei Würmern, die 1000 µg/ml Bioact®180 ausgesetzt waren, stieg sie im Vergleich zu nicht exponierten Fadenwürmern von 11 auf 16 Tage. Unser Experiment wurde, ähnlich wie die große Mehrheit der Lebensspanntests, nicht verblindet oder randomisiert durchgeführt, was die Objektivität der Ergebnisse einschränken könnte [39]. Da wir den Test jedoch mit einer großen Anzahl von Würmern durchgeführt haben und die Statistiken solide sind, sind wir zuversichtlich, dass Bioact®180 die Lebensspanne verlängert.

Typischerweise moduliert der Insulin-ähnliche Signalweg das Altern und die Langlebigkeit, wobei DAF-16 ein zentraler Regulator ist. Wir untersuchten die Lokalisierung von DAF-16 nach der Exposition mit Bioact®180 als Stellvertreter für den positiven Einfluss dieses Transkriptionsfaktors auf die Verlängerung der Lebensspanne. In unseren Experimenten führten wir die Exposition von L1 bis L4 in Übereinstimmung mit anderen Studien [31, 40] und erneut in den Nachkommen dieser Eltern durch. In beiden Fällen beobachteten wir keine signifikante Verschiebung von DAF-16::GFP in den Zellkern bei Exposition mit Bioact®180. Es ist zu beachten, dass der Zeitpunkt der Exposition gegenüber den Wirkstoffen von Bedeutung ist, ebenso wie das Alter bei der Messung der Ergebnisse [39]. Daher können wir nicht ausschließen, dass die Lokalisierung von DAF-16 bei älteren Tieren verändert ist. Ein interessantes zukünftiges Experiment wäre es, die Lokalisierung von DAF-16 in Würmern während ihrer gesamten Lebensspanne zu untersuchen, insbesondere aber zum Zeitpunkt der 50 %igen Mortalität, wo es deutliche Unterschiede zwischen den Kontrollnematoden und den mit Bioact®180 exponierten Nematoden gibt. Allerdings steuert bei *C. elegans* der Insulin-Signalweg-Rezeptor DAF-2 die Phosphorylierung von DAF-16 über die insulinaktivierte Kinase Akt (AKT-1 und AKT-2), um die Anreicherung von DAF-16 im Zellkern zu verhindern [41]. Daher ist es möglich, dass die Tatsache, dass wir keine nukleäre Lokalisierung von DAF-16 beobachten, auf die Aktivität von AKT-1 und AKT-2 zurückzuführen ist. Außerdem ist die Phosphorylierung von DAF-16 auch durch AMPK unabhängig von der subzellulären Lokalisierung von DAF-16 möglich [42].

Die Klärung der Frage, welcher dieser Wege durch die Anwesenheit von Bioact®180 aktiviert werden könnten, würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, aber da bereits früher gezeigt wurde, dass die einzelnen Komponenten von Bioact®180 AMPK aktivieren [43-45], gehen wir davon aus, dass dies hier der Fall ist. AMPK ist in der Lage, die mitochondriale Homöostase zu koordinieren [46], was die Autophagie, die mitochondriale Biogenese und die Expression antioxidativer Enzyme induzieren kann, die in der Lage sind, die zelluläre Funktion zu verbessern [46], und viele Phytochemikalien haben gezeigt, dass sie auf diese

