

ЕКСТРАКТ *CIMICIFUGA RACEMOSA* ZE 450 ВІДНОВЛЮЄ ЕНЕРГЕТИЧНИЙ МЕТАБОЛІЗМ І СПРИЯЄ ДОВГОЛІТТЮ*

ВСТУП

Екстракти *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt. (*Ranunculaceae*) (синонім загальноприйнятої назви *Actaea racemosa* L.) у висновках Комітету з рослинних лікарських засобів (Committee on Herbal Medicinal Products, HMPC), включених до монографії «Чорний кохощ» Європейського агентства з лікарських засобів (European Medicines Agency, EMA) (EMA/265439/2018) отримали статус «добре зарекомендували себе» в лікуванні менопаузальних симптомів. Незважаючи на те що екстракти цимицифуги (*C. racemosa*) широко використовують протягом десятиліть [1–3], механізми їхньої дії ще не з'ясовані. До клімактеричних симптомів належать посилене потовиділення, безсоння, зміни настрою, головний біль, сухість піхви та, найчастіше, припливи [4]. Добре відомо, що під час переходу до менопаузи коливання рівня естрогену призводить до змін в експресії генів центральної нервової системи, синтезу нейромедіаторів і порушення активності нейронів гіпоталамуса, включаючи дисфункцію мітохондрій та дисбаланс окисно-відновного гомеостазу [5]. Ці зміни сприяють запальним процесам і окислювальному стресу [6]. Також вони можуть значною мірою сприяти розвитку припливів через звуження точки терморегуляції [7]. Відповідно до загальноприйнятого погляду на менопаузальні симптоми, зумовлені гормональними порушеннями, зазвичай для їх лікування використовують замісну гормональну терапію (ЗГТ) [6], але вона має обмеження через несприятливі побічні ефекти, як-от головний біль, маткові кровотечі й ризик розвитку венозної тромбоемболії, раку молочної залози, інсульту та ішемічної хвороби серця [8, 9].

Настання менопаузи та відповідні симптоми, зокрема припливи, пов'язані з дисбалансом окисно-відновного гомеостазу і, отже, часто супроводжуються підвищеним утворенням активних форм кисню (АФК) [10]. Нещодавно автори повідомляли, що препарат Сімідона британської компанії Атаха LTD, до складу якого входить екстракт *C. racemosa* Ze 450, опосередковує сприятливі метаболічні ефекти, захищаючи від окисного пошкодження клітини різних типів, включно з клітинами нейронів і печінки [11, 12]. Посилений окислювальний стрес як загальна патологічна ознака тісно асоціюється з багатьма віковими розладами, метаболічними захворюваннями

та імунними порушеннями [13]. Крім того, Ze 450 продемонстрував виражений вплив на енергетичний метаболізм, зменшуючи мітохондріальне дихання та сприяючи гліколізу [12], подібно до ефекту Варбурга [14]. Щоб задовольнити потреби клітин в енергії за допомогою гліколізу, потрібна більша кількість глюкози порівняно зі значно ефективнішою системою окисного фосфорилування мітохондрій (OXPHOS).

Ze 450 продемонстрував протидіабетичний ефект на моделі мишей, а також сприятливий вплив на метаболічні параметри в оваріоектомованих щурів, подібно до метформіну [15, 16]. Метформін є засобом лікування першої лінії для більшості пацієнтів, які страждають на цукровий діабет II типу [17], і можна отримати надзвичайно цікаві висновки, порівнявши вплив Ze 450 і метформіну на мітохондрії. Крім того, нещодавнє ретроспективне обсерваційне дослідження продемонструвало, що Ze 450 зменшував набирання ваги у жінок під час менопаузи [18]. Це засвідчує, що Ze 450 може опосередковувати метаболічні ефекти в пацієнтів.

Проведено велику кількість досліджень щодо аналізу ефекту Варбурга, який полягає в метаболічному перепрограмуванні в бік аеробного гліколізу в ракових клітинах [14]. У ракових клітинах такі метаболічні перемикачання на гліколіз були пов'язані з активацією ключових регуляторів транскрипції – індукованих гіпоксією фактора 1 α (HIF1 α) і білка сМус. Екстракт *C. racemosa* Ze 450 може здійснювати подібну регуляцію енергетичного метаболізму шляхом прямого та непрямого впливу на систему окисного фосфорилування мітохондрій.

Крім того, попередні дослідження пояснили механізм дії екстрактів *C. racemosa* естрогеноподібним ефектом. Однак це є суперечливим питанням, і більшість останніх повідомлень свідчать, що екстракти *C. racemosa* не слід розглядати як фітоестрогени і вони не можуть ані активувати рецептори естрогену, ані чинити ефект, подібний до гормону естрогену.

У цьому дослідженні Ze 450 порівнювали з 17 β -естрадіолом, агоністами рецепторів естрогену 4,4',4''-(4-пропіл-[1H]-піразол-1,3,5-триіл) трисфенолом (PPT) і діарилпропіонітрилом (DPN), а також модулятором рецепторів

MALENA RABENAU

Біохіміко-фармакологічний центр, Інститут фармакології та клінічної фармації Марбурзького університету, Центр розумового мозку та поведінки, Марбург, Німеччина; компанія Max Zeller Soehne AG (доклінічні дослідження), Романсхорн, Швейцарія

BENJAMIN DILLBERGER

Центр біомедичних досліджень Зельтерсберга, Лабораторія харчування у профілактиці та терапії, Інститут наук про харчування, Гіссенський університет імені Юстуса Лібиха, Гіссен, Німеччина

MADELINE GÜNTHER

Біохіміко-фармакологічний центр, Інститут фармакології та клінічної фармації Марбурзького університету, Центр розумового мозку та поведінки, Марбург, Німеччина

та інші автори

Контакти:

Carsten Culmsee

Biochemical-Pharmacological Center, Institute of Pharmacology and Clinical Pharmacy, University of Marburg
Karl-von-Frisch-Strasse 2,
35043 Marburg, Germany

* Реферативний огляд статті, опублікованої в Antioxidants 10.9 (2021): 1432, DOI: 10.3390/antiox10091432

естрогену тамоксифеном для оцінювання подібності та відмінності екстракту від естроген-опосередкованих ефектів у модельних системах окисного стресу та впливу на параметри мітохондрій. Для імітації дисбалансу окисно-відновного гомеостазу під час менопаузального переходу та підкреслення важливості метаболічних змін (окрім виснаження рівня естрогенів) було використано добре вивчену модель окислювального стресу *in vitro* [19]. Потім порівнювали ефекти Ze 450 і метформіну *in vivo* в модельному організмі *Caenorhabditis elegans* для оцінювання впливу на тривалість життя в базових (вихідних) умовах та в умовах окислювального стресу, який був спричинений мітохондріальним токсином паракватом.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Етанольний сухий екстракт *C. racemosa* Ze 450 виготовляли із сухих коренів і кореневищ та отримували від компанії Max Zeller Soehne AG (Романсхорн, Швейцарія). Дози, застосовувані в цьому дослідженні, містили 75% нативний екстракт. Вміст тритерпенових глікозидів становив 6,4% [12].

Референтні речовини

Гідрохлорид метформіну (Cayman Chemical, Анн-Арбор, Мічиган, США) був розчинений у воді, 17 β -естрадіол (Merck KGaA, Дармштадт, Німеччина) – у 60% етанолі, а DPN, PPT і 4-ОН-тамоксифен (Merck KGaA, Дармштадт, Німеччина) – у диметилсульфоксиді. Усі реагенти додатково розводили в культуральному середовищі до концентрацій обробки.

Культура клітин

Клітини HT22 люб'язно надав David Schubert, Лабораторія клітинної нейробіології Інституту біологічних досліджень Салка Терренса Седжновські, Ла-Хоя, Каліфорнія, США) вирощували в модифікованому Дульбекко середовищі Ігла (DMEM, Capricorn Scientific GmbH, Німеччина), з додаванням інактивованої теплою фетальної телячої сироватки (Merck KGaA, Німеччина), 100 ОД/мл пеніциліну, 100 мг/мл стрептоміцину (Capricorn Scientific GmbH, Ебсдорфергруд, Німеччина) та 2 мМ L-глутаміну (Merck KGaA, Дармштадт, Німеччина). Щоб викликати загибель клітин, до середовища додавали ерастин (Calbiochem®, Merck KGaA, Дармштадт, Німеччина) протягом певного часу (8–16 год).

Ізоляція мітохондрій

Мітохондрії кортикальних нейронів отримували від щурів лінії Sprague-Dawley безпосередньо після розтину префронтальної кори. Усі подальші етапи ізоляції здійснювали на льоду за добре відпрацьованим методом [20].

Життєздатність клітин

Проліферацію клітин аналізували в режимі реального часу шляхом вимірювання електричного імпедансу [21]. Дані збирали щонайменше з 5000 клітин із як мінімум трьома повтореннями умов.

Перекисне окислення ліпідів

Після зазначених процедур клітини HT22 фарбували за допомогою BODIPY 581/591 C₁₁ (Invitrogen, Карлсбад, Каліфорнія, США) протягом 1 год (37 °C, 4,5% CO₂) і збирали для аналізу FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting – сортування клітин, що активуються флуоресценцією). Перекисне окислення ліпідів аналізували, реєструючи зелену (випромінювання: 525 нм/30) та червону (випромінювання: 585 нм/50) флуоресценцію з довжиною хвилі збудження 488 нм принаймні в 5000 клітин мінімум у трьох повтореннях умов. Рівень перекисного окислення ліпідів розраховували шляхом аналізу зсуву флуоресценції від зеленої до червоної.

Утворення АФК у мітохондріях

MitoSOX червоний (Invitrogen, США) вибірково фарбує мітохондрії, де окислюється супероксидами і має червону флуоресценцію. Для виявлення утворення АФК у мітохондріях MitoSOX червоний застосовували впродовж 30 хв при 37 °C, а клітини відбирали для аналізу FACS. Збільшення червоної флуоресценції, що корелює з утворенням мітохондріальних АФК, було виявлено за допомогою аналізу FACS (хвиля збудження 488 нм, випромінювання 690/50 нм). Дані реєстрували щонайменше в 5000 клітин і трьох повтореннях умов.

