

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕДИ НА КУЛЬТИВИРОВАННЫЕ ГЛИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

Е.В. Стельмашук¹, Е.Е. Генрихс¹, О.П. Александрова¹, А.Е. Ланцева^{1,2}, М.Р. Капкаева¹, Н.К. Исаев^{1,2*}

¹Российский центр неврологии и нейронаук, 125367, Москва, Волоколамское шоссе, 80

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1; *эл. почта: nisaev61@mail.ru

Ионы меди (Cu^{2+}) в концентрации 25–50 мкМ стимулируют вызванную липополисахаридом (ЛПС) продукцию оксида азота (NO) в культурах глиальных клеток, полученных из коры головного мозга крыс и содержащих как астроциты, так и клетки микроглии. Более высокая концентрация Cu^{2+} (100 мкМ) при стимуляции ЛПС не вызвала достоверного повышения NO в среде инкубации, а при 200 мкМ Cu^{2+} происходило снижение этого параметра по сравнению с ЛПС. Ионы Cu^{2+} в этих концентрациях снижали жизнеспособность культивируемых клеток. Видимо, снижение жизнеспособности клеток не связано с накоплением нитритов, так как добавление в среду культивирования даже 100 мкМ нитрита натрия не снижало выживаемость клеток и не влияло на цитотоксичность Cu^{2+} . Исследование клеток микроглии (маркер IBA1) показало, что в культурах, обработанных ЛПС, микроглия имела преимущественно распластанную амебоидную морфологию, характерную для активированной микроглии. Кроме того, под действием ЛПС происходило увеличение площади профильного поля тела клеток и периметра. В концентрации 25 мкМ ионы Cu^{2+} не влияли на морфологические изменения клеток микроглии, связанные с воспалительным фенотипом. Нельзя исключать, что усиление ионами меди продукции NO, вызванной ЛПС, опосредовано астроцитами.

Ключевые слова: воспаление; Cu^{2+} ; астроциты; микроглия; оксид азота

DOI: 10.18097/PBMC1597

ВВЕДЕНИЕ

Нейровоспаление и нарушение гомеостаза меди являются ключевыми патологическими признаками нескольких нейродегенеративных заболеваний, включая болезни Вильсона-Коновалова, Паркинсона и Альцгеймера [1–3]. За последние годы во многих исследованиях было продемонстрировано провоспалительное действие ионов меди [4–6]. Их чрезмерное воздействие может усиливать регуляцию провоспалительных цитокинов, увеличивать секрецию медиаторов воспаления и снижать регуляцию противовоспалительных цитокинов в различных органах, активируя воспалительные реакции посредством различных молекулярных и клеточных сигнальных путей, включая путь NF- κ B, путь MAPKs, путь JAK-STAT и инфламасому NLRP3 [7]. Ранее на линии микроглиальных клеток мыши BV2 было показано, что при добавлении липополисахарида (ЛПС) и Cu^{+} (0,1 мкМ или 100 мкМ) в среду культивирования снижается продукция оксида азота (NO), в то время как экспрессия iNOS существенно не изменяется. Модулирующее действие Cu^{+} на высвобождение NO в среду авторы объясняли тем, что M1 (воспалительный) фенотип микроглии BV2, наблюдаемый при действии ЛПС, смещается в M2 (адаптивный) фенотип при введении Cu^{+} в комбинации с ЛПС [8]. Однако в экспериментах на крысах было обнаружено, что внутривенное введение ионов меди (до конечной концентрации около 35 мкмоль/л в плазме) приводило к значительной индукции NOS2

в ряде тканей, включая аорту, печень и лёгкие, повышению уровня TNF- α в плазме крови. Это позволило авторам сделать вывод, что медь может действовать как провоспалительный агент [9]. Более того, хелатирование меди тетрагидромолибдатом у мышей ингибировало ЛПС-индуцированные воспалительные реакции *in vivo* [10]. Однако, по данным других авторов, как повышенный, так и пониженный уровень меди, вызванный химическими обработками, подавлял вызванное ЛПС воспаление в клетках микроглии [11]. В то же время ионы меди в концентрации 25 мкМ или 50 мкМ могут способствовать индуцированной ЛПС активации макрофагов крупного рогатого скота, стимулировать провоспалительные факторы путём активации пути NF- κ B и увеличивать способность макрофагов к фагоцитозу и миграции [6]. NO — это распространённый вторичный мессенджер, который используется животными как физиологический регулятор и цитотоксический агент, вовлечённый в целый ряд физиологических и патофизиологических процессов, в том числе и в нейровоспаление. Нейровоспаление, в свою очередь, является ключевым патологическим признаком ряда нейродегенеративных заболеваний. Астроциты и микроглия как основные клеточные участники нейровоспаления производят и высвобождают медиаторы воспаления. Выделенные и культивированные клетки микроглии и астроцитов из ткани ЦНС могут служить мощным инструментом для изучения процессов нейровоспаления [12].



© 2025 Коллектив авторов. Лицензиат ИБМХ, Москва. Статья открытого доступа, распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY-SA 4.0) (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>).

В связи с вышесказанным, целью настоящего исследования было определение влияния ионов меди (Cu^{2+}) на продукцию NO и изменения морфологии клеток микроглии в направлении воспалительного фенотипа в культурах глиальных клеток при их стимуляции ЛПС. Актуальность данного вопроса связана с тем, что нарушение гомеостаза меди и нейровоспаление и являются значимыми патологическими звеньями ряда нейродегенеративных заболеваний [1–3].

