

МЕТАБОЛІЧНИЙ ЗСУВ, ІНДУКОВАНИЙ ЕКСТРАКТОМ *CIMICIFUGA RACEMOSA*, ЗАПОБІГАЄ ПОШКОДЖЕННЮ МІТОХОНДРІЙ ТА ОКИСЛЮВАЛЬНІЙ ЗАГИБЕЛІ КЛІТИН*

M. RABENAU

Інститут фармакології та клінічної фармації, Біохіміко-фармакологічний центр Марбурга, Марбурзький університет ім. Філіппа; Center for Mind Brain and Behavior, Марбург, Німеччина

M. UNGER

відділ доклінічних досліджень, компанія Max Zeller Soehne AG, Романсхорн, Швейцарія

J. DREWE

відділ доклінічних досліджень, компанія Max Zeller Soehne AG, Романсхорн, Швейцарія

C. CULMSEE

Інститут фармакології та клінічної фармації, Біохіміко-фармакологічний центр Марбурга, Марбурзький університет ім. Філіппа; Center for Mind Brain and Behavior, Марбург, Німеччина

Контакти:

Carsten Culmsee
Institut für Pharmakologie und
Klinische Pharmazie, Biochemisch-
Pharmakologisches Centrum
Marburg, Philipps-Universität
Marburg, Karl-von-Frisch-Straße 1,
35032 Marburg, Germany
email: culmsee@staff.uni-marburg.de

ВСТУП

Екстракт *Cimicifuga racemosa* зазвичай використовується для лікування симптомів менопаузи (Schellenberg et al., 2012). Гормональні зміни, такі як виснаження рівнів естрогену, призводять до менопаузальних скарг; багато жінок, які переживають менопаузу, страждають від вазомоторних симптомів, таких як приливи та пітливість, зміна настрою і збільшення ваги. При лікуванні цих симптомів широко застосовується замісна гормональна терапія (ЗГТ), але ця терапія обмежена через несприятливі ефекти, такі як підвищений ризик раку молочної залози та тромбоемболічні події (Warren et al., 2000; Rossouw et al., 2002; Beral, 2003). Крім того, ЗГТ не затверджена для застосування в жінок у періоді перименопаузи, а відсутність терапевтичних альтернатив і той факт, що такі пацієнтки надають перевагу рослинним препаратам, демонструє потребу в подальшому поглибленому дослідженні екстракту *C. racemosa*. Насправді екстракт *C. racemosa* чинить сприятливі терапевтичні ефекти і має позитивний профіль співвідношення користь/ризик, що зазначено у монографії Комітету з рослинних лікарських засобів (Committee on Herbal Medicinal Products, HMPC) Європейського агентства з лікарських засобів (European Medicines Agency, EMA) (2010).

Ze 450 – це екстракт *C. racemosa*, який виробляється за стандартизованою процедурою і схвалений для лікування скарг у перименопаузі у дозах 6,5–13 мг/добу в багатьох європейських країнах (торгова назва – препарат Сімідона, Атаха Pharma). Добре відомо, що виснаження рівнів естрогену спричиняє загальні менопаузальні прояви, проте все більше даних свідчать про наявність додаткових ефектів, зокрема посилення окисного стресу, який може сприяти розвитку метаболічних розладів, що не реагують на ЗГТ (Sekhon and Agarwal, 2013), а також сприяти такому прояву менопаузи, як приливи. У цьому контексті дослідження зосереджуються на вивченні печінки як органу, який відповідає за більшість обмінних процесів. Крім того, інтерес представляє змінена регуляція метаболізму гіпоталамусом, який є вищим ендокринним

контролером метаболізму та терморегуляторним центром. Примітно, що викид критичної кількості активних форм кисню (АФК) у цій області мозку асоціювався з порушенням нейроендокринної регуляції і метаболічного гомеостазу, тим самим індукуючи цукровий діабет II типу (Drougard et al., 2015). Недавні дослідження показали, що Ze 450 підвищує фосфорилування аденозинмонофосфат-активованої протеїнкінази (АМФК) *in vitro* і зменшує метаболічні розлади у мишей лінії ob/ob та в оваріоектомованих щурів *in vivo*, вказуючи на те, що вплив екстракту *Cimicifuga* на біоенергетичний метаболізм має суттєвий терапевтичний ефект щодо менопаузальних проявів (Moser et al., 2014; Sun et al., 2016). Таким чином, дослідження впливу Ze 450 на окислювальний стрес і регуляцію метаболізму в нейронах гіпоталамусу та клітинах печінки дозволить отримати нові уявлення про механізм дії екстракту *Cimicifuga*.

У всіх клітинах організму, включаючи нейрони та клітини печінки, мітохондрії є ключовими органелами енергетичного обміну й основним джерелом АФК при витоку електронів. Мітохондріальні АФК є важливими медіаторами пошкодження клітин і мітохондрій, їх рівень часто підвищується за певних патологічних станів та окисного стресу (Galluzzi et al., 2009). Таким чином, мітохондрії можуть бути загальною мішенню для Ze 450. Посилення утворення АФК розглядається як руйнівна сила мітохондріальної та клітинної дисфункції і чинить значний вплив на порушення регуляції метаболізму, запальні процеси та загибель клітин. Недавні дослідження показали, що стійкість мітохондрій послаблюється при вікових, імунологічних і метаболічних патологіях, наприклад, при цукровому діабеті II типу (Held and Houtkooper, 2015). Відтак було запропоновано, що захист мітохондрій є перспективною терапевтичною стратегією при лікуванні метаболічних захворювань, пов'язаних із окислювальним стресом. Тому основною метою цього дослідження було з'ясування впливу Ze 450 на нейрони та клітини печінки стосовно мітохондріальних показників і токсичності окислювальних клітин із використанням добре вивчених *in vitro* моделей окисного стресу (Neitemeier et al., 2017; Jelinek et al., 2018).

* Переклад статті, опублікованої в журналі Phytomedicine 52 (2019): 107–116.

DOI: 10.1016/j.phymed.2018.09.177

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Культура клітин

Клітини HT22 (люб'язно надав David Schubert, Лабораторія клітинної нейробіології Інституту біологічних досліджень ім. Салка, Ла-Хойя, Каліфорнія, США) та клітини mHypo (Cedarlane®, Cellutions Biosystems Inc., Канада) вирощували в модифікованому Дульбекко середовищі Ігла (DMEM, Capricorn Scientific GmbH, Німеччина) з додаванням 10% інактивованої теплою фетальної телячої сироватки (Merck KGaA, Німеччина), 100 Од/мл пеніциліну, 100 мг/мл стрептоміцину (Merck KGaA, Німеччина) і 2 мМ глутаміну (Merck KGaA, Німеччина). Для індукції загибелі клітин до середовища протягом певного періоду часу (8–16 год) додавали 1 мкМ ерастину (Calbiochem®, Німеччина).

Клітини HepG2 (ATCC®™ HB-8065™) вирощували в мінімально необхідному середовищі Ігл (EMEM, Merck KGaA, Німеччина), з додаванням 10% інактивованої теплою фетальної телячої сироватки, 100 Од/мл пеніциліну, 100 мг/мл стрептоміцину. Для індукції окисної загибелі клітин було додано 4 мкМ 1S,3R-RSL-3 (ras-селективна летальна сполука) (Neitemeier et al., 2017), яку люб'язно надав професор Diederich (Університет Марбурга, Німеччина).

Екстракт *Cimicifuga racemosa* Ze 450

Етанольний (об/об) сухий екстракт *Cimicifuga racemosa* Ze 450 виготовляли із сухих коренів і кореневищ та отримували від компанії Max Zeller and Soehne AG (Романсхорн, Швейцарія). Вміст тритерпенових глікозидів становив 6,4%. Для екстракції Ze 450 використовували 60% етанол (об/об) (Carl Roth GmbH, Німеччина) для всіх експериментів. Ze 450 відповідає рослинному препарату В (торгова назва – препарат Сімідона, Амаха Pharma), який добре описаний у монографії про *Cimicifuga racemosa* Комітету рослинних лікарських засобів (Committee on Herbal Medicinal Products, HMPC) у 2010 р.

Життєздатність клітин

Проліферацію клітин аналізували в реальному часі, вимірюючи електричний імпеданс (Diemert et al., 2012). Метаболічну активність як показник життєздатності клітин визначали кількісно за допомогою аналізу MTT (Neitemeier et al., 2017). Життєздатні та метаболічно активні клітини конвертували 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію бромідом (MTT, Merck KGaA, Німеччина), який додавали у концентрації 2,5–5 мг/мл за 1 год при 37 °C до живильного середовища, у фіолетовий формазан. Поглинання вимірювали при 570 нм проти 630 нм за допомогою FluoStar (BMG Labtech, Німеччина) після розчинення в диметилсульфоксиді (DMSO, Carl Roth GmbH, Німеччина).