Потенціал мітохондріальної мембрани

Після обробки Ze 450 та ерастином клітини фарбували тетраметилродаміном, етиловим ефіром (TMRE) (0,4 нМ протягом 30 хв при 37 °C, MitoPT ΔΨm Kit, ImmunoChemistry Technologies, Блумінгтон, Мінесота, США) і вимірювали TMRE-флуоресценцію за допомогою аналізу FACS. Після втрати цілісності мітохондріальної мембрани, а отже, мембранного потенціалу, втрата TMRE-флуоресценції може бути виявлена за допомогою аналізу FACS (хвиля збудження 488 нм, випромінювання 690/50 нм). Дані отримували щонайменше в 5000 клітин і трьох лунках за аналогічних умов.

Вимірювання аденозинтрифосфорної кислоти

Рівні аденозинтрифосфорної кислоти (АТФ) визначали за допомогою комплекту ViaLight™plus (Lonza, Базель, Швейцарія). Через 24 год після висіву на 96-лункові планшети (6000 клітин на лунку) клітини обробляли Ze 450 та ерастином. У визначені моменти часу після обробки клітини переносили на білий 96-лунковий планшет, рівні АТФ аналізували за люмінесценцією за допомогою FluoStar OPTIMA (BMG Labtech, Ортенберг, Німеччина).

Вимірювання за допомогою технології Seahorse на клітинах HT22

Для визначення швидкості споживання кисню (ШСК) і швидкості позаклітинного закислення (ШПЗ) як показників мітохондріального дихання та гліколізу відповідно, проводили одночасне їх вимірювання в реальному часі за допомогою аналізатора позаклітинного потоку XF (Agilent Technologies, Санта-Клара, Каліфорнія, США), як описано раніше [19]. Виконано три вимірювання.

Вимірювання за допомогою технології Seahorse на ізольованих первинних мітохондріях префронтальної кори

Для аналізу активності мітохондріального комплексу I застосовували тест електронного потоку, вимірюючи ШСК за допомогою аналізатора Seahorse XFe69 (Agilent Technologies, Санта-Клара, Каліфорнія, США) після ізольованості кортикальних мітохондрій кори за встановленими протоколами [20].

Для вимірювання активності мітохондріальних комплексів II і III застосовували аналіз зчеплення, вимірюючи ШСК за допомогою аналізатора Seahorse XFe69 (Agilent, Санта-Клара, Каліфорнія, США). Аналіз зчеплення проводили за раніше описаними протоколами [22] з незначними модифікаціями.

Вимірювання родаміну

Вимірювання родаміну використовували для оцінювання цілісності потенціалу мітохондріальної мембрани. Тому протягом 40 хв визначали гасіння флуоресценції родаміну 123 (Thermo Fisher Scientific, Волтем, Массачусетс, США) за раніше описаною методикою [24].

Вимірювання глутатіону

Для визначення рівнів глутатіону клітини HT-22 висівали на 6-лункові планшети (180 000 клітин/лунку). Вимірювання глутатіону проводили за допомогою набору для глутатіонового аналізу (Cayman Chemical Company, Анн-Арбор, Мічиган, США) згідно з протоколом виробника. Поглинання обчислювали при довжині хвилі 405 нм після 30 хв інкубації. Загальну кількість глутатіону визначали за допомогою розрахунку стандартної кривої та нормували на вміст білка.

Аналіз білка

Клітини лізували після певного часу обробки в 0,25 М D-манітолу, 0,05 М тріс-основи, 1 мМ етилендіамінтетраоцтової кислоти, 1 мМ етиленглікольтетраоцтової кислоти, 1 мМ дитіотреїтолу і 1% Triton X-100 з додаванням протеази та інгібіторів фосфатази (Roche Diagnostics, Мангейм, Німеччина). Загальну кількість білка визначали за допомогою набору Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Волтем, Массачусетс, США).

Нематоди і бактеріальні штами

Дикий штам *C. elegans* N2 був отриманий із *Caenorhabditis elegans* у Центрі генетики (Університет Міннесоти, Міннеаполіс, Міннесота, США). Розмноження нематод підтримували на агарових планшетах із середовищем для росту нематод (NGM – nematode growth medium), засіяним *Escherichia coli* OP50 при 20 °С відповідно до стандартних протоколів [25].

Культитивування та обробка

Синхронізовані личинки двічі промивали в буфері M9 (6 г Na₂HPO₄, 3 г KH₂PO₄, 5 г NaCl і 0,25 г MgSO₄ × 7 H₂O на літр), підраховували та доводили до 10 личинок на 10 мкл. Нематоди вирощували в колбах для культур клітин (Sarstedt, Нюмбрехт, Німеччина) або на чашках NGM, оброблених

E. coli OP50. Після досягнення молодого віку, за 48 год до експерименту, нематод обробляли Ze 450 (100, 500, 1000 мкг/мл), розчиненим в 1% етанолі, і метформіном (25, 50 і 100 мМ) або паракватом (5 мМ; Merck KGaA, Дармштадт, Німеччина), розчиненими в M9. Контролем слугували стандартні OP50, M9 та 1% етанол.

Аналіз тривалості життя

Тривалість життя нематод при 20 °С визначали за модифікованим протоколом від Amrit et al. [27], синхронізовані личинки вирощували на чашках з агаром NGM, на який наносили стандартну культуру *E. coli* OP50. Нематод перевіряли на наявність життєвих ознак за допомогою гарячого платиного дроту. Черв'яки, які не реагували на тепловий подразник, вважалися мертвими. Криві тривалості життя статистично порівнювали за допомогою тесту логрангового критерію.

Аналіз виживання при тепловому шоку

Приблизно 10 нематод вирощували на 96-лунковому мікропланшеті, як зазначено вище. Через 48 год інкубації з ефекторами визначали час до смерті за допомогою аналізу термотолерантності на мікропланшетах [28].

Тест хемотаксису

Хемотаксис оцінювали за раніше опублікованою методикою [29].

Статистичний аналіз

Для статистичного аналізу кривих виживання використовували логарифмічний тест (критерій Мантеля – Кокса) порівняно з відповідним контролем. Значення р нижче від 0,05 вважали істотною різницею між двома кривими виживання. Усі дані наведені як середнє значення або ± стандартне відхилення (SD). Статистичне порівняння між групами обробки проводили шляхом дисперсійного аналізу (двосторонній аналіз ANOVA) з подальшим тестом Шеффе, показник р < 0,05 вважали статистично значущим.

РЕЗУЛЬТАТИ

Антиоксидантні властивості Ze 450 переважно не впливають на його захисну дію

Ze 450 не вплинув на рівень глутатіону й на опосередковане ерастином виснаження рівня глутатіону в нейронних клітинах HT22 (рис. 1 А). Екстракт Ze 450 містить фенольні сполуки, які можуть виявляти антиоксидантні властивості. Тому головною метою цього дослідження було вивчити потенційну активність поглинання радикалів Ze 450 та оцінити відповідний вплив на захисні ефекти Ze 450. Аналіз 2,2-дифеніл-1-пікрілгідразилу (DPPH) показав, що Ze 450 дійсно мав помірну антиоксидантну активність, яка була менш вираженою порівняно з радикальною активністю тролоксу (водорозчинного аналога вітаміну Е) (рис. 1 Б).

Потім були вивчені рівні ферментів, які беруть участь у системі антиоксидантного захисту. Примітно, що рівні каталази, супероксиддисмутази міді/цинку і супероксиддисмутази марганцю залишалися незмінними у відповідь на застосування Ze 450 (рис. 1 В). Однак залишалося з'ясувати, чи сприяли антиоксидантні властивості Ze 450

спостережуваним захисним ефектам у нейронах [12]. Тому нейронні клітини HT22 обробляли ерастином у присутності інгібітора гліколізу 2-дезоксиглюкози (2-DG), флуоресцентного індикатора 2-NBDG. Результати чітко показали, що Ze 450 захищає від окислювального ураження, опосередкованого ерастином, але за наявності 2-DG цей ефект нівелювався, тоді як тролокс усе ще опосередковував захист, який, очевидно, не залежав від постачання енергії через гліколіз (рис. 1 В). Ці результати свідчать, що Ze 450 захищає клітини від окислювальної загибелі завдяки зменшенню утворення АФК у мітохондріях, а не за рахунок підтримання рівня глутатіону (рис. 1 А). Загалом наведені дані демонструють, що основний механізм, який лежить в основі захисних ефектів Ze 450, не пов'язаний із помірною активністю поглинання радикалів Ze 450 або будь-яким іншим антиоксидантним впливом, але залежить від метаболічних ефектів екстракту.

Ze 450 безпосередньо впливає на функцію дихального ланцюга в ізольованих мітохондріях

Щоб з'ясувати, чи впливає Ze 450 на мітохондрії опосередковано через клітинні сигнальні шляхи або ж безпосередньо діє на мітохондріальне дихання, оцінили ефект Ze 450 в ізольованих мітохондріях префронтальної кори щурів. Для визначення активності мітохондріальних комплексів II і III використовували аналіз зчеплення за наявності ротенону як інгібітора для комплексу I та сукцинату як субстрату для дихання комплексу II. Ze 450 експонували на ізольовані мітохондрії протягом 30–60 хв. Як показано на рисунку 2, Ze 450 спричиняв залежне від часу та концентрації зниження мітохондріальної ШСК (рис. 2 А, Б). За 60 хв профіль дихання мітохондрій, оброблених 100 мкг/мл Ze 450, значно знижувався, що було виявлено після введення аденозиндифосфату, і, крім того, порушувалася функціональність комплексу II, що було зафіксовано при стимуляції повного дихання додаванням іонофору FCCP (рис. 2 Б).

Вимірювання родаміну 123 проводили для оцінювання цілісності мітохондріальної мембрани як контролю якості ізольованих мітохондрій. У цьому аналізі гасіння флуоресценції в усіх досліджених умовах було подібним, що вказує на хорошу якість мітохондрій.

Для оцінювання активності мітохондріального комплексу аналізували потік електронів через різні комплекси з початковою наявністю пірувату й малату I (рис. 2 В). Відповідно до попередніх висновків [12], Ze 450 мав залежний від часу вплив на дихання, зумовлене піруватом і малатом, але не повністю інгібував активність комплексу I, оскільки ін'єкція ротенону (порт А, рис. 2 В) ще більше зменшувала мітохондріальне дихання. Введення FCCP (порт В, рис. 2 В) привело до збільшення ШСК, що свідчить про те, що потік електронів відбувається належним чином. Крім того, було виключено припущення, що інгібувальний ефект Ze 450 пояснюється зниженням експресії білка (рис. 2 Г). Не виявлено відмінностей між контролем і клітинами, обробленими Ze 450, щодо рівнів експресії білків, які представляють мітохондріальні дихальні комплекси.