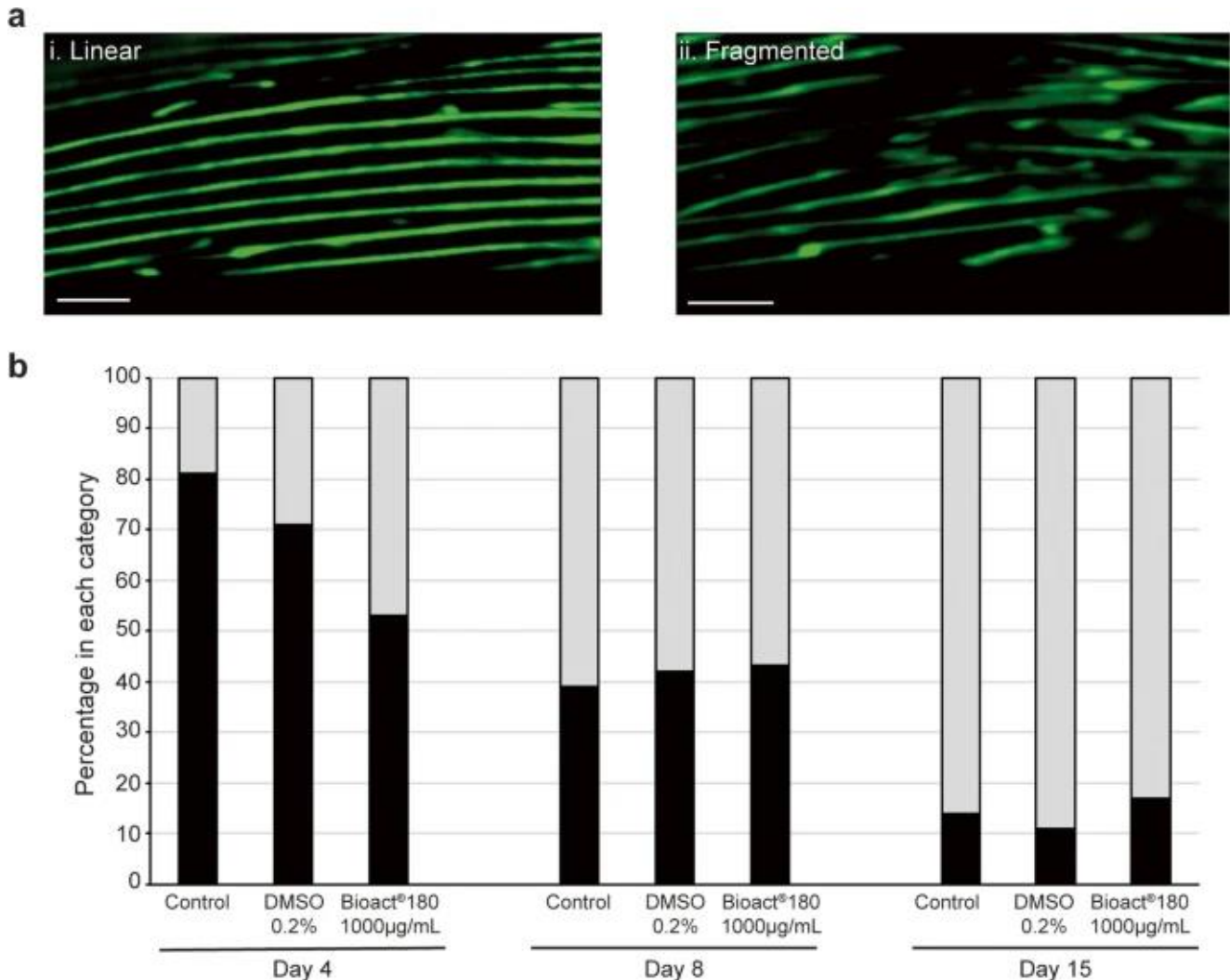


Fig. 4 Muscle morphology is unchanged in Bioact®180 exposed worms compared to wild type. Worms (strain, *RW1596*) were placed on no compound control, 0.2% DMSO or 1000 µg/mL Bioact®180 supplemented NGM as L4s (at T = 0). The muscle morphology was observed via the *myo-3p::GFP* reporter for each condition on days 4, 8 and 15 and assessed as being linear or fragmented. **(a)** Representative image of a worm displaying (i) linear or (ii) fragmented muscle fibres. Scale bars, 100 µm. **(b)** Graph to show the percentage of worms in each category at the different time points. Black bars indicate linear muscle morphology while the grey bars are for those fibres which are fragmented. Data was from 4 independent biological replicates with more than 85 worms assessed on day 4 (control $n = 88$; DMSO $n = 85$; Bioact®180 $n = 85$) and more than 95 worms on day 8 (control $n = 110$; DMSO $n = 95$; Bioact®180 $n = 93$), and around 20 worms on day 15 (control $n = 28$; DMSO $n = 19$; Bioact®180 $n = 24$)

