

МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДИНАМИКА И МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ПЕРЕСТРОЙКА В КСЕНОТРАНСПЛАНТАТЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРОДУЦИРОВАННЫХ НЕЙРОНАЛЬНЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. Д. Н. Воронков^{1,*}, А. В. Егорова^{1,2}, Е. Н. Федорова^{1,2}, А. В. Ставровская¹, О. С. Лебедева³, А. С. Ольшанский¹, В. В. Подопригора², В. С. Сухоруков^{1,2}

¹ФГБНУ НЦ неврологии, Москва, Россия

²ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

³ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия

*e-mail: voronkov@neurology.ru

Поступила в редакцию 04.04.2024 г.

После доработки 18.04.2024 г.

Принята к публикации 19.04.2024 г.

Известно, что регуляция митохондриальных функций влияет на дифференцировку и созревание нейронов. Изучение этих процессов имеет как фундаментальное, так и практическое значение для регенеративной нейробиологии. Цель исследования: охарактеризовать изменения деления митохондрий и их связь с активацией окислительного фосфорилирования (метаболического переключения) при созревании и ПСК-продуцированных нейрональных предшественников при введении в стриатум крыс. Крысам Вистар ($n = 15$) в хвостатое ядро односторонне вводили нейрональные предшественники, полученные из иПСК человека. С помощью иммуноокрашивания оценивали изменения локализации и экспрессии маркеров дифференцировки нейронов: нестина, NeuN, нейрональной енолазы, а также белка наружной мембраны митохондрий, АТФ-синтазы и белка деления митохондрий Dgr1. Измерения проводились на клетках трансплантата через 2 недели, 3 и 6 месяцев после операции. Созревание трансплантата было связано с колебаниями морфометрических параметров митохондриальной фракции и уровня Dgr1. Усиление деления митохондрий выявляли через 3 месяца после трансплантации, что предшествовало увеличению содержания АТФ-синтазы к 6 месяцу и переключению трансплантированных клеток на окислительное фосфорилирование. Проведенный эксперимент показал связь митохондриальной динамики с изменениями метаболического профиля и созреванием трансплантированных нейронов. Регуляция митохондриальной динамики может иметь значение для разработки методов улучшения интеграции трансплантированных нейронов в структуры мозга.

Ключевые слова: нейрогенез, трансплантация, индуцированные плюрипотентные клетки человека, митохондриальная динамика, Dgr1, окислительное фосфорилирование

DOI: 10.31857/S0044452924030107, **EDN:** YWSURR

ВВЕДЕНИЕ

Развитие методов репрограммирования соматических клеток и их направленной дифференцировки в клетки с заданными свойствами, помимо очевидного расширения перспектив в восстановлении поврежденного мозга, позволило сформировать методическую основу для изучения разных аспектов развития, регенерации и межклеточных взаимодействий в центральной нервной системе [1, 2]. Химерные биологические системы, полученные в результате гетеротрансплантации нейрональных предшественников, могут рассматриваться как своеобразная модель нейрогенной ниши и применяться, в том числе для изучения дифференци-

ровки нейронов [3], используя возможности отслеживания развития трансплантированных клеток, например, благодаря применению видоспецифичных антител.

Нейрональные прогениторные клетки могут замещать поврежденные нейроны и стимулировать компенсаторные процессы в мозге реципиента за счет их способности к дифференцировке, миграции, интеграции и экспрессии специфических ростовых и трофических факторов [4]. Расшифровка этих механизмов открывает пути для управления репаративными процессами в центральной нервной системе. Вместе с тем дифференцировка клеток трансплантата и его интеграция в структуры мозга зависит от многих факторов. Например, в недав-

них исследованиях показано, что решающее значение для пролиферации и дифференцировки нейрональных предшественников имеет активность митохондрий [5]. Известно, что нейральные стволовые клетки (NSC) получают энергию путем гликолиза [6], что сочетается с их низкими энергетическими потребностями и ограничивает зависимость от окислительного фосфорилирования (ОХРНОС) образование активных форм кислорода, индуцирующее повреждение клеток. Наряду с гликолитическим профилем, NSC характеризуются незрелыми, удлинёнными («тубулярными») митохондриями со слабо развитыми кристами и низким числом копий митохондриальной ДНК [7]. Гликолиз для NSC не только имеет адаптационное значение ввиду особенностей их микроокружения, но и является ключевым фактором, поддерживающим мультипотентность [8]. В процессе дифференцировки NSC в связи с возрастающими энергетическими потребностями возрастает значение ОХРНОС [9], что сопровождается перестройкой морфологии митохондрий. Этот метаболический переход рассматривают как ключевое событие, определяющее судьбу дифференцирующихся нейрональных предшественников. Исследования *in vivo* [10, 11], показали, что состояние нейрогенной ниши в зрелом гиппокампе зависит от функционирования митохондриальных комплексов на уровне прогениторных клеток. Дифференцировка нейронов сопровождается увеличением уровня Drp1 (ГТФ-аза DNMI1L — динамин-подобный белок), осуществляющего деление митохондрий, причем незрелые нейроны высоко чувствительны как к ингибированию, так и к усилению экспрессии Drp1 [12]. Кроме ведущей функции Drp1 в ремоделировании митохондриальной сети, предполагается его участие в синаптической передаче [13].

Вместе с тем большинство работ, демонстрирующих роль митохондриальной динамики в дифференцировке нейронов, выполнены на культурах клеток, а особенности изменений митохондрий в трансплантированных нейронах изучены недостаточно.

Цель исследования: охарактеризовать связь митохондриальной динамики и метаболического переключения в дифференцирующихся нейронах в долгосрочном эксперименте при трансплантации нейрональных предшественников, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (иПСК).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Использовали 15 крыс Вистар (самцы, 3,5 месяца, 300–350 г), полученных из питомника ФГБУН НЦБМТ ФМБА “Столбовая”. Животных содержали в виварии при неограниченном доступе к пище и воде и 12-часовом световом режиме. Работа была выполнена в рамках экспери-

ментов [14] по трансплантации полученных из иПСК человека нейрональных предшественников, коммитированных в мезенцефальные дофаминергические нейроны.