Отже, Ze 450 чинив пряму дію на мітохондрії, що було продемонстровано пригніченням активності мітохондріальних комплексів I–III в ізольованих органелах *in vitro*.

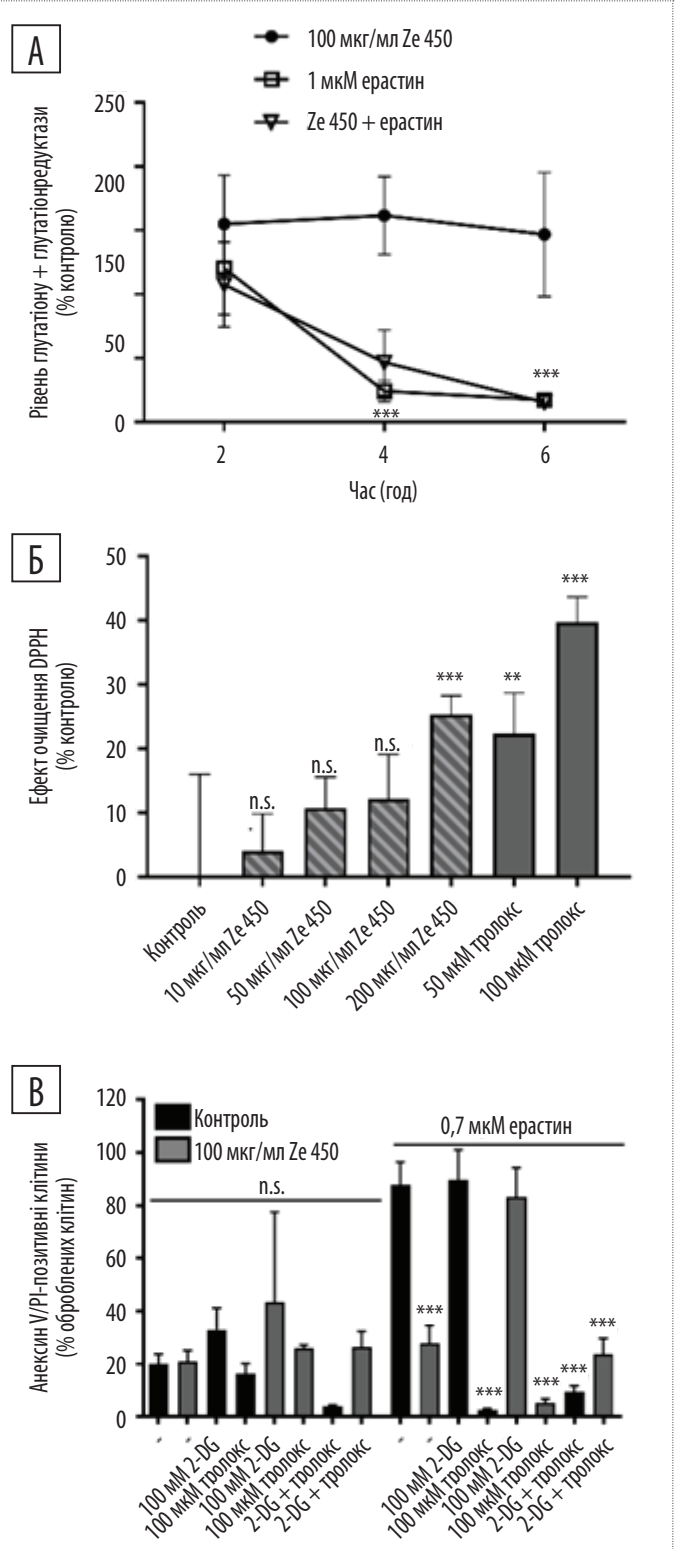


Рисунок 1. Захисні ефекти Ze 450 не залежать від його антиоксидантних властивостей

(А) Вплив Ze 450 на рівень глутатіону в клітині (n = 5–7/стан обробки). Дані представлені як середнє \pm SD (***) p < 0,001 порівняно з необробленим контролем; дисперсійний аналіз ANOVA, тест Шеффе). (Б) Активність поглинання радикалів DPPH визначали при 517 нм (***) p < 0,001, ** p < 0,01 порівняно з контролем; дисперсійний аналіз ANOVA, тест Шеффе; n. s. – статистично не достовірно). (В) Загибель клітин оцінювали за допомогою проточної цитометрії з використанням анексину V/PI після 16 год обробки клітин HT22. Гістограма показує один репрезентативний експеримент із трьома повтореннями на зразок (середнє значення \pm SD; 5000 клітин на повторення; (***) p < 0,001 порівняно з контролем, обробленим ерастином; дисперсійний аналіз ANOVA, тест Шеффе).

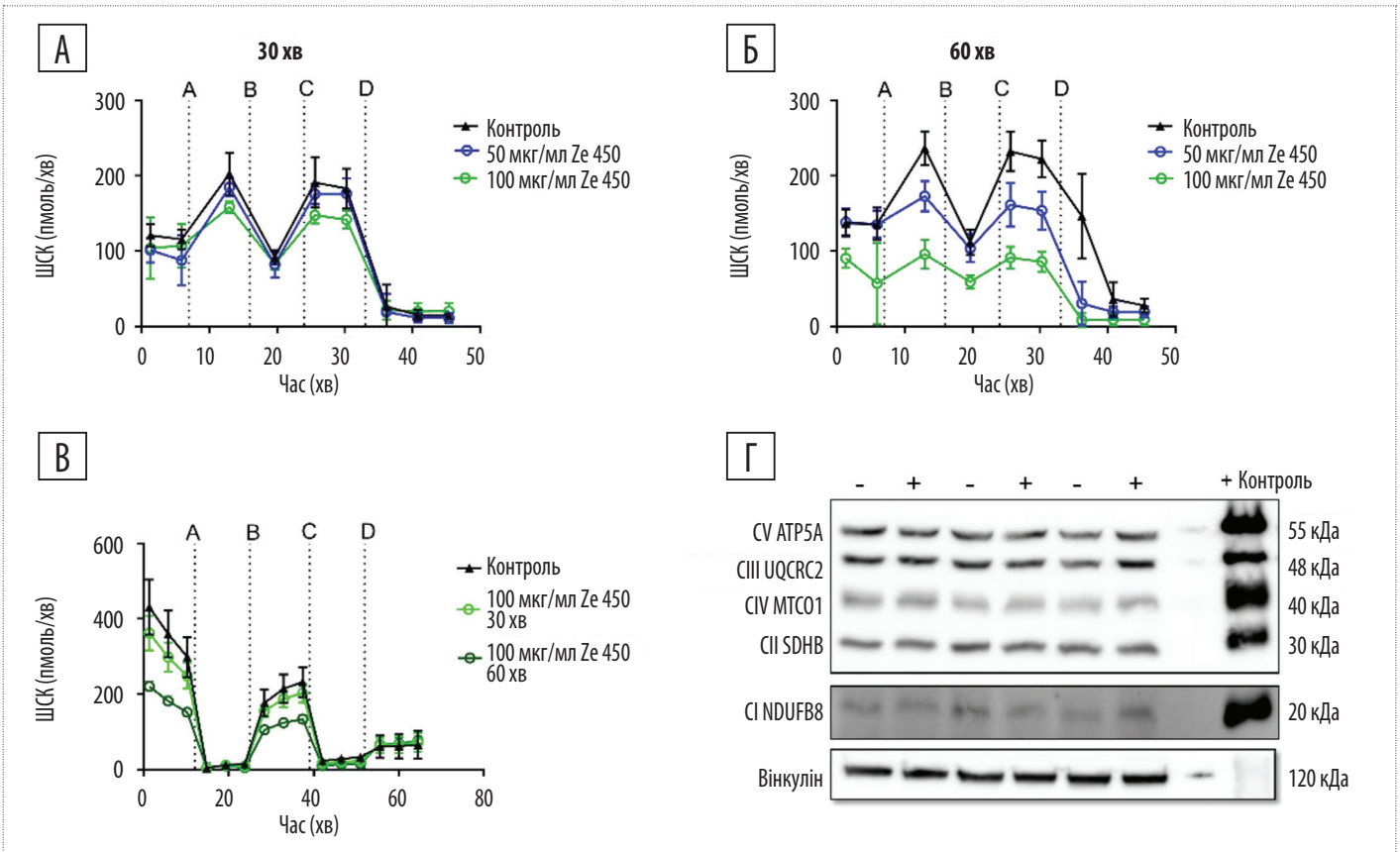


Рисунок 2. Ze 450 зменшує мітохондріальне дихання

(А, Б) ЩСК аналізували після 30 і 60 хв інкубації з Ze 450 (50 і 100 мкг/мл). Послідовно вводили аденозинфосфат (порт А), олігоміцин (порт В), FCCP (порт С) і антимицин А (порт D).

(В) ЩСК аналізували після 30 і 60 хв інкубації з Ze 450 (50 і 100 мкг/мл). Послідовно вводили ротенон (порт А), FCCP (порт В), антимицин А (порт С) та аскорбат/TMPD (порт D).

(Г) Імуноблот. Відносні рівні білка п'яти комплексів ланцюга транспортування електронів (CI-CV) оцінювали в клітинах HT22, які обробляли 100 мкг/мл Ze 450 протягом 16 год порівняно з необробленим контролем (- контроль, + Ze 450). Позитивним контролем слугували мітохондрії префронтальної кори щурів; дисперсійний аналіз ANOVA, тест Шеффе.

Ze 450 сприяє розвитку гліколітичного фенотипу

Основний інтерес цього дослідження полягав у здобутті нового уявлення про молекулярні механізми, що лежать в основі метаболічних ефектів Ze 450. Тому автори проаналізували регуляцію білків HIF1α і сМус, які раніше асоціювалися з метаболічним перемиканням на аеробний гліколіз. Ze 450 у клітинах HT22 регулював рівні білка HIF1α залежно від часу (рис. 3 А, Б). Показники білка HIF1α зростали через 2 год обробки 100 мкг/мл Ze 450 і поверталися до контрольного рівня за 16 год після обробки Ze 450 (рис. 3 А, Б). На додаток до HIF1α, білок сМус, як відомо, бере участь у метаболічному перепрограмуванні, підвищуючи швидкість гліколізу, і, окрім своєї ролі як онкогену, сприяє важливим фізіологічним функціям, включно з енергетичним метаболізмом [30]. Рівні білка сМус досліджено залежно від часу після обробки Ze 450 (рис. 3 В, Г). Спочатку не було виявлено жодних змін (рис. 3 В), але за 16 год після обробки Ze 450 рівень білка сМус значно підвищився (рис. 3 Г).

