

Ионы меди снижают токсическое действие азид натрия и липополисахарида на культивированные зернистые нейроны мозжечка

Е.В. Стельмашук¹, О.П. Александрова¹, Е.Е. Генрихс¹, Е. Верма², А.Б. Салмина¹, Н.К. Исаев^{1,3}

¹ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия;

²Университет Чаудхари Чаран Сингх, Мирут, Индия;

³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Аннотация

Введение. Ионы меди (Cu^{2+}) являются структурными элементами белков, в том числе цитохром с-оксидазы (комплекс IV) — фермента, катализирующего конечный этап переноса электронов на кислород в процессе окислительного фосфорилирования в митохондриях. Поддержание гомеостаза Cu^{2+} в головном мозге очень важно, и его нарушение в центральной нервной системе вовлечено в патогенез многих нейродегенеративных заболеваний и патологических состояний головного мозга.

Цель исследования — определить влияние нетоксических концентраций ионов меди на гибель культивированных зернистых нейронов мозжечка, вызванную липополисахаридом (ЛПС; модель воспаления *in vitro*) и азидом натрия (NaN_3 , ингибитор цитохром с-оксидазы).

Материалы и методы. ЛПС (10 мкг/мл) или NaN_3 (250 мкМ) добавляли на 7–8-й день *in vitro* в среду культивирования клеток мозжечка крыс на 24 ч. Уровень нитритов измеряли в среде культивирования методом Грисса, оптическую плотность регистрировали при длине волны 540 нм с помощью спектрофотометра, а число живых нейронов оценивали методом подсчёта морфологически интактных клеток.

Результаты. Добавление в среду культивирования ЛПС снижало выживаемость нейронов до $15 \pm 2\%$ относительно контроля, а NaN_3 — до $20 \pm 3\%$. В присутствии Cu^{2+} (0,5–5,0 мкМ) выживаемость нейронов дозозависимо повышалась: на фоне 5 мкМ Cu^{2+} при токсическом воздействии ЛПС — до $78 \pm 4\%$, а при действии NaN_3 — до $86 \pm 6\%$. В среде культивирования контрольных культур содержание нитритов составляло $2,0 \pm 0,2$ мкМ. Добавление ЛПС вызывало повышение уровня нитритов до $8,5 \pm 0,5$ мкМ. Ионы меди не оказывали достоверного влияния на накопление нитритов в среде культивирования.

Заключение. Показана возможность защитного действия ионов меди на нейроны при токсичности, вызванной ЛПС и NaN_3 . Видимо, эта защита обусловлена взаимодействием Cu^{2+} с комплексом IV цепи переноса электронов в митохондриях, а не подавлением продукции оксида азота, не исключено также влияние Cu^{2+} на белки путей апоптоза.

Ключевые слова: нейроны; ионы меди; азид натрия; оксид азота

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом ФГБНУ НЦН (протокол № 5-5/22 от 01.06.2022).

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешних источников финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Адрес для корреспонденции: 105064, Москва, пер. Обуха, д. 5, стр. 2, Институт мозга ФГБНУ НЦН. E-mail: estelmash@mail.ru. Стельмашук Е.В.

Для цитирования: Стельмашук Е.В., Александрова О.П., Генрихс Е.Е., Верма Е., Салмина А.Б., Исаев Н.К. Ионы меди снижают токсическое действие азид натрия и липополисахарида на культивированные зернистые нейроны мозжечка. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2023;17(4):52–57.

DOI: <https://doi.org/10.54101/ACEN.2023.4.6>

Поступила 10.05.2023 / Принята в печать 20.06.2023 / Опубликовано 25.12.2023

Copper Ions Reduced Toxicity of Sodium Azide and Lipopolysaccharide on Cultured Cerebellar Granule Neurons

Elena V. Stelmashook¹, Olga P. Alexandrova¹, Elizaveta E. Genrikhs¹, Yeshvandra Verma², Alla B. Salmina¹, Nickolay K. Isaev^{1,3}

¹Research Center of Neurology, Moscow, Russia;

²Chaudhary Charan Singh University, Meerut, India;

³Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Copper ions (Cu^{2+}) are structural elements of proteins such as cytochrome *c* oxidase (Complex IV), an enzyme that catalyzes the final step of electron transfer to oxygen during oxidative phosphorylation in the mitochondria. With Cu^{2+} homeostasis being of utmost importance, its disturbances in the central nervous system are involved in the mechanisms of many neurodegenerative and other brain disorders.

This study aimed to assess the effects of non-toxic copper ion levels on death of cerebellar granule neurons associated with lipopolysaccharide (LPS; *in vitro* inflammation model) or azide sodium (NaN_3 ; cytochrome *c* oxidase inhibitor).