МЕТОДИКА

Получение культур клеток глии и их обработка

Диссоциированную культуру клеток глии получали из 1-дневных крыс методом ферментно-механической диссоциации по ранее описанной методике [13]. Выделенную кору больших полушарий головного мозга промывали фосфатным буфером (PBS, “Gibco Life Technologies”, США), лишённым ионов кальция и магния, измельчали скальпелем и инкубировали 15 мин при 37°C в 0,05% трипсина и 0,02% ЭДТА (“Gibco Life Technologies”), промывали в двух сменах фосфатного буфера и один раз средой и диссоциировали механически ступенчатым пипетированием в среде культивирования. Суспензию клеток центрифугировали 3 мин при 19 g, осадок ресуспендировали в питательной среде и высаживали на культуральный пластик, покрытый полилизинем (“Sigma”, США). Питательная среда содержала 90% минимальной среды Игла на солях Эрла (MEM, “Gibco”, Великобритания), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (“Hy Clone”, Австрия), 2 mM глутамакс (добавка GlutaMAX 200 mM дипептид L-аланил-L-глутамина в 0,85% растворе NaCl, обладающая повышенной стабильностью, “Gibco”), 10 mM буфер HEPES (“Sigma”). Культуры инкубировали в CO_2 -инкубаторе (“RWD Life Science”, Китай) при температуре 36,5°C и относительной влажности 98%. После образования монослоя глиальные культуры пересаживали в 96-луночные пластиковые планшеты (“Eppendorf”, Германия), покрытые полилизинем (“Sigma”), и работали на 1 пассаже после образования монослоя. Прижизненные наблюдения за состоянием культур проводили с помощью фазово-контрастной микроскопии, используя инвертированный микроскоп “Olympus CKX41” (“Olympus”, Япония) или систему визуализации изображения “EVOS M7000” (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Воспаление моделировали добавлением ЛПС (30 мкг/мл, 24 ч, “Sigma”) в кондиционированную среду культивирования. Нитрит натрия (100 мкМ) и CuCl_2 (25–200 мкМ) вносили в кондиционированную среду культивирования на 24 ч.

Иммуноцитохимическое окрашивание

Для иммуноцитохимического исследования глиальные культуры фиксировали в 5% формалине на PBS в течение 15 мин. Промывали PBS, в течение 20 мин инкубировали с 0,1% Тритоном X-100

(“HiMedia”, Индия), 1 ч в PBS с 2,5% БСА (бычий сывороточный альбумин, “Sigma-Aldrich”, США) и 10% сывороткой лошади (“Gibco”). Промывали PBS и инкубировали с первичными антителами в течение ночи при 4°C во влажной камере: кроличьи моноклональные анти-IBA1 (микроглия) (“Abcam”, Великобритания, 1:500) или кроличьи моноклональные к анти-GFAP (астроглия) (“Abcam”, 1:500). После промывания PBS глиальные культуры инкубировали 2 ч со вторичными антителами (моноклональные ослиные анти-кроличьи AlexaFluor 488 флуорохром-конъюгированные (“Invitrogen”, США, 1:1000). Затем промывали и заключали в монтирующую среду Fluoroshield с DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол, “Thermo Fisher Scientific”) и исследовали с помощью системы визуализации изображения “EVOS M7000” (“Thermo Fisher Scientific”) при увеличении объектива $\times 20$ и $\times 10$.

Измерения площади профильного поля тела клеток и периметра и подсчёт клеток производили с помощью программы “Fiji”.

Определение нитритов в среде культивирования

Содержание нитритов в среде культивирования определяли методом Грисса (“Sigma-Aldrich”), основанном на получении диазосоединений, которые в результате реакции с альфа-нафтиламиноом окрашивают раствор в красный цвет. По увеличению количества вещества, реагирующего с реактивом Грисса, судили о синтезе NO. В ходе подготовки проб в ячейки 96-луночного пластикового планшета вносили по 100 мкл анализируемой среды и 100 мкл реактива Грисса (10%-ный раствор в 12%-ной уксусной кислоте), далее инкубировали 10 мин в темноте. Фотометрию выполняли с помощью микропланшетного сканера SpectraMax M2 (“Molecular Devices”, США) при 540 нм. Пробы в планшете перед измерением перемешивали 5 с в микропланшетном сканере. Содержание нитритов в микрограммах вычисляли по калибровочному графику, для калибровки использовали раствор NaNO_2 (0–200 мкМ).

МТТ-тест

Жизнеспособность клеток после экспериментов оценивали с помощью МТТ-теста (3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2н-тетразолийбромид, “Sigma-Aldrich”): чем больше окрашенного формазана образуется, тем выше выживаемость клеток в культуре. Для этого культуры инкубировали с 0,5 мг/мл МТТ в течение 20 мин. Далее отбирали среду культивирования и добавляли в каждую лунку по 50 мкл диметилсульфоксида (DMSO). Фотометрию выполняли с помощью микропланшетного сканера SpectraMax M2 при 570 нм. Жизнеспособность контрольных культур принимали за 100%, а жизнеспособность обработанных клеток подсчитывали в процентах от контроля [14]. Для оценки и контроля состояния клеток и монослоя культуры исследовали с помощью фазово-контрастной микроскопии перед МТТ-тестом.

ВЛИЯНИЕ Cu^{2+} НА КУЛЬТИВИРОВАННЫЕ ГЛИОЦИТЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЛПС

Статистическая обработка данных

Для статистической обработки данных использовали программу Statistica 13.3, однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с посттестом Dunnett при сравнении с контролем или Bonferroni при попарном сравнении. Отличия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Результаты выражали как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$).

Дизайн эксперимента приведён на рисунке 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные нами препараты позволяют с уверенностью говорить о наличии в наших культурах иммунофенотипированных по специфическим

маркерам (GFAP, рис. 2А и IBA1, рис. 2Б) клеток астро- и микроглии. По результатам подсчёта общего количества ядер, окрашенных DAPI, и клеток, окрашенных по IBA-1, полученные нами культуры содержали $16 \pm 1\%$ клеток микроглии.