Загибель клітин HT22, mHypo і HepG2, оброблених Ze 450, ерастином або 1S,3R-RSL-3, виявляли за допомогою комплексу анексин V-FITC/PI Detection Kit (PromoCell, Німеччина) з подальшим сортуванням клітин, що активуються флуоресценцією (аналіз FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting, guava easyCyte, Merck KGaA, Німеччина) – сортування клітин з активованою флуоресценцією). Анексин V-FITC активувався при довжині хвилі 488 нм, випромінювання виявляли через смуговий фільтр 525 ± 30 нм. Йодид пропідію активувався при довжині хвилі 488 нм, випромінювання

флуоресценції виявляли за допомогою смугового фільтра 690 ± 50 нм. Дані збирали щонайменше з 5000 клітин з як мінімум трьома повторами умов. Значення напівмаксимальної ефективної концентрації EC_{50} (нелінійна відповідність: логарифм (Ze 450) порівняно з відповіддю, змінний нахил) були розраховані принаймні у трьох незалежних аналізах за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism Software 6.05 (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

Перекисне окислення ліпідів

Після зазначених процедур клітини HT22 mHypo і HepG2 фарбували BODIPY 581/591 C_{11} (Invitrogen, США) протягом 1 год (37 °C, 4,5% CO_2) і збирали для аналізу FACS. 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 клітинах щонайменше в трьох повторах умов. Рівень перекисного окислення ліпідів розраховували шляхом аналізу зсуву флуоресценції від зеленої до червоної.

Формування АФК у мітохондріях

MitoSOX червоний (Invitrogen, США) вибірково орієнтований на мітохондрії, де окислюється супероксидами з червоною флуоресценцією. Для виявлення утворення АФК у мітохондріях MitoSOX червоний застосовували протягом 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 клітинах та трьох повторах умов.

Морфологія мітохондрій

Для візуалізації змін морфології мітохондрій використовували барвник MitoTrackers Deep Red FM (Invitrogen, США, 200 нм). Клітини HT22 висівали на 8-лункові предметні скельця (Ibidi GmbH, Німеччина) по 14 000 клітин на лунку та обробляли Ze 450 і ерастином. Після зазначеного часу обробки до клітин додавали барвник Mito-Trackers Deep червоний та інкубували протягом 30 хв при 37 °C. Клітини фіксували 4% параформальдегідом протягом 20 хв при кімнатній температурі. Морфологію мітохондрій аналізували, класифікуючи клітини за раніше описаною методикою (Grohm et al., 2010). Мітохондрії I категорії були організовані в трубчасту мережу, мітохондрії II категорії були фрагментовані, але рівномірно розподілені по цитозолу, тоді як мітохондрії III категорії були повністю фрагментовані та оточували ядро. Підраховували щонайменше 500 клітин без відома історії обробки. Зображення були отримані за допомогою епі-флуоресцентного мікроскопа Leica DMI6000 (збільшення об'єктива × 63), з використанням довжини хвилі збудження 620 нм (смуговий фільтр) та виявленням випромінювання за допомогою фільтра пропуску хвиль довжиною 670 нм.

Вимірювання аденозинтрифосфорної кислоти

Рівні аденозинтрифосфорної кислоти (АТФ) визначали за допомогою комплексу ViaLight™ plus Kit (Лонза, США) згід-

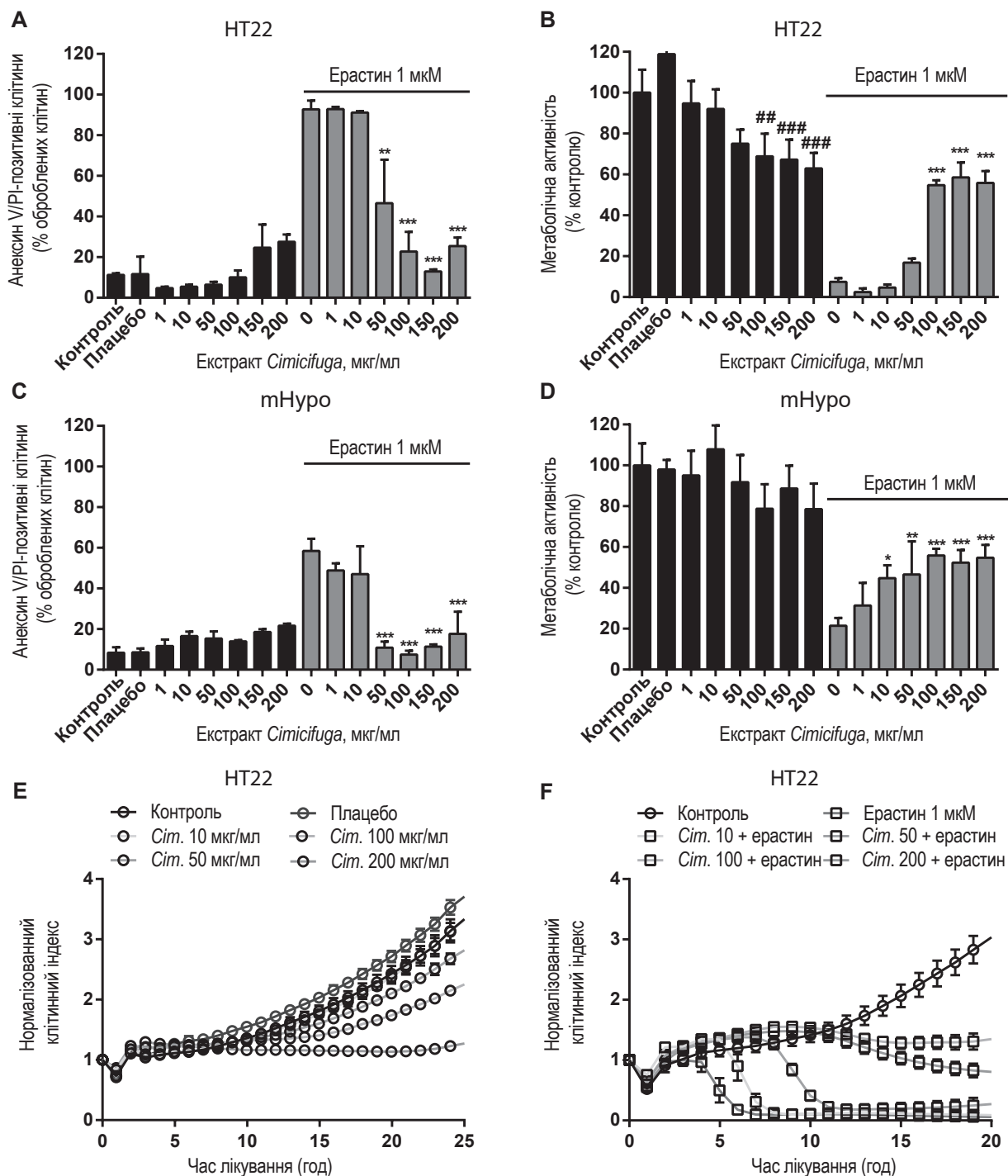


Рисунок 1. А: Фарбування анексином V/PI та подальший FACS-аналіз показали зменшену загибель клітин HT22, оброблених Ze 450 у концентрації більше 50 мкг/мл та ерастином, порівняно з обробленими ерастином клітинами HT22 (1 мкМ, 16 год, $n = 3$ /стан обробки). В: Аналіз MTT показав захисну дію Ze 450 в концентраціях вище 100 мкг/мл проти обумовленого ерастином (1 мкМ, 16 год) зниження метаболічної активності в клітинах HT22 ($n = 6$ /стан обробки). С: Фарбування анексином V/PI та подальший аналіз FACS показали знижену загибель клітин mHypo, оброблених Ze 450 у концентраціях більше 50 мкг/мл та ерастином, порівняно з обробленими ерастином клітинами mHypo (1 мкМ, 16 год, $n = 3$ /стан обробки). D: Аналіз MTT продемонстрував захисну дію Ze 450 в концентрації понад 10 мкг/мл проти обумовленого ерастином (1 мкМ, 16 год) зниження метаболічної активності ($n = 6$) у клітинах mHypo. E + F: Вимірювання імпедансу в режимі реального часу показало знижену проліферацію при застосуванні Ze 450 у концентрації понад 100 мкг/мл у клітинах HT22. Ze 450 (10–200 мкг/мл) залежно від концентрації запобігав зниженню проліферації, обумовленої ерастином. Дані були отримані з того самого експерименту, але показані на окремих графіках для кращої візуалізації ($n = 6$ /стан обробки). Усі дані наведені як середнє значення $\pm$ стандартне відхилення (SD).

$p < 0,05$, ### $p < 0,001$ порівняно з необробленим контролем HT22/mHypo;
*** $p < 0,001$ порівняно з обробленим ерастином контролем HT22/mHypo (дисперсійний аналіз ANOVA, тест Шеффе)

но з виробничим протоколом. Через 24 год після висіву на 96-лункові планшети (6000 клітин на лунку) клітини обробляли Ze 450 та ерастином або 1S,3R-RSL-3. У визначений час після лікування (8 та 16 год) клітини переносили на білий 96-лунковий планшет, а рівень АТФ аналізували шляхом виявлення люмінесценції за допомогою FluoStar OPTIMA (BMG Labtech, Німеччина).