Weise wirken [16, 47]. Wir vermuten, dass die Wirkungsweise von Bioact®180 über die Mitophagie erfolgt, eine spezifische Form der Autophagie, bei der die Zellen beschädigte Mitochondrien beseitigen [48, 49]. Es gibt keine umfassende Definition der Gesundheitsspanne

[50], aber sie wird im Allgemeinen als der Zeitraum im Erwachsenenalter ohne körperliche Beeinträchtigung definiert, der dem Alterungsprozess vorausgeht [8, 37, 51]. Wir fanden heraus, dass die durchschnittliche

Lebensspanne bei Würmern, die Bioact®180 ausgesetzt waren, verlängert wurde und mit einer erhöhten Mobilität der Würmer einherging. Während DMSO allein die Mobilität zu verbessern schien, ist dies wahrscheinlich eine Folge von Veränderungen in der Durchlässigkeit der Membran [52]. Die Tatsache, dass die Exposition gegenüber Bioact®180 einen Rückgang der Mobilität verhindert, deutet darauf hin, dass die Verbindung positive Auswirkungen hat, die über die Fähigkeit von DMSO hinausgehen. Die Organisation der

Muskulatur zeigte kein jugendlicheres Aussehen, was darauf hindeutet, dass Bioact®180 seine Wirkung über andere Mechanismen entfaltet, z. B. mitochondriale Autophagie oder Hemmung des Proteinabbaus. Die Morphologie der Mitochondrien von Nematoden, die während ihres gesamten Lebens Bioact®180 ausgesetzt waren, wurde beobachtet. Wir stellten fest, dass der Fragmentierungsprozess im Vergleich zu den Kontrollbedingungen langsamer ablief, was die Hypothese stützt, dass Bioact®180 eine Rolle im Mitophagie-Prozess spielt, bei dem Zellen beschädigte Mitochondrien beseitigen [48, 49]. Es ist daher plausibel, dass Bioact®180 die Mitophagie induziert. Eine ähnliche Verbindung, Urolithin A, die in Mitgliedern der Familie der Rosengewächse (z. B. Erdbeeren, Himbeeren und Brombeeren) vorkommt, führt ebenfalls zu einer gesteigerten Mobilisierung und einer Verbesserung der Muskelzellqualität [18], was auch wir nach 8 Tagen Exposition mit Bioact®180 beobachten.

Schlussfolgerung

Die Mitglieder der Familien Rosaceae, Solanaceae und Zingiberaceae enthalten verschiedene Verbindungsklassen, denen eine positive Wirkung auf die Gesundheit nachgesagt wird. So sind Solanaceae eine Quelle für Carotinoide, Rosaceae eine Quelle für Ellagitannine und Anthocyane und Zingiberaceae liefern von Phenylpropanoiden abgeleitete Verbindungen. Unser Ziel war es, eine Mischung zu erzeugen, Bioact®180, die alle Vorteile dieser Komponenten aufweist. Zusammenfassend haben wir gezeigt, dass Bioact®180 die Gesundheit und die Verlängerung der Lebensspanne von *Caenorhabditis elegans* fördert, was mit funktionellen Verbesserungen der Mobilität einhergeht. Die genauen Mechanismen, über die Bioact®180 wirkt, sind jedoch noch nicht bekannt. Es ist sehr wahrscheinlich, dass er über die AMPK-Aktivierung und/oder die Mitophagie abläuft, aber es sind weitere Arbeiten erforderlich, um diese komplexen Mechanismen zu erforschen, was derzeit den Rahmen dieser Untersuchung sprengt.

Verfügbarkeit von Daten und Materialien:

Die im Rahmen dieser Studie gewonnenen oder analysierten Daten sind in diesem Artikel enthalten. Die Rohdaten können auf Anfrage an den entsprechenden Autor übermittelt werden.