Получение клеточных культур. Клетки для трансплантации были дифференцированы из иПСК, полученных из фибробластов кожи здорового донора. Использованная линия иПСК IPSRG4S ранее была подробно охарактеризована [15]. Среда для нейрональной дифференцировки иПСК (14 дней, смена среды через день): DMEM/F12 (Gibco, США), 2% заменителя сыворотки (Gibco, США), 1% добавки N2 (Gibco, США), 2-мМ глутамин, 50 ед/мл пенициллин-стрептомицин (PanEco, Россия), 10-мкМ SB431542 (Stemgent, США), 2-мкМ дорсоморфин (Stemgent, США), 0,5-мкМ LDN-193189 (Miltenyi biotec, США). Среда для культивирования нейрональных предшественников (10 дней, смена среды через день): DMEM/F12 1:1 Neurobasal (Gibco, США), 2% B27-добавка (Gibco, США), 2-мМ глутамин, 50 ед/мл пенициллин-стрептомицин, 100 нг/мл Shh (PeproTech, США), 100 нг/мл FGF8 (PeproTech, США) и 2 мкМ пурморфина (Stemgent, США). Протоколы клеточной дифференцировки были подробно описаны нами ранее [16, 17].

Хирургические процедуры. Операции проводили при помощи стереотаксического аппарата (Stoelting Co., США). Для анестезии применяли золетил-100 в дозе 0,3 мг/кг и ксиланит в дозе 3 мг/кг, в/м, для премедикации — атропин в дозе 0,04 мг/кг, п/к за 10–15 мин до введения ксиланита. В черную субстанцию справа (координаты по атласу Paxinos: AP = -4,8; L = 1,9; V = 8,0) вводили 12 мкг нейротоксина 6-гидроксидофамина в 3 мкл 0,05% раствора аскорбиновой кислоты. Слева вводили тот же объем растворителя. Через 25 дней животным на стороне разрушения черной субстанции в хвостатое ядро (AP = 1,5; L = 2,2; V = 4,5) вводили суспензию нейрональных предшественников, содержащую 3×10^5 клеток в 10 мкл 0,9% NaCl, слева вводили растворитель в том же объеме. За день до трансплантации и на протяжении эксперимента животные ежедневно получали циклоспорин в дозе 12 мг/кг.

Иммуногистохимия. Животных выводили из эксперимента через 2 недели ($n = 5$), 3 месяца ($n = 5$) и 6 месяцев ($n = 5$) после введения клеток. Крыс декапитировали гильотиной, мозг фиксировали в 10% формалине. Серийные криостатные срезы (10 мкм), нагревали в цитратном буфере при pH = 6,0 (в пароварке, 15 мин), промывали и инкубировали с первичными антителами 18 ч при комнатной температуре. В настоящем исследовании использовали антитела к ядерному белку нейронов (NeuN, Abcam, № ab104224) или нейронально-

му маркеру PGP9.5 (Abcam, № ab108986), тирозингидроксилазе (TH, Sigma, T8700) и Drp1 (Abcam, клон OT14F6, № ab156951), дополнительно выявляли сукцинатдегидрогеназу (SDHB, Abcam, клон EPR10880, № ab175225), в качестве митохондриального маркера.

Видоспецифичные антитела к белкам человека (не показавшие перекрестной иммунореактивности с белками крысы) использовали для выявления следующих белков: нестина, маркера нейрональных (Nes, Abcam, клон 2C1.3A11, № ab18102), АТФ-синтазы (АТP5A, Invitrogen, клон 5G11, № MA5-38294), белка наружной мембраны митохондрий (MTC02, Invitrogen, № MA5-12014), нейронспецифической енолазы NSE (Leica, клон 22C9). Помимо этого, использовали антитела к ядерному антигену человека (HNA, Novus antibodies, № NBP2-34342). Тел нейронов реципиента при контрольном окрашивании на NeuN и HNA в зоне трансплантации не выявили.

В качестве системы детекции использовали вторичные антитела козы или осла против IgG кролика или мыши, конъюгированные с флуорохромами Atto 488 (Invitrogen, A11008) или Atto 555 (Invitrogen, A31570), для выявления NSE — пероксидазную систему детекции BioSite (KDB-10007). Срезы заключали в среду Fluoroshield (Abcam, ab104139), содержащую DAPI.

Морфометрия. Документирование и анализ препаратов проводили, используя микроскопы Nikon Eclipse Ni-u и Nikon SMZ-18 (Япония), с программным обеспечением NIS Elements BR и ImageJ. Клетки и их ядра на изображении выделяли при помощи графического планшета, выбирая клетки с сохранными ядрами в центральной зоне трансплантата, без взаимного наложения. При выборе клеток для анализа и определении границ сомы нейронов ориентировались на локализацию нейрональных маркеров. Оценивали интенсивность флуоресценции в цитоплазме клеток, при увеличении объектива $\times 20$, не менее чем на 5 срезах (от одного животного), взятых в области трансплантата с шагом не менее 50 мкм; для измерений было взято не менее 250 клеток с животного. Интенсивность окрашивания для иммунопероксидазных препаратов (NSE) определяли как разность максимального значения яркости 8-битного изображения (255) и средней яркости пикселей в выделенной области, чтобы меньшее значение соответствовало более светлым объектам.

Для оценки изменений морфологии митохондриальной сети руководствовались ранее предложенным протоколом [18]. Получали серию снимков из 12 фокальных планов, используя иммерсионный объектив $\times 100$, контраст изображений повышали вычитанием медианного фильтра. На изображениях, полученных методом проекции максимальной интенсивности, выделяли методом адаптивной сегментации MTC02-позитивные объекты — ми-

тохондриальные кластеры, цепочки митохондрий, митохондриальные филаменты и оценивали длину срединной оси объектов (обозначено на графике как “длина митохондрий”).