Materials and methods. LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or NaN_3 (250 μM) was added on day 7 to 8 to the culture medium with rat cerebellar cells for 24 hours *in vitro*. Nitrite concentrations were measured in the culture medium by Griess assay; absorbance was recorded with a spectrophotometer at 540 nm, and morphologically intact cells were counted as survived neurons.

Results. Added to the culture medium, LPS or NaN_3 reduced neuron survival to $15 \pm 2\%$ or $20 \pm 3\%$ vs. control, respectively. Cu^{2+} (0.5 to 5.0 μM) increased neuron survival in a dose-dependent manner to $78 \pm 4\%$ with toxic levels of LPS and to $86 \pm 6\%$ with NaN_3 with 5 μM Cu^{2+} . The concentration of nitrites in the control culture medium was $2.0 \pm 0.2 \mu\text{M}$. Added to the cell cultures, LPS increased the concentration of nitrites to $8.5 \pm 0.5 \mu\text{M}$. Cu^{2+} 5 μM did not show any significant effects on nitrite accumulation in the culture medium.

Conclusions. We showed that copper ions can exert protective effects on neurons against LPS-induced or NaN_3 -induced toxicity. This protection is likely to be associated rather with Cu^{2+} interaction with Complex IV of the electron transfer chain in the mitochondria than with inhibition of NO production. Effects of Cu^{2+} on apoptosis pathway proteins also cannot be ruled out.

Keywords: neurons; copper ions; sodium azide; nitrogen oxide

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). The research protocol was approved by the Local Ethics Committee of the Research Center of Neurology (protocol No. 5-5/22, June 1, 2022).

Source of funding. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For correspondence: 105064, Russia, Moscow, Obukha per., 5, build. 2. Brain Research Institute, Research Center of Neurology.

E-mail: estelmash@mail.ru. Stelmashook E.V.

For citation: M: Stelmashook E.V., Alexandrova O.P., Genrikhs E.E., Verma Ye., Salmina A.B., Isaev N.K. Copper ions reduced toxicity of sodium azide and lipopolysaccharide on cultivated cerebellar granule neurons. *Annals of Clinical and Experimental Neurology*. 2023;17(4):52–57. (In Russ.)

DOI: <https://doi.org/10.54101/ACEN.2023.4.6>

Received 10.05.2023 / Accepted 20.06.2023 / Published 25.12.2023

Введение

Медь является одним из наиболее распространённых переходных металлов в организме: участвует в кислородном обмене, синтезе коллагена и пигментации кожи, поддерживая целостность кровеносных сосудов, а также в гомеостазе железа, антиоксидантной защите и синтезе нейромедиаторов [1]. Ионы Cu^{2+} в виде структурных элементов входят в состав ряда белков. Например, медь является необходимым компонентом цитохром *c*-оксидазы (комплекс IV) — фермента, который катализирует конечный этап переноса электронов на кислород в процессе окислительного фосфорилирования в митохондриях. Кроме того, ионы меди содержатся в молекуле важнейшего антиоксиданта — супероксиддисмутазы, входят в состав церулоплазмينا — белка плазмы крови, вовлечённого в механизмы прооксидантных и антиоксидантных реакций.

Медь также необходима для ряда важных процессов в ткани головного мозга: регуляции передачи внутриклеточных сигналов, поддержания баланса катехоламинов, миелинизации аксонов нейронов и осуществления синаптической передачи в центральной нервной системе (ЦНС) [2].

Содержание меди в головном мозге — около 3–5 мкг/г сырого веса [1]. Рекомендуемое для поддержания системного гомеостаза потребление меди взрослыми должно составлять 0,8–2,4 мг/сут [3]. Стабильный гомеостаз Cu^{2+} в головном мозге очень важен, и отклонения от него могут быть фатальными для нейронов. Нарушение гомеостаза Cu^{2+} в ЦНС вовлечено в патогенез многих нейродегенеративных заболеваний и патологических состояний головного мозга, таких как болезни Вильсона–Коновалова и Альцгеймера [4–6].

Нарушение внутриклеточного баланса меди или железа может вызывать усиление продукции свободных радикалов и окислительный стресс [78], т.к. эти металлы с переменной валентностью принимают непосредственное участие в реакции Фентона, продуктами которой являются высокотоксичные гидроксильные радикалы [9]. В двухвалентном состоянии медь может участвовать в выработке перекиси водорода тау-белком [9] и усиливать действие прооксидантов. Показано, что антиоксидант ацетилцистеин, присутствуя в среде культивирования в микромолярных концентрациях, проявляет прооксидантные свойства на фоне наномолярных концентраций меди [10]. Однако данные литературы о непосредственном влиянии этих ионов на ключевые процессы нейродегенерации, в том числе при воспалительных процессах в ЦНС и ингибировании работы митохондрий, весьма ограничены.