Danksagung

Die Wurmstämme wurden vom *Caenorhabditis Genetics Centre* (CGC) bereitgestellt, das vom NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40OD010440) finanziert wird.

Beiträge der Autoren

Konzeptualisierung, SH, KBB, EK; Untersuchung, DvdK, NK, SH; Methodik, SH, KBB; Validierung, DvdK, NK, SH; Formale Analyse, SH, KBB; Datenpflege, SH, DvdK; Schreiben, SH; Überprüfung und Bearbeitung, SH, KBB, EK. Alle Autoren haben der veröffentlichten Version des Manuskripts zugestimmt.

Finanzierung

Diese Forschungsarbeit erhielt keine externe Finanzierung, wurde aber vom HAN BioCentre unterstützt.

Erklärungen

Ethische Genehmigung und Einverständnis zur Teilnahme

Die Zusammensetzung von Bioact®180 ist eine Mischung aus Früchten, Wurzeln und Blättern von Mitgliedern der Familien der Rosaceae, Solanaceae und Zingiberaceae. Alles verwendete Pflanzenmaterial ist für den menschlichen Verzehr zugelassen. Der Extrakt wurde gemäß den Normen des Europäischen Arzneibuchs hergestellt, wie im Abschnitt Materialien und Methoden beschrieben. Im Rahmen dieser Forschung wurden keine Versuche an Wirbeltieren oder Menschen durchgeführt. Für Versuche an *Caenorhabditis elegans* ist keine Genehmigung einer Tierethikkommission erforderlich, jedoch liegen alle Unterlagen für den Umgang mit *C. elegans* an der HAN University of Applied Sciences vor.

Einverständnis zur Veröffentlichung

Nicht zutreffend

Konkurrierende Interessen

Karin Berger Büter und Emanuel Kreuter sind von Bioactive Botanicals Swiss AG und haben die Zusammensetzung von Bioact®180 erfunden. Alle anderen Autoren haben keine konkurrierenden Interessen zu deklarieren.

Angaben zum Autor

1BioCentre, HAN University of Applied Sciences, 6525EM, Nijmegen, Niederlande. 2Department of Environment and Health, Vrije Universiteit Amsterdam, De Boelelaan 1085, 1081HV Amsterdam, Niederlande. 3Bioactive Botanicals Swiss AG, Emelgarten 6, 8592 Uttwil, Schweiz.