Вимірювання за допомогою технології Seahorse

Для визначення швидкості споживання кисню (ШСК) та швидкості позаклітинного закислення (ШПЗ) як міри дихання мітохондрій та гліколізу відповідно проводили одночасне їх вимірювання в реальному часі за допомогою аналізатора позаклітинного потоку XF (Agilent Technologies, США) за раніше описаною методикою (Neitemeier та ін., 2017). Клітини HT22 висівали в лунки XF96-мікропланшета (6000 клітин на лунку, Seahorse Bioscience) і обробляли Ze 450 та ерастином. За вказаних умов обробки ростове середовище замінювали додаванням ~180 мкл досліджуваного середовища (містить 4,5 г/л глюкози як джерела цукру, 2 мМ глютаміну, 1 мМ пірувату, рН 7,35), і клітини інкубували при 37 °C протягом 60 хв. Перед додаванням сполук були записані три початкові вимірювання. Олігоміцин (інгібітор АТФ-синтази) (Merck KGaA, Німеччина) вводили в порт А (20 мкл) у кінцевій концентрації 3 мкМ, FCCP (роз'єднувальний агент) (Merck KGaA, Німеччина) вводили в порт В (22,5 мкл) у концентрації 0,5 мкМ, ротенон/антиміцин А (комплексні інгібітори І/ІІІ) (Merck KGaA, Німеччина) вводили у порт С (25 мкл) в концентрації 100 нМ та 1 мкМ відповідно, 2-дезоксиглюкозу (інгібітор гліколізу) (Carl Roth GmbH, Німеччина) вводили у порт D (27,5 мкл) в концентрації 50 мМ. Після додавання кожної сполуки проводили три вимірювання (4 хвилини перемішування з подальшим 3-хвилинним виявленням).

Мембранний потенціал мітохондрій

Після обробки Ze 450 та ерастином або 1S,3R-RSL-3 клітини фарбували TMRE 0,4 нМ протягом 30 хв при 37 °C (комплект MitoPT ΔΨm Kit, Immunocytochemistry Technologies, США) та вимірювали TMRE-флуоресценцію за допомогою аналізу FACS. При втраті 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 клітинах та трьох лунках за аналогічних умов.

Статистичний аналіз

Усі дані подані як середнє значення або $\pm$ стандартне відхилення (SD). Статистичне порівняння між групами обробки проводили за допомогою дисперсійного аналізу (двосторонній аналіз ANOVA) з наступним тестом Шеффе; показник $p < 0,05$ вважався статистично значущим. Розрахунки виконували за допомогою стандартного статистичного програмного забезпечення Winstat (R. Fitch Software, Німеччина) та візуалізували за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism (GraphPad Software, США).

РЕЗУЛЬТАТИ

Ze 450 запобігає загибелі нейронів у системних моделях окисного стресу

Клітини HT22 і mHуро обробляли протягом 16 год за допомогою Ze 450 (1–200 мкг/мл), а окислювальний стрес викликали одночасним застосуванням ерастину (рис. 1А, 1С). Інгібування ерастином системи Хс-проковує виснаження глутатіону в клітинах, порушуючи тим самим окислювально-відновний гомеостаз глутатіонпероксидази-4, що призводить до масивного утворення АФК, пошкодження мітохондрій та загибелі клітин (Landshamer et al., 2008; Neitemeier et al., 2017).

Ze 450 не призвів до збільшення клітин, позитивно зафарбованих анексином V/PI (рис. 1А, 1С), але при концентраціях більше 50 мкг/мл запобігав обумовленій ерастином загибелі клітин. Метаболічну активність визначали за допомогою аналізу МТТ. Ze 450 в концентраціях понад 100 мкг/мл дещо знижував метаболічну активність в клітинах HT22 (рис. 1В), тоді як на метаболічну активність клітин mHуро Ze 450 не впливав (рис. 1D). Знижена метаболічна активність, що вказує на загибель клітин після дії ерастину, частково зберігалася завдяки Ze 450 у клітинах mHуро та HT22 (рис. 1В, 1D). Крім того, вимірювання імпедансу в реальному часі показало, що проліферація клітин HT22 була зменшена при концентраціях Ze 450, що перевищували 100 мкг/мл, порівняно з контролем (рис. 1Е). Ці вимірювання в режимі реального часу показали, що 10 і 50 мкг/мл Ze 450 забезпечували тимчасовий захист від токсичності ерастину, тоді як у концентраціях вище 100 мкг/мл екстракт забезпечував постійний захисний ефект (рис. 1F). Такі ж ефекти спостерігались в клітинах mHуро при застосуванні ерастину.

Ze 450 опосередковує захист від індукованих ерастином порушень мітохондрій

Перекисне окислення ліпідів є ранньою подією в модельній системі ерастин-індукованої окислювальної загибелі клітин. Формування АФК в клітинах завдяки підвищеній активності 12/15-ліпоксигеназ досліджували в клітинах HT22 та mHуро за допомогою аналізу C11-BODIPY FACS через 8 і 16 год обробки. Ze 450 не збільшував утворення АФК в клітинах, але в концентраціях вище 50 мкг/мл ліквідував опосередковане ерастином посилення перекисного окислення ліпідів в обидва моменти часу в клітинах HT22 (рис. 2А, 2В). Такий самий ефект спостерігався у клітинах mHуро.

Далі ми проаналізували вплив Ze 450 на рівень АТФ, щоб отримати уявлення про участь мітохондрій у нейропротекторних ефектах Ze 450. У клітинах mHуро та HT22 Ze 450 у концентраціях понад 150 мкг/мл знижував рівень клітинної АТФ до ~70% в стандартних умовах культури (рис. 2С). Після впливу ерастину виснаженню АТФ частково запобігали концентрації Ze 450 понад 100 мкг/мл у клітинах HT22 та 50–150 мкг/мл у клітинах mHуро (рис. 2С).

Мітохондріальні АФК є важливими медіаторами клітинного стресу, а дисфункція мітохондрій пов'язана зі збільшенням утворення мітохондріальних АФК та зі шляхами окислювальної загибелі клітин. Формування АФК мітохондрій досліджували у клітинах HT22 та mHуро, використовуючи фарбування червоним MitoSOX та FACS-аналіз через

16 год після обробки. В обох клітинних лініях нейронів Ze 450 не впливав на накопичення АФК у мітохондріях у початкових умовах (рис. 2D). Навпаки, індукованому ерастином збільшенню утворення АФК в мітохондріях запобігали концентрації Ze 450 понад 50 мкг/мл (рис. 2D). Цей ефект також спостерігався після лікування, коли Ze 450 застосовували до 1 год після початку впливу ерастину (рис. 2E).

Потім через 16 год лікування аналізували в клітинах HT22 та mHypo потенціал мітохондріальної мембрани за допомогою TMRE. Ze 450 в обох клітинних лініях нейронів в стандартних умовах культивування не впливав на потенціал мітохондріальної мембрани (рис. 2F), а втраті потенціалу мітохондріальних мембран через вплив ерастину запобігали концентрації Ze 450, що перевищували 50 мкг/мл (рис. 2F). Загалом Ze 450 продемонстрував сильний захисний ефект на рівні мітохондрій у застосованій системній моделі ерастин-індукованого окисного стресу.

Ze 450 викликає біоенергетичний перехід мітохондрій від дихання до гліколізу

Мітохондрії є вирішальними органелами, що відповідають за енергетичний обмін і енергетичне забезпечення цілої клітини та відіграють вирішальну роль у регульованій окислювальній загибелі клітин. Як показано на рис. 2A і 2B, Ze 450 захищає від ерастин-індукованого перекисного окислення ліпідів. Щоб отримати подальше розуміння потенційних метаболічних ефектів, таких як зміни дихання мітохондрій та метаболічний стан клітин, що зазнали впливу Ze 450, ми досліджували ШСК та ШПЗ за допомогою системи Agilent Seahorse XF96 для виявлення окисного фосфорилування та гліколізу відповідно. Ці функціональні метаболічні параметри важливі для подальшого з'ясування механізму дії Ze 450 на мітохондрії. На рисунку 3A показано, що Ze 450 знижував ШСК порівняно з контрольними клітинами, особливо він впливав на початкове та максимальне дихання. Після дії ерастину ШСК не вдалося зберегти за допомогою Ze 450 (рис. 3B). Клітини здійснювали менше мітохондріального дихання, але демонстрували посилений рівень гліколізу в порівнянні з контрольними клітинами. Сам по собі Ze 450 у концентрації 100 мкг/мл трохи збільшував ШПЗ у порівнянні з контрольними клітинами (рис. 3C). На рисунку 3D зображено залежний від дози порятунок ерастин-обумовленого зменшення ШПЗ. Рисунок 3E ілюструє, що реакція після ін'єкції олігоміцину (порт A) була набагато стрімкішою у контрольних клітинах порівняно з клітинами, обробленими 100 мкг/мл Ze 450 та ерастином. Олігоміцин інгібує АТФ-синтазу дихального ланцюга і тим самим збільшує ШПЗ. Ze 450 викликав перехід до гліколізу і, як наслідок, посилений олігоміцином гліколіз не був настільки помітним у клітинах, попередньо оброблених Ze 450, порівняно з відповідними контролями. Загалом Ze 450 знижував ШСК в залежності від концентрації у початкових умовах та після впливу ерастину, а також попереджав опосередковане ерастином зменшення ШПЗ, тим самим запобігаючи утворенню АФК в мітохондріях, згасанню потенціалу мітохондріальної мембрани та зберігаючи рівень АТФ.

Залишалось питання, чи пов'язаний цей виявлений біоенергетичний зсув до гліколізу, індукований Ze 450, зі спо-

стережуваною цитопротекцією Ze 450. Щоб відповісти на нього, гліколіз блокували за допомогою 2-дезоксиглюкози (2-ДГ), а життєздатність клітин аналізували за допомогою фарбування анексином V/PI та аналізу FACS. 100 мМ 2-ДГ у поєднанні з 100 мкг/мл Ze 450 дещо збільшили кількість клітин, позитивно зафарбованих анексином V/PI, в умовах контролю (рис. 3F). Як зазначалося раніше, ерастин-обумовлену цитотоксичність було усунено 100 мкг/мл Ze 450, але 2-ДГ ліквідувала цей захисний ефект Ze 450 (рис. 3F).