Ці результати демонструють, що Ze 450 змінює рівні білків HIF1α і сМус послідовно, залежно від часу, викликаючи ранню, але короточасну активацію HIF1α, з подальшою стійкою регуляцією сМус у більш пізній період. Відомо, що HIF1α і сМус регулюють ключові ферменти, які беруть участь в енергетичному метаболізмі глюкози, зокрема піруватдегідрогеназу 1 (PDK1) і гексокіназу II (HxkII) [30, 31].

Ze 450 призвів до збільшення рівнів білків PDK1 і HxkII після 16 год обробки (рис. 3 Д-Е).

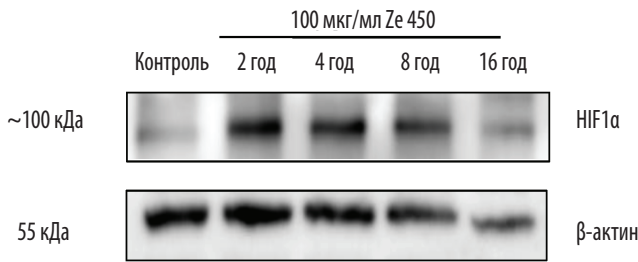
Крім того, шляхом вимірювання флуоресценції 2-NBDG контролювали поглинання глюкози. У результаті Ze 450 сприяв поглинанню 2-NBDG порівняно з контрольними умовами (рис. 4 А-В, Д).

Загалом ці результати свідчать про зв'язок між Ze 450 та ключовими регуляторами енергетичного метаболізму HIFα і сМус, що посилює поглинання глюкози й метаболічне перепрограмування завдяки прискоренню ключових ферментів гліколізу з одночасним зниженням активності системи окисного фосфорилування мітохондрій.

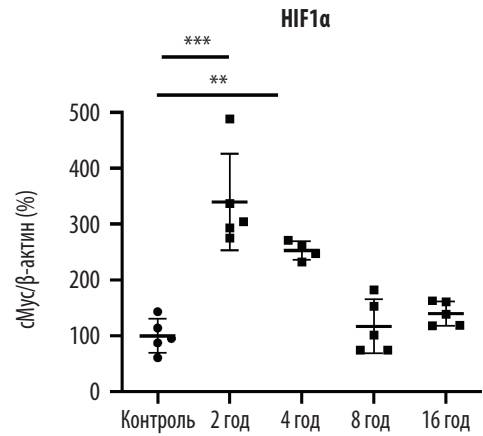
Вплив естрогену, агоністів естрогену та 4-ОН-тамоксифену на нейропротекцію

Раніше терапевтичний ефект екстрактів *S. racemosa* приписували фітоестрогенним властивостям, хоча класичні фітоестрогени не були визначені як основні компоненти екстракту і відповідно їхній вплив на рецептори естрогену не був підтверджений. У нашому дослідженні порівнювали ефекти 17β-естрадіолу, агоністів рецепторів естрогену та 4-ОН-тамоксифену з ефектами Ze 450 на нейронні клітини HT22. В умовах вихідного культивування лише дуже високі концентрації 17β-естрадіолу (100 мкМ) знижували метаболічну активність, як було виявлено в аналізі МТТ (коломиметричний аналіз для оцінювання метаболічної

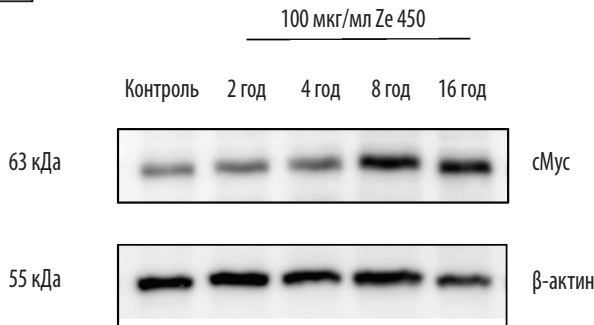
А



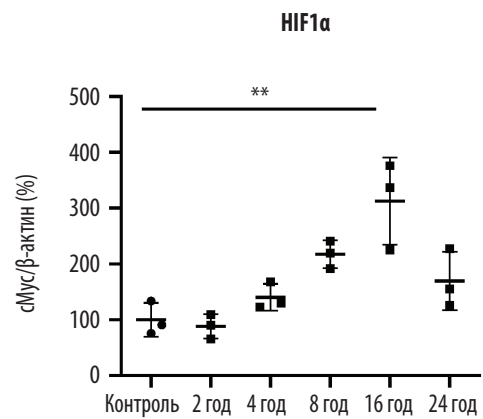
Б



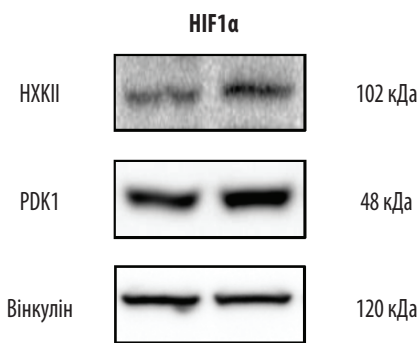
В



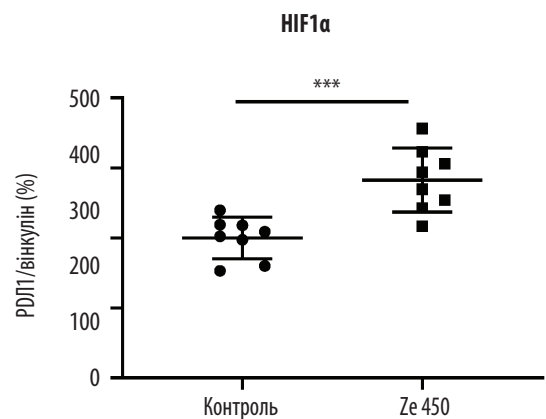
Г



Д



Е



Є

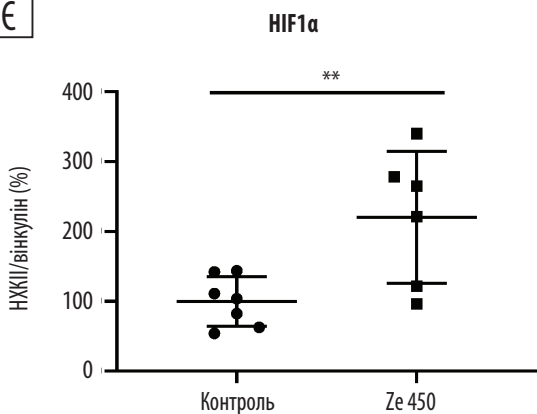


Рисунок 3. Вплив Ze 450 на рівні білків ключових метаболічних регуляторів (А) Вплив 100 мкг/мл Ze 450 на рівні білка HIF1α досліджували за допомогою вестерн-блотингу після 2–16-годинної обробки клітин HT22. (Б) Кількісне оцінювання вестерн-блотингу після 2–16 год обробки 100 мкг/мл Ze 450 зображене як оптична щільність порівняно з β-актином як контролем навантаження (n = 5/стан обробки; *** p < 0,001; ** p < 0,01; непарний t-критерій). (В) Вестерн-блотинг показав вплив обробки Ze 450 100 мкг/мл на рівень білка cMyc після 2–16 год на клітини HT22. (Г) Кількісне оцінювання вестерн-блотингу за оптичною щільністю порівняно з β-актином як контролем навантаження (n = 3/стан обробки; ** p < 0,01; непарний t-критерій). (Д) Вестерн-блотинг рівнів білків PDK1 і HXKII після 16 год обробки Ze 450 (100 мкг/мл) клітин HT22. (Е, Є) Кількісне оцінювання вестерн-блотингу за оптичною щільністю порівняно з вінкуліном як контролем навантаження (n = 8/стан обробки; *** p < 0,001; ** p < 0,01, непарний t-критерій). PDK1 – піруватдегідрогеназа 1, HXKII – гексокіназа II