Manuskript erhalten: 11 September 2021 | angenommen: 3 January 2022

Published online: 13 January 2022

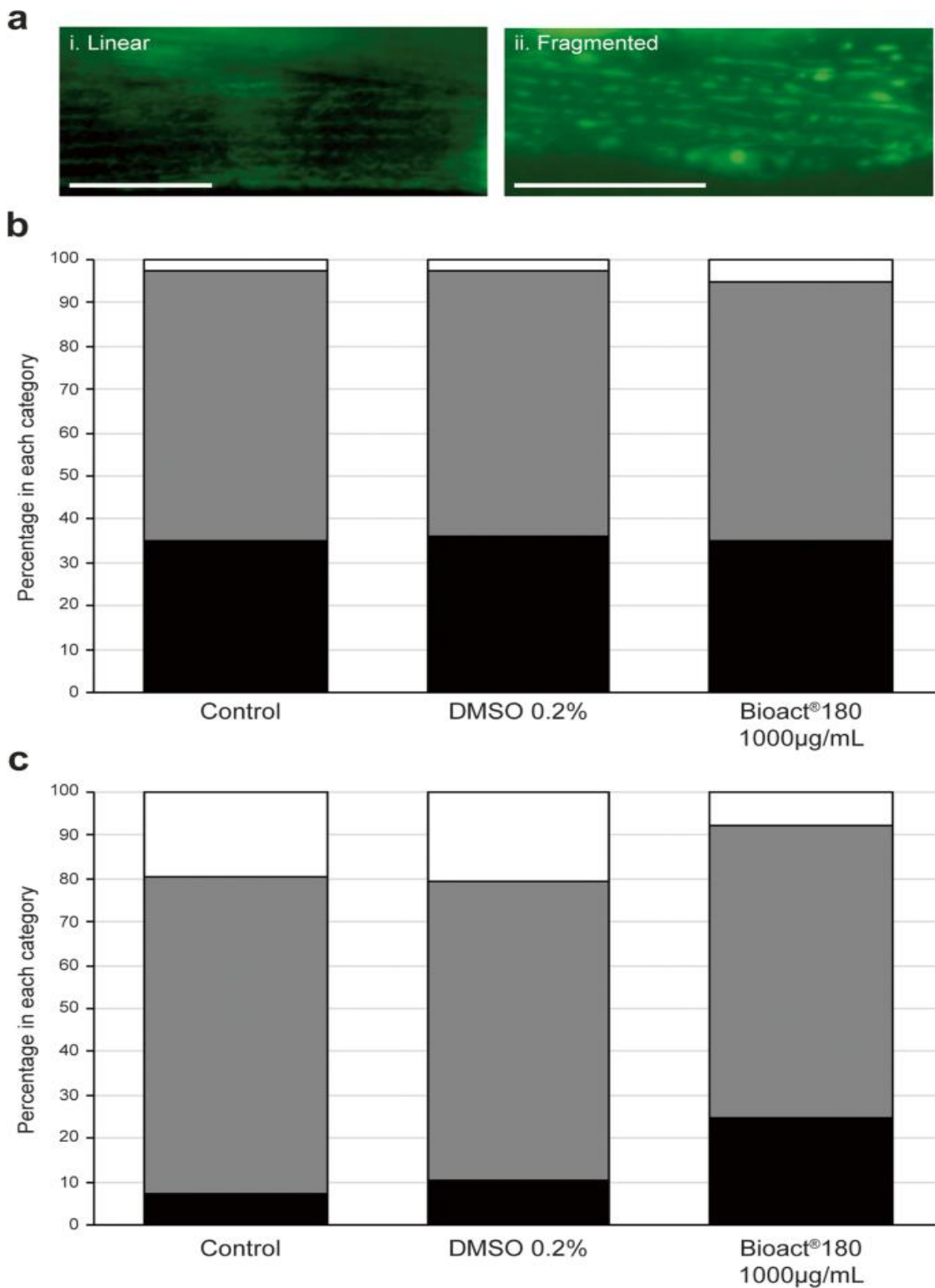


Fig. 5 Mitochondrial morphology of worms exposed to Bioact®180 have less degradation on day 8 of life. Worms (strain, *SD1347*) were placed on no compound control, 0.2% DMSO or 1000 µg/mL Bioact®180 supplemented NGM as L4s (at T = 0). The mitochondrial network of worms was assessed for linear, intermediate or fragmented morphology on day 4 and 8. (a) Representative image of a worm displaying a (i) linear or (ii) fragmented mitochondrial network. Scale bars, 100 µm. Graphs to show the mitochondrial morphology on (b) day 4 and (c) day 8. The classifications are as follows: linear (black bars) where the mitochondrial network has even linear lines; fragmented (white bars) is where the network has reduced significantly and is mostly broken; an intermediate classification (grey bars) is where the network is uneven and starting to fragment. The mitochondrial morphology was assessed over 2 independent experiments, with a total of $n = 40$ for day 4 control, day 4 Bioact®180 and day 8 Bioact®180; $n = 38$ for the DMSO control at day 4 and 8; $n = 41$ for control worms on day 8

