

## Множественные эффекты ингибитора деления митохондрий mdivi-1 на гранулярные нейроны зубчатой извилины гиппокампа крыс

Д.Н. Воронков<sup>1</sup>, А.В. Ставровская<sup>1</sup>, А.К. Павлова<sup>1</sup>, А.В. Егорова<sup>1,2</sup>,  
Е.Н. Федорова<sup>1,2</sup>, М.С. Рябова<sup>1</sup>, В.С. Сухоруков<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ Научный центр неврологии, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

**Резюме.** *Введение.* Ингибиторы митохондриального деления рассматриваются как перспективные фармакологические агенты с нейропротективным действием, однако их влияние на нейрогенные ниши недостаточно охарактеризовано. Цель исследования – охарактеризовать морфологическими методами влияние mdivi-1 (ингибитора деления митохондрий) на нейроны гранулярного слоя зубчатой извилины гиппокампа и нейрогенез в субгранулярной зоне.

*Материалы и методы.* У крыс линии Вистар после интрацеребровентрикулярного и внутрибрюшинного введения mdivi-1 иммуноморфологическими методами проводили оценку изменений дифференцировки и пролиферации нейрональных предшественников, уровня иммуноокрашивания на синаптические белки и митохондриальных изменений при выявлении белков I, II и V дыхательных комплексов. Кроме того, оценивали влияние mdivi-1 на поведенческие показатели животных в тестах «Открытое поле» и «Т-образный лабиринт».

*Результаты.* Внутрижелудочковое и внутрибрюшинное введение mdivi-1 уменьшало плотность даблкортин+ нейрональных предшественников, подавляло развитие дендритов и снижало число меченных BrdU нейронов. Подавление нейрогенеза сопровождалось изменениями иммуноокрашивания на синаптические белки синаптофизин и PSD95, увеличением размеров митохондриальной фракции нейронов гранулярного слоя и также изменениями поведения животных. Также обнаружили снижение иммуноокрашивания на АТФ5Н субъединицу АТФ-синтазы. Эти изменения наблюдали через 14 дней после введения mdivi-1. По-видимому, помимо непосредственного влияния mdivi-1 на синапсы выявленные перестройки синаптических структур в гиппокампе объясняются также результатом подавления нейрогенеза в зубчатой извилине.

*Заключение.* Ингибитор деления митохондрий mdivi-1 подавляет нейрогенез и вызывает изменения уровня иммуноокрашивания синаптических белков в зубчатой извилине гиппокампа. Выявленные эффекты mdivi-1 демонстрируют роль деления митохондрий в развитии нейронов, наряду с этим их следует учитывать при рассмотрении этого и подобных ингибиторов Drp1 в качестве потенциальных фармакологических препаратов для лечения неврологических заболеваний.

**Ключевые слова:** деление митохондрий, Drp1, mdivi-1, гиппокамп, нейрогенез

**Для корреспонденции:** Дмитрий Николаевич Воронков. E-mail: voronkov@neurology.ru

**Для цитирования:** Воронков Д.Н., Ставровская А.В., Павлова А.К., Егорова А.В., Федорова Е.Н., Рябова М.С., Сухоруков В.С. Множественные эффекты ингибитора деления митохондрий mdivi-1 на гранулярные нейроны зубчатой извилины гиппокампа крыс. Клини. эксп. морфология. 2025;14(3):58–71. DOI: 10.31088/СЕМ2025.14.3.58-71.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 24-25-00276).

Статья поступила 21.10.2024. Получена после рецензирования 21.11.2024. Принята в печать 02.12.2024.

# Multiple effects of mitochondrial division inhibitor mdivi-1 on granular neurons of the dentate gyrus in rats

D.N. Voronkov<sup>1</sup>, A.V. Stavrovskaya<sup>1</sup>, A.K. Pavlova<sup>1</sup>, A.V. Egorova<sup>1,2</sup>,  
E.N. Fedorova<sup>1,2</sup>, M.S. Ryabova<sup>1</sup>, V.S. Sukhorukov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Research Center of Neurology, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

**Abstract. Introduction.** Inhibitors of mitochondrial fission are considered promising pharmacological agents with neuroprotective effects; however, their effects on neurogenic niches have not been sufficiently characterized. The aim was to employ morphological methods to characterize the effect of mdivi-1 (mitochondrial division inhibitor) on neurons of the granular layer of the dentate gyrus and neurogenesis in the subgranular zone.

**Materials and methods.** Twenty 4-month male Wistar rats had intracerebroventricular and intraperitoneal mdivi-1 administration. Immunomorphological methods were used to evaluate changes in differentiation and proliferation of neuronal precursors, the level of immunostaining for synaptic proteins, and mitochondrial changes in detecting proteins of respiratory complexes I, II, and V. Moreover, we evaluated the effect of mdivi-1 on behavioral performance of animals in “the open field” and “T-maze” tests.

**Results.** Intraventricular and intraperitoneal mdivi-1 administration decreased the density of doublecortin-positive neuronal precursors, suppressed dendrite development, and reduced the number of BrdU-labeled neurons in the dentate gyrus. Suppression of neurogenesis was accompanied by changes in immunostaining for the synaptic proteins synaptophysin and PSD95, an increase in the mitochondrial size in neurons of granular layer, and changes in animal behavior. We also detected a decrease in immunostaining for ATP5H subunit of ATP synthase. These changes were observed 14 days after mdivi-1 administration. The inhibitor mdivi-1 is supposed to directly affect synapses. The identified synaptic structural changes are likely to be caused by the resulting inhibition of neurogenesis in the dentate gyrus.

**Conclusion.** The mitochondrial division inhibitor mdivi-1 suppresses neurogenesis in the dentate gyrus and causes changes in the level of immunostaining of synaptic proteins. The observed effects of mdivi-1 demonstrate the role of mitochondrial fission in neuronal development and should be accounted for when considering mdivi-1 and similar Drp1 inhibitors as potential pharmacologic agents in treating neurological diseases.

**Keywords:** mitochondrial fission, Drp1, mdivi-1, hippocampus, neurogenesis

**Corresponding author:** Dmitry N. Voronkov. E-mail: voronkov@neurology.ru

**For citation:** Voronkov D.N., Stavrovskaya A.V., Pavlova A.K., Egorova A.V., Fedorova E.N., Ryabova M.S., Sukhorukov V.S. Multiple effects of mitochondrial division inhibitor mdivi-1 on granular neurons of the dentate gyrus in rats. Clin. exp. morphology. 2025;14(3):58–71 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2025.14.3.58-71.