Додатково до дослідження функціональності мітохондрій ми проаналізували їх морфологію. Форму мітохондрій оцінювали за допомогою класифікації мітохондрій, яку було описано раніше (Grohm et al., 2010). Мітохондрії будують трубчасту мережу по всьому цитозолу клітини за стандартних умов культивування; фрагментація мітохондрій є загальною ознакою індукованої окисленням загибелі нейронів (Grohm et al., 2010). У цьому дослідженні цитотоксичність, індукована ерастином, була пов'язана з масивною фрагментацією мітохондрій і накопиченням органел навколо ядра (рис. 4B). Ze 450 не спричиняв фрагментації мітохондрій у стандартних умовах культивування, а клітини продемонстрували подібну морфологію мітохондрій, як і контрольні клітини (рис. 4B). Крім того, Ze 450 у концентрації понад 50 мкг/мл запобігав фрагментації мітохондрій, незважаючи на застосування ерастину (рис. 4A, 4B).

Ze 450 запобігає загибелі клітин і дисфункції мітохондрій у клітинах печінки HepG2, що зазнали окисного стресу

Клітинна лінія гепатоми HepG2 широко використовується для токсикологічних досліджень (Doostdar et al., 1988). Ми зупинились на аспектах цитотоксичності та відповіді мітохондрій на окислювальний стрес. Оскільки застосування ерастину мало незначний токсичний вплив на клітини гепатоми, в цій клітинній лінії печінки для індукції окисного стресу ми застосовували інгібітор глутатіонпероксидази-4. RSL-3 (Yang et al., 2014) діє нижче рівня дії антиспортера цистеїн-глутамату і безпосередньо блокує глутатіонпероксидазу-4 незалежно від виснаження глутатіону, тим самим призводячи до накопичення перекисно окислених ліпідів і до активації шляхів сигналювання про смерть, таких як застосування ерастину. Рисунок 5A показує, що Ze 450 у концентраціях до 200 мкг/мл не викликав загибелі клітин. Більш того, при концентраціях вище 50 мкг/мл Ze 450 захищав від опосередкованої RSL-3 цитотоксичності (рис. 5A). Як засвідчив подальший аналіз з використанням фарбування анексином V/PI та аналізу FACS, Ze 450 був токсичним лише для клітин печінки при дуже високих концентраціях, які перевищують терапевтичний діапазон, що застосовується при лікуванні постменопаузальних скарг (EC_{50} 362,8 мкг/мл).

Як виявлено в лініях нейронів, Ze 450 впливає на функцію мітохондрій, індукуючи біоенергетичний зсув від дихання мітохондрій у бік гліколізу, який опосередковує захист цілісності мітохондрій та зменшує утворення мітохондріальних АФК. Тому ми також досліджували вплив Ze 450 на параметри мітохондрій у клітинах HepG2. Рівень АТФ залишався незмінним після застосування Ze 450 у концентраціях до 200 мкг/мл, тоді як виснаження АТФ, опосередковане RSL-3, було усунене Ze 450 в концентраціях вище 100 мкг/мл

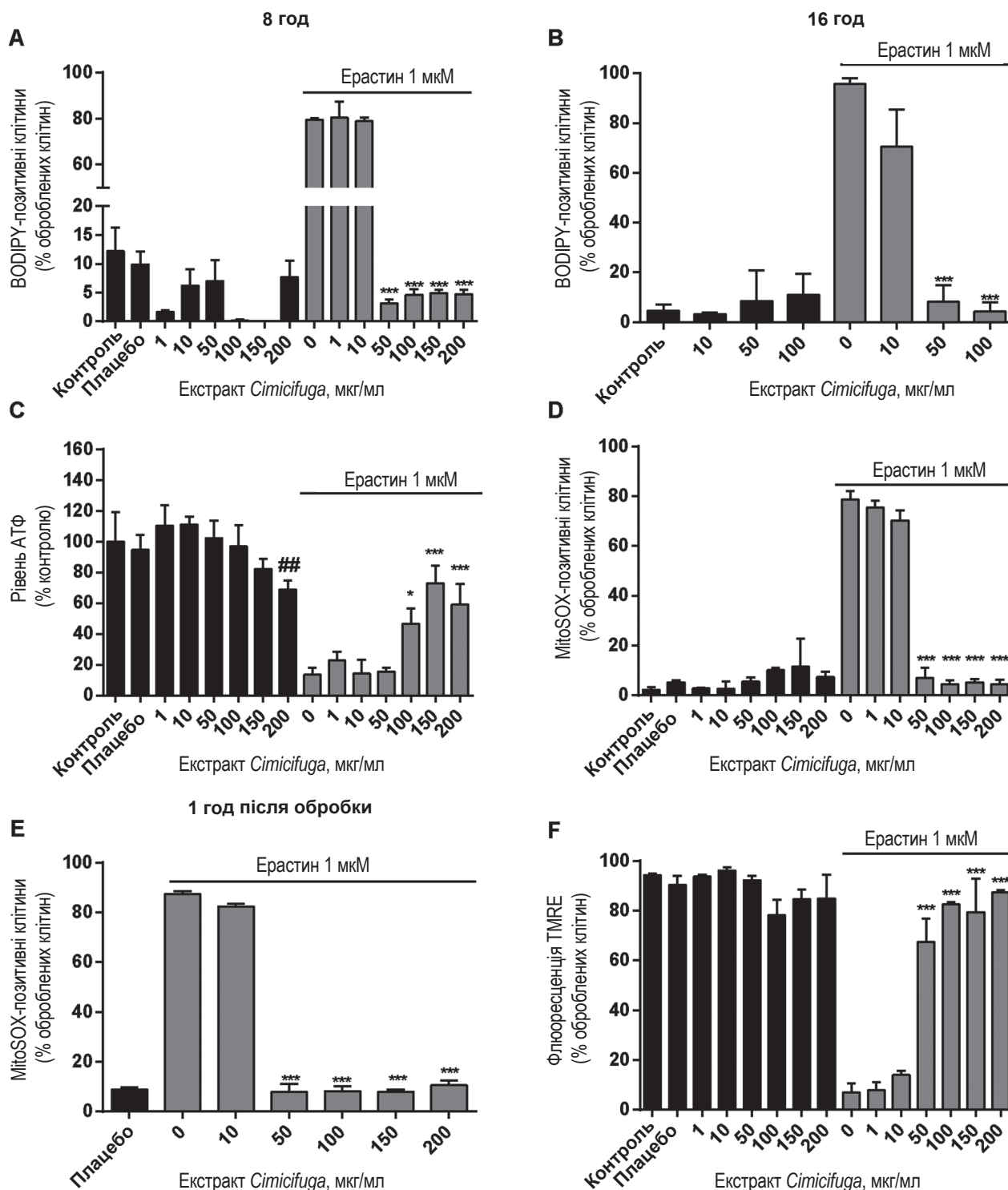


Рисунок 2. А + В: Клітини HT22 фарбували BODIPY 581/591, а зміни флуоресценції виявляли за допомогою аналізу FACS через 8 і 16 год спільної обробки Ze 450 та ерастином (1 мкМ). Концентрації Ze 450 понад 50 мкг/мл запобігали утворенню пероксидів ліпідів порівняно з контрольними клітинами ($n = 3/\text{стан обробки}$). С: Аналіз АТФ. Концентрації Ze 450 понад 200 мкг/мл знижували рівень АТФ, тоді як 100 мкг/мл обумовлювали захист від індукованого ерастином виснаження АТФ у клітинах HT22 (1 мкМ, 16 год, $n = 6/\text{стан обробки}$). Д + Е: Фарбування MitoSOX та подальший аналіз FACS. Концентрації Ze 450 понад 50 мкг/мл продемонстрували захист від обумовленого ерастином (1 мкМ) утворення мітохондріальних АФК у моделі до та після обробки клітин HT22 ($n = 3/\text{стан обробки}$). Ф: Фарбування TMRE та аналіз FACS. Концентрації Ze 450 понад 50 мкг/мл захищають від обумовленої ерастином (1 мкМ) втрати потенціалу мітохондріальної мембрани в клітинах HT22 ($n = 3/\text{стан обробки}$). Усі дані наведені як середнє значення $\pm$ стандартне відхилення (SD).