Базальный уровень веществ, реагирующих с реактивом Грисса в среде инкубирования клеточных культур, составлял $4,7 \pm 0,6$ мкМ. Добавление в среду культивирования только Cu^{2+} в интервале концентраций 25–200 мкМ не оказывало достоверного воздействия на этот параметр, тогда как добавление ЛПС достоверно повышало этот параметр до $47 \pm 2,7$ мкМ. Внесение в среду культивирования Cu^{2+} в концентрации 25 мкМ и 50 мкМ на фоне действия ЛПС достоверно увеличивало накопление веществ, реагирующих с реактивом Грисса, в среде культивирования до $66 \pm 5,6$ мкМ и

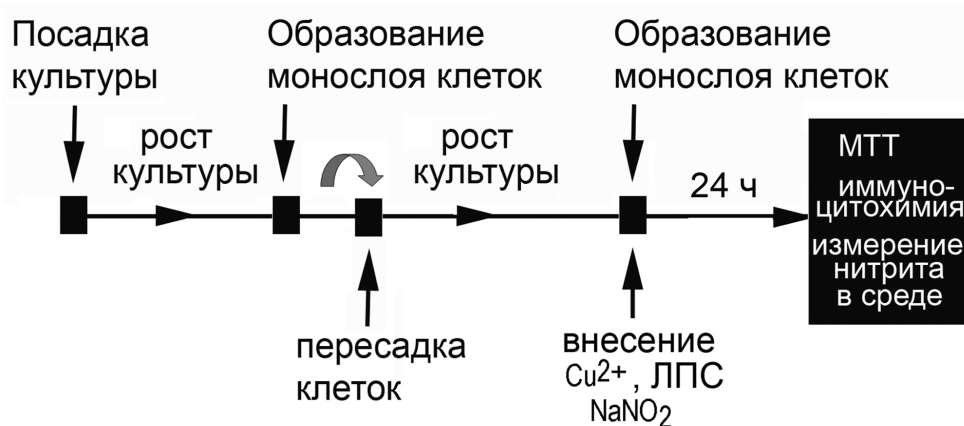


Рисунок 1. Дизайн эксперимента. ЛПС – липополисахарид.

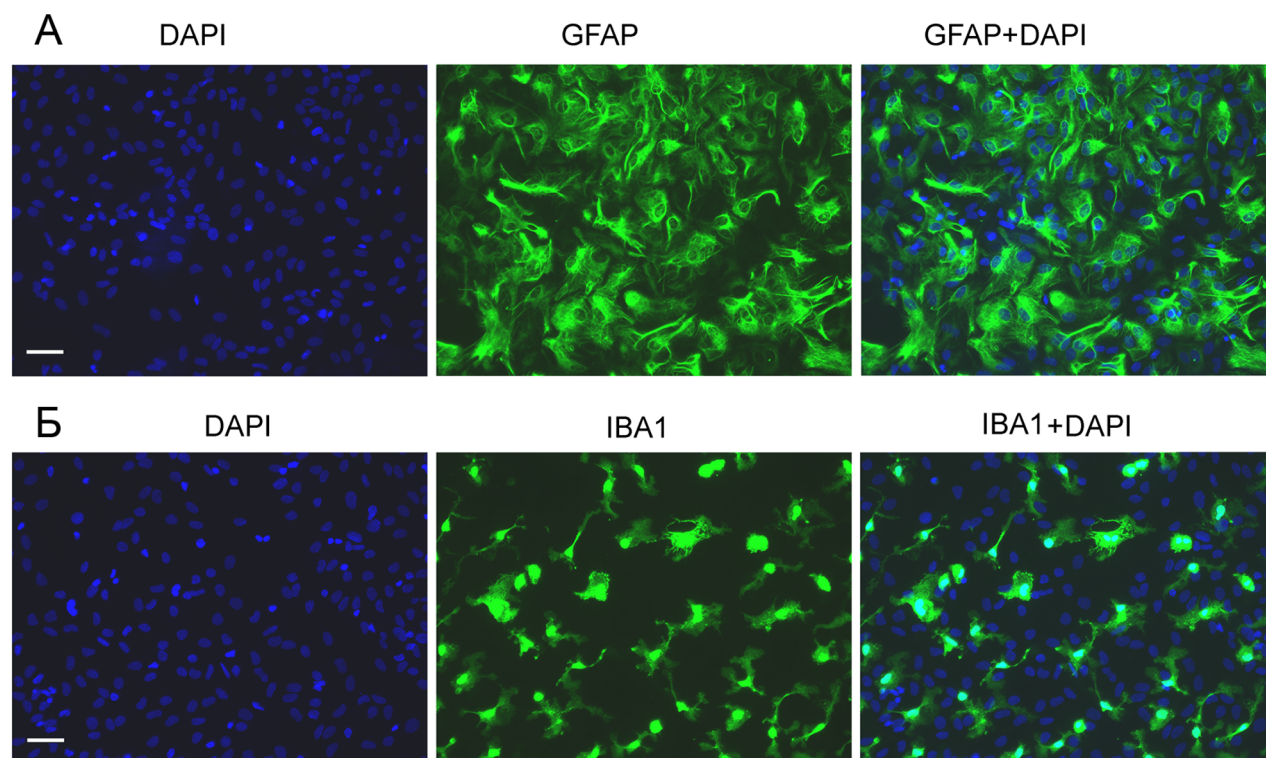


Рисунок 2. Иммуноцитохимическое окрашивание культуры глиальных клеток на А – GFAP (астроглия) и Б – IBA1. Ядра клеток окрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок для всех фото – 50 мкм.

55±6 мкМ соответственно (рис. 3). Более высокая концентрация Cu^{2+} (100 мкМ) при ЛПС стимуляции не вызывала достоверного повышения нитрита в среде инкубации, а 200 мкМ Cu^{2+} вызывала достоверное снижение этого параметра (рис. 3).

В дальнейших наших экспериментах мы провели морфометрию клеток микроглии, выявленных в культурах иммуногистохимически по маркеру IBA1. Анализ препаратов показал, что в контрольных и обработанных только Cu^{2+} присутствует значительное число отростчатых клеток, тогда как в культурах, обработанных ЛПС и ЛПС совместно с Cu^{2+} (ЛПС+ Cu^{2+}), преобладали клетки микроглии с амебоидной морфологией,

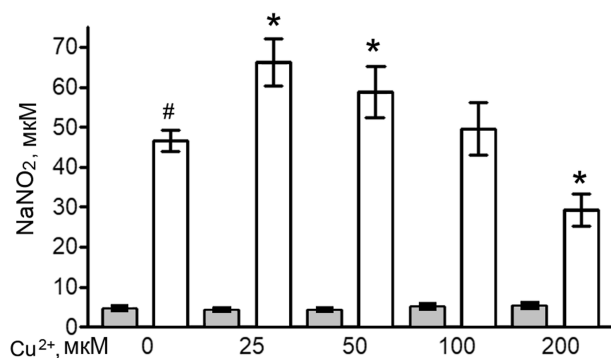


Рисунок 3. Ионы меди (Cu^{2+}) увеличивают накопление веществ, реагирующих с реактивом Грисса, в культурах глиальных клеток коры головного мозга крыс при действии ЛПС (белые столбцы в присутствии ЛПС, серые – без него). # $p < 0,0001$ по сравнению с “0” мкМ Cu^{2+} . * $p < 0,0001$ по сравнению с “0 мкМ +ЛПС”.