**Funding.** The study was supported by the Russian Science Foundation (project No. 24-25-00276).

**Received 21.10.2024. Received in revised form 21.11.2024. Accepted 02.12.2024.**

## Введение

Изучению роли митохондриальной динамики, в частности деления митохондрий в норме и при патологии нервной системы, посвящено много исследований [1, 2]. Такие фундаментальные процессы как пролиферация и дифференцировка нейронов, их выживание, рост аксонов и дендритов, формирование синаптических контактов и медиаторный обмен тесно связаны с ремоделированием митохондрий [3]. Изменения морфологии митохондрий по мере развития нейрона в настоящее время достаточно хорошо изучены и коррелируют с адаптационной метаболической перестройкой дифференцирующихся клеток [3, 4]. Установлено, что пролиферирующие нейрональные стволовые клетки имеют удлиненные митохондрии, в предшественниках нейронов органеллы фрагментируются, а по мере дифференцировки клеток отме-

чается нарастание митохондриальной массы, вновь сопровождающееся увеличением длины органелл. Модификация митохондриальной динамики приводит к изменениям нейрогенеза: так, подавление слияния митохондрий угнетает пролиферацию и обновление популяции нейрональных предшественников, а снижение уровня деления митохондрий нарушает их дифференцировку [3–5]. Деление митохондрий традиционно считается событием, индуцирующим апоптоз в различных типах клеток, включая нейроны, но в последние годы рассматривается и как компенсаторный механизм, поддерживающий нейрональные функции и регулирующий синаптическую пластичность [6].

Ключевым белком, опосредующим митохондриальное деление, является цитозольная ГТФаза Drp1 (dynamin related protein), взаимодействующая с адаптерными белками Mff, Fis1, MiD49 и MiD50 на наружной

мембране митохондрий. Адаптерные белки при этом определяют судьбу будущих новообразованных оргanelл, а разнообразие рецепторов обеспечивает тонкую регуляцию функционирования Drp1 [7]. Активность Drp1 задает размер, форму и распределение митохондрий по всему нейрону, от сомы до нервных окончаний. Наибольшее содержание Drp1 обнаруживается в соме и дендритах нейронов, в меньшей степени – в аксонах и аксональных терминалах [8], что коррелирует с особенностями внутриклеточной компарментализации митохондрий [9].

За последние два десятилетия предложено несколько ингибиторов Drp1, обладающих разной селективностью [1] и рассматриваемых как потенциальные терапевтические агенты, так как их нейропротекторные эффекты были продемонстрированы на моделях различных неврологических заболеваний. Помимо этого фармакологические ингибиторы митохондриального деления широко используют в модельных системах для изучения роли митохондриальной динамики в разных клеточных процессах.

Впервые mdivi-1 был описан как ингибитор деления митохондрий, селективно тормозящий активацию Drp1. mdivi-1 препятствует конформационным изменениям Drp1, необходимым для самосборки и гидролиза гуанозинтрифосфата (ГТФ), что предотвращает митохондриальное деление [10, 11]. Однако в последнее время появилось достаточно свидетельств о неспецифичности действия mdivi-1 в отношении Drp1 и обсуждаются нецелевые эффекты этого соединения [12, 13].

Наряду с этим многочисленные исследования свидетельствуют о нейропротективном эффекте mdivi-1 при моделировании многих неврологических заболеваний: ишемического инсульта мозга, болезни Альцгеймера, Паркинсона и Гентингтона, а также при черепно-мозговой травме [1, 2, 11, 14, 15]. На животных моделях и *in vitro* mdivi-1 уменьшал выраженность митохондриальных и синаптических нарушений при патологически повышенном уровне Drp1. Например, при ишемическом повреждении гиппокампа mdivi-1 восстанавливал работу дыхательной цепи митохондрий и снижал экспрессию факторов апоптоза [16]. В синаптосомальной фракции стриатума на модели болезни Паркинсона с экспрессией мутантного альфа-синуклеина mdivi-1 вызывал увеличение резервной дыхательной емкости митохондрий [17]. На модели болезни Альцгеймера mdivi-1 снижал накопление амилоида, уменьшал митохондриальную и синаптическую дисфункцию [18]. Из приведенных выше источников следует, что нейропротекторный эффект mdivi-1 включает повышение дыхательной емкости митохондрий, антиапоптотическое действие, предупреждение глутаматной эксайтотоксичности и снижение выработки активных форм кислорода.

Поскольку работ, непосредственно рассматривающих влияние mdivi-1 на структуры мозга в норме, недостаточно, а изучение возможностей регуляции

молекулярных механизмов динамики митохондрий представляет интерес с точки зрения репаративного и адаптационного потенциала нервной ткани, целью исследования было охарактеризовать морфологическими методами влияние mdivi-1 на нейроны гранулярного слоя зубчатой извилины (ЗИ) гиппокампа и процесс нейрогенеза в субгранулярной зоне.

## Материалы и методы

### Животные

В работе использованы 20 самцов крыс линии Вистар, полученных из питомника «Столбовая», возраст животных на момент начала экспериментов составил 4 месяца. Манипуляции с животными проводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986), приказом Минздрава России № 119н от 01.04.2016 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики», а также руководствуясь Правилами работы с лабораторными грызунами и кроликами (ГОСТ 33216-2014). Исследование одобрено этическим комитетом Научного центра неврологии (протокол № 5-3/22 от 01.06.2022). Животные содержались в стандартных условиях вивария с неограниченным доступом к пище и воде при 12-часовом световом режиме. Эксперимент начинали после их 10-дневной адаптации к условиям вивария.