Данные полученные от каждого животного усредняли, для сравнения групп применяли дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным тестом Тьюки, различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Статистическую обработку проводили в программе GraphPad Prism 7.0, данные представлены в виде $M \pm SD$ (M — среднее, SD — среднееквадратичное отклонение).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Трансплантированные клетки располагались по ходу иглы, область трансплантации имела отчетливые границы, а миграции нейронов за пределы трансплантата не выявили. Со временем плотность клеток в трансплантате снижалась, а их размеры увеличивались. На 3-й и 6-й месяц после операции в трансплантате выявляли нейроны человека, содержащие тирозингидроксилазу — маркерный белок дофаминовых нейронов (рис. 1а). Двойное выявление митохондриальных белков MTC02 (маркер наружной мембраны митохондрий) и SDHB (маркер внутренней мембраны митохондрий) позволило выявить в клетках трансплантата скопления митохондрий. Двойное окрашивание на Drp1 и SDHB продемонстрировало ассоциацию Drp1 и митохондриальной сети (рис. 1).

По мере созревания трансплантата, начиная со второй недели, увеличивалась интенсивность флуоресценции при выявлении NeuN (рис. 2, 4), что согласуется со сроками увеличения экспрессии NSE (рис. 2, 4), и ранее показанном нами в сходном эксперименте [14] снижением экспрессии даблкортина (маркера нейрональных предшественников), развитием отростков и экспрессией синаптофизина в трансплантированных нейронах. При этом, выявление нестина (Nes) — маркера нейрональных предшественников, демонстрировало обратную динамику. Если ко второй неделе в области введения обнаруживали многочисленные Nes-позитивные клетки, то к шестому месяцу интенсивность флуоресценции при выявлении нестина в трансплантате было резко снижено (ANOVA, $F_{(2,12)} = 28.78$; $p < 0.001$).

Результаты выявления Nes и NeuN свидетельствуют не только о росте количества дифференцированных нейронов со временем, но и о завершении созревания трансплантата, когда популяция незрелых Nes-позитивных клеток практически отсутствовала.

К шести месяцам интенсивность флуоресценции при выявлении АТP5A в трансплантирован-

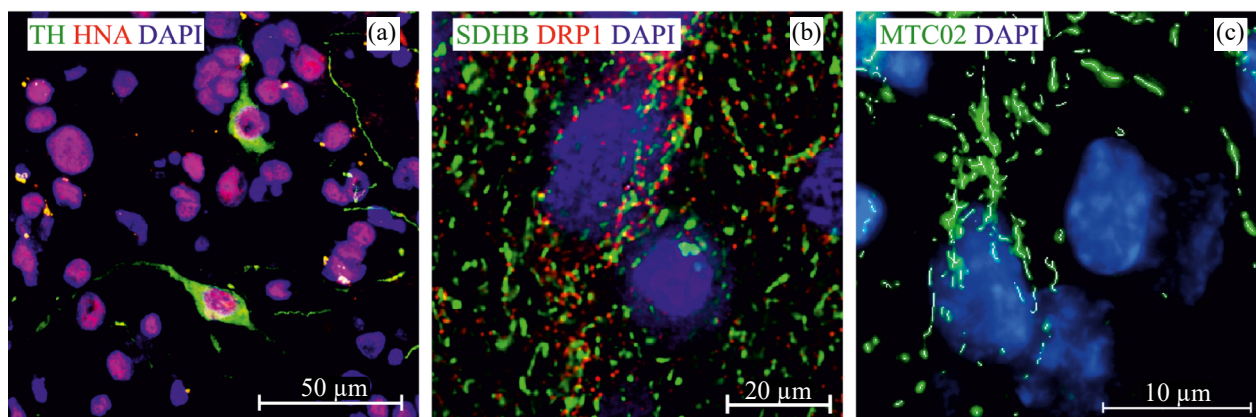


Рис. 1. Выявление тирозингидроксилазы и митохондриальных маркеров в трансплантате: (a) — выявление тирозингидроксилазы (TH, зеленым) и ядерного антигена (HNA, красным), 6 месяц после трансплантации; (b) — ассоциация митохондриальной сети и Drp1 (SDHB — зеленым, Drp1 — красным), 6 месяц после трансплантации, изображение получено методом деконволюции из 24 фокальных планов; (c) — выявление наружной мембраны митохондрий (MTC02, зеленым) и результат работы алгоритма выделения срединной оси объектов (белым), 2 неделя после трансплантации, изображение получено с помощью медианного фильтра из 12 фокальных планов.