характерной для активированной микроглии (рис. 4A1–A4). Кроме того, под действием ЛПС происходило достоверное увеличение площади профильного поля тела и периметра клеток, что также характерно для активированной микроглии. Ионы Cu^{2+} в концентрации 25 мкМ не влияли на эти параметры (рис. 4Б,В).

В последующих экспериментах оценивали выживаемость клеток, используя МТТ-метод. Показано, что накопление формазана в клетках, инкубированных с МТТ, достоверно дозозависимо снижалось, когда концентрация Cu^{2+} в среде культивирования была 50 мкМ и более. Добавление только ЛПС в среду не влияло на накопление формазана в клетках (рис. 5).

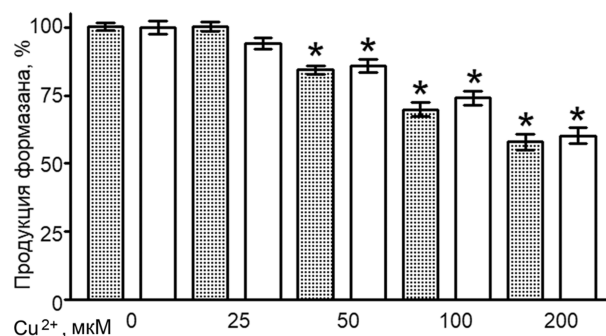


Рисунок 5. Токсическое действие ионов Cu^{2+} на культивируемые глиоциты коры головного мозга крыс в присутствии ЛПС (30 мкг/мл, 24 ч, белые столбцы). * $p < 0,01$ достоверное отличие от контроля (“0” мкМ Cu^{2+}).

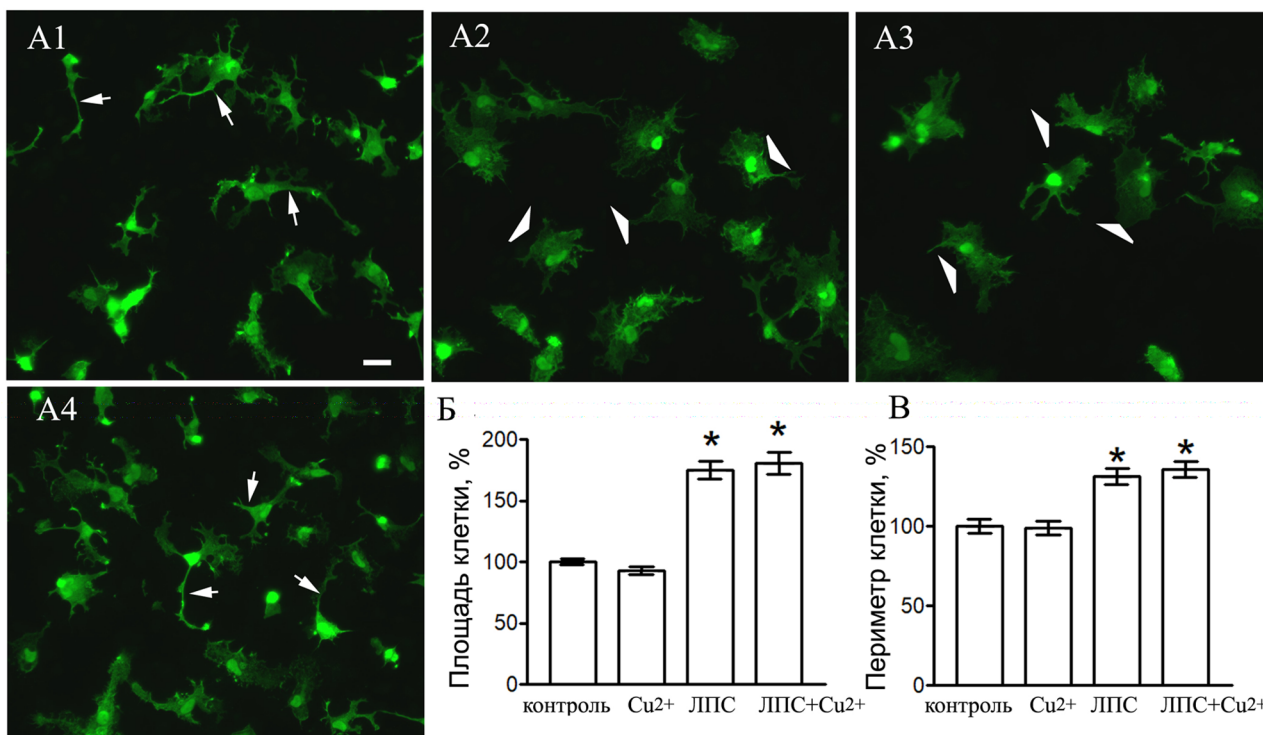


Рисунок 4. Влияние ЛПС и 25 мкМ Cu^{2+} на культивируемые клетки микроглии. A1–A4 – иммуногистохимическая окраска микроглии (IBA1). Стрелки указывают на отростчатые формы микроглии, треугольники на амебоидные. Масштабный отрезок для всех фото – 10 мкм. Б – площадь профильного поля клеток; В – периметр клеток в процентах относительно контроля. * $p = 0,0001$ в сравнении с контролем, $n = 163$, n – количество клеток на точку.

ВЛИЯНИЕ Cu^{2+} НА КУЛЬТИВИРОВАННЫЕ ГЛИОЦИТЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЛПС

Для контроля специфичности МТТ метода и токсического действия Cu^{2+} живые культуры исследовали с помощью фазово-контрастной микроскопии, которая, как и МТТ-метод, показала нарастающее повреждение глиальных культур в интервале концентраций 50–200 мкМ (рис. 6).