Цель исследования — определить влияние нетоксических концентраций Cu^{2+} на гибель культивированных зернистых нейронов мозжечка, вызванную липополисахаридом (ЛПС; модель воспаления *in vitro*) и азидом натрия (NaN_3) — ингибитором цитохром *c*-оксидазы.

Материалы и методы

В экспериментах использовали 7–8-суточные культуры мозжечка 8-дневных крыс, полученные методом ферментно-механической диссоциации: 15 мин при $36,5^\circ\text{C}$ в растворе трипсина (0,05%) и ЭДТА (0,02%) на фосфатном буфере («Gibco Life Technologies»), далее ступенчатое пипетирование в среде [10]. Культивирование производили в 96-луночных пластиковых планшетах («Eppendorf»), покрытых полилизинном («Sigma»). Питательная среда содержала 90% минимальной среды Игла на солях Эрла («Gibco»), 10% эмбриональной телячьей сыворотки («HyClone»), 2 мМ глутамина (glutaMAX, «Gibco»), 25 мМ KCl и 10 мМ буфера HEPES, pH 7,2–7,4 («VWR Life Science»). В каждую ячейку планшета добавляли 0,1 мл суспензии клеток, создавая конечную плотность $3\text{--}5 \times 10^3$ клеток на mm^2 . Культуры развивались в CO_2 -инкубаторе, при $36,5^\circ\text{C}$ и относительной влажности 98%.

Хлорид меди (II) (0,5–5,0 мкМ, «Sigma»), ЛПС (10 мкг/мл, «Sigma») или NaN_3 (250 мкМ) добавляли на 7–8-й день *in vitro* в среду культивирования клеток мозжечка 7-дневных крыс на 24 ч.

После эксперимента культуры фиксировали в смеси этанол + формальдегид + уксусная кислота (7 : 2 : 1) и окрашивали трипановым синим. Культуры фотографировали на инвертированном микроскопе «Olympus CKX41» или в системе визуализации изображения «EVOS M7000» («Termo Fisher Scientific») при увеличении объектива $\times 40$. Процент выживших нейронов оценивали при подсчёте морфологически интактных культивированных зернистых нейронов в 5 последовательных полях зрения. Выживаемость в экспериментальных культурах выражали в процентах относительно контроля.

Уровень оксида азота (NO) определяли методом Грисса, основанном на получении диазосоединений, которые в результате реакции с альфа-нафтиламином окрашивают раствор в красный цвет. Фотометрию выполняли с помощью микропланшетного сканера («SpectraMax M2», «Molecular Devices») при длине волны 540 нм.

Для статистической обработки данных использовали программу «Statistica v. 13.3» («StatSoft Inc.»), однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным тестом Newman–Keuls или *t*-тест. Отличия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Результаты выражали как среднее с ошибкой среднего ($M \pm SEM$).

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утверждённым правовыми актами России, принципам Базельской декларации и рекомендациям локального этического комитета ФГБНУ НЦН (протокол № 5-5/22 от 01.06.2022).

Результаты

Токсическое действие Cu^{2+} на культивированные клетки наблюдалось при концентрации этого иона в культурах от 25 мкМ. С дальнейшим повышением концентрации Cu^{2+} выживаемость нейронов снижалась дозозависимо (рис. 1). Добавление в среду культивирования ЛПС снижало выживаемость нейронов до $15 \pm 2\%$ (рис. 2) относительно контроля, а NaN_3 — до $20,0 \pm 2,5\%$ (рис. 3). Если обработка нейронов токсинами проводилась в присутствии нетоксических концентраций ионов меди, то выживаемость нейронов дозозависимо повышалась.

На фоне 5 мкМ Cu^{2+} при токсическом действии ЛПС выживаемость нейронов возрастала до $78 \pm 4\%$ (рис. 2), а при действии NaN_3 — до $86 \pm 6\%$ (рис. 3). Уровень нитритов в среде культивирования контрольных культур составлял $2,0 \pm 0,2$ мкМ. Добавление ЛПС к клеточным культурам вызывало повышение содержания нитритов до $8,5 \pm 0,5$ мкМ (рис. 4). Хлорид меди в концентрации 5 мкМ не оказывал достоверного влияния на накопление нитрита в среде культивирования при воздействии ЛПС (рис. 4).