References

- Lopez-Otin C, et al. The hallmarks of Aging. *Cell*. 2013;153(6):1194–217.
- Calfio C, Huidobro-Toro JP. Potent Vasodilator and Cellular Antioxidant Activity of Endemic Patagonian Calafate Berries (*Berberis microphylla*) with Nutraceutical Potential. *Molecules*. 2019;24(15):2700.
- Dayoub O, Andriantsitohanian R, Clere N. Pleiotropic beneficial effects of epigallocatechin gallate, quercetin and delphinidin on cardiovascular diseases associated with endothelial dysfunction. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2013;11:249–64.
- Xie Y, et al. Antibacterial activities of flavanoids: Structure-activity relationship and mechanism. *Curr Med Chem*. 2015;22(1):1132–49.
- Rathee P, et al. Mechanism of action of flavanoids as anti-inflammatory agents: A review. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*. 2009;8(3):229–35.
- Wang L-S, Stoner GD. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett*. 2008;269:281–90.
- Swanson CA. Suggested guidelines for articles about botanical dietary supplements. *Am J Clin Nutr*. 2002;75(1):8–10.
- Herndon LA, et al. Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*. *Nature*. 2002;419(6909):808–14.
- Glenn CF, et al. Behavioral deficits during early stages of aging in *Caenorhabditis elegans* result from locomotory deficits possibly linked to muscle frailty. *Journals of Gerontology Series A Biological Sciences and Medicinal Sciences*. 2004;59(12):1251–60.
- van de Klashorst D, et al. Montmorency tart cherry (*Prunus cerasus* L.) acts as a calorie restriction mimetic that increases intestinal fat and lifespan in *C. elegans*. *Journal of Functional Foods*. 2020;68:103890.
- Guha S, et al. The longevity effect of cranberry extract in *Caenorhabditis elegans* is modulated by daf-16 and osr-1. *Age*. 2013;35(5):1559–74.
- Ding A-J, et al. Current perspectives in the discovery of anti-aging agents from natural products. *Natural Products and Bioprospecting*. 2017;7(5):335–404.
- Wilson MA, et al. Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*. 2006;5(1):59–68.
- Wang J, et al. Effects of orange extracts on longevity, healthspan, and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Molecules*. 2020;25:351–68.
- Song B, et al. Raspberry extract ameliorates oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* via the SKN-1/Nrf2 pathway. *Journal of Functional Foods*. 2020;70:103977.
- Martel J, et al. Plant and fungal products that extend lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Microbial Cell*. 2020;7(10):255–69.
- Jiang TA. Health benefits of culinary herbs and spices. *J AOAC Int*. 2019;102(2):395–411.
- Ryu D, et al. Urolithin A induces mitophagy and prolongs lifespan in *C. elegans* and increases muscle function in rodents. *Nature Medicine*. 2016;22(8):879–88.
- Martins RJ, Lithgow GJ, Link W. Long live FOXO: Unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity. *Aging Cell*. 2016;15(2):196–207.
- Gross DN, Wan M, Birnbaum MJ. The role of FOXO in the regulation of metabolism. *Curr DiabRep*. 2009;9:208–14.
- Chen W, et al. Anthocyanin-rich purple wheat prolongs the lifespan of *Caenorhabditis elegans* probably by activating the DAF-16/FOXO transcription factor. *J Agric Food Chem*. 2013;61:3407–3053.
- Wang H, et al. Blueberry extract promotes longevity and stress tolerance via DAF-16 in *Caenorhabditis elegans*. *Food Funct*. 2018;9(10):5273–82.
- Badejo AA, Damilare A, Ojuade tD. Processing effects on the antioxidant activities of beverage blends developed from *Cyperus esculentus*, *Hibiscus sabdariffa* and *Moringa oleifera* extracts. *Preventative Nutrition and Food Science*. 2014;19(3):227–223.
- Jain DP, Pancholi SS, Patel R. Synergistic antioxidant activity of green tea with some herbs. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*. 2011;2(3):177–83.
- Skrovankova S, et al. Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *International Journal for Molecular Sciences*. 2015;16:24673–796.
- Yang X, et al. The neuroprotective and lifespan-extension activities of *Damnacanthus officinarum* extracts in *Caenorhabditis elegans*. *J Ethnopharmacol*. 2012;141(1):41–7.
- Fang EF, et al. Tomatidine enhances lifespan and healthspan in *C. elegans* through mitophagy induction via the SKN-1/Nrf2 pathway. *Scientific Reports*. 2017;7:46208.
- Lee EB, et al. Longevity and stress resistant property of 6-Gingerol from *Zingiber officinale* Roscoe in *Caenorhabditis elegans*. *Biomolecules and Therapeutics*. 2018;25(6):568–75.
- Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1974;77:71–94.
- Stiernagle T., Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community. 2006.
- Buchter C, et al. Myricetin-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by DAF-16. *Int J Mol Sci*. 2013;14(6):11895–914.
- Yang JS, et al. OASIS: Online Application for the Survival Analysis of Lifespan Assays Performed in Aging Research. *PLoS One*. 2011;6(8):e23525.
- Han SK, et al. OASIS 2: online application for survival analysis 2 with features for the analysis of maximal lifespan and healthspan in aging research. *Oncotarget*. 2016;7:56147–52.
- Momma K, et al. Heat induced calcium leakage causes mitochondrial damage in *Caenorhabditis elegans* body-wall muscles. *Genetics*. 2017;206:1985–94.
- Regmi SG, Rolland SG, Condradt B. Age-dependent changes in mitochondrial morphology and volume are not predictors of lifespan. *Aging*. 2014;6(2):118–30.
- Schindelin J, et al. The ImageJ ecosystem: an open platform for biomedical image analysis. *Mol Reprod Dev*. 2015;82(708):518–29.
- Luyten W, et al. Ageing with elegans: a research proposal to map healthspan pathways. *Biogerontology*. 2016;17:771–82.
- Marck A, et al. Age-Related Changes in Locomotor Performance Reveal a Similar Pattern for *Caenorhabditis elegans*, *Mus domesticus*, *Canis familiaris*, *Equus caballus*, and *Homo sapiens*. *The Journals of Gerontology Series A*. 2017;72(4):455–63.
- Saul N, et al. Health and longevity studies in *C. elegans*: the “healthy worm database” reveals strengths, weaknesses and gaps of test compound-based studies. *Biogerontology*. 2021;22(2):215–36.
- Rangsinth P, et al. Leaf extract of *Caesalpinia mimosoides* enhances oxidative stress resistance and prolongs lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2019;19:164.
- Henderson ST, Johnson TE. daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*. 2001;11(24):1975–80.
- Greer EL, et al. An AMPK-FOXO pathway mediates longevity induced by a novel method of dietary restriction in *C. elegans*. *Current Biology*. 2007;17:1646–56.

