

ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ АЦИДОЗ, ЦИСТЕИН И ГЛУТАТИОН УСИЛИВАЮТ ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ИОНОВ МЕДИ В КУЛЬТУРАХ ЗЕРНИСТЫХ НЕЙРОНОВ МОЗЖЕЧКА

Е.В.Стельмашук¹, Т.Ю.Будагова^{1,2}, Е.Е.Генрихс¹, Н.К.Исаев^{1,2}

¹ФГБНУ Научный центр неврологии, Москва, РФ; ²МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, РФ

Изучали влияние внеклеточного ацидоза, цистеина, глутатиона и ионов железа (Fe^{3+}) на нейротоксическое действие ионов меди *in vitro*. При кислотном pH 6.8 среды культивирования токсическое действие ионов меди (Cu^{2+}) на культивируемые нейроны достоверно возрастает по сравнению с нейтральным pH 7.3. Выживаемость нейронов в присутствии 25 мкМ Cu^{2+} в среде культивирования составляла 89 ± 2 и $63 \pm 4\%$ при pH 7.3 и 6.8 соответственно. Однако если в среде культивирования присутствовал глутатион или цистеин (1 мМ), то даже 0.5 мкМ Cu^{2+} вызывали 100% гибель культивируемых нейронов, а присутствие Fe^{3+} (10-50 мкМ) не оказывало влияния на токсическое действие Cu^{2+} . В целом цитотоксичность ионов меди может повышаться в условиях внешнего ацидоза, в присутствии глутатиона или цистеина.

Ключевые слова: выживаемость; нейроны; ионы меди; ацидоз; pH

Медь является одним из наиболее распространенных металлов с переменной валентностью в организме. Ионы этого металла участвуют в кислородном обмене, антиоксидантной защите, образовании коллагена, поддержании целостности кровеносных сосудов, а также в гомеостазе железа и синтезе нейромедиаторов. В настоящее время известно, что Cu^{2+} входит в состав ряда белков, в том числе и в состав цитохром-*c*-оксидазы (комплекс IV) — фермента, катализирующего конечный этап перехода электронов к кислороду в процессе окислительного фосфорилирования в митохондриях [1]. Кроме того, этот металл содержится в молекуле такого важного антиоксиданта, как СОД (Cu/Zn-СОД, или СОД1) и входит в состав церулоплазмينا, белка плазмы крови, участвующего в ряде прооксидантных и антиоксидантных реакций [2,3]. Медь является компонентом дофамин-бета-мо-

нооксигеназы и пептидилглицин-альфа-гидроксилирующей монооксигеназы — важных ферментов, катализирующих превращение дофамина в норадреналин [4].

Поддержание гомеостаза Cu^{2+} в головном мозге очень важно, и отклонения от него в ЦНС вовлечено в патогенез многих нейродегенеративных заболеваний и патологических состояний головного мозга, таких как болезни Вильсона—Коновалова и Альцгеймера [5-7].

Болезнь Вильсона—Коновалова — наследственное заболевание, затрагивающее ЦНС и внутренние органы. Ведущим звеном патогенеза является хроническая эндогенная интоксикация медью, поскольку в ходе развития заболевания происходит нарушение обмена меди, из-за чего избыточные её количества накапливаются в печени, головном мозге, роговице и других тканях и органах, приводя к нарушению их функций. Cu^{2+} -зависимая клеточная смерть (купроптоз) [8,9] может играть важную роль в патогенезе болезни Вильсона—Коновалова.

Факторы, способные влиять на нейротоксичность меди, в настоящее время недостаточно изучены. Известно, что внеклеточный pH может влиять на клеточную гибель, вызванную двухвалентными металлами [10], а одной из главных точек связывания ионов меди в клетке является глутатион. Кроме того, при болезни Вильсона—Коновалова в головном мозге накапливаются не только ионы меди, но и железа.

Цель данной работы — исследовать влияние внеклеточного ацидоза, цистеина, глутатиона и ионов железа на нейротоксическое действие ионов меди *in vitro*.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах использовали 7-8-суточные культуры зернистых нейронов мозжечка 7-8-дневных крыс, полученные методом ферментно-механической диссоциации: 15 мин при 36.5°C в растворе трипсина (0.05%) и ЭДТА (0.02%) на фосфатном буфере (Gibco Life Technologies), затем ступенчатое пипетирование в среде [10]. Экспериментальные протоколы одобрены этическим комитетом ФГБНУ НЦН (Протокол № 9-4/23 от 23.11.2023 г.).