### Эксперимент с внутрижелудочковым введением mdivi-1 и введением 5-бромо-2'-дезоксидуридина (BrdU) (группа icv)

Животным (n=10) внутрибрюшинно вводили раствор BrdU («ПанЭко», Россия) в дозе 40 мг/кг, ежедневно, три последовательных дня, каждые 24 часа. Срок между введением BrdU и введением mdivi-1 был выбран, исходя из времени созревания нейронов в субгранулярной зоне, с целью оценить влияние mdivi-1 на созревание нейронов в ЗИ гиппокампа (рис. 1). Через 2 недели после введения BrdU крысам выполняли стереотаксические операции. Животные получали золетил-ксилазиновый наркоз (золетил-100, 0,3 мг/кг (Virbac, Франция), ксила, 3 мг/кг, внутримышечно (Interchemie Werken De Adelaar, Нидерланды). При помощи стереотаксического аппарата RWD билатерально (координаты по: Paxinos and Watson. The rat brain in stereotaxic coordinates) вводили mdivi-1 (по 2,33 мкг в 0,1% DMSO, в 0,9% растворе NaCl в каждое полушарие) в желудочки мозга пяти животным, а контрольная группа (ложнооперированные, группа sham – SH, n=5) получала инъекции носителя в том же объеме.

### Эксперимент с внутрибрюшинным введением mdivi-1 (группа ip)

mdivi-1 (IM2550, Solarbio) растворяли в безводном диметилсульфоксиде (DMSO, Sigma), после чего разбавляли 0,9% раствором NaCl. Конечная эмульсия

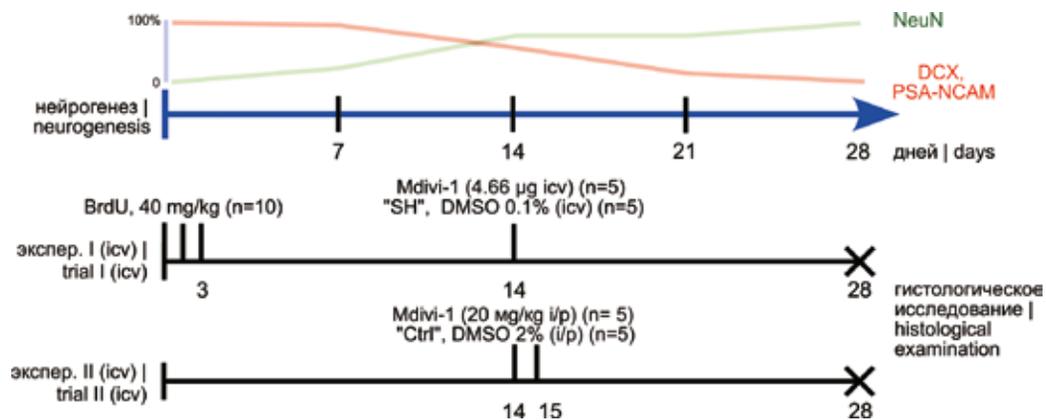


Рис. 1. Схема эксперимента и динамика изменений соотношения DCX+ и NeuN+, меченных BrdU клеток в зубчатой извилине крыс по данным литературы [Snyder, 2009]

Fig. 1. The experimental design and DCX+ and NeuN+ BrdU-labeled cells changes in the dentate gyrus of rats over time [Snyder, 2009]

содержала 2% DMSO и 10 мг/мл mdivi-1, его вводили первой группе животных (n=5) внутривентриально в дозе 20 мг/кг два последовательных дня. Доза была выбрана, исходя из ранее опубликованных данных [15]. Контрольной группе животных (группа control – Ctrl, n=5) внутривентриально вводили только носитель в том же объеме.

#### Исследование поведения

Поведение животных оценивали до проведения манипуляций и через 14 дней после внутривентриального или внутривентриального введения веществ. Установка «Открытое поле» («Открытая наука», Россия) для оценки двигательной активности представляла собой короб 97×97×40 см из жесткого ПВХ, продолжительность теста – 3 минуты. Регистрацию поведения крыс и последующий анализ данных проводили с помощью системы видеонаблюдения Any-Maze (Stoelting Inc., США) с программным обеспечением.

Для оценки уровня тревожности использовали Т-образный лабиринт («Открытая наука», Россия), приподнятый над полом на 76 см, два закрытых рукава которого имели боковые и торцевые стенки высотой 30 см, а у открытого рукава стенок не было. Ширина рукавов составляла 14 см, длина 50 см, на их пересечении располагался стартовый отсек – площадка размером 10×10 см. В начале эксперимента крысу помещали на начало открытого рукава. Продолжительность теста составляла 3 минуты.

#### Иммуноморфологическое исследование

Животных выводили из эксперимента на 14-й день после введения mdivi-1 и проведения поведенческих тестов. Крыс декапитировали гильотиной, мозг извлекали и фиксировали 24 часа в 10% формалине. Исследование выполняли на фронтальных срезах, полученных при помощи криостата, 15 мкм толщиной. Использовали антитела против белков ми-

тохондриальных комплексов: субъединицы 30 кДа комплекса I (NDUFS3, ab183733, Abcam, США), субъединицы В сукцинатдегидрогеназы (SDHB, ab175225, Abcam, США), АТФ-синтазы (АТФ5Н, clone 7F9BG1, Invitrogen, США); синаптических белков: синаптофизина (SYP, ab32127, Abcam, США) и белка постсинаптического уплотнения PSD95 (clone 7E3-1B8, Invitrogen, США); антитела к маркерам нейрональной дифференцировки – даблкортину (DCX, 4604S, Cell Signalling, США), полисиализированной нейрональной молекуле клеточной адгезии (PSA-NCAM, clone 12E3, Invitrogen, США), а также к бромдезоксипуридину (BrdU, Bu20a, Cell Signalling, США) и маркерному белку зрелых нейронов NeuN (ab177487, Abcam, США) для оценки созревания нейрональных предшественников. Перед нанесением антител срезы подвергали температурной демаскировке в пароварке (0,01 М цитратный буфер, 0,05% Tween-60, pH 6,0, +96–98°, 15 минут). Для выявления BrdU срезы выдерживали в 1М HCl 20 минут при температуре +37°. Срезы промывали фосфатным солевым буфером, содержащим 0,05% Triton X-100. Для разведения антител использовали буферный раствор IHC Diluent (Leica Biosystems, США) в соотношении, рекомендованном производителем антител. Для блокирования неспецифического связывания применяли раствор БСА (Protein block, ab64226, Abcam, США). Связывание антител визуализировали при помощи соответствующих вторичных антител осла или козы (Invitrogen, США), меченных флуорохромами Alexa 488 и Alexa 594 (Thermo Fisher Scientific, США).