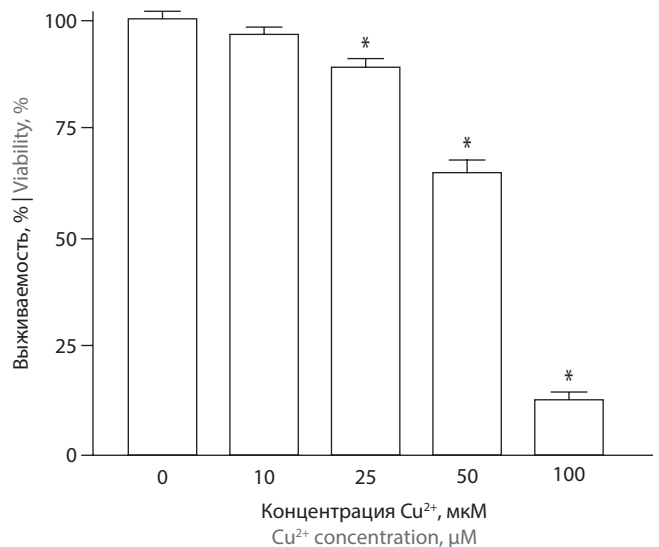


Рис. 1. Влияние различных концентраций ионов меди на выживаемость культивированных зернистых нейронов мозжечка крыс. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем (0 мкМ).

Fig. 1. Effects of different copper ion levels on survival of cultured rat cerebellar granule neurons.

* $p < 0.05$ vs. control (0 μM).

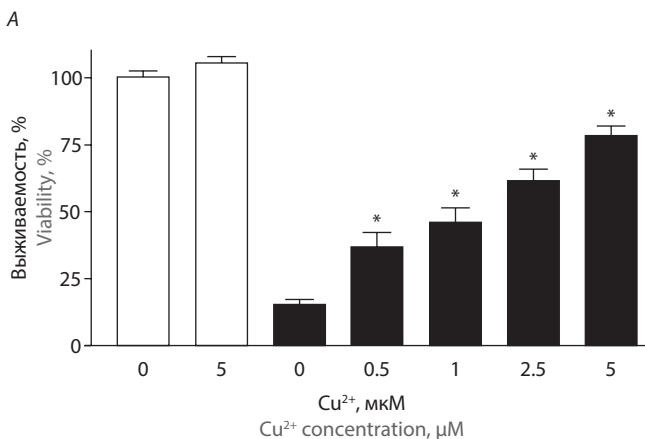
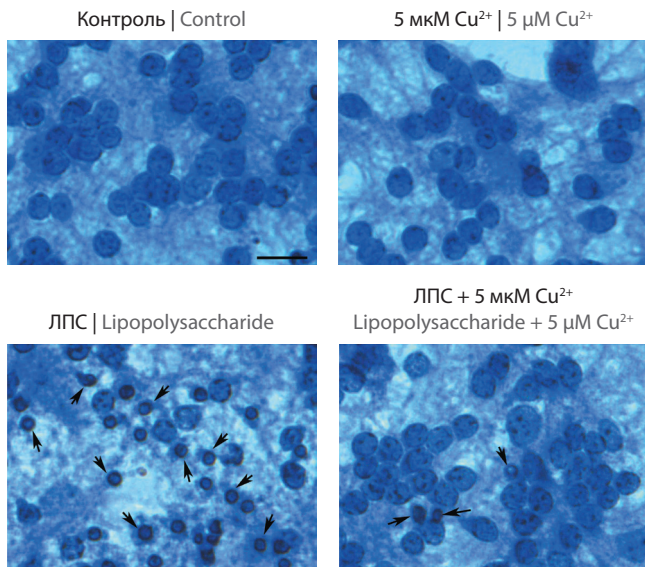


Рис. 2. Ионы меди снижают токсическое действие ЛПС на культивируемые зернистые нейроны мозжечка крыс.

A — окраска трипановым синим фиксированных культур. Стрелки указывают на ядра погибших нейронов. Масштаб 15 мкм.

B — количественные данные подсчёта морфологически интактных нейронов без (белые столбики) и при действии ЛПС (чёрные столбики).

* $p < 0,05$ по сравнению с 0 мкМ Cu^{2+} при действии ЛПС.

Fig. 2. Copper ions reduced LPS toxicity in cultured rat cerebellar granule neurons.

A: fixed cultures stained with trypan blue. Dead neuron nuclei are shown with arrows. Scale 15 μm.

B: quantitative data obtained by counting morphologically intact neurons without (white bars) and with LPS (black bars).

* $p < 0.05$ compared to 0 μM Cu^{2+} with LPS.