43. Liu L, et al. Polyphenol-enriched extract of *Rosa rugosa* Thunb regulates lipid metabolism in diabetic rats by activation of AMPK pathway. *Biomed Pharmacother.* 2018;100:29–35.
44. Zaklos-Szyda M, Pawlik N. Japanese quince (*Chaenomeles japonica* L.) fruit polyphenolic extract modulates carbohydrate metabolism in HepG2 cells via AMP-activated protein kinase. *Acta Biochimica Polonica.* 2019;65(1):67–78.
45. Tajik Kord M, Pourrajab F, Hekmatimoghaddam S. Ginger Extract Increases GLUT-4 Expression Preferentially Through AMPK Than PI3K Signalling Pathways in C2C12 Muscle Cells. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity : Targets and Therapy.* 2020;13:3231–8.
46. Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;12(2):121–35.
47. Lee J, et al. Adaptive cellular stress pathways as therapeutic targets of dietary phytochemicals: Focus on the nervous system. *Pharmacol Rev.* 2014;66(3):815–68.
48. Rubinsztein DC, Marino G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell.* 2011;146(5):682–95.
49. Bratic A, Larsson N-G. The role of mitochondria in aging. *J Clin Investig.* 2013;123(3):951–7.
50. Bansal A, et al. Uncoupling lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans* longevity mutants. *PNAS.* 2015;112(3):E277–86.
51. Rollins JA, et al. Assessing Health Span in *Caenorhabditis elegans*: Lessons From Short-Lived Mutants. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2017;72(4):473–80.
52. Calaharro F, Holden-Dye L, O’Conner V. Impact of drug solvents on *C. elegans* pharyngeal pumping. *Toxicology Reports.* 2021;8:1240–7.

Publisher’s Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.