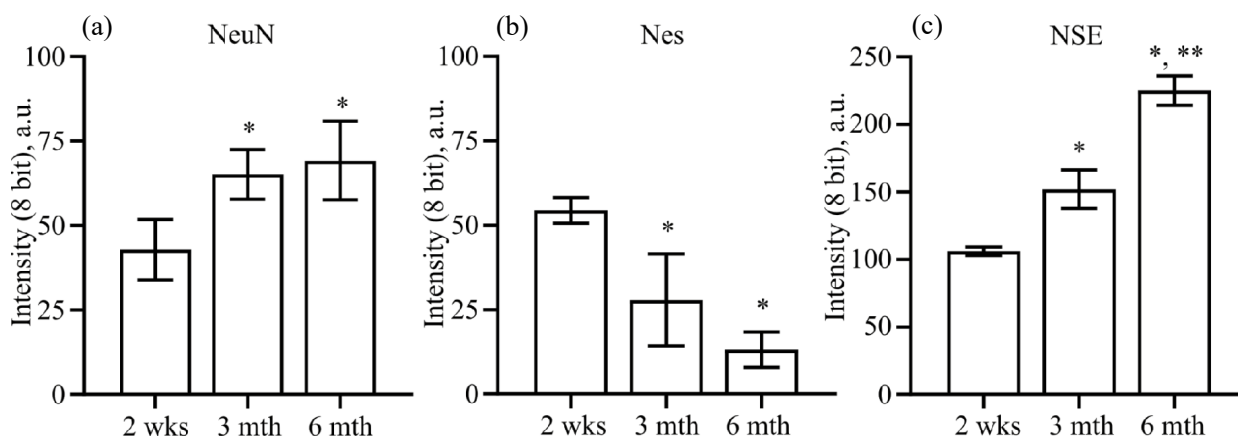


Рис. 2. Динамика выявления маркерных белков дифференцировки нейронов в трансплантате: (a) — интенсивность флуоресценции (8 бит, градации яркости) при выявлении ядерного белка нейронов (NeuN); (b) — интенсивность флуоресценции (8 бит, градации яркости) при выявлении нестина (Nes); (c) — интенсивность иммунопероксидазного окрашивания (8 бит, градации яркости) при выявлении нейрональной енолазы (NSE). wks — недели, mth — месяцы * — $p < 0.05$ по сравнению с 2 неделями после трансплантации, ** — $p < 0.05$ по сравнению с 3 месяцами после трансплантации. ANOVA, апостериорный тест Тьюки.

ных нейронах была значимо (ANOVA, $F_{(2,12)} = 13.18$; $p < 0.001$) выше по сравнению с более ранними сроками (рис. 2, 3), что может свидетельствовать как о наработке митохондриальной массы, так и о завершении переключения клеток с гликолиза на окислительное фосфорилирование.

Показатели митохондриальной динамики в клетках трансплантата различались на всех исследованных сроках. Так, наибольшее существенные изменения экспрессии Drp1 выявили на третьем месяце, когда созревание клеток еще не завершилось. Увеличение содержания Drp1 предшествовало увеличению экспрессии АТФ-синтазы.

К трем месяцам интенсивность иммунофлуоресценции при выявлении Drp1 значимо возрас-

тала по сравнению с ранним сроком после трансплантации, а к шести месяцам она вновь снижалась (ANOVA $F_{(2,12)} = 19.70$; $p < 0.001$) по сравнению с пиком, наблюдавшимся к трем месяцам (рис. 3, 4).

При выявлении белка наружной митохондриальной мембраны MTC02 в трансплантате, начиная со второй недели обнаруживали клетки, имеющие как удлиненные, так и короткие митохондрии, находящиеся на разных этапах дифференцировки.

При этом, увеличение содержания Drp1 сопровождалось снижением размеров MTC02-позитивных объектов (митохондриальных кластеров и филаментов). Их средняя длина в клетках трансплантата на второй неделе в среднем была значимо выше, по сравнению с последующими сроками,

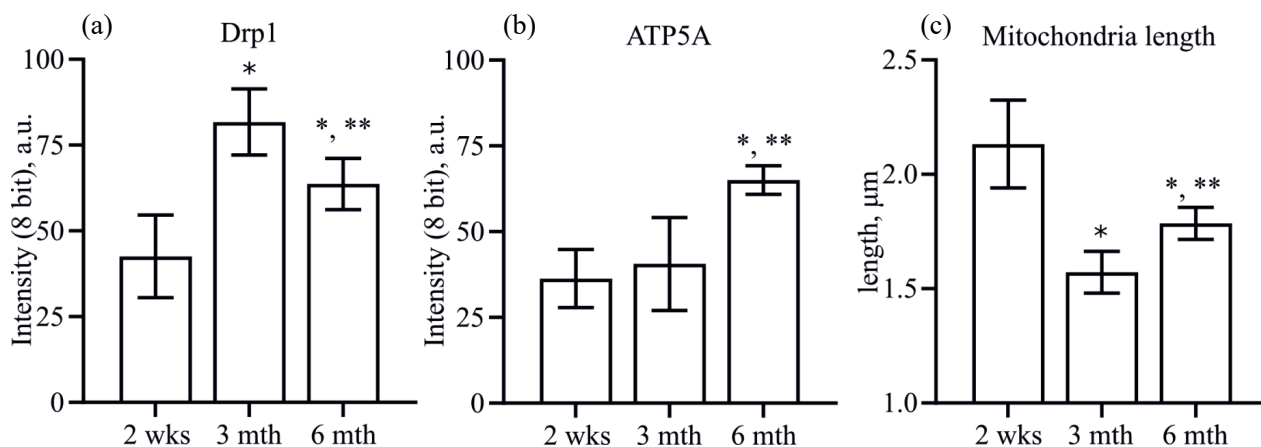


Рис. 3. Изменения митохондриальных показателей в клетках трансплантата. (a) — интенсивность флуоресценции (8 бит, градации яркости) при использовании антител к Drp1; (b) — интенсивность флуоресценции (8 бит, градации яркости) при использовании антител к ATP5A; (c) — изменения длины МТC02-позитивных объектов (“mitochondria length”) (мкм); Обозначения как на рис. 1.

к третьему месяцу она значимо снижалась, однако к шестому месяцу вновь возрастала (ANOVA, $F_{(2,12)} = 23.97$; $p < 0.001$), хотя и оставалась ниже, чем у незрелых нейронов (рис. 3, 4).

Выраженные изменения выявили и при оценке среднего объема митохондрий в клетке — доля, занимаемая МТC02-позитивными структурами (area fraction) в перинуклеарной области, возрастала с $2.99 \pm 0.17\%$ на второй неделе, до $4.39 \pm 0.71\%$ к шестому месяцу после введения ($F_{(2,12)} = 13.64$; $p < 0.001$), что, по-видимому, связано с увеличением количества и размеров митохондрий и митохондриальных кластеров.