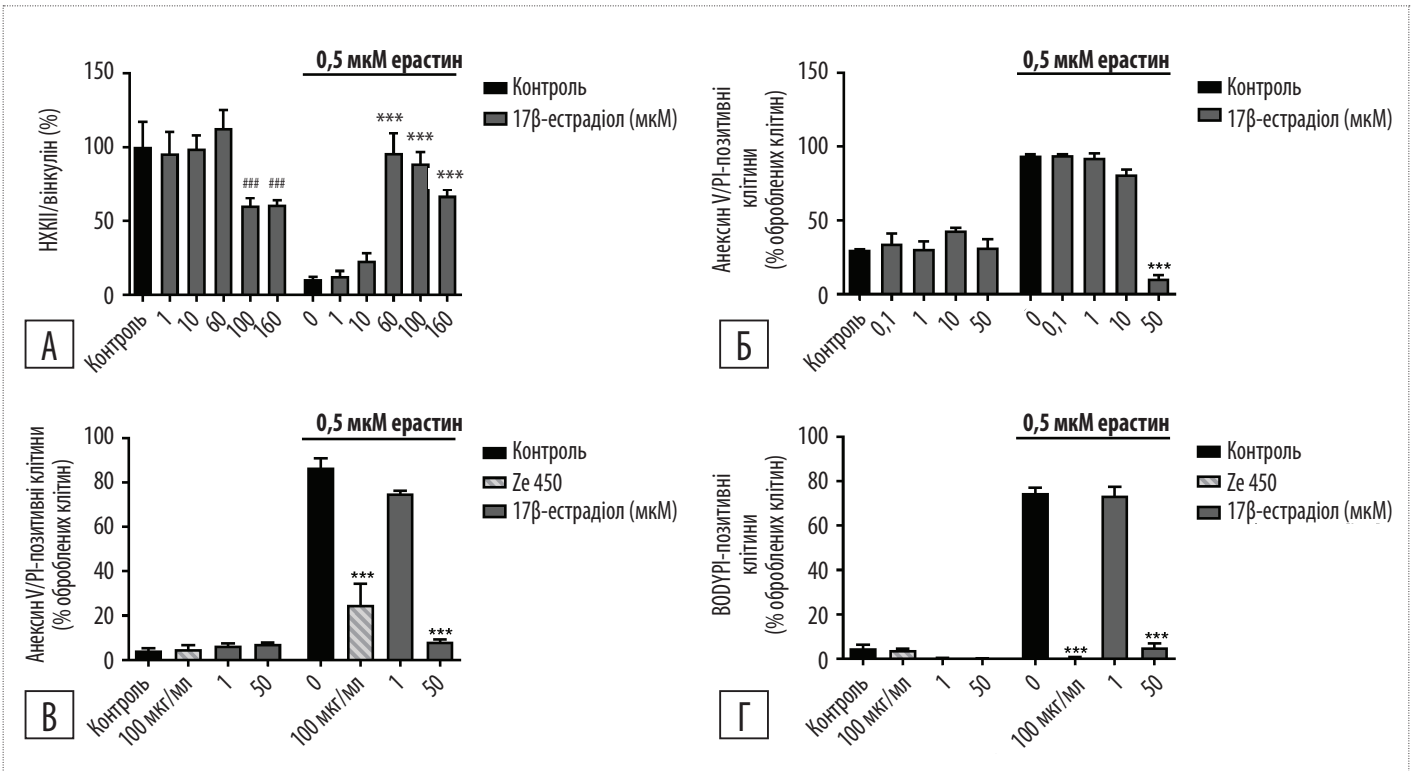


Рисунок 4. Вплив 17β-естрадіолу на клітини HT22

(А) Оцінювали метаболічну активність у клітинах HT22, оброблених ерастином, шляхом вимірювання абсорбції формазану за допомогою аналізу МТТ (0,5 мкМ, 16 год).

Всім повторюваним лункам для кожного стану відображено як середнє значення ± SD. Поглинання в контрольних умовах встановлено як 100%.

(Б, В) Загибель клітин оцінювали за допомогою проточної цитометрії з використанням забарвлення анексином V/PI після 16 год обробки клітин HT22.

Гістограма показує один репрезентативний експеримент із трьома повтореннями на зразок (середнє значення ± SD; 5000 клітин на повторення).

(Г) Перекисне окислення ліпідів оцінювали за допомогою проточної цитометрії з використанням фарбника BODIPY™ через 8 год. Гістограма демонструє один репрезентативний експеримент із трьома повтореннями на зразок (***) $p < 0,001$ порівняно з контролем, обробленим ерастином; ### $p < 0,001$ порівняно з необробленим контролем; дисперсійний аналіз ANOVA, тест Шеффе).

активності клітин) (рис. 4 А), тоді як зумовленому ерастином цитотоксичному зниженню метаболічної активності запобігав 17β-естрадіол у концентрації 50 мкМ (рис. 4 А). Ці результати були підтверджені в аналізі загибелі клітин шляхом забарвлення анексином V/PI, який показав, що 17β-естрадіол у дозі 50 мкМ зберігав життєздатність клітин (рис. 4 Б, В), тоді як його більш низькі концентрації не забезпечували захисного ефекту (рис. 4 Б, В). Крім того, аналіз FACS із фарбуванням BODIPY виявив залежний від концентрації захисний ефект 17β-естрадіолу на рівні перекисного окислення ліпідів (рис. 4 Г). Ці результати доводять, що естрадіол-опосередкований захист від окислювального пошкодження не залежить від ефектів, опосередкованих рецепторами естрогенів, оскільки лише високі мікромолярні концентрації 17β-естрадіолу зумовлюють цей захист, тоді як естроген у концентрації, необхідній для стимуляції рецепторів, не мав ефекту.

Крім того, мітохондріальне дихання клітин, оброблених 17β-естрадіолом, порівнювали з ефектами Ze 450. На відміну від Ze 450, 1 мкМ 17β-естрадіолу посилював мітохондріальне дихання. Щоб проаналізувати ефекти незалежно від початкової різниці у ШСК, було досліджено резервну дихальну здатність. Результати засвідчили, що Ze 450 і 50 мкМ 17β-естрадіолу знижували резервну дихальну спроможність порівняно з контрольними умовами. На відміну від Ze 450, 17β-естрадіол у дозі 50 мкМ частково запобігав зумовленому ерастином зменшенню ШСК. Аналіз

швидкості гліколізу показав, що 50 мкМ 17β-естрадіолу та Ze 450 частково запобігали зниженню ШПЗ, спричиненому ерастином.

Для подальшого з'ясування потенційної ролі стимуляції рецепторів естрогену були застосовані агоністи рецепторів естрогену DPN і PPT в модельній системі окисної смерті, індукованої ерастином. DPN і PPT відрізняються за спорідненістю зв'язування з естрогеновими рецепторами (ER), при цьому DPN переважно зв'язується з ERα, а PPT – з ERβ. На метаболічну активність не впливав жоден з агоністів, вони також не запобігали окислювальному пошкодженню, зумовленому ерастином, яке оцінювали за допомогою аналізу МТТ. Крім того, комбіноване лікування PPT або DPN з 100 мкг/мл Ze 450 не перевищувало ефектів Ze 450.

Також досліджено селективний модулятор рецепторів естрогену 4-ОН-тамоксифен. Тамоксифен – відомий антагоніст ER, який клінічно використовують для лікування естрогензалежного раку молочної залози [32]. Ефекти 4-ОН-тамоксифену порівнювали із Ze 450 у нейронних клітинах. При концентрації 50 мкМ 4-ОН-тамоксифен спричиняв сильне зниження метаболічної активності, ймовірно, відображаючи токсичні ефекти та загибель клітин при такій високій концентрації, тоді як 4-ОН-тамоксифен у дозі 10 мкМ захищав від окислювального пошкодження, опосередкованого ерастином. Для подальшого вивчення синергічних і адитивних ефектів Ze 450 з 4-ОН-тамоксифеном використовували низькі незахисні концентрації 4-ОН-тамоксифену

(0,5 і 1 мкМ). Жодних додаткових ефектів не було виявлено порівняно з Ze 450. Загалом Ze 450 захищав від зумовленої ерастином загибелі клітин, тимчасом як для агоністів ER (DPN, PPT) або для 4-ОН-тамоксифену не спостерігалось адитивного або синергічного ефекту, що підтвердило попередні висновки.

Отже, наведені результати продемонстрували, що зумовлені естрогеном та 4-ОН тамоксифеном ефекти не залежали від сигналізації ER, і, що найважливіше, вплив Ze 450 не був пов'язаний з естрогеноподібною дією.

Метформін опосередковує захисні ефекти на мітохондріальному рівні

У цьому дослідженні ефекти метформіну порівнювали із Ze 450 в модельній системі окислювального стресу, щоб з'ясувати схожість або відмінність їхнього механізму дії.

Метформін не впливав на метаболічну активність у досліджуваному діапазоні концентрацій, що було оцінено за допомогою аналізу МТТ в умовах вихідної культури (рис. 5 А). У моделі окисної смерті, зумовленої ерастином, метформін у концентрації 50 мМ зберігав життєздатність клітин, оцінену за допомогою МТТ-аналізу, що було порівнянно зі 100 мкг/мл Ze 450 (рис. 5 А). Аналіз FACS із використанням анексину V/PI підтвердив залежний від концентрації захист метформіну від цитотоксичності, спричиненої ерастином (рис. 5 Б).

Було продемонстровано, що Ze 450 чинить сильний захисний вплив на перекисне окислення ліпідів у модельних системах окислювального стресу [11, 12]. Досліджено ефекти метформіну на формування АФК у клітинах. Результати показали, що метформін здатний захищати від зумовленого ерастином посилення перекисного окислення ліпідів, але цей ефект був менш вираженим порівняно зі 100 мкг/мл Ze 450. Крім того, утворення мітохондріальних АФК вивчали за допомогою фарбування MitoSOX та подальшого аналізу FACS. Зростання синтезу мітохондріальних супероксидів, спричинене ерастином, зменшувалося при концентрації метформіну понад 2 мМ. Тож метформін захищав від зумовленої

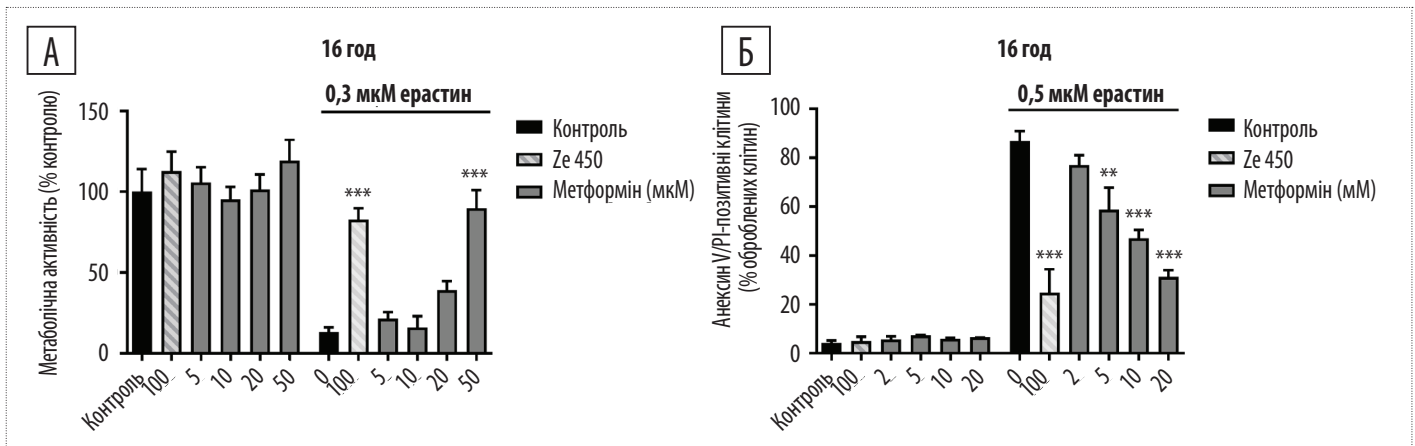
ерастином втрати потенціалу мітохондріальної мембрани залежно від концентрації. На відміну від Ze 450, метформін знижував рівень АТФ у клітинах. Ба більше, виснаження АТФ, викликане ерастином, було повністю нівельоване за допомогою 100 мкг/мл Ze 450, тоді як метформін лише впливав на спричинене ерастином зниження рівня АТФ.