Максимальная концентрация нитритов в среде клеточных культур в наших экспериментах составляла $66 \pm 5,6$ мкМ, однако добавление в среду культивирования даже 100 мкМ нитрита натрия не снижало выживаемость клеток и не влияло на цитотоксичность Cu^{2+} (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ

Астроциты и микроглия считаются ключевыми фигурами в инициировании воспалительной реакции после повреждения головного мозга и последующего

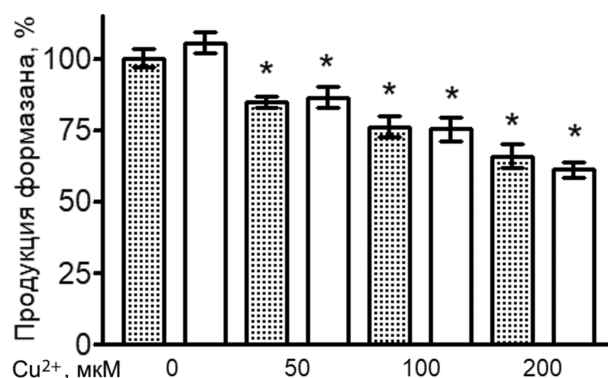
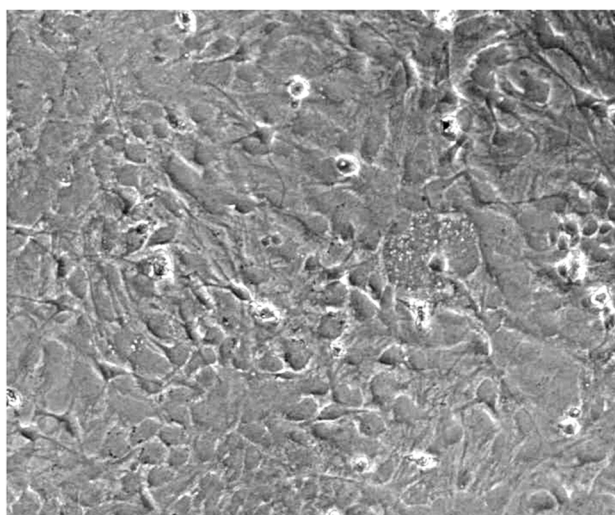
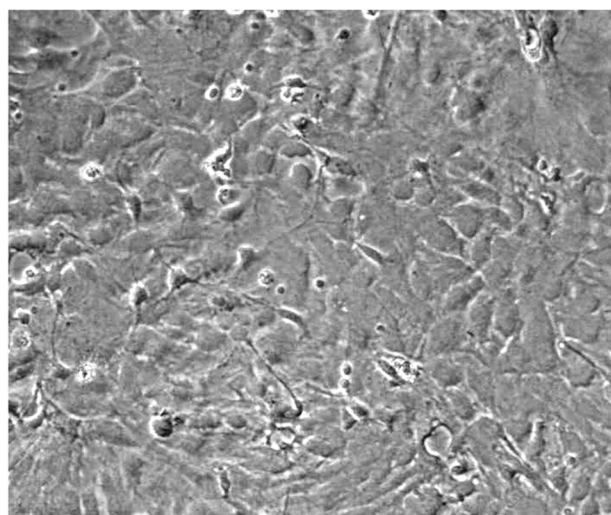


Рисунок 7. Добавление нитрита натрия (100 мкМ, белые столбцы) в среду культивирования не снижало выживаемость клеток и не влияло на цитотоксичность Cu^{2+} (МТТ-тест). * $p < 0,01$ достоверное отличие от контроля ("0" мкМ Cu^{2+}).

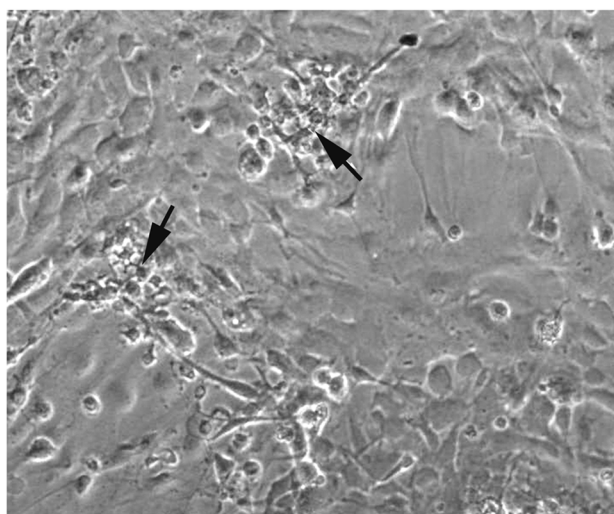
0 мкМ



25 мкМ Cu^{2+}



50 мкМ Cu^{2+}



100 мкМ Cu^{2+}

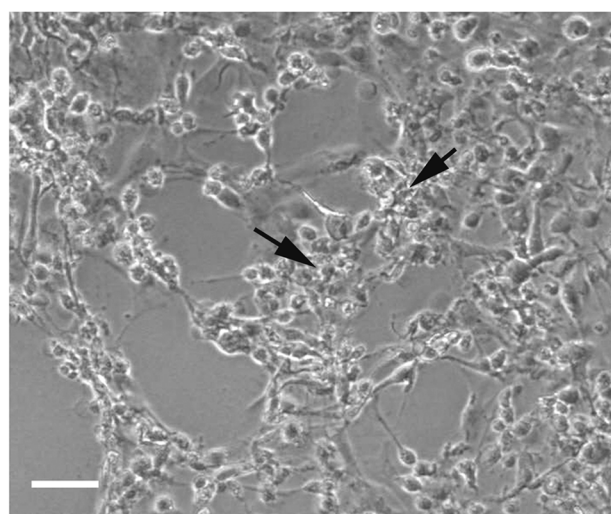


Рисунок 6. Токсическое действие Cu^{2+} на монослой культивированных глиоцитов коры головного мозга крыс. Фазовый контраст. Стрелки указывают на повреждённые участки монослоя клеток. Масштабный отрезок для всех фото – 50 мкм.