Для количественной оценки и документирования использовали микроскоп Nikon Eclipse Ni-u (Nikon, Япония) с камерой Nikon Ds-Qi (Nikon, Япония), программное обеспечение NIS Elements Br и ImageJ-FIJI. При увеличении объектива ×40 измеряли интенсивность флуоресценции (среднюю яркость пикселей в единицах 8-битной шкалы) SDHB, NDUFS3, PSD95, АТФ5Н в те-

лах нейронов гранулярного слоя гиппокампа (области ядер исключали из измерения), интенсивность флуоресценции при выявлении SYR оценивали во внутреннем молекулярном слое ЗИ. Размеры митохондриальной фракции оценивали по локализации SDHB, как описано ранее [19]. В эксперименте с введением BrdU число BrdU+ и NeuN+ клеток на поле зрения подсчитывали вручную, при увеличении объектива  $\times 20$ , верифицируя локализацию BrdU в ядрах нейронов при  $\times 40$ . Число DCX+ клеток оценивали на изображениях, сделанных на всем протяжении ЗИ гиппокампа, и выражали в единицах на 1 мм длины, измеряемой по нижней ее границе. Распределение DCX+ клеток оценивали при помощи функции distance map. На основе оценки кратчайшего расстояния между DCX+ клетками вычисляли индекс агрегации Кларка–Эванса, безразмерный показатель распределения точек на плоскости, возрастающий при кластеризации объектов [20]. Подсчет типов DCX+ нейронов выполняли на препаратах с двойным окрашиванием на DCX/PSA-NCAM для надежной оценки морфологии дендритов по классификации Plumpe [21]. Для количественного анализа использовали не менее 5–12 серийных срезов гиппокампа от животного, взятых из ростральной его трети с интервалом от 120 мкм. Полученные результаты усредняли.

По технической причине (количество срезов) в экспериментах с выявлением PSD95, SDHB, NDUFS3, PSA-NCAM группы контроля для внутрижелудочкового введения составила четыре животных, а для выявления ATR5H все группы были уменьшены на одно животное.

#### Методы статистического анализа

Статистическую обработку выполняли в программе GraphPad Prism (GraphPad Software, США). Данные представляли в виде медианы и межквартильного размаха или среднего и среднеквадратичного отклонения (SD). Для сравнения нескольких групп использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса (K-W ANOVA) с апостериорным тестом Данна. В ряде случаев дополнительно проводили двухфакторный анализ ANOVA с факторами «воздействие» (растворитель или mdivi-1)  $\times$  «способ введения» (группы icv или i/p). Для оценки нормальности распределения использовали критерий Шапиро–Уилка. Прочие примененные тесты указаны в тексте и подписях к рисункам. Статистически значимыми считали отличия при  $p < 0,05$ .

#### Результаты

##### *mdivi-1 подавляет нейрогенез в зубчатой извилине гиппокампа*

Как внутрижелудочковое (группа icv), так и внутрибрюшинное введение mdivi-1 (группа i/p) приводило к значимому снижению количества DCX+ нейрональных предшественников в ЗИ гиппокампа животных (рис. 2), что указывает на уменьшение нейрогенеза. В группе с внутрижелудочковым введением также вы-

являли статистически значимое (K-W ANOVA,  $p=0,03$ ) повышение индекса Кларка–Эванса (возрастающего при кластеризации объектов), что свидетельствует о формировании групп DCX+ клеток у животных под действием mdivi-1.

Анализ соотношения морфологических типов DCX+ нейронов показал, что в группе icv была значимо снижена доля PSA-NCAM+, DCX-содержащих клеток в постмитотической фазе, имеющих длинные и разветвленные дендриты, доходящие до молекулярного слоя (тип E-F, согласно работе [21]). К типу C-D относили нейроны с неразвитыми дендритами, не доходящими до молекулярного слоя, а тип A-B составляли клетки на митотической стадии с короткими отростками или лишённые их (рис. 2). Двухфакторный дисперсионный анализ показал значимое (ANOVA F (2, 21) = 8,735,  $p=0,002$ ) взаимодействие факторов «тип нейронов»  $\times$  «воздействие».

Исходя из этих данных, введение mdivi-1 замедляет дифференцировку нейронов, что подтверждает оценка количества меченных BrdU ядер NeuN+ нейронов (рис. 2). В группе icv под влиянием mdivi-1 число NeuN+/BrdU+ нейронов значимо снижалось (t-тест,  $p=0,02$ ).

Полученные результаты указывают на то, что mdivi-1 подавляет нейрогенез, снижает развитие дендритов у DCX+ нейронов и, по-видимому, влияет на миграцию нейрональных предшественников в субгранулярной зоне гиппокампа, что может отражать выявленная по повышению индекса Кларка–Эванса кластеризация DCX+ клеток.

##### *mdivi-1 вызывает изменения иммуноокрашивания на синаптические белки*

Интенсивность окрашивания на синаптофизин (локализованный преимущественно пресинаптически) оценивали во внутреннем молекулярном и полиморфном слое ЗИ (рис. 3). Известно, что внутренняя часть молекулярного слоя представлена преимущественно дендритами гранулярных нейронов и комиссуральными и ассоциативными входами, в то время как аксоны гранулярных клеток формируют синапсы в полиморфном слое. Статистически значимых изменений окрашивания на синаптофизин в полиморфном слое не обнаружили (K-W ANOVA,  $p=0,13$ ), тогда как в молекулярном слое выявили существенное снижение интенсивности окрашивания в группе icv (K-W ANOVA, апостериорный тест Данна,  $p=0,02$ ) и сходную тенденцию для группы с внутрижелудочковым введением (i/p). Двухфакторный анализ ANOVA показал статистически значимое влияние mdivi-1 на содержание синаптофизина в молекулярном слое (фактор «воздействие» ANOVA F (1, 16) = 13,41,  $p=0,0021$ ) и отсутствие влияния способа его введения ( $p=0,61$ ).