Потім було досліджено вплив метформіну на енергетичний метаболізм (рис. 6 А–Г). Ze 450 показав залежне від концентрації зниження ШСК, зумовлене мітохондріальним диханням, і цей ефект також був притаманний метформіну (рис. 6 А). Метформін (5 і 10 мМ) знижував вихідне значення ШСК, а FCCP стимулював ШСК порівняно із Ze 450 ($p < 0,001$ проти контрольних клітин), тоді як ефект 2 мМ метформіну був менш вираженим для FCCP-стимульованого ШСК ($p < 0,05$) (рис. 6 А). Ze 450 запобігав спричиненому ерастином зниженню ШПЗ, тоді як метформін не захищав гліколітичну енергію тією самою мірою (рис. 6 Г).

Цікаво, що метформін і Ze 450 забезпечували порівняльний захисний ефект у модельній системі окисної загибелі клітин, але щодо впливу на енергетичний метаболізм ефекти метформіну були менш вираженими порівняно із Ze 450.

Метформін і Ze 450 подовжують тривалість життя *C. elegans*

Нематоди *C. elegans* – добре зарекомендована модельна система для вивчення тривалості життя та стійкості мітохондрій до стресу під час дії параквату *in vivo*. Метою цього дослідження було вивчити потенційні захисні ефекти Ze 450 проти смерті, спричиненої паракватом, і потім оцінити вплив Ze 450 на тривалість життя порівняно з метформіном. Як систему попереднього тестування для визначення діапазону концентрацій Ze 450 і метформіну використовували аналіз теплового шоку, який надалі застосовували в дослідженні тривалості життя (рис. 7 А, Б). На основі аналізу теплового шоку 100 мкг/мл Ze 450 було обрано як відповідну концентрацію для стрес-тесту з паракватом. В аналізі з паракватом Ze 450 покращував загальну та середню виживаність (середня виживаність: Ze 450 9,5 год)



Рисунки 5. Метформін захищає клітини HT22 від окисного пошкодження

(А) Метаболічну активність оцінювали в клітинах HT22, оброблених ерастином, шляхом вимірювання абсорбції формазану за допомогою МТТ (0,3 мкМ, 16 год). Вісім повторюваних лунок для кожного стану відображаються як середні значення \pm SD. Поглинання в контрольних умовах встановлено як 100%.

(Б) Загибель клітин оцінювали за допомогою проточної цитометрії з використанням анексину V/PI після 16 год обробки клітин HT22. Гістограма показує один репрезентативний експеримент із трьома повтореннями на зразок (середні значення \pm SD; 5000 клітин на повторення).

*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ порівняно з контролем, який оброблений ерастином (дисперсійний аналіз ANOVA, тест Шеффе).

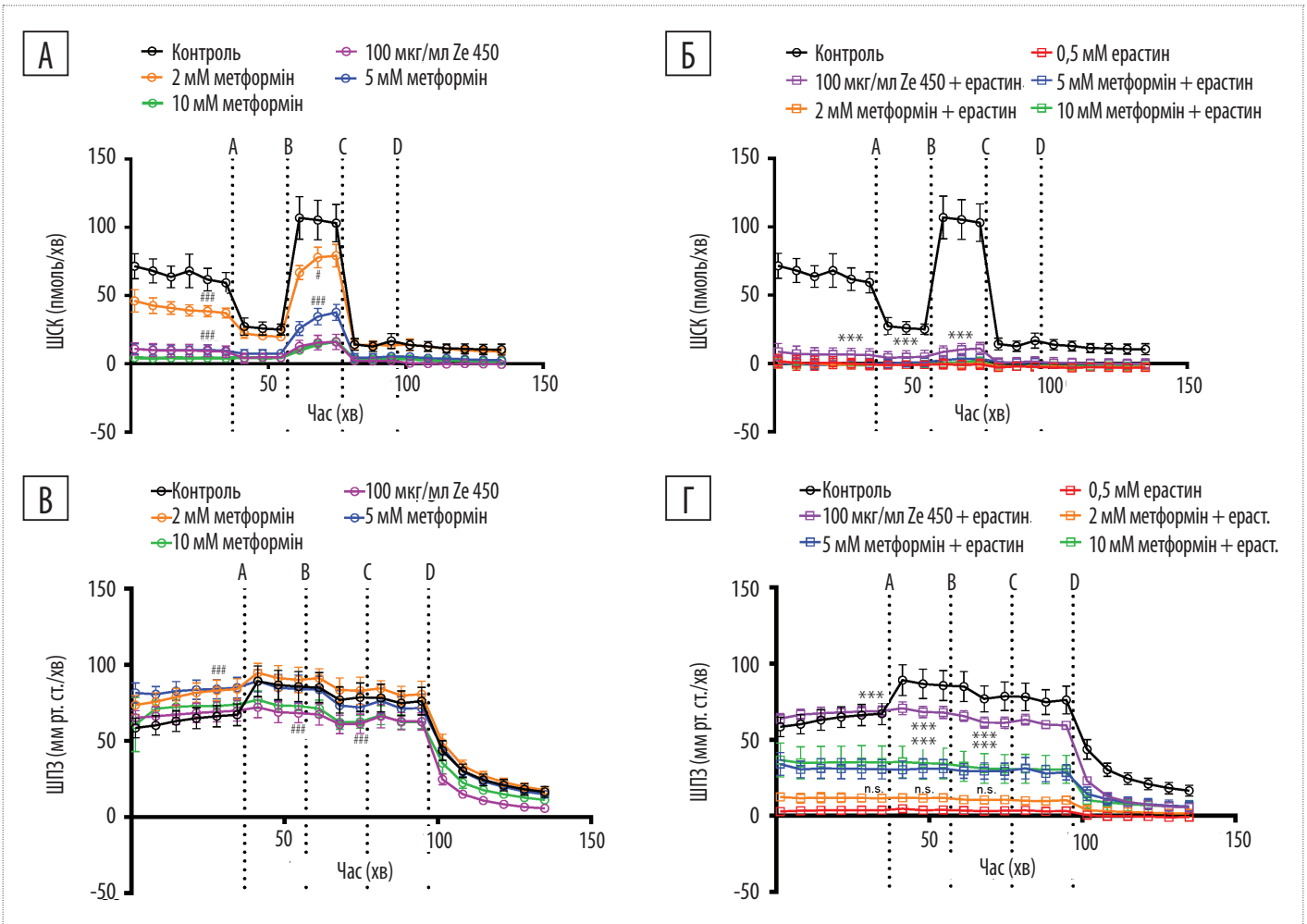


Рисунок 6. Вплив метформіну на швидкість споживання кисню та швидкість позаклітинного закислення

Зображено репрезентативні дані експерименту, що показують ШСК і ШПЗ в умовах вихідного та окислювального стресу. (А, Б) Через 16 год обробки Ze 450 і метформіном (А) і 0,5 мкМ ерастином (Б) ШСК клітин HT22 аналізували за допомогою аналізатора Seahorse XFe96. Дані про 5–8 повторних лунок для кожної умови наведені як середнє значення \pm SD (порт С, D); після 16 год обробки Ze 450 і метформіном (В) і 0,5 мкМ ерастином (Г) ШПЗ визначали за допомогою аналізатора Seahorse XFe96. Дані 5–8 повторюваних лунок для кожної умови наведені як середнє значення \pm SD (порт А: олігоміцин; порт В: FCCP; порт С: ротенон і антимицин А; порт D: 2-дезоксиглюкоза; *** $p < 0,001$ порівняно з контролем, обробленим ерастином; ### $p < 0,001$; ## $p < 0,01$; # $p < 0,05$ порівняно з необробленим контролем; дисперсійний аналіз ANOVA, тест Шеффе; n. s. – не є статистично значущим).

порівняно з виживанням *C. elegans*, підданих впливу параквату (медіана виживання: паракват 8 год) (рис. 7 В).

Було продемонстровано, що метформін подовжує тривалість життя мишей [33] та *C. elegans* [34, 35]. Оскільки подібні механізми можуть спричинятися дією Ze 450 і метформіну, метформін використовували як референтний стан. В аналізі теплового шоку концентрації метформін 50 і 100 мМ знижували виживання, тоді як 25 мМ збільшувала виживання, порівняно з контрольними засобами (рис. 7 Б). Також метформін у концентрації 25 мМ покращив виживання нематод, оброблених паракватом, порівняно з обробленим паракватом контролем (рис. 7 Г).

Після цих багатообіцяльних висновків Ze 450 і метформін були додатково досліджені щодо їхнього впливу на тривалість життя *C. elegans* в аналізі в реальному часі в концентраціях, що відповідають таким, які раніше використовувалися в культивованих нейронних клітинах (рис. 7 Д, Е). Результати показали, що Ze 450 подовжує середню виживаність (24 дні) і загальну виживаність (рис. 7 Д) порівняно з контролем носія (20 днів). Ба більше, метформін 25 мМ

продемонстрував подібні результати щодо загальної виживаності порівняно з контролем із розчинником (рис. 7 В), але не покращив середню виживаність (22 дні для M9 та 25 мМ метформіну). У режимі реального часу виявлено потужний вплив Ze 450 на тривалість життя, який був більш вираженим порівняно з метформіном.

Окрім вивчення тривалості життя, *C. elegans* використовуються для дослідження нейронної функції завдяки їхній добре розвиненій сенсорній та нюховій системі. Щоб оцінити, чи впливає Ze 450 на функцію нейронів, вивчали хемотактичну поведінку нематод. Метформін і Ze 450 підвищували хемотаксичний індекс порівняно з відповідним контролем.

Сукупно результати на моделі *C. elegans* свідчать, що Ze 450 може мати сприятливі ефекти на функції нейронів і загальну тривалість життя організму *in vivo*.