восстановления [15, 16]. В связи с этим работа была выполнена на диссоциированной смешанной культуре клеток астроцитов и микроглии, полученных из коры головного мозга крыс. По литературным данным, такие глиальные культуры могут содержать до 25–30% клеток микроглии [17, 18]. Используемые в наших экспериментах культуры содержали $16 \pm 1\%$ клеток микроглии. В настоящее время считается, что NO оказывает модулирующее действие на воспаление и играет ключевую роль в регуляции иммунных реакций, влияет на функциональную активность, рост и гибель многих типов иммунных и воспалительных клеток [19, 20]. В целом ряде работ для определения продукции NO в культурах микроглии и астроцитов, стимулированных ЛПС, использовали метод Грисса [21–23]. Наши результаты, полученные с помощью этого метода, показали, что обработка культур глии ЛПС вызвала достоверное увеличение содержания в среде культивирования веществ, реагирующих с реактивом Грисса. Ранее было показано, что ионы Cu^{2+} в концентрациях 25 мкМ и 50 мкМ способны стимулировать индуцированную ЛПС активацию макрофагов [6]. Мы показали, что эти же концентрации Cu^{2+} на фоне действия ЛПС достоверно увеличивали накопление в среде культивирования веществ, реагирующих с реактивом Грисса, что предположительно может указывать на увеличение продукции NO в культурах. В то же время необходимо сказать о работе, выполненной на линии микроглиальных клеток мыши BV2. Её авторами было показано, что при добавлении липополисахарида и меди (0,1 мкМ или 100 мкМ) в среду культивирования снижается продукция NO [8]. Однако авторы использовали не первичные культуры, а применяли иммортализованную линию клеток микроглии мышей BV2, в которой отсутствуют сопутствующие клетки, в том числе и астроциты, которые могут модулировать ответ микроглии. В этих условиях обнаруженное ингибирование строго специфично для Cu^{2+} [8]. Концентрация Cu^{2+} , которую использовали в этом исследовании (100 мкМ), как и в нашей работе не давала стимулирующего эффекта. Более того, при концентрации ионов меди в среде 200 мкМ содержание веществ, реагирующих с реактивом Грисса в среде культивирования, достоверно снижалось, что совпадало со снижением выживаемости клеток в культурах. Таким образом, возможно, есть связь снижения стимулирующего эффекта продукции нитрита ионами меди в интервале концентраций 100–200 мкМ с нарастающим цитотоксическим действием этих ионов.

Следует отметить, что ингибирование NOS2 отменяет индуцированную ЛПС продукцию NO в глиальных культурах грызунов [17]. Показано, что в клеточных смешанных глиальных культурах ЛПС индуцирует экспрессию NOS2 в микроглии [17, 18]. Эти результаты свидетельствуют, что при активации ЛПС в смешанных глиальных культурах грызунов клетки микроглии продуцируют NO. Однако в других исследованиях с помощью иммуноцитохимических исследований показано, что при активации астроцитов в этих

клетках может активироваться NOS2 [24, 25]. Более того, Zn^{2+} в концентрации до 125 мкМ усиливает индуцированную ЛПС продукцию NO [26]; подобный эффект мы показали для более низких концентраций Cu^{2+} в этой работе. Кроме того, астроциты могут влиять на микроглию и стимулировать пролиферацию этих клеток [27]. На астроцитоподобных клетках глиомы C6 крыс было обнаружено, что индуцируемый ЛПС NOS2-опосредованный синтез NO увеличивается при поглощении меди клетками, причём этот эффект был обусловлен гиперэкспрессией мРНК NOS-II [28]. Следует отметить, что стареющий фенотип астроцитов приводит к активации микроглии [29], а при действии метамфетамина астроциты высвобождают фактор некроза опухоли и глутамат, что также приводит к активации микроглии [30, 31].

В работе Zanier и соавт. при моделировании на мышах таких патологических состояний головного мозга как инсульт и черепно-мозговая травма показано, что через 24 ч после травмы или окклюзии происходит достоверное увеличение площади и периметра клеток микроглии/макрофагов [32]. Известно, что эти клетки играют основную роль в развитии воспалительной реакции головного мозга после повреждения. В повреждённом мозге происходит быстрая активация резидентных микроглиальных клеток, у которых происходят значительные морфологические и фенотипические изменения, что выражается в изменении их морфологии с разветвлённой на амёбовидную с увеличенной сомой и втянутыми отростками [33]. В наших экспериментах исследование популяции клеток микроглии, положительных по маркеру IBA1, показало, что в контрольных и обработанных только Cu^{2+} культурах преобладают отросчатые клетки, тогда как в культурах, обработанных ЛПС и ЛПС совместно с Cu^{2+} , большинство клеток имели амёбовидную морфологию, характерную для активированной микроглии. Под действием ЛПС происходило достоверное увеличение площади профильного поля тела и периметра клеток, что также характерно для активированной микроглии. Ионы Cu^{2+} в концентрации 25 мкМ не влияли на эти параметры. Полученные данные демонстрируют, что в концентрации 25 мкМ, которая в предыдущих экспериментах стимулировала продукцию NO на фоне ЛПС, ионы Cu^{2+} не влияли на морфологические изменения клеток микроглии, которые соответствуют воспалительному фенотипу этих клеток, как отдельно, так и в присутствии ЛПС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные демонстрируют, что в культурах, обработанных ЛПС, происходят морфологические изменения клеток микроглии, связанные с воспалительным фенотипом, на которые ионы Cu^{2+} в концентрации 25 мкМ не оказывают влияния, но стимулируют вызванную ЛПС продукцию NO в культурах глиальных клеток. Нельзя исключать, что усиление ионами меди продукции NO, вызванной ЛПС, опосредовано астроцитами.