Обратные изменения наблюдали в уровне окрашивания на белок постсинаптической плотности PSD95 в гранулярном слое (рис. 3). В группе icv выявляли тенденцию к увеличению, а в группе i/p обнаруживали статистически значимое увеличение интенсивности

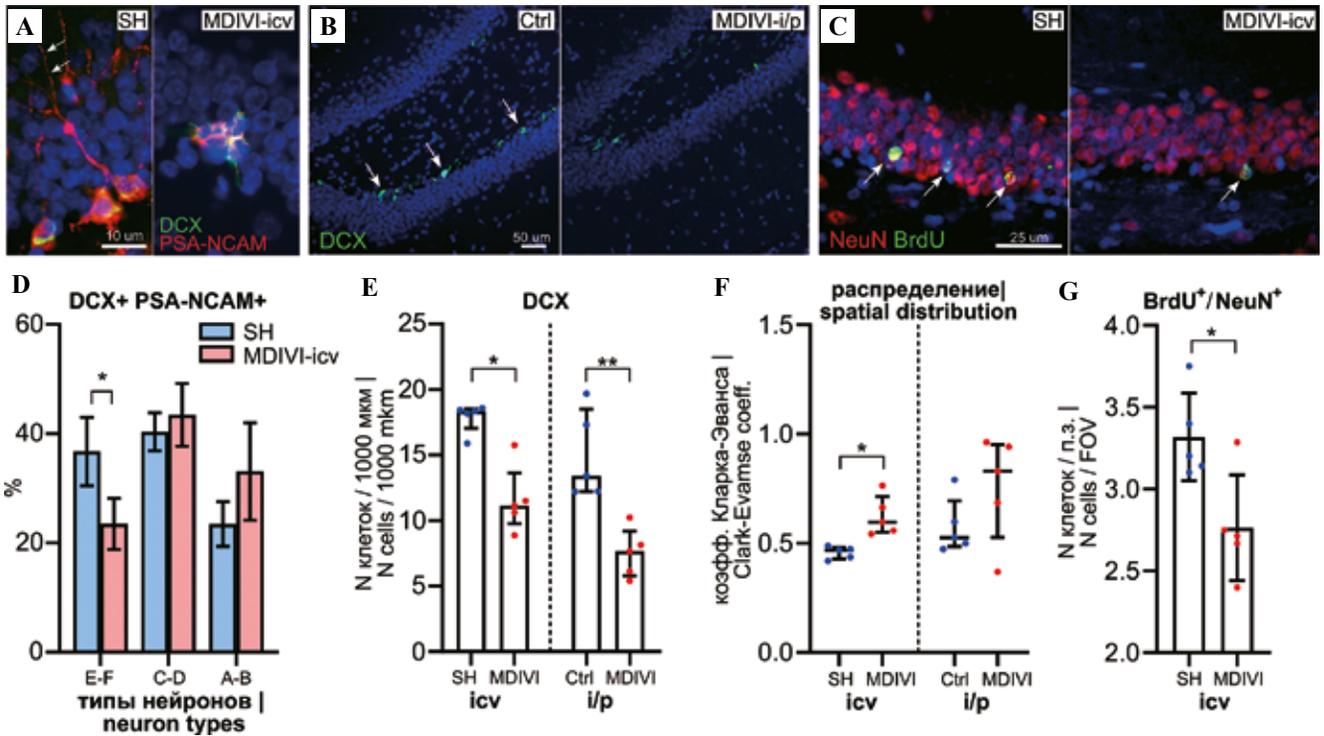


Рис. 2. Изменения нейрогенеза в зубчатой извилине гиппокампа под действием mdivi-1.

A – DCX+ (зеленым)/PSA-NCAM+ (красным) клетки в субгранулярной зоне ложнооперированных (SH) и получавших внутримозговые инъекции mdivi-1 (MDIVI-icv) животных. Стрелками показаны дендриты развивающихся нейронов, достигающие молекулярного слоя, характерные для контрольных групп животных.  $\times 100$ . B – распределение DCX+ клеток у животных контрольной группы (Ctrl) и у животного, получавшего внутривентрикулярные инъекции mdivi-1 (MDIVI-i/p). Стрелки указывают на DCX+ клетки.  $\times 10$ . C – снижение плотности BrdU+ ядер нейронов в гранулярном слое (окрашивании на NeuN – красным) у ложнооперированных животных и животных, получавших внутримозговые инъекции mdivi-1. Стрелки указывают на ядерную локализацию BrdU в нейронах.  $\times 40$ . D – процентное соотношение типов DCX+ клеток по возрастанию разветвленности и протяженности дендритов от A до F (по классификации Plümpe, 2006) у ложнооперированных животных и животных, которым внутримозгово вводили mdivi-1. Данные в виде  $M \pm SD$ , \* –  $p < 0,05$ , двухфакторный тест ANOVA, апостериорный тест Сидак. E – число DCX+ клеток в зубчатой извилине (единиц на 1000 мкм длины). Данные в виде Me (HQ, LQ), \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , Тест Краскела–Уоллиса, апостериорный тест Данна. F – изменение пространственного распределения DCX+ клеток (коэффициент Кларка–Эванса) в зубчатой извилине под действием mdivi-1. Данные в виде Me (HQ, LQ), \* –  $p < 0,05$ , Тест Краскела–Уоллиса, апостериорный тест Данна. G – изменение плотности BrdU+/NeuN+ нейронов в гранулярном слое (единиц на поле зрения). Данные в виде  $M \pm SD$ , непарный t-тест SH – sham, ложнооперированные животные; MDIVI-icv – животные, которым внутримозгово вводили mdivi-1; Ctrl – control, животные, которым внутривентрикулярно вводили растворитель; MDIVI-i/p – животные, которым внутривентрикулярно вводили mdivi-1

Fig. 2. Changes in neurogenesis in the dentate gyrus following the mdivi-1 treatment.