ОБГОВОРЕННЯ

Хоча екстракти *C. racemosa* широко використовують для лікування менопаузальних симптомів, точний механізм їхньої дії не з'ясований. Фізіологічний процес переходу до

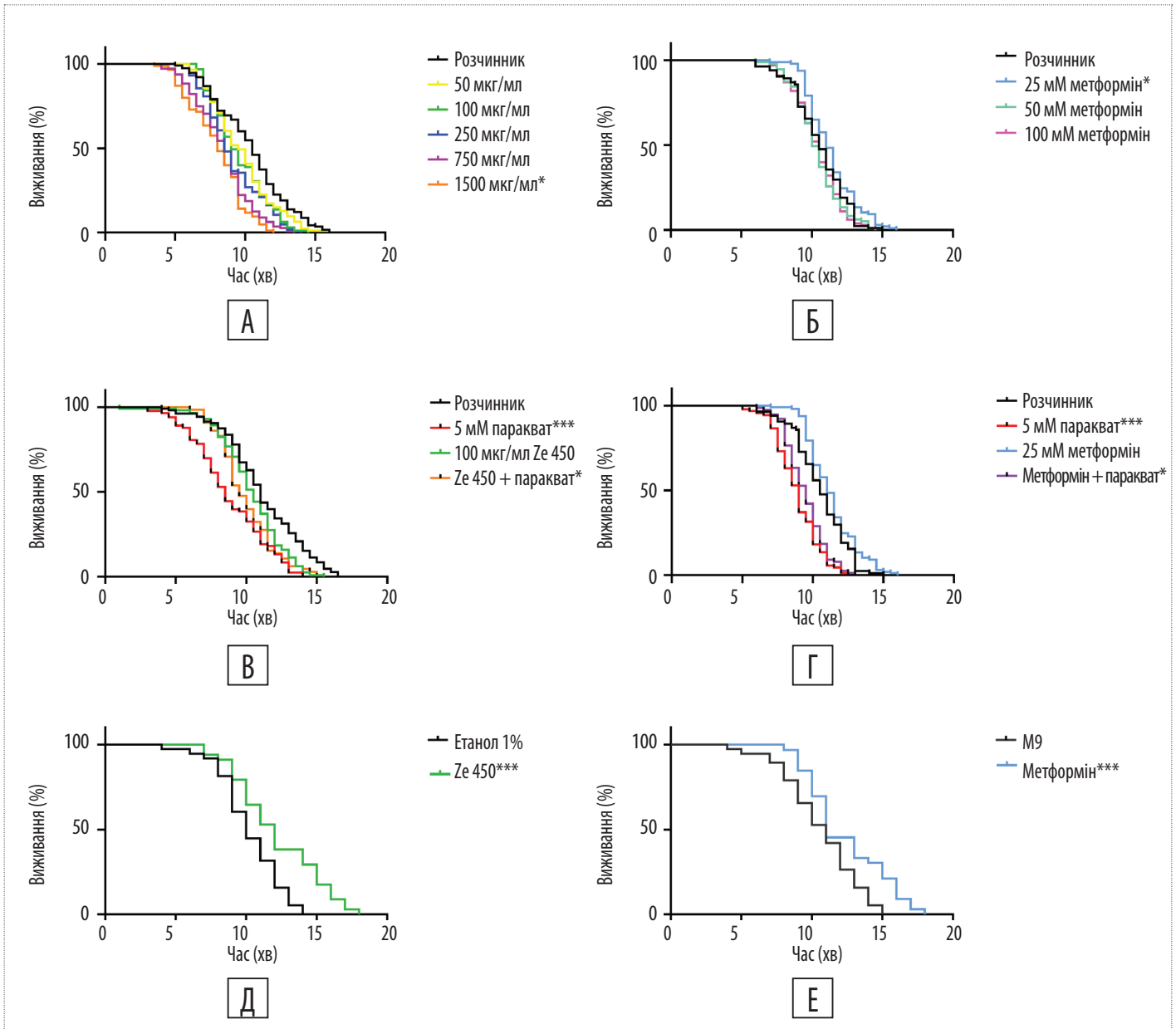


Рисунок 7. Вплив Ze 450 і метформіну на *C. elegans*

(А) Вплив різних концентрацій Ze 450 в системній моделі теплового стресу в *C. elegans*. Ze 450 у концентрації 50–250 мкг/мл не впливав на тривалість життя, тоді як нематоди, оброблені Ze 450 у концентрації 750 або 1500 мкг/мл, показали зменшення тривалості життя (* $p < 0,05$, $n = 85-115$).

(Б) Вплив метформіну (25–100 мМ) у системній моделі теплового стресу в *C. elegans*. Метформін у концентрації 25 мМ подовжував тривалість життя (* $p < 0,05$ порівняно з контролем М9), тоді як лікування метформіном у концентрації ≥ 50 мМ не вплинуло на тривалість життя ($n = 75-97$).

(В) Ефекти 100 мкг/мл Ze 450 у системній моделі індукованого паракватом окислювального стресу в *C. elegans* ($n = 65-113$, *** $p < 0,001$ паракват порівняно з розчинником, * $p < 0,05$ для Ze 450 + паракват порівняно з тільки паракватом).

(Г) Ефекти 25 мМ метформіну в модельній системі індукованого паракватом окислювального стресу в *C. elegans* ($n = 76-97$, *** $p < 0,001$ паракват порівняно з розчинником М9, * $p < 0,05$ для метформіну 25 мМ + паракват порівняно з тільки паракватом).

(Д) Вплив 100 мкг/мл Ze 450 на *C. elegans* в аналізі тривалості життя в реальному часі (*** $p < 0,001$ порівняно з розчинником 1% етанолом).

(Е) Вплив 25 мМ метформіну на *C. elegans* в аналізі тривалості життя в реальному часі (** $p < 0,001$ порівняно з розчинником М9).

менопаузи супроводжується не тільки виснаженням рівня естрогенів, але й віковими змінами метаболізму, зокрема збільшенням маси тіла. Отже, жінки в період менопаузи піддаються впливу чинників ризику метаболічних захворювань, як-от цукровий діабет II типу та остеопороз [10, 36]. Нещодавно було досліджено вплив Ze 450 на метаболічні параметри жінок у менопаузі [18]. Автори продемонстрували, що Ze 450 зменшував набирання ваги в таких жінок. Також було показано, що Ze 450 опосередковував сприятливі

ефекти на мишачій моделі діабету, включно зі зниженням маси тіла та покращенням метаболізму глюкози [16]. У представленому дослідженні виявлено, що екстракт *C. racemosa* Ze 450 чинив сприятливий вплив на клітинний енергетичний метаболізм і захищав від окисного пошкодження клітин, що не залежало від естроген-опосередкованого сигналізування. Продемонстровано, що екстракт *C. racemosa* не впливав на рівень гормонів у жінок у пері- та постменопаузі [37].

Симптоми, спричинені менопаузою, часто лікують за допомогою ЗГТ, хоча ця терапія має деякі обмеження через несприятливі побічні ефекти, як-от ішемічна хвороба серця, інсульт і підвищений ризик розвитку раку молочної залози. У цьому дослідженні було продемонстровано, що механізм дії Ze 450 відрізняється від ефектів 17 β -естрадіолу, агоністів рецепторів естрогену DPN і PPT, а також селективного модулятора естрогенових рецепторів тамоксифену. Виявлено, що 17 β -естрадіол захищає від пошкодження, зумовленого ерастином, але цей ефект пояснюється радше його антиоксидантними властивостями [38–40]. Крім того, мітохондріальне дихання дещо посилювалося при застосуванні концентрації 1 мкМ 17 β -естрадіолу порівняно з контрольними умовами. Це різко контрастує з ефектом Ze 450, який зменшував ШСК (механістична основа захисної дії).

До того ж *in vitro* продемонстровані антипроліферативні ефекти [12], а екстракт *C. racemosa* був запропонований як такий, що має захисну дію у хворих на рак [41–43]. Сукупно результати, отримані в поточному дослідженні, вказують на механізм дії Ze 450, який відрізняється від естроген-опосередкованого сигналізування, що підкреслює важливість ефектів *C. racemosa* як негормональної альтернативи для лікування менопаузальних симптомів, а також дозволяє припустити, що *C. racemosa* сприятливо впливає на порушення обміну речовин [15, 16].

Результати наших попередніх випробувань [12] та поточного дослідження продемонстрували, що Ze 450 зменшував мітохондріальне дихання в нейрональних клітинах і мав інгібувальний ефект на мітохондріальні комплекси залежно від концентрації та часу. Таке гальмування мітохондріального дихання через послаблення функціональності мітохондріального комплексу приводить до зниження продукції супероксидів. Це підтверджує гіпотезу, що Ze 450 опосередковує захисні ефекти, зменшуючи утворення мітохондріальних АФК. Отже, основні місця синтезу супероксидів у мітохондріях інгібуються Ze 450, що згодом зменшує загальне окислювальне пошкодження клітин. Результати нашого дослідження вказують, що Ze 450 частково пригнічує респіраторний комплекс I, а також може бути задіяне пряме або непряме пригнічення інших респіраторних комплексів. Поки що авторам не вдалося виявити інгібування Ze 450 комплексів II або III, тож увагу було зосереджено на інших механізмах, які можуть зумовлювати спостережуваний метаболічний зсув від системи окисного фосфорилування мітохондрій до гліколізу.

Подібний гліколітичний перемикач, виявлений у нейронних клітинах, оброблених Ze 450, вперше був описаний як фундаментальний механізм у ракових клітинах і названий ефектом Варбурга. Основні молекулярні механізми ефекту Варбурга не цілком зрозумілі, але білки HIF1 α і cMyc були визнані головними регуляторами важливих гліколітичних ферментів, як-от HXKII і PDK1, що сприяють метаболічному перепрограмуванню. У цій модельній системі в нейронних клітинах Ze 450 регулював рівні білків HIF1 α і cMyc у різній часовій залежності, що, врешті, спричинило посилення гліколітичного метаболізму завдяки підвищенню рівнів білків HXKII і PDK1.

Було описано, що білок HIF бере участь у регуляції циклу трикарбонової кислоти шляхом посилення активності

PDK1, тим самим обмежуючи надходження пірувату до циклу трикарбонової кислоти. Як наслідок, мітохондріальне дихання зменшується [44, 45]. Щоб дослідити вплив на HIF-опосередковану регуляцію енергетичного метаболізму, автори вимірювали рівні білка PDK1. Одночасно з підвищенням рівня HIF1 α , Ze 450 підвищував рівень білка PDK1, а мітохондріальне дихання, виміряне за допомогою ШСК, знижувалося [12]. Ба більше, наші результати в ізольованих мітохондріях свідчать, що цей вплив на ШСК прискорювався Ze 450 шляхом прямого інгібування комплексів мітохондріальних дихальних ланцюгів.