Таким образом, в нашем эксперименте в трансплантированных клетках наблюдались колебания уровня белка деления митохондрий Drp1, ассоциированные с изменениями морфометрических параметров митохондриальной фракции, при этом, по мере созревания трансплантата отмечали увеличение объема митохондрий в клетке.

Причем, изменения митохондриальной динамики предшествовали увеличению содержания АТФ-синтазы, которое, по-видимому, отражает окончательное переключение трансплантированных клеток на окислительное фосфорилирование к шестому месяцу и согласуется со сроками их созревания и интеграции в структуры мозга реципиента.

ОБСУЖДЕНИЕ

Показанные в настоящей работе особенности динамики содержания Drp1 и размеров митохондрий в созревающих нейронах трансплантата согласуются с описанными в литературе изменениями при дифференцировке нервных клеток в эмбриогенезе, в нейрогенных нишах зрелого мозга грызунов

in vivo и *in vitro*, а также при развитии полученных из иПСК человека нейральных стволовых клеток [19, 20]. Так, известно, что пролиферирующие NSC в интерфазе имеют удлинённые митохондрии, в то время как в нейрональных предшественниках (NPC) митохондрии более фрагментированы, а по мере продвижения по этапам нейрональной дифференцировки длина и объем митохондрий увеличиваются [5, 10, 20]. Баланс слияния и деления митохондрий, обеспечиваемый антагонистически действующими белками митофузином и Drp1 критически важен для регуляции пролиферации, дифференцировки и миграции нервных клеток. Так, нокаут Drp1 подавляет нейрогенез в постнатальном гиппокампе [21], а для клеток субвентрикулярной зоны было показано снижение миграции под действием Mdivi-1 — ингибитора Drp1 [22]. Делеция митофузинов 1 и 2, регулирующих слияние митохондрий, приводила к фрагментации митохондрий, и снижению пролиферации NSC [10, 11]. На более поздних сроках нейрональной дифференцировки, в исследованиях NPC, полученных из иПСК человека было выявлено, что экспрессия митофузина возрастает по мере созревания нейронов, а его нокаут приводит к задержке формирования фенотипически зрелых нейронов [9, 19]. В целом, высказывается мнение [20], что нарушение слияния митохондрий ведет к задержке пролиферации и обновления популяции NSC, а нарушение деления митохондрий — к нарушению созревания нейронов. Выявленное к третьему месяцу увеличение содержания Drp1 и уменьшение длины митохондриальных цепочек и филаментов в клетках трансплантата согласуется со снижением экспрессии нестина — маркера NPC, и отражает активацию Drp1 на ранних этапах дифференцировки нейронов. По-

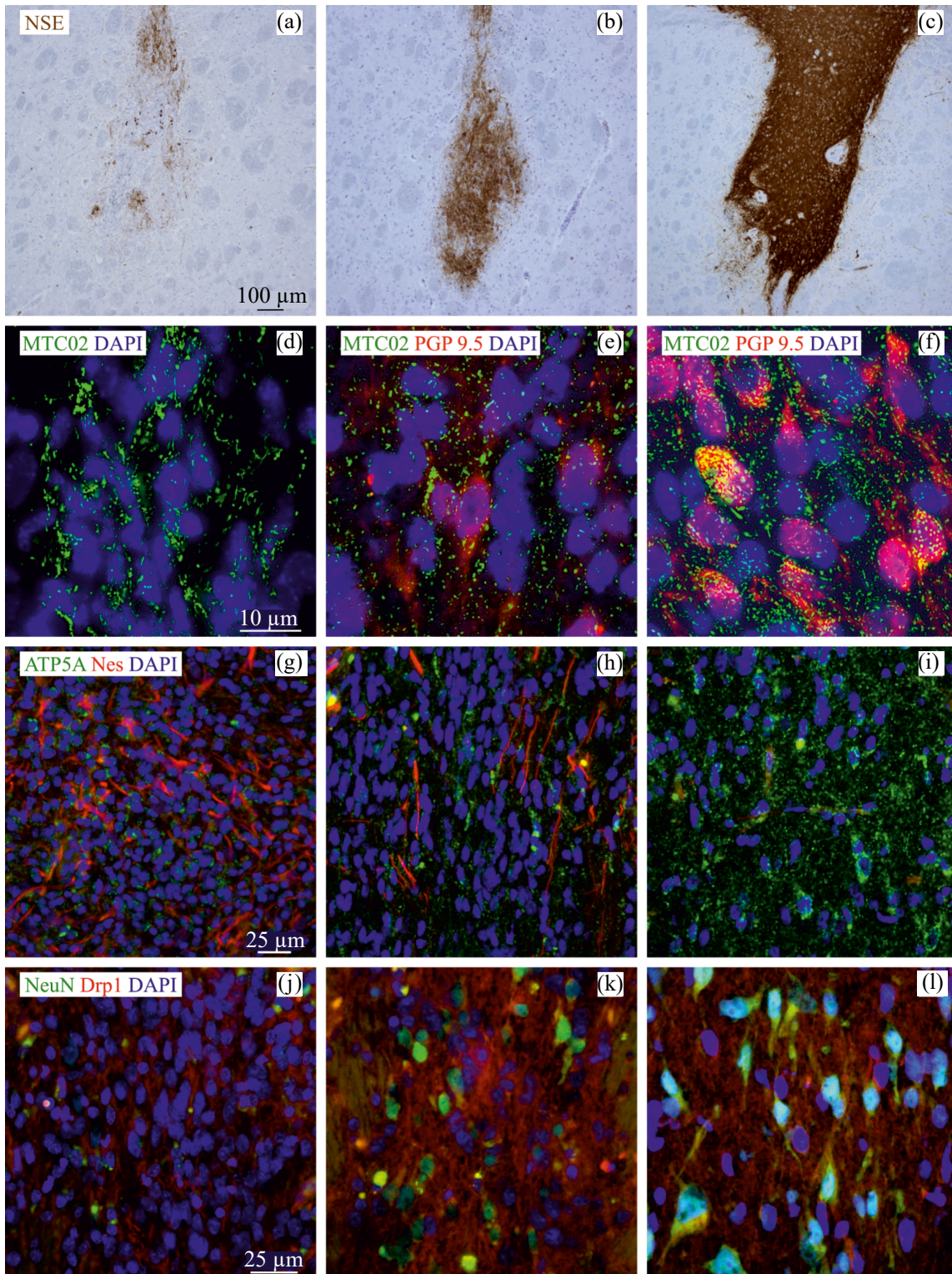


Рис. 4. Локализация нейрональных и митохондриальных маркеров в центральной области трансплантата на разных сроках после операции.