A – DCX+ and PSA-NCAM+ cells (green and red, respectively) in the subgranular zone of animals that received sham treatment and intraventricular mdivi-1 injections. Arrows show dendrites of developing neurons that reach the molecular layer characteristic of the control group.  $\times 100$ . B – distribution of DCX+ cells in control animals and an animal with an intraperitoneal mdivi-1 injection. Arrows indicate DCX+ cells.  $\times 10$ . C – decreased density of BrdU+ neuronal nuclei in the granular layer (immunostaining for NeuN in red) in animals with sham treatment and those with intraventricular mdivi-1 injections. Arrows indicate nuclear location of BrdU in neurons.  $\times 40$ . D – the percentage of DCX+ cell types by ascending order of branching and dendrite length from “A” to “F” (according to Plümpe classification, 2006) in animals with sham treatment and those with intraventricular mdivi-1 injection.  $M \pm SD$ , \* –  $p < 0.05$ , two-factor ANOVA, Sidak post-hoc test. E – the number of DCX+ cells in the dentate gyrus (units per 1000  $\mu\text{m}$  length). Me (HQ, LQ), \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , Kruskal–Wallis test, Dunn’s post-hoc test. F – changes in the spatial distribution of DCX+ cells (Clark-Evans coefficient) in the dentate gyrus following mdivi-1 injections. Me (HQ, LQ), \* –  $p < 0.05$ , Kruskal–Wallis test, Dunn’s post-hoc test. G – changes in the density of BrdU+ and NeuN+ neurons in the granular layer (cell per field of view).  $M \pm SD$ , unpaired t-test SH – sham treated animals; MDIVI-icv – intraventricular mdivi-1 injection; Ctrl – control animals with intraperitoneal mdivi-1 injection; MDIVI-i/p – animals with intraperitoneal mdivi-1 injection

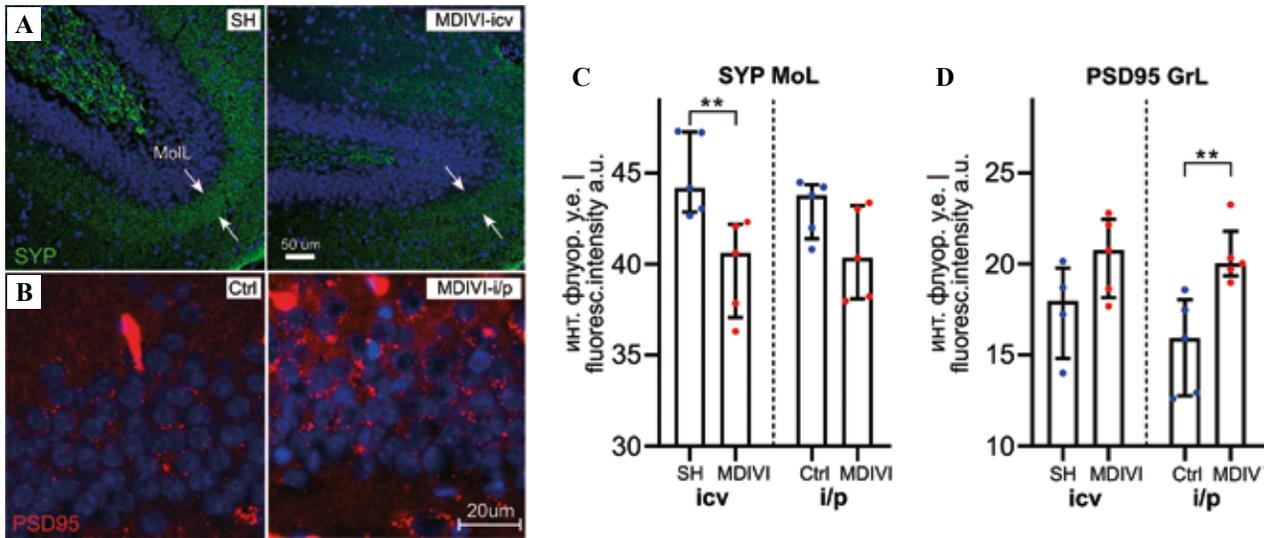


Рис. 3. Изменения интенсивности иммунофлуоресцентного окрашивания на синаптические белки в зубчатой извилине гиппокампа под действием mdivi-1.

А – выявление синаптофизина (SYP, зеленым). Снижение интенсивности окрашивания во внутреннем молекулярном слое зубчатой извилины у животного, получавшего внутривентрикулярные инъекции mdivi-1.  $\times 100$ . В – выявление белка постсинаптического уплотнения (PSD95) (красным). Увеличение точечного окрашивания в гранулярном слое.  $\times 40$ . С – изменение интенсивности иммунофлуоресцентного окрашивания на синаптофизин в молекулярном слое под действием mdivi-1. D – изменение интенсивности иммунофлуоресцентного окрашивания на PSD95 в молекулярном слое под действием mdivi-1

SH – sham, ложнооперированные животные; MDIVI-icv – животные, которым внутривентрикулярно вводили mdivi-1; Ctrl – control, животные, которым внутривентрикулярно вводили растворитель; MDIVI-i/p – животные, которым внутривентрикулярно вводили mdivi-1; MoL – внутренний молекулярный слой зубчатой извилины гиппокампа. Данные в виде Me (LQ; HQ), \*\* –  $p < 0,01$ , Тест Краскела–Уоллиса, апостериорный тест Данна

Fig. 3. Changes in the intensity of immunofluorescence staining for synaptic proteins in the dentate gyrus following mdivi-1 injections. A – detection of synaptophysin (SYP, green). Decreased staining intensity in the inner molecular layer of the dentate gyrus in an animal with an intraventricular mdivi-1 injection. B – detection of postsynaptic density protein PSD95 (red). Increased dot staining in the granular layer. C – change in immunofluorescence intensity for synaptophysin in the molecular layer after mdivi-1 administration. D – change in the immunofluorescence intensity for PSD95 in the molecular layer after mdivi-1 administration. SH – sham treated animals; MDIVI-icv – intraventricular mdivi-1 injection; Ctrl – control animals with intraperitoneal mdivi-1 injection; MDIVI-i/p – animals with intraperitoneal mdivi-1 injection; MoL – internal molecular layer of the dentate gyrus; GrL – granular layer of the dentate gyrus. Data as Me (LQ; HQ), \*\* –  $p < 0,01$ , Kruskal–Wallis test, Dunn's post-hoc

окрашивания на PSD95 (K-W ANOVA, апостериорный тест Данна,  $p < 0,01$ ). Двухфакторный анализ ANOVA выявил статистически значимое влияние mdivi-1 (фактор «воздействие» ANOVA  $F(1, 15) = 13,62$ ,  $p = 0,002$ ) и отсутствие влияния способа его введения ( $p = 0,37$ ).

Окрашивание на пре- и постсинаптические белки определило их разнонаправленные изменения под действием mdivi-1 в области синаптических контактов с клетками гранулярного слоя. Изменения синаптических связей могут влиять на активность гранулярных нейронов и на нейрогенез в субгранулярной зоне.