$p < 0,05$, ### $p < 0,001$ порівняно з необробленим контролем HT22;

*** $p < 0,001$ порівняно з обробленим ерастином контролем HT22 (дисперсійний аналіз ANOVA, тест Шеффе)

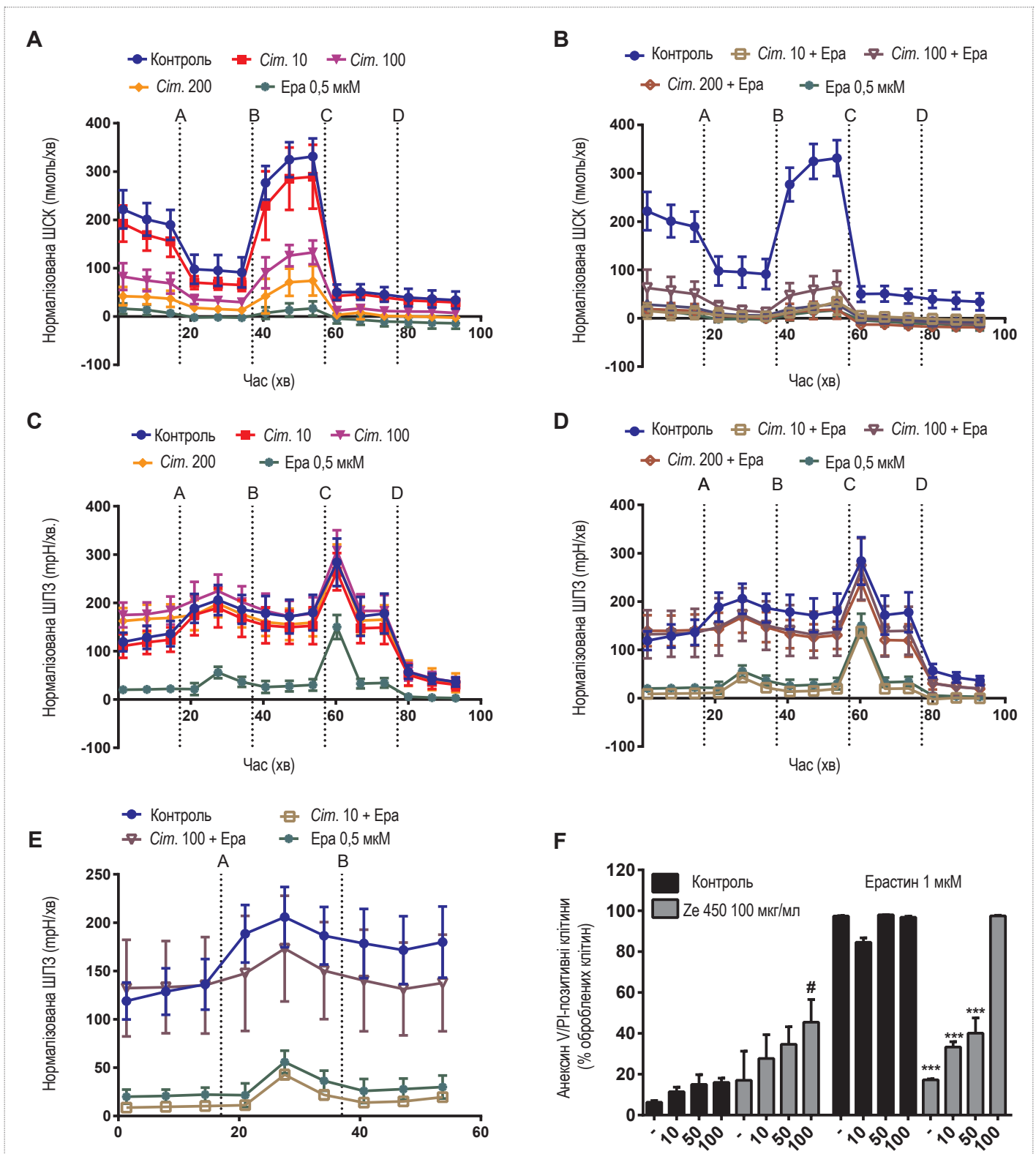


Рисунок 3. А–Е: Вимірювання ШСК та ШПЗ визначали на початковому рівні та після введення модуляторів дихального ланцюга та гліколізу (А: 3 мкМ олігоміцину, В: 0,5 мкМ FCCP, С: 1 мкМ антимицину А/100 нМ ротенону, D: 50 мМ 2-ДГ). Клітини HT22 піддавали спільній обробці різними концентраціями Ze 450 та ерастину (0,5 мкМ) протягом 16 год (n = 6/стан обробки). Ze 450 знижував початкове та максимальне дихання (А) і не захищав від індукованого ерастином зниження ШСК (В). Концентрації Ze 450 понад 100 мкг/мл збільшували ШПЗ порівняно з контрольними клітинами (С) та захищали від індукованого ерастином зниження ШПЗ (D). На рис. Е показано збільшений рисунок D. Дані були отримані в тому ж експерименті, але показані на окремих графіках для кращої візуалізації. F: Фарбування анексином V/PI та подальший аналіз FACS. Концентрації Ze 450 понад 100 мкг/мл втратили захисний ефект проти обумовленої ерастином (1 мкМ, 16 год) загибелі клітин у присутності 2-ДГ (100 мМ, n = 3/стан обробки). Усі дані наведені як середнє значення $\pm$ SD.

$p < 0,05$, ### $p < 0,001$ порівняно з необробленим контролем HT22;

*** $p < 0,001$ порівняно з обробленим ерастином контролем HT22 (дисперсійний аналіз ANOVA, тест Шеффе)

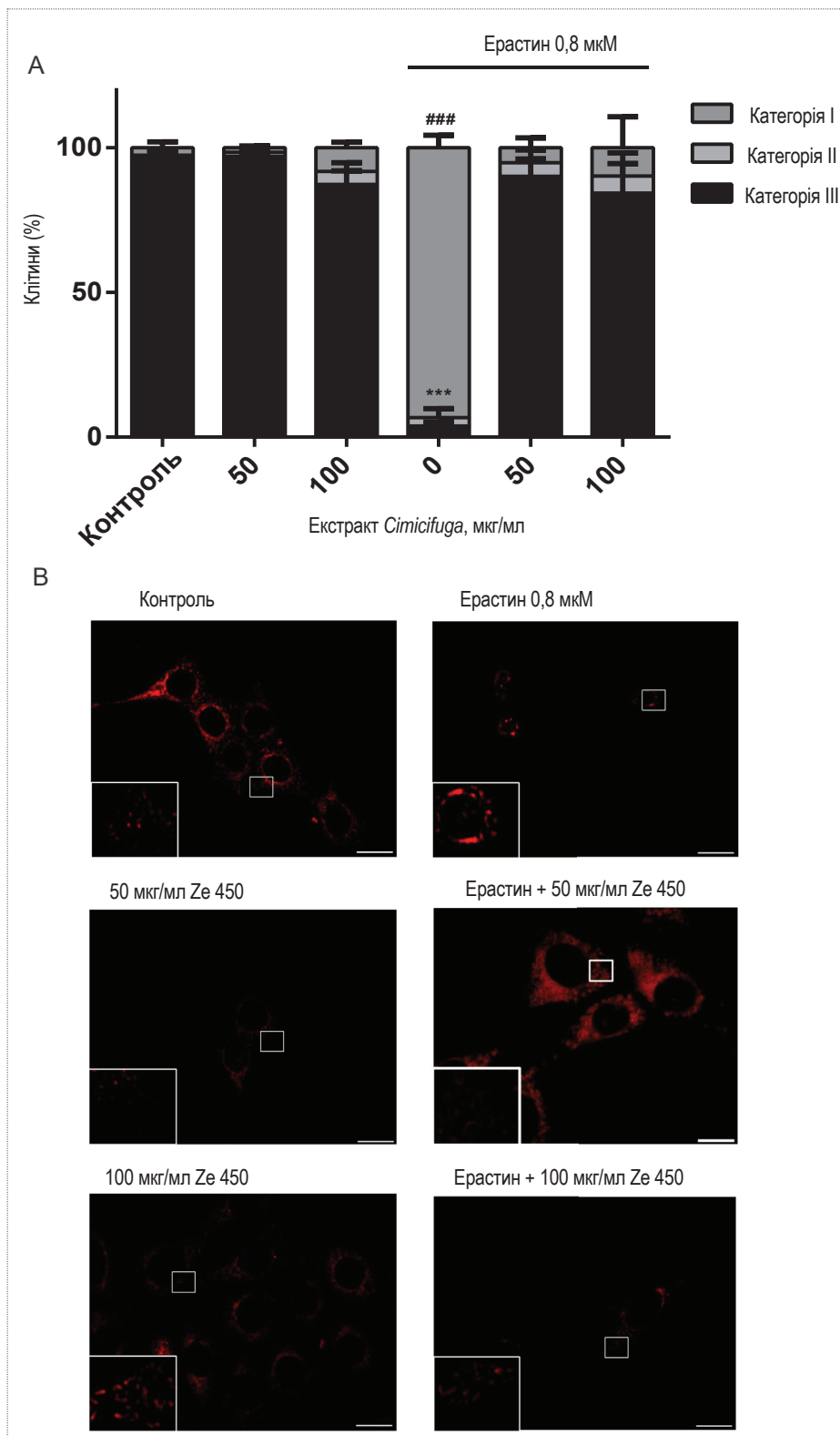


Рисунок 4. А: Кількісне визначення морфології мітохондрій в клітинах HT22, що зазнали впливу Ze 450 та ерастину (0,8 мкМ, 16 год). Застосування ерастину призвело до збільшення мітохондрій III категорії, чому запобігали концентрації Ze 450 понад 50 мкг/мл. Середні значення були отримані в результаті трьох незалежних експериментів, де морфологію мітохондрій визначали щонайменше в 500 клітинах без знання історії обробки. В: Зображення епі-флуоресценції отримували за допомогою флуоресцентного мікроскопа (DMI6000, Leica, Німеччина) з використанням іммерсійного об'єктива зі збільшенням 63 × 1,4 NA (шкала 20 мкм). Усі дані наведені як середнє значення ± SD.