(a, b, c) – Выявление нейрональной енолазы (NSE); (d, e, f) – Выявление белка наружной мембраны митохондрий (MTC02, зеленым), на (e) и (f) дополнительно показан нейрональный маркер PGP 9.5 (красным); (g, h, i) – Выявление АТФ-синтазы (ATP5A, красным) и нестина (Nes, зеленым); (j, k, l) – Выявление Drp1 (красным) и нейронального маркера NeuN (зеленым).

Первый столбец (a, d, g, j) – 2 недели, второй столбец (b, e, h, k) – 3 месяца, третий столбец (c, f, i, l) – 6 месяцев после трансплантации.

мимо непосредственного участия в нейрональной дифференцировке деление, митохондрий связано и с регуляцией дендрито- и аксоногенеза [23, 24]. Например, при направленном нокауте *Dpr1* в дофаминовых нейронах отмечали нарушение дофаминергической иннервации хвостатого ядра [25]. Кроме того *Dpr1*, кроме участия в митохондриальной динамике, связан с процессами высвобождения и утилизации синаптических везикул [13, 26].

Обнаруженное нами к шести месяцам после трансплантации увеличение содержания АТФ-синтазы в нейронах и изменение морфометрических параметров митохондрий, по-видимому, отражает завершение метаболической перестройки нейронов и демонстрирует связь изменений морфологии митохондрий с усилением ОХРНOS. Действительно, ранее было показано, что нейрональная дифференцировка происходит параллельно с активацией компонентов митохондриальных комплексов, особенно комплекса V (АТФ-синтазы), ключевого для выработки АТФ путем ОХРНOS [27]. Интересно, что наряду с энергообеспечением, АТФ-синтаза участвует в образовании крист внутренней митохондриальной мембраны [28], обеспечивая формирование функционально зрелых митохондрий. Показанная в настоящей работе согласованность изменений митохондриальной динамики и экспрессии АТФ-синтазы обнаруживается и другими авторами, например, в развивающемся переднем мозге мышей увеличение экспрессии АТФ-синтазы сочетается с ростом экспрессии митофузина и снижением гликолитической активности [29].

По нашим данным, по мере созревания нейронов трансплантата, наряду с увеличением экспрессии синаптофизина [14] и маркерных белков зрелых нейронов, увеличивается и содержание участвующей в гликолизе NSE, что согласуется известным переключением при дифференцировке нейронов с альфа-енолазы на NSE [30] и может отражать протекающую параллельно активации ОХРНOS перестройку и гликолитических ферментов.

По данным литературы, изменения митохондриального метаболизма и переключение на ОХРНOS, влияют на пост-трансляционные модификации белков (в том числе — гистонов), метилирование и ацетилирование ДНК, что также является частью регуляторных механизмов клеточной дифференцировки [31, 32]. Таким образом, необходимость метаболической перестройки и переключения дифференцирующихся нейронов на ОХРНOS определяется не только их возрастающими потребностями в АТФ, но и регуляцией отдельных этапов созревания клеток через многочисленные сигнальные пути [8, 11], что подчеркивает и наше исследование.

Отметим, что в настоящей и более ранних наших работах [14, 16] в сходных условиях созревание и интеграция трансплантированных нейронов человека продолжались до полугода, что превышает сроки развития нейронов грызунов. Эти различия отмечены и другими авторами, например, по данным Iwata [33] кортикальные нейроны человека, по сравнению с нейронами мыши, имеют особенности посттрансляционной модификации белков, участвующих в митохондриальной динамике, экспрессии генов цикла Кребса и сборки электрон-транспортной цепи, что, предположительно, определяет их замедленное созревание.

В целом, литературные данные подтверждают общность изменений митохондриальной динамики выявленных в настоящей работе (при гетеротрансплантации нейрональных предшественников, полученных из иПСК человека в мозг крысы) и в дифференцирующихся нейронах в различных условиях (*in vitro*, в эмбриогенезе и зрелом мозге).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенный эксперимент демонстрирует связь изменений митохондриальной динамики и метаболического профиля трансплантированных нейронов, полученных из иПСК человека с их созреванием в трансплантате. Дальнейшее изучение изменений митохондриальной динамики в дифференцирующихся нейронах, может иметь значение для разработки методов управления интеграцией трансплантированных нейронов в структуры мозга.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование исследования: В.С.С., Д.Н.В., А.В.С.; Клеточные культуры: О.С.Л.; Манипуляции с животными и трансплантация: А.В.С., А.С.О.; Обработка гистологического материала и анализ данных: Д.Н.В., Е.Н.Ф., А.В.Е., В.В.П., А.С.О.; Написание и редактирование финального текста статьи: Д.Н.В., В.С.С., А.В.Е., Е.Н.Ф.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомен-