Культивирование проводили в 96-луночных пластиковых планшетах (Eppendorf). Питательная среда содержала 90% минимальной среды Игла на солях Эрла (Gibco), 10% ЭТС (HyClone), 2 мМ глутамин (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 клеток, создавая конечную плотность $3-5 \times 10^3$ клеток/мм². Культуры развивались в CO₂-инкубаторе при 36.5°C и относительной влажности 98%.

Эксперименты по выживаемости культивированных зернистых нейронов проводили в описанной выше среде, в которую в зависимости от эксперимента на 24 ч добавляли CuCl₂ (до конечной концентрации 100-0.5 мкМ; Sigma-Aldrich). Остальные добавки — глутатион 1 мМ, цистеин 1 мМ, FeCl₃ (10-50 мкМ) — вносили в среду культивирования одновременно с CuCl₂. Ацидоз в культурах индуцировали их переносом в среду с pH 6.8, где сыворотка была заменена на 1% добавки для бессывороточных сред B27 минус антиоксиданты (B27-AO, Invitrogen). После эксперимента культуры фиксировали в смеси этанол:формальдегид:уксусная кислота (7:2:1) и окрашивали трипановым синим. Процент выживших нейронов оценивали подсчетом морфологически интактных культивированных зернистых нейронов в пяти последовательных

полях зрения при увеличении объектива 40×. Выживаемость выражали в процентах относительно контроля.

Полученные результаты обрабатывали в программе Statistica 13.3 (StatSoft, Inc.), используя однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с пост-тестом Ньюмана—Кейлса. Данные представляли в виде среднего значения и ошибки среднего ($M \pm SEM$). Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Достоверное снижение выживаемости культивированных зернистых нейронов мозжечка начинается при концентрации Cu²⁺ в среде культивирования 25 мкМ. За 24 ч при такой концентрации Cu²⁺ выживаемость нейронов снижалась до $89 \pm 2\%$. Более высокие концентрации — 50 и 100 мкМ — снижали выживаемость этих клеток до 65 ± 4 и $15 \pm 2\%$ соответственно (рис. 1). При кислом значении pH среды культивирования (pH 6.8) токсическое действие меди на культивированные нейроны достоверно возрастает по сравнению с таковым при pH 7.3. При pH 6.8 повреждающее действие Cu²⁺ проявляется уже в концентрации 10 мкМ, а выживаемость нейронов снижается до $81 \pm 3\%$, тогда как при pH 7.3 составляет $95 \pm 2\%$. Выживаемость в присутствии 25 мкМ Cu²⁺ в среде культивирования составляла 89 ± 2 и $63 \pm 4\%$ при pH 7.3 и 6.8 соответственно. В настоящее время известно, что поступление меди в клетки опосредовано переносчиком меди 1 (Ctr1), а также независимыми от Ctr1 механизмами, которые могут включать переносчик двухвалентного металла 1 (DMT1)

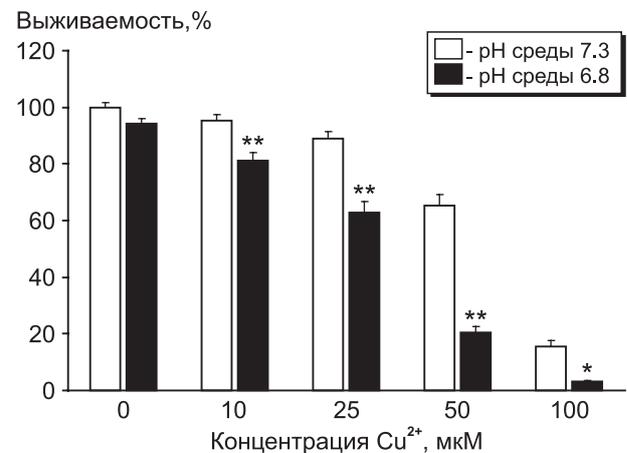


Рис. 1. Внеклеточный ацидоз увеличивает токсическое действие Cu²⁺ на культивированные нейроны.

* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ по сравнению с pH 7.3.

или представителей семейства переносчиков металлов ZIP [1,8]. При этом экто-куприредуктаза и/или внеклеточный аскорбат обеспечат восстановленные формы меди до Cu^+ для поглощения клетками [11]. Более того, показано, что снижение внеклеточного pH вызывает уве-

личение аккумуляции меди клетками [12], что может отражать модуляцию активности переносчика меди протонами [13]. Все эти данные способны объяснить показанное нами усиление токсического действия меди при снижении внеклеточного pH.