$p < 0,001$, мітохондрії III категорії порівняно з мітохондріями III категорії необробленого контролю HT22;
 *** $p < 0,001$, мітохондрії I категорії порівняно з мітохондріями I категорії клітини HT22, оброблених 50 мкг/мл Ze 450 + ерастин та 100 мкг/мл Ze 450 + ерастин (дисперсійний аналіз ANOVA, тест Шеффе). Змін у мітохондріях II категорії за різних умов не відбувалось

(рис. 5B). Подальший аналіз рівня АФК ліпідів за допомогою фарбування C11-BODIPY та FACS-аналізу показав, що Ze 450 не збільшує перекисне окислення ліпідів через 8 і 16 год (рис. 5C, 5D). У системній моделі клітин HepG2 Ze 450 ослаблював зумовлені RSL-3 формування мітохондріальних АФК, тоді як сам по собі Ze 450 не викликав збільшення рівня АФК у мітохондріях (рис. 5E). Більше того, Ze 450 не впливав на потенціал мітохондріальної мембрани, а в концентрації понад 10 мкг/мл запобігав індукованій RSL-3 втраті потенціалу мітохондріальної мембрани (рис. 5F). Загалом ці результати показали, що Ze 450 не чинив токсичної дії на клітини печінки, а навпаки, захищав їх від окисного впливу.

ОБГОВОРЕННЯ

Метою цього дослідження було вивчити вплив Ze 450 на нейрони та клітини печінки з особливим акцентом на параметри мітохондрій в модельних системах окисного стресу, індукованого ерастином або RSL-3. Результати показали, що Ze 450 захищає від обумовленого ерастином пошкодження мітохондрій та загибелі клітин у різних типах клітин, включаючи нейрони HT22, які були створені як відповідна модельна система для вивчення окисного стресу (Li et al., 1997; Neitemeier et al., 2017), та клітини mHypo, оскільки гіпоталамус функціонує як надпорядковий центр ендокринного контролю метаболізму та терморегуляції, і вважається, що він головним чином бере участь в опосередкуванні симптомів менопаузи, таких як приливи, і пов'язаних з цим метаболічних порушень. Подібні захисні ефекти також були виявлені на рівні метаболічної активності і проліферації клітин, які були врятовані Ze 450 після індукції окисного стресу. Найцікавіше, що ця захисна дія Ze 450 на мітохондрії та на життєздатність клітин була пов'язана з біоенергетичним переходом від окисного фосфорилювання до гліколізу; зокрема, було виявлено, що Ze 450 у концентрації вище 100 мкг/мл знижує рівень АТФ, але не впливає на життєздатність клітин. Моніторинг проліферації клітин у режимі реального часу показав, що Ze 450 (> 100 мкг/мл) зменшує ріст клітин (рис. 1E), але

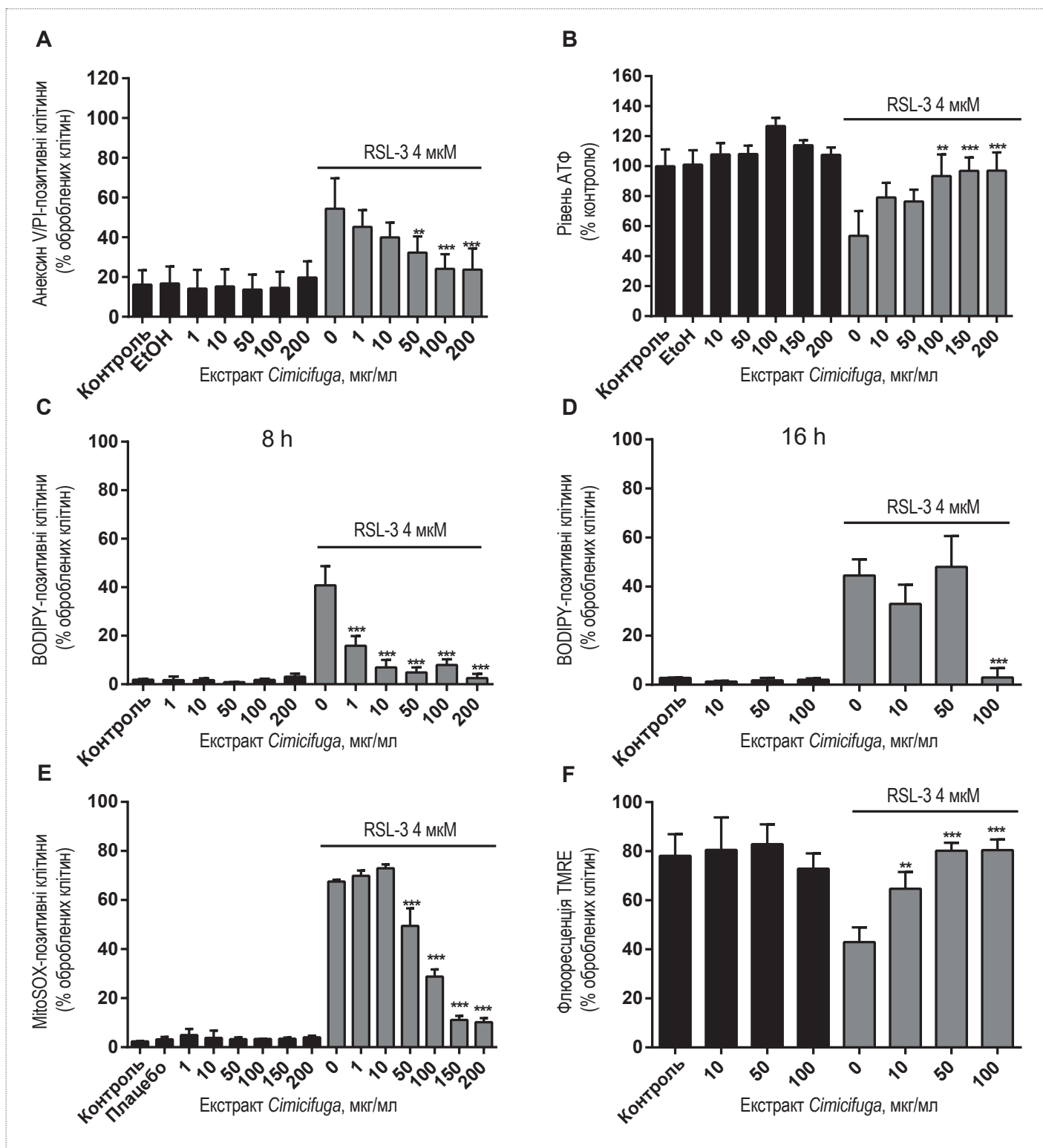


Рисунок 5. А: Фарбування анексином V/PI та подальший аналіз FACS показали зменшену загибель клітин HerG2, оброблених Ze 450 у концентрації понад 50 мкг/мл та 1S,3R-RSL-3 порівняно з клітинами HerG2, обробленими 1S,3R-RSL-3 (4 мкМ, 16 год, n = 3/стан обробки).
 В: Аналіз АТФ. Концентрації Ze 450 понад 100 мкг/мл захищали від ерастинового виснаження АТФ у клітинах HerG2 (4 мкМ, 16 год, n = 6/стан обробки).
 С + D: Клітини HerG2 фарбували BODIPY 581/591 C11, а зміни флуоресценції виявляли за допомогою аналізу FACS через 8 і 16 год спільної обробки Ze 450 та 1S,3R-RSL-3 (4 мкМ). Ze 450 продемонстрував залежність від часу та концентрації захисту від перекисного окислення ліпідів, обумовленого 1S,3R-RSL-3 (4 мкМ).
 Е: Фарбування MitoSOX та подальший аналіз FACS. Концентрації Ze 450 більше 50 мкг/мл продемонстрували захист від обумовленого 1S,3R-RSL-3 (4 мкМ) мітохондріального утворення АФК у клітинах HerG2 (16 год, n = 3/стан обробки).
 F: Фарбування TMRE та аналіз FACS. Концентрації Ze 450 понад 10 мкг/мл захищали від 1S,3R-RSL-3-індукованої (4 мкМ) втрати потенціалу мітохондріальної мембрани в клітинах HerG2 (16 год, n = 3/стан обробки).
 Усі дані наведені як середнє значення $\pm$ SD.
 # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ порівняно з необробленим контролем HerG2;
 *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ порівняно з контролем, обробленим 1S,3R-RSL-3 (дисперсійний аналіз ANOVA, тест Шеффе)

цей ефект був оборотним після відміни Ze 450 (рис. 2С). Ці дані свідчать про основний вплив Ze 450 на біоенергетичний метаболізм клітин, який, імовірно, пов'язаний з раніше встановленою активацією АМФК як передумовою спостережуваних захисних ефектів від пошкодження мітохондрій та клітин, що зазнають окисного стресу, і який може лежати в основі терапевтичних ефектів Ze 450 щодо постменопаузальних проявів.