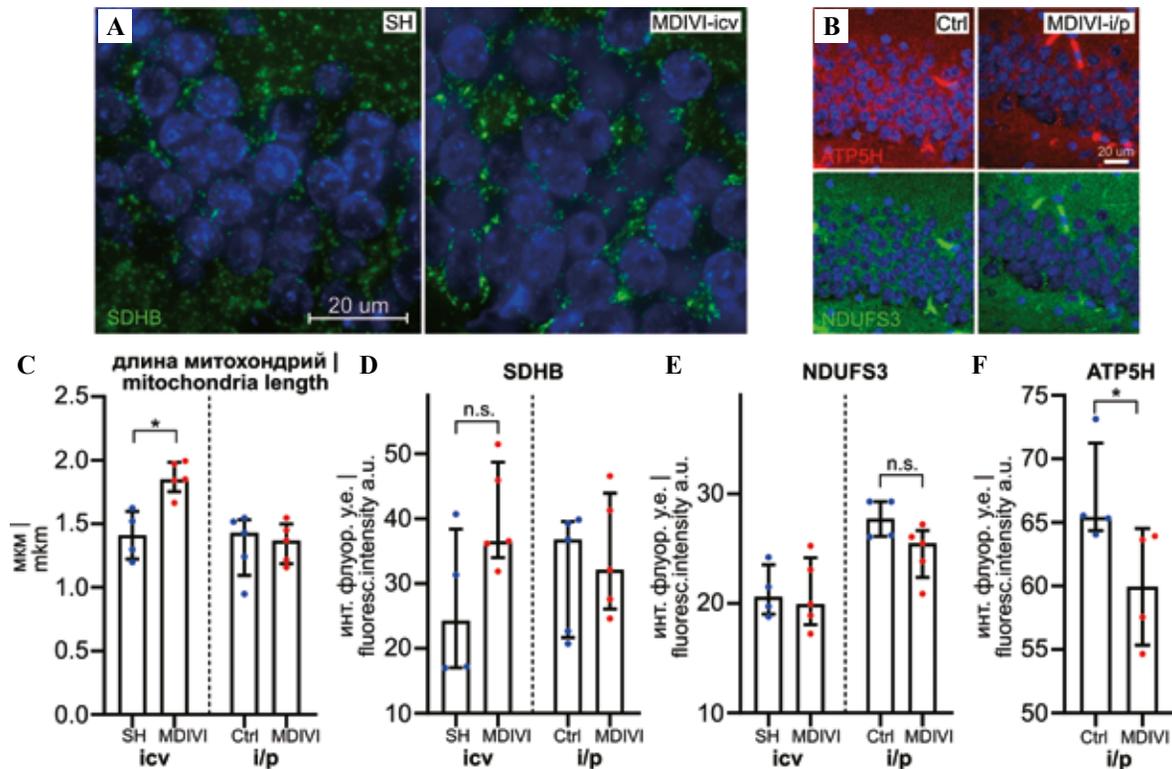
#### Влияние mdivi-1 на митохондрии

В эксперименте с внутривентрикулярным введением mdivi-1 (группа icv) обнаружили статистически значимое увеличение (K-W ANOVA,  $p = 0,013$ ) среднего размера митохондрий (рис. 4) в гранулярном слое – митохондриальной фракции, выявляемой по локализации SDHB, однако в группе i/p таких изменений не выявили.

Двухфакторный анализ ANOVA подтвердил влияние взаимодействия факторов («воздействие»  $\times$  «способ введения»,  $F(1, 15) = 6,5$ ,  $p = 0,022$ ) на этот показатель, что говорит о разной выраженности ингибирования митохондриального деления и влияния mdivi-1 на митохондриальную морфологию при разных способах введения.

Оценка интенсивности окрашивания на белки дыхательных комплексов I (NDUFS3) и II (SDHB) не выявила значимого влияния mdivi-1 на их содержание в нейронах гранулярного слоя. При этом в дополнительном проведенном тесте было обнаружено значимое (тест Манна–Уитни,  $p = 0,02$ ) снижение интенсивности окрашивания на субъединицу комплекса V (ATP5H) при внутривентрикулярном введении mdivi-1 (окрашивание в группе icv не проводили).

Таким образом, полученные данные демонстрируют влияние mdivi-1 на морфологию митохондрий, но отсутствие изменений экспрессии исследованных белков митохондриальных комплексов, за исключением АТФазы.



**Рис. 4.** Изменения митохондриальных показателей в зубчатой извилине гиппокампа под действием mdivi-1. А – выявление сукцинатдегидрогеназы (SDHB, зеленым) в гранулярных нейронах. Увеличение размеров митохондриальной фракции при внутрижелудочковых инъекциях mdivi-1. В – двойное окрашивание на ATP5H-субъединицу АТФ-синтазы (красным) и NDUFS3 (зеленым). С – изменения среднего размера митохондриальной фракции (по окрашиванию на SDHB) в перикарионах нейронов гранулярного слоя под действием mdivi-1. D – интенсивность иммунофлуоресцентного окрашивания на SDHB в гранулярном слое. E – интенсивность иммунофлуоресцентного окрашивания на NDUFS3 в гранулярном слое. F – изменения интенсивности иммунофлуоресцентного окрашивания на ATP5H в гранулярном слое у животных, получавших внутривентрикулярные инъекции mdivi-1. SH – sham, ложнопериоперированные животные; MDIVI-icv – животные, которым внутривентрикулярно вводили mdivi-1; Ctrl – control, животные, которым внутривентрикулярно вводили растворитель; MDIVI-i/p – животные, которым внутривентрикулярно вводили mdivi-1; C, D, E – данные в виде Me (HQ, LQ), \* –  $p < 0.05$ , тест Краскела–Уоллиса, апостериорный тест Данна, n.s. – статистически значимых изменений нет. F – данные в виде Me (HQ, LQ), \* –  $p < 0.05$ , тест Манна–Уитни