дациям локального этического комитета ФГБНУ НЦН.
Протокол № 5–3/22 от 01.06.2022 г.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РФФ 24-45-00052.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Doss MX, Sachinidis A* (2019) Current Challenges of iPSC-Based Disease Modeling and Therapeutic Implications. *Cells* 8: 403.
<https://doi.org/10.3390/cells8050403>
2. *Bigarreau J, Rouach N, Perrier AL, Mouthon F, Charvériat M* (2022) Modeling and Targeting Neuroglial Interactions with Human Pluripotent Stem Cell Models. *Int J Mol Sci* 23: 1684.
<https://doi.org/10.3390/ijms23031684>
3. *Crane AT, Voth JP, Shen FX, Low WC* (2019) Concise Review: Human-Animal Neurological Chimeras: Humanized Animals or Human Cells in an Animal? *Stem Cells* 37: 444–452.
<https://doi.org/10.1002/stem.2971>
4. *Aleksandrova MA, Marey MV* (2015) [Stem Cells in the Brain of Mammals and Human: Fundamental and Applied Aspects]. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 65: 271–305
5. *Iwata R, Casimir P, Vanderhaeghen P* (2020) Mitochondrial dynamics in postmitotic cells regulate neurogenesis. *Science* (80) 369:858–862.
<https://doi.org/10.1126/science.aba9760>
6. *Folmes CDL, Terzic A* (2016) Energy metabolism in the acquisition and maintenance of stemness. *Semin Cell Dev Biol* 52: 68–75.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.02.010>
7. *Sun X, St John JC* (2016) The role of the mtDNA set point in differentiation, development and tumorigenesis. *Biochem J* 473: 2955–2971.
<https://doi.org/10.1042/BCJ20160008>
8. *Maffezzini C, Calvo-Garrido J, Wredenber A, Freyer C* (2020) Metabolic regulation of neurodifferentiation in the adult brain. *Cell Mol Life Sci* 77: 2483–2496.
<https://doi.org/10.1007/s00018-019-03430-9>
9. *Zheng X, Boyer L, Jin M, Mertens J, Kim Y, Ma L, Ma L, Hamm M, Gage FH, Hunter T* (2016) Metabolic reprogramming during neuronal differentiation from aerobic glycolysis to neuronal oxidative phosphorylation. *Elife* 5.
<https://doi.org/10.7554/eLife.13374>
10. *Khacho M, Slack RS* (2018) Mitochondrial dynamics in the regulation of neurogenesis: From development to the adult brain. *Dev Dyn* 247: 47–53.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.24538>
11. *Khacho M, Harris R, Slack RS* (2019) Mitochondria as central regulators of neural stem cell fate and cognitive function. *Nat Rev Neurosci* 20:34–48.
<https://doi.org/10.1038/s41583-018-0091-3>
12. *Vantaggiato C, Castelli M, Giovarelli M, Orso G, Bassi MT, Clementi E, De Palma C* (2019) The Fine Tuning of Drp1-Dependent Mitochondrial Remodeling and Autophagy Controls Neuronal Differentiation. *Front Cell Neurosci* 13.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00120>
13. *Singh M, Denny H, Smith C, Granados J, Renden R* (2018) Presynaptic loss of dynamin-related protein 1 impairs synaptic vesicle release and recycling at the mouse calyx of Held. *J Physiol* 596: 6263–6287.
<https://doi.org/10.1113/JP276424>
14. *Voronkov DN, Stavrovskaya AV, Lebedeva OS, Li W, Olshansky AS, Gushchina AS, Kapkaeva MR, Bogomazova AN, Lagarkova MA, Illarioshkin SN* (2023) Morphological Changes in Neural Progenitors Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells and Transplanted into the Striatum of a Parkinson's Disease Rat Model. *Ann Clin Exp Neurol* 17: 43–50.
<https://doi.org/10.54101/ACEN.2023.2.6>
15. *Holmqvist S, Lehtonen S, Chumarina M, Puttonen KA, Azevedo C, Lebedeva O, Ruponen M, Oksanen M, Djelouil M, Collin A, Goldwurm S, Meyer M, Lagarkova M, Kiselev S, Koistinaho J, Roybon L* (2016) Creation of a library of induced pluripotent stem cells from Parkinsonian patients. *npj Park Dis* 2: 16009.
<https://doi.org/10.1038/npjparkd.2016.9>
16. *Voronkov DN, Stavrovskaya AV, Gushchina AS, Olshansky AS, Lebedeva OS, Ereemeev AV, Lagarkova MA* (2022) Morphological Characterization of Astrocytes in a Xenograft of Human iPSC-Derived Neural Precursor Cells. *Acta Naturae* 14: 100–108.
<https://doi.org/10.32607/actanaturae.11710>
17. *Lebedeva OS, Sharova EI, Grekhnev DA, Skorodumova LO, Kopylova IV, Vassina EM, Oshkolova A, Novikova IV, Krisanova AV, Olekhovich EI, Vigont VA, Kaznacheeva E V, Bogomazova AN, Lagarkova MA* (2023) An Efficient 2D Protocol for Differentiation of iPSCs into Mature Postmitotic Dopaminergic Neurons: Application for Modeling Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci* 24: 7297.
<https://doi.org/10.3390/ijms24087297>
18. *Song W, Bossy B, Martin OJ, Hicks A, Lubitz S, Knott AB, Bossy-Wetzel E* (2008) Assessing mitochondrial morphology and dynamics using fluorescence wide-field microscopy and 3D image processing. *Methods* 46: 295–303.
<https://doi.org/10.1016/j.jymeth.2008.10.003>
19. *Son G, Han J* (2018) Roles of mitochondria in neuronal development. *BMB Rep* 51: 549–556.
<https://doi.org/10.5483/BMBRep.2018.51.11.226>
20. *Iwata R, Vanderhaeghen P* (2021) Regulatory roles of mitochondria and metabolism in neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 69: 231–240.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2021.05.003>
21. *Steib K, Schäffner I, Jagasia R, Ebert B, Lie DC* (2014) Mitochondria Modify Exercise-Induced Development of Stem Cell-Derived Neurons in the Adult Brain. *J Neurosci* 34: 6624–6633.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4972-13.2014>
22. *Kim HJ, Shaker MR, Cho B, Cho HM, Kim H, Kim JY, Sun W* (2015) Dynamin-related protein 1 controls the migration and neuronal differentiation of subventricular zone-derived neural progenitor cells. *Sci Rep* 5: 15962.
<https://doi.org/10.1038/srep15962>