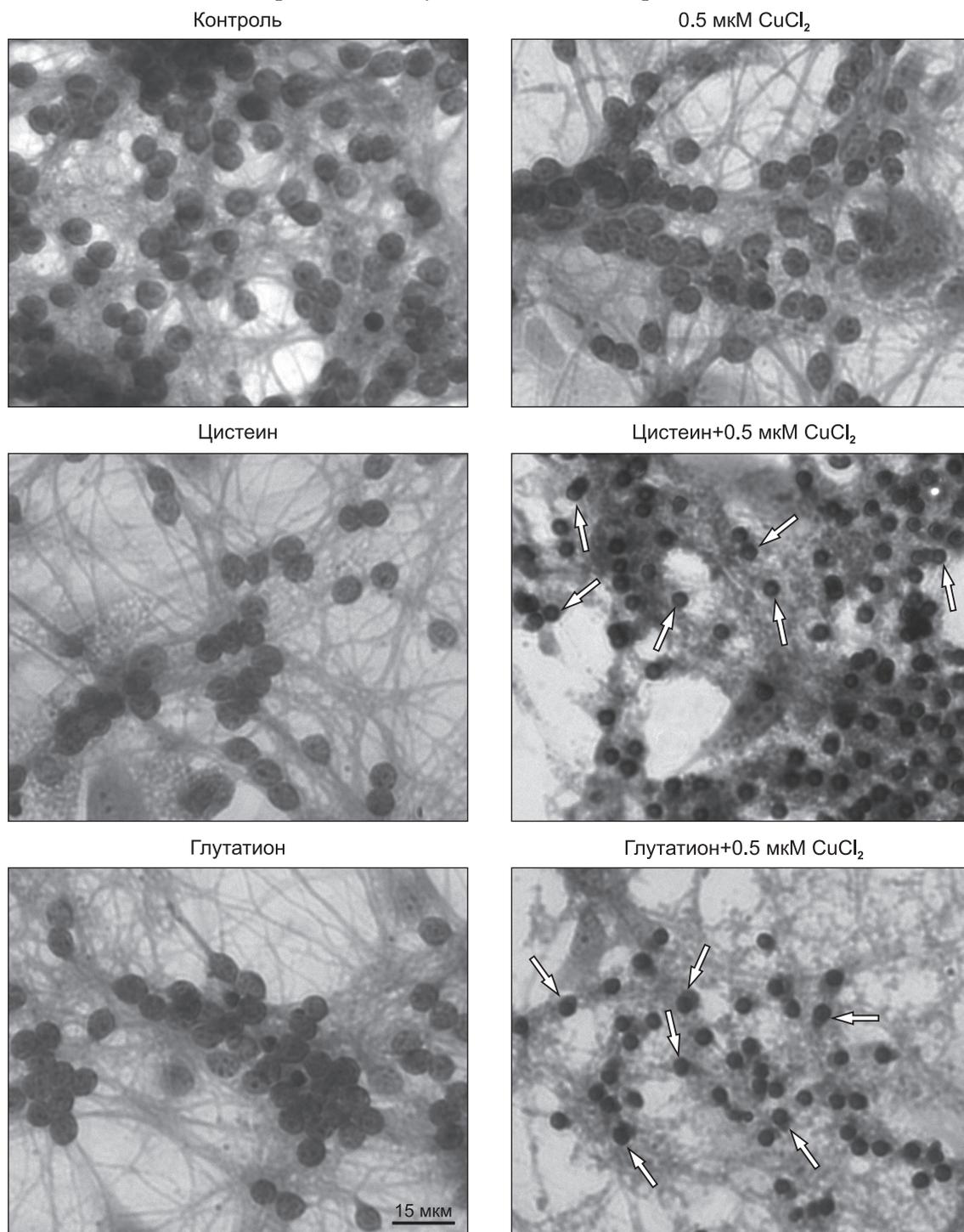


Рис. 2. Глутатион и цистеин усиливают нейроцитотоксическое действие ионов меди. Фиксированные культуры, окрашенные трипановым синим. Обработка веществами 24 ч. Пикнотические ядра погибших нейронов указаны стрелками.