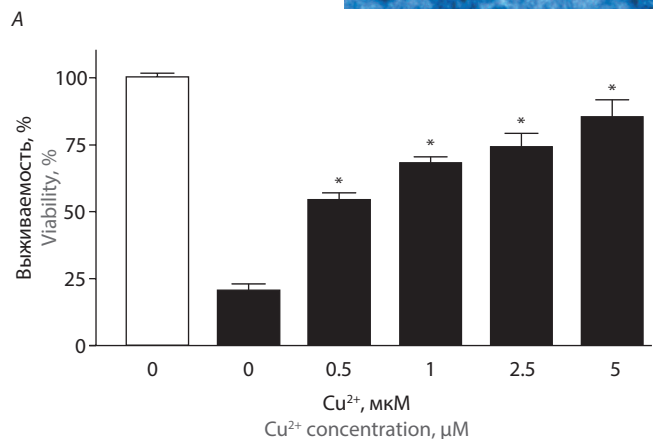
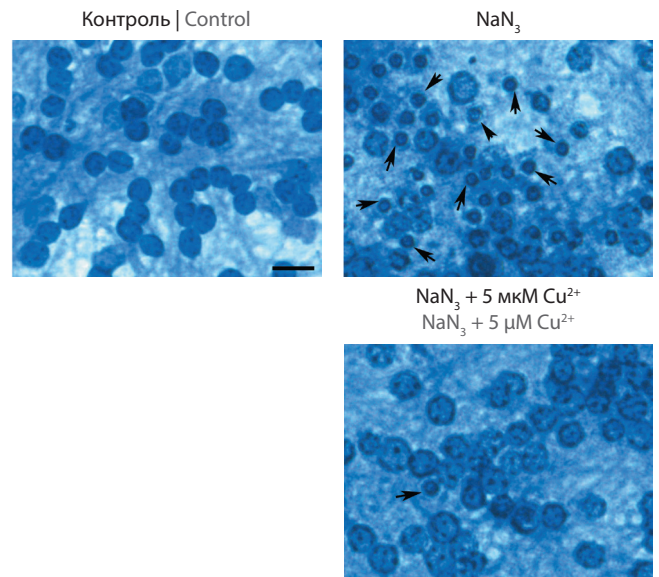


Рис. 3. Ионы меди снижают токсическое действие NaN_3 (чёрные столбики) на культивируемые зернистые нейроны мозжечка крыс.

A — окраска трипановым синим фиксированных культур. Стрелки указывают на ядра погибших нейронов. Масштаб 15 мкм.

B — количественные данные подсчёта морфологически интактных нейронов без (белые столбики) и при действии NaN_3 (чёрные столбики).

* $p < 0,05$ по сравнению с 0 мкМ Cu^{2+} при действии NaN_3 .

Fig. 3. Copper ions reduce NaN_3 toxicity (black bars) in cultured rat cerebellar granule neurons.

A: fixed cultures stained with trypan blue. Dead neuron nuclei are shown with arrows. Scale 15 μm.

B: quantitative data obtained by counting morphologically intact neurons without (white bars) and with NaN_3 (black bars).

* $p < 0.05$ compared to 0 μM Cu^{2+} with NaN_3 .

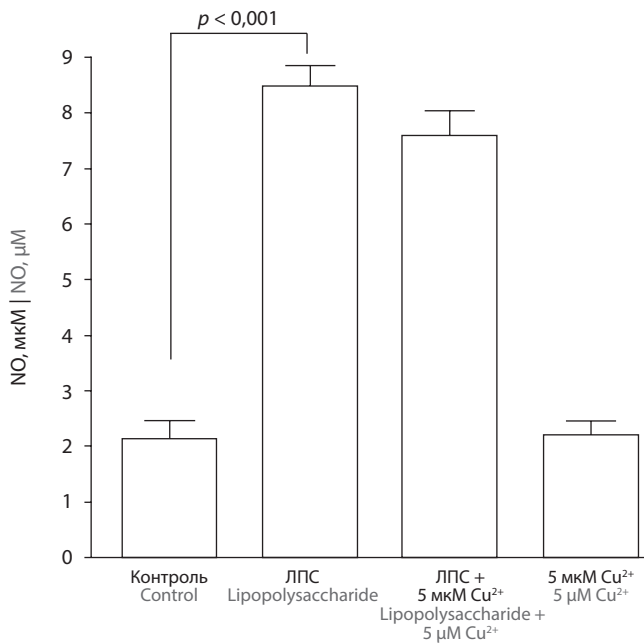


Рис. 4. Количество нитритов (NO) в среде культивирования зернистых нейронов мозжечка крыс. Добавление ЛПС (10 мкг/мл, 24 ч) вызывает повышение уровня нитритов в среде культивирования. Cu²⁺ (5 мкМ) не оказывает достоверного влияния на накопление нитрита в среде культивирования при воздействии ЛПС.