Таким образом, для дальнейшего исследования вопроса о влиянии ионов меди на моделированное ЛПС воспаление в глиальных культурах и продукцию в них NO в перспективе интересно исследовать в смешанной культуре астроциты/микроглия влияние Cu^{2+} на активированный провоспалительный фенотип микроглия M1/M2 и астроцитов A1/A2, определение направления смещения популяции клеток, которая характеризуется продукцией провоспалительных и нейротоксичных медиаторов, в том числе и NO.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 24-25-00036, <https://rscf.ru/project/24-25-00036/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты одобрены этическим комитетом Российского центра неврологии и нейронаук (протокол № 9-4/23 от 23.11.2023 г.). Все методики выделения и посадки культур соответствуют этическим стандартам, утверждённым правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации, позиции по этике использования животных в исследованиях.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Wen Y., Zhao C., Chen J., Tian L., Wu B., Xie W., Dong T. (2024) Gandouling regulates ferroptosis and improves neuroinflammation in Wilson's disease through the LCN2/NLRP3 signaling pathway. *J. Inflamm. Res.*, **17**, 5599–5618. DOI: 10.2147/JIR.S465341
- Zhou Q., Zhang Y., Lu L., Zhang H., Zhao C., Pu Y., Yin L. (2022) Copper induces microglia-mediated neuroinflammation through ROS/NF- κ B pathway and mitophagy disorder. *Food Chem. Toxicol.*, **168**, 113369. DOI: 10.1016/j.fct.2022.113369
- Chen L.L., Fan Y.G., Zhao L.X., Zhang Q., Wang Z.Y. (2023) The metal ion hypothesis of Alzheimer's disease and the anti-neuroinflammatory effect of metal chelators. *Bioorg. Chem.*, **131**, 106301. DOI: 10.1016/j.bioorg.2022.106301
- Aloysius Dhivyaa M., Sulochana K.N., Bharathi Devi S.R. (2022) High glucose induced inflammation is inhibited by copper chelation via rescuing mitochondrial fusion protein 2 in retinal pigment epithelial cells. *Cell. Signal.*, **92**, 110244. DOI: 10.1016/j.cellsig.2022.110244
- Zhang L., Tsai I.C., Ni Z., Chen B., Zhang S., Cai L., Xu Q. (2024) Copper chelation therapy attenuates periodontitis inflammation through the cuproptosis/autophagy/lysosome axis. *Int. J. Mol. Sci.*, **25**(11), 5890. DOI: 10.3390/ijms25115890
- Guo H., Jing L., Xia C., Zhu Y., Xie Y., Ma X., Fang J., Wang Z., Zuo Z. (2024) Copper promotes LPS-induced inflammation via the NF- κ B pathway in bovine macrophages. *Biol. Trace Elem. Res.*, **202**(12), 5479–5488. DOI: 10.1007/s12011-024-04107-6
- Deng H., Zhu S., Yang H., Cui H., Guo H., Deng J., Ren Z., Geng Y., Ouyang P., Xu Z., Deng Y., Zhu Y. (2023) The dysregulation of inflammatory pathways triggered by copper exposure. *Biol. Trace Elem. Res.*, **201**(2), 539–548. DOI: 10.1007/s12011-022-03171-0
- Rossi-George A., Guo C.J., Oakes B.L., Gow A.J. (2012) Copper modulates the phenotypic response of activated BV2 microglia through the release of nitric oxide. *Nitric Oxide*, **27**(4), 201–209. DOI: 10.1016/j.niox.2012.07.002
- Cuzzocrea S., Persichini T., Dugo L., Colasanti M., Musci G. (2003) Copper induces type II nitric oxide synthase *in vivo*. *Free Radic. Biol. Med.*, **34**(10), 1253–1262. DOI: 10.1016/s0891-5849(03)00110-2
- Wei H., Frei B., Beckman J.S., Zhang W.J. (2011) Copper chelation by tetrathiomolybdate inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses *in vivo*. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **301**(3), H712–H720. DOI: 10.1152/ajpheart.01299.2010
- Craciun L., Muroy S.E., Saijo K. (2024) Role of copper during microglial inflammation. *bioRxiv* [Preprint], DOI: 10.1101/2024.09.18.613750
- Goshi N., Morgan R.K., Lein P.J., Seker E. (2020) A primary neural cell culture model to study neuron, astrocyte, and microglia interactions in neuroinflammation. *J. Neuroinflammation*, **17**(1), 155. DOI: 10.1186/s12974-020-01819-z. Erratum in: *J. Neuroinflammation*, 2022, **19**(1), 49. DOI: 10.1186/s12974-022-02391-4
- Стельмашук Е.В., Капкаева М.Р., Розанова Н.А., Александрова О.П., Генрихс Е.Е., Обмолов В.В., Новикова С.В., Исаев Н.К. (2022) Влияние индуктора нейровоспаления на компоненты нейроваскулярной единицы головного мозга *in vitro*. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*, **108**(5), 686–696. DOI: 10.31857/S0869813922050107 [Stelmashook E.V., Kapkaeva M.R., Rozanova N.A., Alexandrova O.P., Genrikhs E.E., Obmolov V.V., Novikova S.V. Isaev N.K. (2022) The *in vitro* effect of the neuroinflammation inducer on brain neurovascular unit components. *J. Evol. Biochem. Phys.*, **58**(3), 856–864. DOI: 10.1134/S002209302203019X]
- Stelmashook E.V., Alexandrova O.P., Genrikhs E.E., Novikova S.V., Salmina A.B., Isaev N.K. (2022) Effect of zinc and copper ions on cadmium-induced toxicity in rat cultured cortical neurons. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **73**, 27012. DOI: 10.1016/j.jtemb.2022.127012
- Karve I.P., Taylor J.M., Crack P.J. (2016) The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br. J. Pharmacol.*, **173**(4), 692–702. DOI: 10.1111/bph.13125
- Genrikhs E.E., Shedenkova M.O., Voronkov D.N., Isaev N.K., Stelmashook E.V. (2024) Activation of microglia and astroglia in unilateral focal traumatic brain injury in rats. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **178**(2), 196–201. DOI: 10.1007/s10517-025-06306-0
- Saura J., Angulo E., Ejarque A., Casadó V., Tusell J.M., Moratalla R., Chen J.-F., Schwarzschild M.A., Lluis C., Franco R., Serratosa J. (2005) Adenosine A2A receptor stimulation potentiates nitric oxide release by activated microglia. *J. Neurochem.*, **95**(4), 919–929. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2005.03395.x
- Saura J. (2007) Microglial cells in astroglial cultures: a cautionary note. *J. Neuroinflammation.*, **4**, 26. DOI: 10.1186/1742-2094-4-26
- Coleman J.W. (2001) Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int. Immunopharmacol.*, **1**(8), 1397–1406. DOI: 10.1016/s1567-5769(01)00086-8