Медь, поступившая в цитоплазму клеток, связывается с глутатионом и металлотионеинами, которые являются главными участниками депонирования этого иона. Глутатион присутствует в цитоплазме всех типов клеток в миллимолярных концентрациях и может непосредственно поглощать свободные радикалы или выступать в качестве субстрата для глутатион-S-трансферазы и глутатионпероксидазы во время детоксикации пероксида водорода, гидроперекисей липидов и электрофильных соединений [14]. Однако неожиданно оказалось, что в присутствии 1 мМ глутатиона даже наномолярные концентрации меди вызывают 100% гибель культивируемых нейронов (рис. 2). Глутатион является трипептидом, в состав которого входят три аминокислоты: глицин, глутамин и цистеин. В составе последней содержится тиоловая группа. Поэтому усиление токсичности меди в присутствии глутатиона может быть связано с тиоловой группой цистеина, так как ранее мы показали, что антиоксидант ацетилцистеин усиливает токсическое действие ионов меди [15]. Для проверки этой гипотезы мы оценили токсическое действие меди на фоне 1 мМ цистеина. Медь на фоне цистеина оказалась токсичной в наномолярных концентрациях — 0.5 мкМ меди вызывали 100% гибель культивируемых нейронов (рис. 2), что может происходить в результате окислительного стресса, так как при взаимодействии тиоловых групп аминокислот с медью может продуцироваться супероксид [16,17]. Следует отметить, что окислительный стресс задействован в патогенезе болезни Вильсона—Коновалова [18]. Более того, внеклеточное микроокружение головного мозга содержит множество биологических окислительно-восстановительных агентов, включая аскорбат, глутатион, цистеин и гомоцистеин. Во время ишемии/реперфузии, старения или неврологических заболеваний внеклеточные уровни восстановителей могут резко повышаться из-за нарушения регуляции гомеостаза [19].

Интересно, что при болезни Вильсона—Коновалова в головном мозге накапливаются не только ионы меди, но и железа [5,20]. Мы также исследовали влияние ионов железа на нейротоксическое действие ионов меди. Однако в выполненных нами экспериментах влияния Fe^{3+} (10-50 мкМ) на токсическое действие Cu^{2+} не обнаружено.

В целом полученные результаты свидетельствуют, что цитотоксичность ионов меди может повышаться в условиях внешнего ацидоза, в присутствии глутатиона или цистеина.

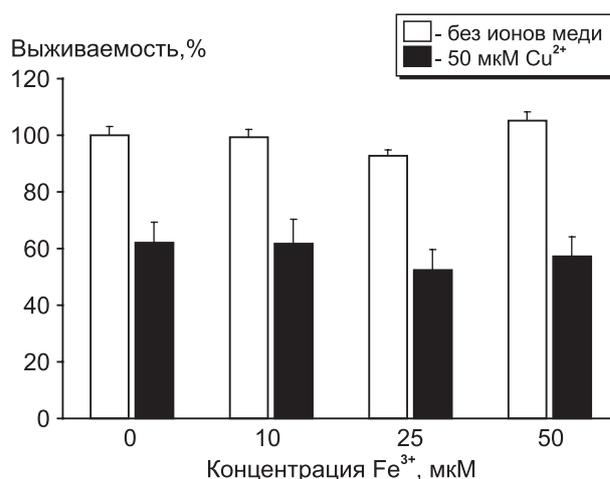


Рис. 3. Выживаемость нейронов при токсическом воздействии Fe^{3+} и Cu^{2+} на культуру нейронов.

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Scheiber I.F., Mercer J.F., Dringen R. Metabolism and functions of copper in brain // Prog. Neurobiol. 2014. Vol. 116. P. 33-57. doi: 10.1016/j.pneurobio.2014.01.002
2. Stelmashook E.V., Isaev N.K., Genrikhs E.E., Amelkina G.A., Khaspekov L.G., Skrebitsky V.G., Illarioshkin S.N. Role of zinc and copper ions in the pathogenetic mechanisms of Alzheimer's and Parkinson's diseases // Biochemistry (Mosc). 2014. Vol. 79, N 5. P. 391-396. doi: 10.1134/S0006297914050022
3. Gromadzka G., Tarnaacka B., Flaga A., Adamczyk A. Copper dyshomeostasis in neurodegenerative diseases—therapeutic implications // Int. J. Mol. Sci. 2020. Vol. 21, N 23. ID 9259. doi: 10.3390/ijms21239259
4. Klinman J.P. The copper-enzyme family of dopamine beta-monooxygenase and peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase: resolving the chemical pathway for substrate hydroxylation // J. Biol. Chem. 2006. Vol. 281, N 6. P. 3013-3016. doi: 10.1074/jbc.R500011200
5. Сальков В.Н., Худоевков Р.М., Сухоруков В.С. Патогенетические аспекты повреждений головного мозга при болезни Вильсона—Коновалова // Рос. вестник перинатол. и педиатр. 2020. Т. 65, № 6. С. 22-28. doi: 10.21508/1027-4065-2020-65-6-22-28
6. Isaev N.K., Stelmashook E.V., Genrikhs E.E. Role of zinc and copper ions in the pathogenetic mechanisms of traumatic brain injury and Alzheimer's disease // Rev.