Fig. 4. The levels of nitrites (NO) in the culture medium of rat cerebellar granule neurons.

The addition of LPS (10 μg/ml, 24 h) causes an increase in nitrites in the culture medium. Cu²⁺ (5 μM) have no significant effect on the accumulation of nitrite in the culture medium under LPS action.

Обсуждение

Считается, что дисбаланс ионов некоторых металлов, особенно цинка и меди, играет важную роль в патогенезе многих нейродегенеративных заболеваний, включая мультисистемную атрофию, боковой амиотрофический склероз, болезни Крейтцфельда–Якоба, Вильсона–Коновалова, Альцгеймера и Паркинсона [1, 11, 12]. В норме ионы меди являются структурными элементами большого числа белков, в том числе белка плазмы крови церулоплазмина, участвующего в механизмах различных прооксидантных и антиоксидантных реакций. Медь необходима для функционирования антиоксидантной системы клетки, т.к. содержится в молекуле супероксиддисмутазы. Производные Cu(II) являются эффективными противовоспалительными средствами [13, 14], а Cu-связывающие пептиды проявляют противовоспалительную активность в первичных культурах микроглии [15].

Одним из важных медиаторов воспаления является NO. Ранее было показано, что клетки глии при воспалительной активации, наблюдаемой при большинстве патологий ЦНС, способны оказывать токсическое воздействие на нейроны, которое предотвращается ингибиторами индуцируемой синтазы NO [16]. Избыточное образование NO или актив-

ных форм NO, пероксинитрита ухудшает функционирование митохондрий и, в конечном итоге, влияет на метаболизм и выживаемость нейрональных клеток [17, 18]. Было обнаружено, что помимо множества регуляторных функций NO отвечает за модуляцию клеточного дыхания путём обратимого ингибирования цитохром *c*-оксидазы [19, 20].

В настоящем исследовании мы показали, что добавление в среду культивирования нейроглиальных культур ЛПС снижает выживаемость культивированных зернистых нейронов мозжечка крыс и сопровождается накоплением нитрита в среде культивирования за счёт продукции NO. Добавление Cu²⁺ в нетоксических концентрациях в среду культивирования достоверно снижало клеточную гибель, вызванную ЛПС. Известно, что NO может действовать как лиганд для атомов меди, а также может вступать в окислительно-восстановительную реакцию с металлом после его связывания. Кроме того, NO обладает неспаренным электроном, который может соединяться с неспаренным электроном Cu²⁺ [21]. В наших экспериментах медь не оказывала достоверного влияния на накопление нитрита в среде культивирования при воздействии ЛПС. В то же время NO может нарушать митохондриальное дыхание, главным образом, за счёт конкурентного ингибирования связывания кислорода с содержащей Cu²⁺ цитохром *c*-оксидазой (комплекс IV) [22] и прямого взаимодействия Cu²⁺ с ферментами цикла трикарбоновых кислот [23]. В выполненных нами экспериментах продемонстрировано, что защита нейронов ионами меди происходит при токсическом действии NaN₃, который является ингибитором комплекса IV цепи переноса электронов в митохондриях.

Полученные нами данные коррелируют с более ранними результатами, демонстрирующими, что вызванное 1-метил-4-фенилпиридином (MPP⁺) снижение активности митохондриальных комплексов I, II, IV, V и Cu/Zn-супероксиддисмутазы в стриатуме крыс предотвращалось предварительной обработкой CuSO₄ [24]. Кроме того, в этой модели нейродегенерации CuSO₄ снижал индуцированное MPP⁺ повышение уровня ферментативной активности каспаз 8, 9 и 3 и вызывал уменьшение апоптотического повреждения клеток [25], предотвращал гипокинетическое состояние мышей, обработанных MPP⁺ [26]. Введение мышам хелатора меди приводит к снижению уровня активности комплекса IV в нейронах и падению активности антиоксидантной системы в ткани головного мозга [27, 28]. Исходя из приведённых выше данных, можно предположить, что защитное действие ионов меди при ингибировании комплексов цепи переноса электронов может происходить за счёт прямого воздействия на медь-зависимые белки или косвенного воздействия на белки путей апоптоза.

Заключение

Показана возможность защитного действия Cu²⁺ на нейроны при токсичности, вызванной индуктором воспаления ЛПС и ингибитором цитохром *c*-оксидазы NaN₃. Видимо, эта защита обусловлена взаимодействием Cu²⁺ с комплексом IV цепи переноса электронов в митохондриях, а не подавлением продукции NO, не исключено также влияние Cu²⁺ на белки путей апоптоза.