20. Guzik T.J., Korbut R., Adamek-Guzik T. (2003) Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol. Pharmacol.*, **54**(4), 469–487.
21. Quintas C., Pinho D., Pereira C., Saraiva L., Gonçalves J., Queiroz G. (2014) Microglia P2Y₆ receptors mediate nitric oxide release and astrocyte apoptosis. *J. Neuroinflammation*, **11**, 141. DOI: 10.1186/s12974-014-0141-3
22. More S., Choi D.-K. (2017) Neuroprotective role of atractylenolide-I in an *in vitro* and *in vivo* model of Parkinson's disease. *Nutrients*, **9**(5), 451. DOI: 10.3390/nu9050451
23. Hwang J.H., Kumar V.R., Kang S.Y., Jung H.W., Park Y.-K. (2018) Effects of flower buds extract of *Tussilago farfara* on focal cerebral ischemia in rats and inflammatory response in bV2 microglia. *Chin. J. Integr. Med.*, **24**(11), 844–852. DOI: 10.1007/s11655-018-2936-4
24. Galea E., Feinstein D.L., Reis D.J. (1992) Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**(22), 10945–10949. DOI: 10.1073/pnas.89.22.10945
25. Hamby M.E., Hewett J.A., Hewett S.J. (2006) TGF-beta1 potentiates astrocytic nitric oxide production by expanding the population of astrocytes that express NOS-2. *Glia*, **54**(6), 566–577. DOI: 10.1002/glia.20411
26. Moriyama M., Fujitsuka S., Kawabe K., Takano K., Nakamura Y. (2018) Zinc potentiates lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in cultured primary rat astrocytes. *Neurochem. Res.*, **43**(2), 363–374. DOI: 10.1007/s11064-017-2431-5
27. Kim S., Son Y. (2021) Astrocytes stimulate microglial proliferation and M2 polarization *in vitro* through crosstalk between astrocytes and microglia. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**(16), 8800. DOI: 10.3390/ijms22168800
28. Colasanti M., Persichini T., Venturini G., Polticelli F., Musci G. (2000) Modulation of the nitric oxide pathway by copper in glial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **275**(3), 776–782. DOI: 10.1006/bbrc.2000.3396
29. Zhang W., Yang X., Liu J., Pan Y., Zhang M., Chen L. (2022) Senescent phenotype of astrocytes leads to activation of BV2 microglia and N2a neuronal cells death. *Molecules*, **27**(18), 5925. DOI: 10.3390/molecules27185925
30. Canedo T., Portugal C.C., Socodato R., Almeida T.O., Terceiro A.F., Bravo J., Silva A.I., Magalhães J.D., Guerra-Gomes S., Oliveira J.F., Sousa N., Magalhães A., Relvas J.B., Summavielle T. (2021) Astrocyte-derived TNF and glutamate critically modulate microglia activation by methamphetamine. *Neuropsychopharmacology*, **46**(13), 2358–2370. DOI: 10.1038/s41386-021-01139-7
31. Silva A.I., Socodato R., Pinto C., Terceiro A.F., Canedo T., Relvas J.B., Saraiva M., Summavielle T. (2024) IL-10 and Cdc42 modulate astrocyte-mediated microglia activation in methamphetamine-induced neuroinflammation. *Glia*, **72**(8), 1501–1517. DOI: 10.1002/glia.24542
32. Zanier E.R., Fumagalli S., Perego C., Pischiutta F., de Simoni M.G. (2015) Shape descriptors of the “never resting” microglia in three different acute brain injury models in mice. *Intensive Care Med. Exp.*, **3**(1), 39. DOI: 10.1186/s40635-015-0039-0
33. Hanisch U.-K., Kettenmann H. (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.*, **10**(11), 1387–1394. DOI: 10.1038/nn1997

Поступила в редакцию: 27.06.2025.
После доработки: 26.10.2025.
Принята к печати: 14.11.2025.

THE EFFECT OF COPPER IONS ON CULTURED RAT GLIAL CELLS OF THE CEREBRAL CORTEX UNDER THE ACTION OF LIPOPOLYSACCHARIDE

E.V. Stelmashook¹, E.E. Genrikhs¹, O.P. Alexandrova¹, A.E. Lapieva^{1,2}, M.R. Kapkaeva¹, N.K. Isaev^{1,2,*}

¹Russian Center of Neurology and Neurosciences, 80 Volokolamskoe Shosse, Moscow, 125367 Russia

²M.V. Lomonosov Moscow State University,

1 Leninskiye Gory, Moscow, 119234 Russia; *e-mail: nisaev61@mail.ru

Copper ions (Cu²⁺) at concentrations of 25–50 μM stimulate lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) production in glial cell cultures derived from rat cerebral cortex and containing both astrocytes and microglia. Addition of a higher Cu²⁺ concentration (100 μM) during LPS stimulation did not significantly increase NO in the incubation medium, while 200 μM Cu²⁺ decreased this parameter compared to LPS. Cu²⁺ ions at these concentrations decreased viability of cultured cells. Apparently, the decrease in cell viability is not associated with nitrite accumulation, because the addition of even 100 μM sodium nitrite to the culture medium did not reduce cell viability or affect the cytotoxicity of Cu²⁺. The study of microglial cells (using the IBA1 marker) revealed that in LPS-treated cultures, microglia had a predominantly flattened amoeboid morphology, characteristic of activated microglia. The LPS treatment also increased the cell body profile area and perimeter. At a concentration of 25 μM, Cu²⁺ ions did not affect the morphological changes in microglia associated with the inflammatory phenotype. It is possible that the copper-induced increase in LPS-induced NO production is mediated by astrocytes.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Keywords: inflammation; Cu²⁺; astrocytes; microglia; nitric oxide

Funding. The study as supported by a grant from the Russian Science Foundation no. 24-25-00036, <https://rscf.ru/project/24-25-00036/>

Received: 27.06.2025; revised: 26.10.2025; accepted: 14.11.2025.