Крім того, було продемонстровано, що HIF бере участь у зміні субодиниць цитохром-с-оксидази IV у відповідь на гіпоксію в клітинах ссавців шляхом відновлення перенесення електронів на O₂ [46]. А отже, це зумовлює зниження утворення супероксидів комплексами I та III. Тому регуляція утворення супероксидів є важливою метаболічною адаптацією, що керується HIF [46, 47], і цей вплив також може сприяти спостережуваним захисним ефектам Ze 450.

До того ж незбалансований окисно-відновний гомеостаз пов'язаний із багатьма патологічними станами. Наприклад, припливи та підвищене утворення АФК асоціювалися з порушенням обміну речовин у хворих на цукровий діабет [48]. Раніше автори показали, що Ze 450 зменшує опосередковані окислювальним стресом мітохондріальні порушення та загибель клітин гіпоталамуса [12], що свідчить про потенційний зв'язок із зафіксованими метаболічними ефектами екстракту *C. racemosa*; однак механізм дії Ze 450 в експериментальних умовах *in vivo* та в пацієнтів досі невідомий. Крім ефективного лікування менопаузальних симптомів, було припущено, що Ze 450 має терапевтичний потенціал при метаболічних захворюваннях. Наприклад, у моделі мишей Ze 450 опосередковував протидіабетичні ефекти, які були порівнянні з метформіном [16], що підкреслює потенціал Ze 450 як можливого засобу раннього лікування метаболічних захворювань, зокрема діабету II типу. Це також підтверджується клінічними даними, що демонструють зниження ваги у постменопаузальних жінок, які застосовували Ze 450 [18].

Ожиріння – один із найважливіших чинників ризику розвитку цукрового діабету II типу, і перша лінія терапії захворювання неінсулінотропним протидіабетичним препаратом метформіном добре відома. Тому в цьому дослідженні особливу увагу приділено порівнянню механізму дії Ze 450 з метформіном. Метформін регулює рівень глюкози в крові та інсуліну натще завдяки зменшенню шлунково-кишкового та збільшенню периферичного поглинання глюкози [17, 49, 50]. Однак наразі молекулярний механізм дії метформіну потребує з'ясування. Було припущено, що метформін діє на клітинному рівні як мітохондріальний інгібітор ланцюга транспортування електронів та активатор аденозинмонофосфат-активованої протеїнкінази (AMPK) [50], у такий спосіб втручаючись у кілька важливих шляхів регуляції енергетичного метаболізму [51]. Крім того, активація AMPK була пов'язана з нейропротекторними ефектами [52]. І метформін, і Ze 450 захищали від утворення мітохондріальних АФК, втрати потенціалу мітохондріальної мембрани та окислювальної загибелі клітин. Водночас метформін був описаний


як мітохондріальний інгібітор комплексу I, що спричиняє зниження продукції АФК у мітохондріях [50, 51]. Це також було виявлено в представленому дослідженні, оскільки метформін знижував ШСК залежно від концентрації. Ze 450 продемонстрував сильніші захисні ефекти щодо запобігання зумовленому ерастином виснаженню АТФ порівняно з метформіном. Це може бути пов'язано з більш вираженим зрушенням у бік гліколізу в умовах окислювального стресу. Ці результати демонструють, що Ze 450 може втручатися в клітинний енергетичний метаболізм і тим самим сприяти позитивним ефектам, що може розширити його терапевтичні можливості.

З огляду на це великий інтерес становить порівняння впливу метформіну та Ze 450 на весь організм. Задля цієї мети використовували *C. elegans* як систему *in vivo* для оцінювання впливу на мітохондріальний окислювальний стрес і тривалість життя [53]. У цьому дослідженні 100 мкг/мл Ze 450 захищали *C. elegans* від токсичності, зумовленої паракватом. Було виявлено відмінності між метформіном і Ze 450, оскільки метформін у концентрації 25 мМ підвищував виживання в системі на стійкість до теплового стресу, тоді як 100 мкг/мл Ze 450 – ні. У попередніх дослідженнях подовження тривалості життя *C. elegans* за допомогою метформіну пояснювалося безліччю ефектів, наприклад модуляцією мікробного метаболізму фолатів і метіоніну [35], а також активацією AMPK і лізосомальних шляхів [34]. До того ж вплив метформіну на старіння досліджується в поточних клінічних випробуваннях [54]. Це дослідження може погли-

бити знання про інші терапевтичні показання, крім впливу на цукровий діабет II типу [55]. Аналогічно, основні механізми екстракту *C. racemosa*, що подовжують тривалість життя та захищають від окислювального впливу *in vivo*, потребують подальшого вивчення, також у клінічних умовах.

Результати, отримані на нематодах *C. elegans in vivo*, підкреслюють, що Ze 450 чинить позитивний вплив на весь організм і може сприяти здоровому старінню. Крім того, Ze 450 продемонстрував захисні ефекти проти окислювальної дії параквату, підтвердивши попередні висновки *in vitro*, які показали, що Ze 450 зберігає мітохондріальну функцію та цілісність у парадигмах фероптозу¹.

ВИСНОВКИ

Отже, препарат Сімідона британської компанії Amaha LTD, у складі якого є екстракт Ze 450, безпосередньо впливає на мітохондрії і в такий спосіб підвищує стійкість клітин до окислювального стресу. Загалом отримані результати підтверджують висновок, що Ze 450 чинить сильний вплив на мітохондріальному рівні, що було продемонстровано в ізольованих мітохондріях, нейронних клітинах *in vitro* та у *C. elegans in vivo*. Наші результати свідчать, що Ze 450 має додатковий сприятливий ефект на віковий і метаболічний захворювання. 

Оригінал статті та список літератури можна знайти за адресою:
<https://www.mdpi.com/2076-3921/10/9/1432>

ЕКСТРАКТ *CIMICIFUGA RACEMOSA* ZE 450 ВІДНОВЛЮЄ ЕНЕРГЕТИЧНИЙ МЕТАБОЛІЗМ І СПРИЯЄ ДОВГОЛІТТЮ

Malena Rabenau, Біохіміко-фармакологічний центр, Інститут фармакології та клінічної фармації Марбурзького університету, Центр розумового мозку та поведінки, Марбург, Німеччина; компанія Max Zeller Soehne AG (доклінічні дослідження), Романсхорн, Швейцарія

Benjamin Dillberger, Центр біомедичних досліджень Зельтерсберга, Лабораторія харчування в профілактиці та терапії, Інститут наук про харчування, Гіссенський університет ім. Юстуса Лібіха, Гіссен, Німеччина

Madeline Günther, Біохіміко-фармакологічний центр, Інститут фармакології та клінічної фармації Марбурзького університету, Центр розумового мозку та поведінки, Марбург, Німеччина та інші автори

Нещодавно автори повідомляли, що екстракт *Cimicifuga racemosa* Ze 450 зумовлював захист від окисного пошкодження клітин через метаболічний зсув від окисного фосфорилування до гліколізу. У цій роботі було досліджено молекулярні механізми, що лежать в основі впливу Ze 450 щодо фероптозу в нейронних клітинах, з особливим акцентом на мітохондріях. Вплив Ze 450 на активність дихального комплексу та ознаки фероптозу досліджували в ізольованих мітохондріях та в культивованих нейронних клітинах відповідно. Для вивчення пошкоджень мітохондрій і довголіття *in vivo* модельним організмом були нематоди *Caenorhabditis elegans*.

Виявлено, що Ze 450 безпосередньо інгібує активність комплексу I у мітохондріях та посилює метаболічний зсув у бік гліколізу через регуляцію cMyc і HIF1α. Захисні ефекти щодо фероптозу були опосередковані незалежно від активації рецепторів естрогенів і відрізнялися від таких метформіну. Ze 450 *in vivo* захищав *C. elegans* від мітохондріального токсину параквату та сприяв подовженню тривалості життя залежно від дози. Зрештою, Ze 450 опосередковував метаболічний зсув до гліколізу шляхом прямого впливу на мітохондрії та зміненої клітинної сигналізації, тим самим сприяючи вираженій стійкості клітин до окислювального стресу *in vitro* та *in vivo*.

Ключові слова: *Cimicifuga racemosa*, кохош чорний, мітохондрії, метформін, окислювальний стрес, довголіття.

CIMICIFUGA RACEMOSA EXTRACT ZE 450 RE-BALANCES ENERGY METABOLISM AND PROMOTES LONGEVITY

Malena Rabenau, Biochemical-Pharmacological Center, Institute of Pharmacology and Clinical Pharmacy, University of Marburg; Center for Mind, Brain and Behavior, Marburg, Germany; Preclinical Research, Max Zeller Soehne AG, Romanshorn, Switzerland

Benjamin Dillberger, Biomedical Research Center Seltersberg, Laboratory for Nutrition in Prevention and Therapy, Institute of Nutritional Sciences, Justus-Liebig-University of Giessen, Giessen, Germany

Madeline Günther, Biochemical-Pharmacological Center, Institute of Pharmacology and Clinical Pharmacy, University of Marburg; Center for Mind, Brain and Behavior, Marburg, Germany and other authors

Recently, we reported that the *Cimicifuga racemosa* extract Ze 450 mediated protection from oxidative cell damage through a metabolic shift from oxidative phosphorylation to glycolysis. Here, we investigated the molecular mechanisms underlying the effects of Ze 450 against ferroptosis in neuronal cells, with a particular focus on mitochondria. The effects of Ze 450 on respiratory complex activity and hallmarks of ferroptosis were studied in isolated mitochondria and in cultured neuronal cells, respectively. In addition, *Caenorhabditis elegans* served as a model organism to study mitochondrial damage and longevity *in vivo*. We found that Ze 450 directly inhibited complex I activity in mitochondria and enhanced the metabolic shift towards glycolysis via cMyc and HIF1α regulation. The protective effects against ferroptosis were mediated independently of estrogen receptor activation and were distinct from effects exerted by metformin. *In vivo*, Ze 450 protected *C. elegans* from the mitochondrial toxin paraquat and promoted longevity in a dose-dependent manner. In conclusion, Ze 450 mediated a metabolic shift to glycolysis via direct effects on mitochondria and altered cell signaling, thereby promoting sustained cellular resilience to oxidative stress *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: *Cimicifuga racemosa*, black cohosh, longevity, metformin, mitochondria, oxidative stress, longevity.

¹ Фероптоз – тип програмованої окисної некротичної загибелі клітини, характерною особливістю якого є залізо залежне перекисне окиснення ліпідів (прим. ред.).