Список источников / References

- Gromadzka G., Tarnacka B., Flaga A., Adamczyk A. Copper dyshomeostasis in neurodegenerative diseases—therapeutic implications. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(23):9259. DOI: 10.3390/ijms21239259
- An Y., Li S., Huang X. et al. The role of Copper homeostasis in brain disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(22):13850. DOI: 10.3390/ijms232213850
- Bost M., Houdart S., Oberli M. et al. Dietary copper and human health: current evidence and unresolved issues. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2016;35:107–115. DOI: 10.1016/j.jtemb.2016.02.006
- Сальков В.Н., Худоерков Р.М., Сухоруков В.С. Патогенетические аспекты повреждений головного мозга при болезни Вильсона—Коновалова. *Российский вестник перинатологии и педиатрии.* 2020;65(6):22–28. Salkov V.N., Khudoerkov R.M., Sukhorukov V.S. Pathogenetic aspects of brain lesions in Wilson—Konovalov disease. *Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics.* 2020;65(6):22–28 (in Russ.). DOI: 10.21508/1027-4065-2020-65-6-22-28
- Isaev N.K., Stelmashook E.V., Genriks E.E. Role of zinc and copper ions in the pathogenetic mechanisms of traumatic brain injury and Alzheimer's disease. *Rev. Neurosci.* 2020;31(3):233–243. DOI: 10.1515/revneuro-2019-0052
- Гулевская Т.С., Чайковская Р.П., Ануфриев П.Л. Патоморфология головного мозга при гепатолентикулярной дегенерации (болезни Вильсона—Коновалова). *Анналы клинической и экспериментальной неврологии.* 2020;14(2):50–61. Gulevskaya T.S., Chaykovskaya R.P., Anufriev P.L. Cerebral pathology in hepatolenticular degeneration (Wilson disease). *Annals of Clinical and Experimental Neurology.* 2020;14(2):50–61. (in Russ) DOI: 10.25692/ACEN.2020.27
- Fujimoto Y., Maruta S., Yoshida A., Fujita T. Effect of transition metal ions on lipid peroxidation of rabbit renal cortical mitochondria. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 1984;44(3):495–498.
- Jimenez Del Rio M., Velez-Pardo C. Transition metal-induced apoptosis in lymphocytes via hydroxyl radical generation, mitochondria dysfunction, and caspase-3 activation: an in vitro model for neurodegeneration. *Arch. Med. Res.* 2004;35(3):185–193. DOI: 10.1016/j.arcmed.2004.01.001
- Su X.Y., Wu W.H., Huang Z.P. et al. Hydrogen peroxide can be generated by tau in the presence of Cu(II). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;358(2):661–665. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.04.191
- Stelmashook E.V., Genriks E.E., Kapkaeva M.R. et al. N-acetyl-l-cysteine in the presence of Cu²⁺ induces oxidative stress and death of granule neurons in dissociated cultures of rat cerebellum. *Biochemistry (Mosc.).* 2017;82(10):1176–1182. DOI: 10.1134/S0006297917100108
- Stelmashook E.V., Isaev N.K., Genriks E.E., et al. Role of zinc and copper ions in the pathogenetic mechanisms of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Biochemistry (Mosc.).* 2014;79(5):391–396. DOI: 10.1134/S0006297914050022
- Agarwal P., Ayton S., Agrawal S. et al. Brain copper may protect from cognitive decline and Alzheimer's disease pathology: a community-based study. *Mol. Psychiatry.* 2022;27(10):4307–4313. DOI: 10.1038/s41380-022-01802-5
- Whitehouse M.W., Walker W.R. Copper and inflammation. *Agents Actions.* 1978;8(1-2):85–90. DOI: 10.1007/BF01972407
- Berthon G. Is copper pro- or anti-inflammatory? A reconciling view and a novel approach for the use of copper in the control of inflammation. *Agents Actions.* 1993;39(3-4):210–217. DOI: 10.1007/BF01998975
- Caetano-Silva M.E., Rund L.A., Vailati-Riboni M. et al. Copper-binding peptides attenuate microglia inflammation through suppression of NF-κB pathway. *Mol. Nutr. Food Res.* 2021;65(22):e2100153. DOI: 10.1002/mnfr.202100153
- Bal-Price A., Brown G.C. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *J. Neurosci.* 2001;21(17):6480–6491. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-17-06480.2001
- Ghasemi M., Mayasi Y., Hannoun A. et al. Nitric oxide and mitochondrial function in neurological diseases. *Neuroscience.* 2018;376:48–71. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2018.02.017
- Singh S., Zhuo M., Gorgun F.M., Englander E.W. Overexpressed neuroglobin raises threshold for nitric oxide-induced impairment of mitochondrial respiratory activities and stress signaling in primary cortical neurons. *Nitric Oxide.* 2013;32:21–28. DOI: 10.1016/j.niox.2013.03.008
- Brunori M., Giuffrè A., Forte E. et al. Control of cytochrome c oxidase activity by nitric oxide. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004;1655(1-3):365–371. DOI: 10.1016/j.bbabi.2003.06.008
- Mason M.G., Nicholls P., Wilson M.T., Cooper C.E. Nitric oxide inhibition of respiration involves both competitive (heme) and noncompetitive (copper) binding to cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006;103(3):708–713. DOI: 10.1073/pnas.0506562103
- Torres J., Wilson M.T. The reactions of copper proteins with nitric oxide. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999;1411(2-3):310–322. DOI: 10.1016/S0005-2728(99)00022-5
- Larsen F.J., Schiffer T.A., Weitzberg E., Lundberg J.O. Regulation of mitochondrial function and energetics by reactive nitrogen oxides. *Free Radic. Biol. Med.* 2012;53(10):1919–1928. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.580
- Tsvetkov P., Coy S., Petrova B. et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins. *Science.* 2022;375(6586):1254–1261. DOI: 10.1126/science.abf0529
- Rubio-Osornio M., Orozco-Ibarra M., Díaz-Ruiz A. et al. Copper sulfate pretreatment prevents mitochondrial electron transport chain damage and apoptosis against MPP⁺-induced neurotoxicity. *Chem. Biol. Interact.* 2017;271:1–8. DOI: 10.1016/j.cbi.2017.04.016
- Islas-Cortez M., Rios C., Rubio-Osornio M. et al. Characterization of the antiapoptotic effect of copper sulfate on striatal and midbrain damage induced by MPP⁺ in rats. *Neurotoxicology.* 2021;82:18–25. DOI: 10.1016/j.neuro.2020.10.011
- Alcaraz-Zubeldia M., Boll-Woehrens M.C., Montes-López S. et al. Copper sulfate prevents tyrosine hydroxylase reduced activity and motor deficits in a Parkinson's disease model in mice. *Rev. Invest. Clin.* 2009;61(5):405–411.
- Varhaug K.N., Kråkenes T., Alme M.N. et al. Mitochondrial complex IV is lost in neurons in the cuprizone mouse model. *Mitochondrion.* 2020;50:58–62. DOI: 10.1016/j.mito.2019.09.003
- Shiri E., Pasbakhsh P., Borhani-Haghighi M. et al. Mesenchymal stem cells ameliorate cuprizone-induced demyelination by targeting oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2021;41(7):1467–1481. DOI: 10.1007/s10571-020-00910-6