Попередні дослідження показали, що мітохондрії відіграють вирішальну роль у визначенні життєздатності клітин в умовах окисного стресу (Landshamer et al., 2008; Tobaben et al., 2011); щойно мітохондріальна функція та цілісність порушуються, клітини не можуть вижити (Galluzzi et al., 2009). Було виявлено, що пошкодження мітохондрій є основною ознакою окислювальної смерті нейронів, наприклад, після застосування ерастину (Neitemeier et al., 2017). Крім того, окислювальний стрес та пов'язані з ним порушення мітохондрій беруть участь у патогенезі метаболічних захворювань, таких як цукровий діабет II типу (Reagan et al., 2000), підкреслюючи важливість визначення стратегій захисту мітохондрій шляхом підвищення їх здатності справлятися з окислювальним стресом та асоційованою метаболічною дисфункцією. Окрім цього, окислювальний стрес був тісно пов'язаний з такою менопаузальною скаргю, як приливи (Agarwal et al., 2013). Продemonстровано сильний вплив Ze 450 на функцію мітохондрій, що запобігає окислювальним пошкодженням клітин гіпокампа і гіпоталамуса. Було показано, що масивне утворення АФК через збільшення активності ліпоксигеназ-12/15 (Seiler et al., 2008; Tobaben et al., 2011) призводить до функціональних порушень мітохондрій і наступних порушень окислювально-відновного балансу клітини (Liot et al., 2009). Зокрема, перекисне окислення ліпідів, викликане окислювальним стресом, було повністю ліквідоване при застосуванні Ze 450 у концентрації вище 50 мкг/мл. Слід зазначити, що цей виражений захисний ефект спостерігався через 8 год, а також і через 16 год окисного впливу. Цей висновок дозволяє припустити, що навіть вторинний сплеск АФК, ініційований порушенням мітохондрій, був компенсований Ze 450 (рис. 2А, 2В). Як було описано раніше, порушення мітохондрій, а саме формування мітохондріальних АФК та втрата мітохондріального мембранного потенціалу, є вирішальними подіями, що позначають так звану «точку неповернення» у загибелі нейронів (Doti et al., 2014; Neitemeier et al., 2014; Reuther et al., 2014; Neitemeier et al., 2017). Ze 450 опосередковує захист від цих процесів, тим самим зберігаючи цілісність мітохондрій та життєздатність клітин (рис. 1А, 2Д і 2Е, 4А і 4В).

Мітохондрії – це «електростанції» клітини; тому активність дихальних ланцюгів та окисне фосфорилювання важливі для задоволення потреб клітини в енергії. Оцінка ШСК є корисним та усталеним методом дослідження мітохондріального дихання; ми спостерігали залежне від концентрації Ze 450 зниження ШСК (рис. 3А), що не впливало на життєздатність клітин. Одночасно клітини, оброблені 100 мкг/мл Ze 450, продемонстрували збільшення ШПЗ, що свідчить про перехід енергетичного метаболізму з окисного фосфорилювання на гліколіз у клітинах, які зазнали впливу Ze 450 (рис. 3С). Ze 450 може діяти як інгібітор комплексів дихаль-

них ланцюгів, що призводить до зменшення мітохондріального дихання, але інші механізми, що ведуть до підвищення швидкості гліколізу, такі як активація АМФК (Moser et al., 2014), можуть сприяти цьому зсуву енергетичного обміну. У попередньому дослідженні АМФК була використана як мішень для Ze 450 в клітинах НераRG і залучена до процесу регуляції клітинного метаболізму (Moser et al., 2014). Отже, активація АМФК за допомогою Ze 450 пропонується як потенційна механістична ланка між параметрами мітохондрій та реакцією клітини на окислювальний стрес. Однак раніше описана активація АМФК за допомогою Ze 450 також може призвести до цього біоенергетичного зсуву та падіння АТФ, виявленого в нашому дослідженні після інкубації клітин із Ze 450 в контрольних умовах.

Зауважимо, що пригнічення гліколізу 2-ДГ підтримує ймовірний зв'язок між біоенергетичним зрушенням, індукованим Ze 450, та спостережуваними захисними ефектами. Фактично, 2-ДГ скасував захист від окисного стресу (рис. 3F), і, отже, було зроблено висновок, що захист мітохондрій та виживання клітин після окисного стресу обумовлені метаболічним переходом мітохондрій від дихання до гліколізу.

Більше того, захисний ефект Ze 450 щодо нейронів підтверджений у клітинах печінки. Це представляє особливий інтерес, оскільки триває суперечка щодо того, чи викликає екстракт цимицифуги токсичність печінки *in vivo*. Наприклад, є повідомлення, що екстракт *C. racemosa* пов'язують із побічними ефектами з боку печінки в пацієнтів із можливими, але поки невідомими факторами ризику (Huntley and Ernst, 2003; Low Dog et al., 2003). У щурів Ze 450 викликав мікровезикулярний стеатоз печінки у дуже високій дозі – 1000 мг/кг маси тіла (Lüde et al., 2007). Однак автори дійшли висновку, що таких високих концентрацій дуже мало ймовірно досягти у людей, які отримують рекомендовані добові дози екстракту 6,5–13 мг (Lüde et al., 2007). Наші результати, отримані в культивованих клітинах печінки, демонструють яскраво виражений захист від окислювального пошкодження, і також свідчать, що концентрації, які призводять до порушення клітин печінки, набагато більші, ніж концентрації, необхідні для захисних ефектів (рис. 4А, 4В). Ми виявили захисні ефекти Ze 450 (50–200 мкг/мл) стосовно індукованої RSL-3 загибелі клітин і показали, що Ze 450 у концентрації 1–200 мкг/мл не впливав на життєздатність клітин (рис. 5А). Зокрема, у клітинах печінки ми також спостерігали сильний захисний ефект Ze 450 щодо виснажених рівнів АТФ, перекисного окислення ліпідів, утворення АФК у мітохондріях та втрати потенціалу мембрани мітохондрій (рис. 5В–F), що узгоджувалося з подібними висновками щодо нейронів. Ці результати скоріше свідчать про те, що Ze 450 чинить сприятливий вплив на захворювання, пов'язані з окислювальним ураженням печінки, але потребує подальшої оцінки *in vivo*.

На закінчення, Ze 450 (основа препарату Сімідона) має захисний вплив на нейрони та клітини печінки, що зазнають окисного стресу. Отримані результати дозволяють припустити, що біоенергетичний зсув, викликаний Ze 450 (від окисного фосфорилювання мітохондрій до гліколізу) відіграє важливу роль у стійкості клітин, що зазнають окисного стресу. Отже, Ze 450 володіє перспективним терапевтичним потенціалом щодо захворювань, пов'язаних із

окислювальним стресом, включаючи вікові захворювання, які впливають на підтримку та функціонування нейронів, а також метаболічні захворювання, пов'язані з дисфункцією мітохондрій. Спостережуваний біоенергетичний зсув також може бути ключем до механістичного розуміння обумовленого Ze 450 полегшення симптомів у жінок в менопаузі і, крім того, має терапевтичний потенціал для лікування метаболічних захворювань, таких як цукровий діабет II типу.

Фінансування

Фінансування дослідження було здійснено за рахунок компанії Max Zeller Soehne AG (Швейцарія) для відділу проекту TransMIT «Мітохондріальні механізми нейрональних процесів» професора д-ра Carsten Culmsee.

Конфлікт інтересів

Matthias Unger та Jürgen Drewe – співробітники компанії Max Zeller Soehne AG.

Додаткові матеріали

Додаткові матеріали, пов'язані з цією статтею, і список літератури можна знайти за адресою: doi: 10.1016/j.phymed.2018.09.177



МЕТАБОЛІЧНИЙ ЗСУВ, ІНДУКОВАНИЙ ЕКСТРАКТОМ *CIMICIFUGA RACEMOSA*, ЗАПОБІГАЄ ПОШКОДЖЕННЮ МІТОХОНДРІЙ ТА ОКИСЛЮВАЛЬНИЙ ЗАГИБЕЛІ КЛІТИН

M. Rabenau, Інститут фармакології та клінічної фармації, Біохіміко-фармакологічний центр Марбурга, Марбурзький університет ім. Філіппа; Center for Mind Brain and Behavior, Марбург, Німеччина
M. Unger, відділ доклінічних досліджень, компанія Max Zeller Soehne AG, Романсхорн, Швейцарія
J. Drewe, відділ доклінічних досліджень, компанія Max Zeller Soehne AG, Романсхорн, Швейцарія
C. Culmsee, Інститут фармакології та клінічної фармації, Біохіміко-фармакологічний центр Марбурга, Марбурзький університет ім. Філіппа; Center for Mind Brain and Behavior, Марбург, Німеччина

Вступ. Екстракт *Cimicifuga racemosa* – це терапія симптомів менопаузи, яка добре себе зарекомендувала. Механізми, що лежать в основі численних терапевтичних ефектів екстракту *Cimicifuga*, наприклад, зменшення приливів і сильного потовиділення, недостатньо чітко визначені. Невдачі дослідження виявили виражений вплив Ze 450 (екстракту *Cimicifuga racemosa*, який виробляється за стандартизованою процедурою) на енергетичний метаболізм завдяки активації АТФ-активованої протеїнкінази *in vitro* та корисні антидіабетичні ефекти *in vivo*.

Мета дослідження. Дослідити вплив Ze 450 на енергетичний метаболізм. Оскільки мітохондрії є ключовими регуляторами клітинного енергетичного гомеостазу, ми хотіли з'ясувати, чи впливає Ze 450 на стійкість мітохондрій та чи може забезпечити захист клітин нейронів і печінки від окислювальних пошкоджень.