23. Rossi MJ, Pekkurnaz G (2019) Powerhouse of the mind: mitochondrial plasticity at the synapse. *Curr Opin Neurobiol* 57: 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.02.001>
24. Zhang S, Zhao J, Quan Z, Li H, Qing H (2022) Mitochondria and Other Organelles in Neural Development and Their Potential as Therapeutic Targets in Neurodegenerative Diseases. *Front Neurosci* 16. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.853911>
25. Berthet A, Margolis EB, Zhang J, Hsieh I, Zhang J, Hnasko TS, Ahmad J, Edwards RH, Sesaki H, Huang EJ, Nakamura K (2014) Loss of Mitochondrial Fission Depletes Axonal Mitochondria in Midbrain Dopamine Neurons. *J Neurosci* 34: 14304–14317. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0930-14.2014>
26. Itoh K, Murata D, Kato T, Yamada T, Araki Y, Saito A, Adachi Y, Igarashi A, Li S, Pletnikov M, Hugarir RL, Watanabe S, Kamiya A, Iijima M, Sesaki H (2019) Brain-specific Drp1 regulates postsynaptic endocytosis and dendrite formation independently of mitochondrial division. *Elife* 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.44739>
27. Beckervordersandforth R, Ebert B, Schöffner I, Moss J, Fiebig C, Shin J, Moore DL, Ghosh L, Trincherio MF, Stockburger C, Friedland K, Steib K, von Wittgenstein J, Keiner S, Redecker C, Hölter SM, Xiang W, Wurst W, Jagasia R, Schinder AF, Ming G, Toni N, Jessberger S, Song H, Lie DC (2017) Role of Mitochondrial Metabolism in the Control of Early Lineage Progression and Aging Phenotypes in Adult Hippocampal Neurogenesis. *Neuron* 93: 560–573.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.017>
28. Paumard P, Vaillier J, Couly B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller DM, Brèthes D, di Rago J-P, Velours J (2002) The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J* 21: 221–230. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.3.221>
29. Fame RM, Shannon ML, Chau KF, Head JP, Lehtinen MK (2019) Concerted metabolic shift in early forebrain alters the CSF proteome and depends on cMYC down-regulation for mitochondrial maturation. *Development* 146(20):dev182857. <https://doi.org/10.1242/dev.182857>
30. Haque A, Polcyn R, Matzelle D, Banik NL (2018) New Insights into the Role of Neuron-Specific Enolase in Neuro-Inflammation, Neurodegeneration, and Neuroprotection. *Brain Sci* 8: 33. <https://doi.org/10.3390/brainsci8020033>
31. Tarazona OA, Pourquié O (2020) Exploring the Influence of Cell Metabolism on Cell Fate through Protein Post-translational Modifications. *Dev Cell* 54: 282–292. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.06.035>
32. Dai Z, Ramesh V, Locasale JW (2020) The evolving metabolic landscape of chromatin biology and epigenetics. *Nat Rev Genet* 21: 737–753. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0270-8>
33. Iwata R, Casimir P, Erkol E, Boubakar L, Planque M, Gallego López IM, Ditkowska M, Gaspariunaite V, Beckers S, Remans D, Vints K, Vandekeere A, Poovathingal S, Bird M, Vlaeminck I, Creemers E, Wierda K, Corthout N, Vermeersch P, Carpentier S, Davie K, Mazzone M, Gounko NV, Aerts S, Ghesquière B, Fendt S-M, Vanderhaeghen P (2023) Mitochondria metabolism sets the species-specific tempo of neuronal development. *Science* (80) 379. <https://doi.org/10.1126/science.abn4705>

MITOCHONDRIAL DYNAMICS AND METABOLIC REMODELING IN XENOGRAFT OF IPSC-DERIVED HUMAN NEURAL PRECURSORS

D. N. Voronkov^{a, #}, A. V. Egorova^{a, b}, E. N. Fedorova^{a, b}, A. V. Stavrovskaya^a, O. S. Lebedeva^c, A. S. Olshanskiy^a, V. V. Podoprigora^b and V. S. Sukhorukov^{a, b}

^aResearch Center of Neurology, Moscow, Russia

^bN.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

^cLopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

[#]e-mail: voronkov@neurology.ru

It is well recognized that the regulation of mitochondrial functions affects the differentiation and maturation of neurons. The study of these processes is of both fundamental and practical importance for regenerative neurobiology. Aim of the study: to characterize the mitochondrial fission changes and their relation to the activation of oxidative phosphorylation (metabolic shift) during maturation of human IPSC-derived neural precursors grafted into rat striatum. Wistar rats ($n = 15$) were unilaterally injected into the caudate nucleus with neural precursors derived from human IPSCs. Changes in localization and expression of neuronal differentiation markers: nestin, NeuN, neuronal enolase, as well as mitochondrial outer membrane protein, ATP synthase and mitochondrial fission protein Drp1 were assessed by immunostaining. Measurements were performed on graft cells 2 weeks, 3 and 6 months after surgery. Maturation of grafted neurons was associated with fluctuations morphometric parameters of the mitochondrial fraction and Drp1 levels. Increased mitochondrial fission was detected 3 months after transplantation, before an increase in ATP synthase staining by 6th month and a switch of transplanted cells to oxidative phosphorylation. The conducted experiment demonstrated a link between mitochondrial dynamics and changes in the metabolic profile and maturation of transplanted neurons. The regulation of mitochondrial dynamics may have future implications for developing methods to improve the integration of transplanted neurons into recipient brain structures.

Keywords: neurogenesis, grafting, human IPSC, mitochondrial dynamics, Drp1, Oxidative phosphorylation