Информация об авторах

Степашук Елена Викторовна — д.б.н., в.н.с. лаб. нейробиологии и тканевой инженерии Института мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2533-7673>
Александрова Ольга Петровна — к.б.н., н.с. лаб. нейробиологии и тканевой инженерии Института мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия, <https://orcid.org/0009-0006-9109-1463>
Генрикс Елизавета Евгеньевна — к.б.н., с.н.с. лаб. нейробиологии и тканевой инженерии Института мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3203-0250>
Верма Ешвандра — магистр филологии, доктор философии, первый старший доцент кафедры токсикологии Университет Чаудхари Чаран Сингх, Мирут, Индия, <https://orcid.org/0000-0002-5994-7501>
Салмина Алла Борисовна — д.м.н., г.н.с., руководитель лаб. нейробиологии и тканевой инженерии и отдела молекулярных и клеточных механизмов нейропластичности Института мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4012-6348>
Исаев Николай Константинович — д.б.н., в.н.с. лаб. нейробиологии и тканевой инженерии Института мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия; доцент каф. клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8427-1163>

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Information about the authors

Elena V. Stelmashook — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of neurobiology and tissue engineering, Brain Science Institute, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2533-7673>
Olga P. Alexandrova — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Laboratory of neurobiology and tissue engineering, Brain Science Institute, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0009-0006-9109-1463>
Elizaveta E. Genriks — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of neurobiology and tissue engineering, Brain Science Institute, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3203-0250>
Verma Yeshvandra — Department of Toxicology, Chaudhary Charan Singh University, Meerut, India. <https://orcid.org/0000-0002-5994-7501>
Alla B. Salmina — Professor, chief researcher, Head, Laboratory of neurobiology and tissue engineering, Department of molecular and cellular mechanisms of neuroplasticity, Brain Science Institute, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4012-6348>
Nickolay K. Isaev — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of neurobiology and tissue engineering, Brain Science Institute, Research Center of Neurology, Moscow, Russia; Department of cell biology and histology, Biological faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8427-1163>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.