- Neurosci. 2020. Vol. 31, N 3. P. 233-243. doi: 10.1515/revneuro-2019-0052
7. Гулевская Т.С., Чайковская Р.П., Ануфриев П.Л. Патоморфология головного мозга при гепатолентикулярной дегенерации (болезни Вильсона—Коновалова) // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2020. Т. 14, № 2. С. 50-61. doi: 10.25692/ACEN.2020.2.7
 8. Chen L., Min J., Wang F. Copper homeostasis and cuproptosis in health and disease // *Signal Transduct. Target. Ther.* 2022. Vol. 7, N 1. ID 378. doi: 10.1038/s41392-022-01229-y
 9. Feng D., Zhao Y., Li W., Li X., Wan J., Wang F. Copper neurotoxicity: Induction of cognitive dysfunction: A review // *Medicine (Baltimore)*. 2023. Vol. 102, N 48. ID e36375. doi: 10.1097/MD.00000000000036375
 10. Shedenkova M.O., Stelmashook E.V., Isaev N.K. Toxic effect of zinc ions is accompanied by acidification of the cytoplasm in cultured rat cerebellar granule neurons // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2022. Vol. 173, N 4. P. 539-543. doi: 10.1007/s10517-022-05578-0
 11. Dringen R., Scheiber I.F., Mercer J.F. Copper metabolism of astrocytes // *Front. Aging Neurosci.* 2013. Vol. 5. P. 9. doi: 10.3389/fnagi.2013.00009
 12. Scheiber I.F., Mercer J.F., Dringen R. Copper accumulation by cultured astrocytes // *Neurochem. Int.* 2010. Vol. 56, N 3. P. 451-460. doi: 10.1016/j.neuint.2009.12.002
 13. Lee J., Peña M.M., Nose Y., Thiele D.J. Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1 // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, N 6. P. 4380-4387. doi: 10.1074/jbc.M104728200
 14. Masella R., Di Benedetto R., Vari R., Filesi C., Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes // *J. Nutr. Biochem.* 2005. Vol. 16, N 10. P. 577-586. doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.05.013.
 15. Stelmashook E.V., Genrikhs E.E., Kapkaeva M.R., Zelenova E.A., Isaev N.K. 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. Vol. 82, N 10. P. 1176-1182. doi: 10.1134/S0006297917100108
 16. White A.R., Huang X., Jobling M.F., Barrow C.J., Beyreuther K., Masters C.L., Bush A.I., Cappai R. Homocysteine potentiates copper- and amyloid beta peptide-mediated toxicity in primary neuronal cultures: possible risk factors in the Alzheimer's-type neurodegenerative pathways // *J. Neurochem.* 2001. Vol. 76, N 5. P. 1509-1520. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00178.x
 17. Злобин И.Е. Лабильный пул ионов меди как необходимый компонент системы ее клеточного гомеостатирования // *Вестник Томского гос. ун-та. Биология*. 2015. № 3. С. 67-83.
 18. Zhou X.X., Xiao X., Qin H., Chen D., Wu C. Study on different pathogenic factors in different disease stages of patients with Wilson disease // *Neurol. Sci.* 2021. Vol. 42, N 9:3749-3756. doi: 10.1007/s10072-020-04973-7
 19. White A.R., Barnham K.J., Huang X., Voltakis I., Beyreuther K., Masters C.L., Cherny R.A., Bush A.I., Cappai R. Iron inhibits neurotoxicity induced by trace copper and biological reductants // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2004. Vol. 9, N 3. P. 269-280. doi: 10.1007/s00775-004-0521-8
 20. Dusek P., Hofer T., Alexander J., Roos P.M., Aaseth J.O. Cerebral iron deposition in neurodegeneration // *Biomolecules*. 2022. Vol. 12, N 5. ID 714. doi: 10.3390/biom12050714

Получено 01.04.24