Методи і дизайн дослідження. У цьому дослідженні ми вивчали вплив Ze 450 (1–200 мкг/мл) на цілісність і функціонування мітохондрій та життєздатність нейронів і клітин печінки у моделях окисного стресу, індукованого ерастином та RSL-3. Вплив Ze 450 в контрольних умовах та після індукції окисного стресу аналізували за допомогою аналізу FACS для виявлення перекисного окислення ліпідів (BODIPY), утворення активних форм кисню у мітохондріях (MitoSOX), потенціалу мембрани мітохондрій (TMRE) та загибелі клітин (фарбування анексіном V/PI). Крім того, ми визначили метаболічну активність (тест MTT), рівень аденозинтрифосфатної кислоти, дихання і гліколізу мітохондрій (швидкість споживання кисню і швидкість позаклітинного закислення шляхом технології Seahorse).

Результати. Ze 450 (основа препарату Сімідона, Атаха Pharma) зберігав цілісність мітохондрій і рівень аденозинтрифосфатної кислоти та запобігав утворенню активних форм кисню в мітохондріях, втраті потенціалу мембрани мітохондрій та загибелі клітин. Примітно, що сам по собі екстракт *Cimicifuga racemosa* не змінює рівень активних форм кисню у мітохондріях, а незначний інгібує вплив на проліферацію клітин зникає після відміни екстракту. Крім того, Ze 450 не чинив токсичної дії на клітини печінки, а навпаки, захищав їх від окисного впливу. Подальший аналіз швидкості споживання кисню в мітохондріях та швидкості позаклітинного підкислення показав, що Ze 450 опосередковує перехід від дихання мітохондрій до гліколізу, і цей метаболічний зсув був необхідною умовою захисного ефекту від окисного пошкодження.

Висновок. Біоенергетичний зсув, індукований Ze 450, чинить захисну дію на різні типи клітин і має перспективний терапевтичний потенціал щодо вікових захворювань, обумовлених окислювальним стресом і пошкодженням мітохондрій.

Ключові слова: чорний кохош, *Cimicifuga racemosa*, мітохондрії, нейрон, печінка, окислювальний стрес, метаболічна регуляція.

METABOLIC SWITCH INDUCED BY *CIMICIFUGA RACEMOSA* EXTRACT PREVENTS MITOCHONDRIAL DAMAGE AND OXIDATIVE CELL DEATH

M. Rabenau, Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmazie, Biochemisch-Pharmakologisches Centrum Marburg, Philipps-Universität Marburg, Marburg, Germany; Center for Mind Brain and Behavior, Marburg, Germany
M. Unger, Preclinical Research Department, Max Zeller Soehne AG, Romanshorn, Switzerland
J. Drewe, Preclinical Research Department, Max Zeller Soehne AG, Romanshorn, Switzerland
C. Culmsee, Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmazie, Biochemisch-Pharmakologisches Centrum Marburg, Philipps-Universität Marburg, Marburg, Germany; Center for Mind Brain and Behavior, Marburg, Germany

Background. *Cimicifuga racemosa* extract is a well-established therapy for menopausal symptoms. The mechanisms underlying the multiple therapeutic effects of *Cimicifuga* extract, e.g. reducing hot flashes and profuse sweating are not well defined. Recent studies revealed pronounced effects of Ze 450, a *Cimicifuga racemosa* extract that was produced by a standardized procedure, on energy metabolism through activation of AMP-activated protein kinase *in vitro* and beneficial anti-diabetic effects *in vivo*.

Purpose. The aim of the study was to investigate the effects of Ze 450 on energy metabolism. Since mitochondria are the key regulators of cellular energy homeostasis, we wanted to elucidate whether Ze 450 affects mitochondrial resilience and can provide protection against oxidative damage in neuronal and liver cells.

Methods/study design. In this study, we investigated the effects of Ze 450 (1–200 µg/ml) on mitochondrial integrity and function, and cell viability in models of oxidative stress induced by erastin and RSL-3 in neuronal and liver cells. The effects of Ze 450 in control conditions and after induction of oxidative stress were analyzed using FACS for detecting lipid peroxidation (BODIPY), mitochondrial ROS formation (MitoSOX), mitochondrial membrane potential (TMRE) and cell death (Annexin V/PI staining). Furthermore, we determined metabolic activity (MTT assay), ATP levels and mitochondrial respiration and glycolysis (oxygen consumption rates, extracellular acidification rates; Seahorse).

Results. Ze 450 preserved mitochondrial integrity and ATP levels, and prevented mitochondrial ROS formation, loss of mitochondrial membrane potential and cell death. Notably, *Cimicifuga racemosa* extract alone did not alter mitochondrial ROS levels, and subtle inhibitory effects on cell proliferation were reversed after withdrawal of the extract. In addition, Ze 450 did not exert toxic effects to liver cells, but rather protected these from the oxidative challenge. Further analysis of the mitochondrial oxygen consumption rate and the extracellular acidification rate revealed that Ze 450 mediated a switch from mitochondrial respiration to glycolysis, and this metabolic shift was a prerequisite for the protective effects against oxidative damage.

Conclusion. In conclusion, the bioenergetic shift induced by Ze 450 exerted protective effects in different cell types, and offers promising therapeutic potential in age related diseases involving oxidative stress and mitochondrial damage.

Keywords: black cohosh, *Cimicifuga racemosa*, mitochondria, neuron, liver, oxidative stress, metabolic regulation.

МЕТАБОЛІЧЕСЬКИЙ СДВИГ, ІНДУЦІЙОВАНИЙ ЕКСТРАКТОМ *CIMICIFUGA RACEMOSA*, ПРЕДОТВРАЩАЄ ПОВРЕЖДЕННЯ МІТОХОНДРІЙ І ОКИСЛИТЕЛЬНОЇ ГИБЕЛІ КЛІТОК

M. Rabenau, Інститут фармакології та клінічної фармації, біохіміко-фармакологічний центр Марбурга, Марбурзький університет ім. Філіппа; Center for Mind Brain and Behavior, Марбург, Німеччина
M. Unger, відділ доклінічних досліджень, компанія Max Zeller Soehne AG, Романсхорн, Швейцарія
J. Drewe, відділ доклінічних досліджень, компанія Max Zeller Soehne AG, Романсхорн, Швейцарія
C. Culmsee, Інститут фармакології та клінічної фармації, біохіміко-фармакологічний центр Марбурга, Марбурзький університет ім. Філіппа; Center for Mind Brain and Behavior, Марбург, Німеччина

Введення. Екстракт *Cimicifuga racemosa* – це терапія симптомів менопаузи, яка добре себе зарекомендувала. Механізми, що лежать в основі численних терапевтичних ефектів екстракту *Cimicifuga*, наприклад, зменшення приливів і сильного потовиділення, недостатньо чітко визначені. Невдачі дослідження виявили виражене вплив Ze 450 (екстракту *Cimicifuga racemosa*, який виробляється за стандартизованою процедурою) на енергетичний метаболізм за рахунок активації АТФ-активованої протеїнкінази *in vitro* і корисні антидіабетичні ефекти *in vivo*.

Ціль дослідження. Дослідити вплив Ze 450 на енергетичний метаболізм. Оскільки мітохондрії є ключовими регуляторами клітинного енергетичного гомеостазу, ми хотіли з'ясувати, чи впливає Ze 450 на стійкість мітохондрій і чи може забезпечити захист клітин нейронів і кліток печінки від окислювальних пошкоджень.

Методи і дизайн дослідження. В цьому дослідженні ми вивчали вплив Ze 450 (1–200 мкг/мл) на цілісність і функціонування мітохондрій та життєздатність нейронів і кліток печінки у моделях окислювального стресу, індукованого ерастином та RSL-3. Вплив Ze 450 в контрольних умовах і після індукції окислювального стресу аналізували за допомогою аналізу FACS для виявлення перекисного окислення ліпідів (BODIPY), утворення активних форм кисню в мітохондріях (MitoSOX), потенціалу мембрани мітохондрій (TMRE) і загибелі кліток (фарбування анексіном V/PI). Крім того, ми визначили метаболічну активність (тест MTT), рівень аденозинтрифосфатної кислоти, дихання і гліколіз мітохондрій (швидкість споживання кисню і швидкість позаклітинного закислення шляхом технології Seahorse).

Результати. Ze 450 (основа препарату Сімідона, Атаха Pharma) зберігав цілісність мітохондрій і рівень аденозинтрифосфатної кислоти і запобігав утворенню активних форм кисню в мітохондріях, втраті потенціалу мембрани мітохондрій і загибелі кліток. Примітно, що сам по собі екстракт *Cimicifuga racemosa* не змінює рівень активних форм кисню в мітохондріях, а незначний інгібує вплив на проліферацію кліток зникає після відміни екстракту. Крім того, Ze 450 не оказував токсичного впливу на клітки печінки, а навпаки, захищав їх від окисного впливу. Подальший аналіз швидкості споживання кисню в мітохондріях і швидкості позаклітинного закислення показав, що Ze 450 опосередковує перехід від дихання мітохондрій до гліколізу, і цей метаболічний зсув був необхідною умовою захисного ефекту від окислювального пошкодження.

Висновок. Біоенергетичний зсув, індукований Ze 450, чинить захисну дію на різні типи кліток і має перспективний терапевтичний потенціал щодо вікових захворювань, обумовлених окислювальним стресом і пошкодженням мітохондрій.

Ключові слова: чорний кохош, *Cimicifuga racemosa*, мітохондрії, нейрон, печінка, окислювальний стрес, метаболічна регуляція.