**Fig. 4.** Changes in mitochondrial indices in the dentate gyrus following mdivi-1 injections. A – detection of succinate dehydrogenase (SDHB, green) in granular neurons. Increase in mitochondrial fraction size, upon intraventricular mdivi-1 injections. B – double staining for ATP5H-subunit of ATP synthase (red) and NDUFS3 (green). C – changes in mean mitochondrial fraction size (by staining for SDHB) in perikaryons of granule cells following mdivi-1 administration. D – the intensity of immunofluorescence staining for SDHB in the granular layer. E – the intensity of immunofluorescence staining for NDUFS3 in the granular layer. F – changes in the intensity of immunofluorescence staining for ATP5H in the granular layer in animals with intraperitoneal mdivi-1 injections. SH – sham treated animals; MDIVI-icv – intraventricular mdivi-1 injection; Ctrl – control animals with intraperitoneal mdivi-1 injection; MDIVI-i/p – animals with intraperitoneal mdivi-1 injection; C, D, E, – data as Me (HQ, LQ), \* –  $p < 0.05$ , Kruskal–Wallis test, Dunn's post-hoc test, n.s. – no statistically significant differences. F – data as Me (HQ, LQ), \* –  $p < 0.05$ , Mann–Whitney test

#### Изменения поведения животных под действием mdivi-1

В тесте «Т-образный лабиринт» при внутривентрикулярном введении mdivi-1 наблюдалась тенденция ( $p=0,06$ , тест Вилкоксона) к увеличению соотношения времени нахождения животных в открытом и закрытом рукавах (рис. 4,  $p=0,06$ , тест Вилкоксона). При этом число заходов в закрытые рукава значимо не менялось. Интраперитонеальное введение mdivi-1 не привело к изменению времени нахождения в открытом рукаве, однако было отмечено статистически значимое снижение числа заходов в закрытые рукава ( $p=0,049$ , ANOVA, апостериорный тест Тьюки, данные не показаны).

В тесте «Открытое поле» введение mdivi-1 не оказало влияния на общую локомоторную активность животных как при интравентрикулярном введении (ANOVA,  $p=0,91$ , средняя дистанция составила  $10,2 \pm 3,1$  м у ложнопериоперированных животных и  $12,5 \pm 2,4$  м в группе, получавшей mdivi-1), так и при интраперитонеальном (ANOVA,  $p=0,75$ , в группе контроля  $10,5 \pm 3,9$  м, в группе, получавшей mdivi-1,  $9,6 \pm 3,6$  м). При этом в группе icv наблюдали статистически значимое увеличение времени, проводимого животными в центральной зоне арены (рис. 5,  $p < 0,01$ , тест Вилкоксона, по сравнению с теми же крысами до введения mdivi-1).

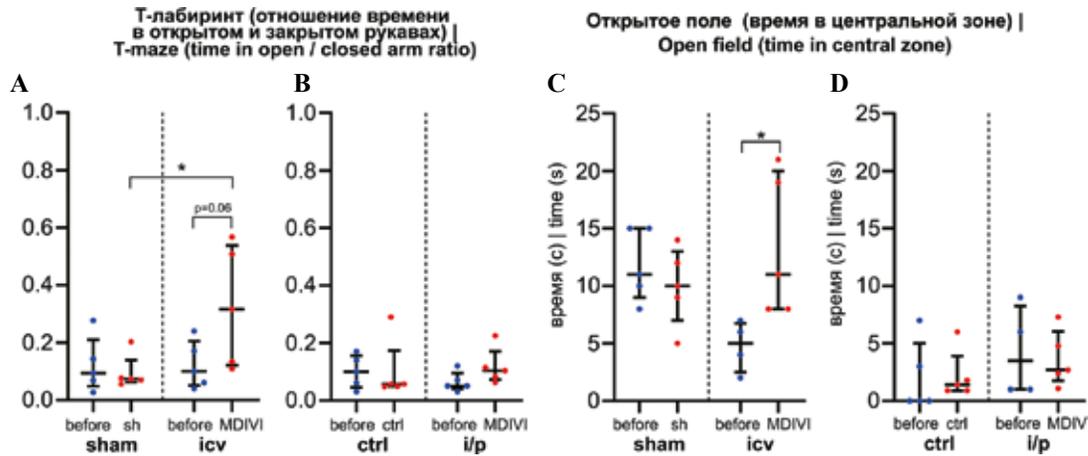


Рис. 5. Изменения поведенческих показателей животных, получавших mdivi-1, в тестах «Т-образный лабиринт» и «Открытое поле».

А – изменения соотношения времени, проведенного животным в открытом и закрытом рукавах Т-образного лабиринта в эксперименте с внутривенным введением mdivi-1. \* –  $p < 0,05$ , тест Манна–Уитни,  $p = 0,06$  – тест Вилкоксона.

В – изменения соотношения времени, проведенного животным в открытом и закрытом рукавах Т-образного лабиринта в эксперименте с внутривенным введением mdivi-1. С – изменения времени, проведенного животным в центральной зоне открытого поля в эксперименте с внутривенным введением mdivi-1\* –  $p < 0,05$ , тест Вилкоксона.

Д – изменения времени, проведенного животным в центральной зоне открытого поля в эксперименте с внутривенным введением mdivi-1.

Обозначения как на рис. 1, before – животные до введения носителя или mdivi-1

Fig. 5. Changes in behavioral parameters of animals with mdivi-1 injections in the T-maze and open-field tests.

А – changes in time spent by an animal with an intraperitoneal mdivi-1 injection in the open and enclosed arms of the T-maze.

\* –  $p < 0,05$ , Mann-Whitney test,  $p = 0,06$ , Wilcoxon test. В – changes in time spent by an animal with an intraperitoneal mdivi-1 injection in the open and enclosed arms of the T-maze. С – changes in time spent by an animal with an intraperitoneal mdivi-1 injection in the central area of the open field\* –  $p < 0,05$ , Wilcoxon test. D – changes in time spent by an animal with intraperitoneal mdivi-1 injection in the central zone of the open field.

Designations as in Figure 1, before – figures shown by animals before a solvent or mdivi-1 administration

Таким образом, при интрацеребровентрикулярном введении mdivi-1 наблюдалась тенденция к увеличению времени нахождения в открытом рукаве в Т-образном лабиринте и в центральной зоне в тесте «Открытое поле», что свидетельствует о снижении тревожности животных.

## Обсуждение

Согласно полученным результатам, mdivi-1 влияет на поведение животных при внутривенном введении и многосторонне воздействует на нейроны гранулярного слоя гиппокампа при обоих способах введения – внутривенном и внутривенном. Введение mdivi-1 подавляло нейрогенез и дифференцировку нейронов в ЗИ, при этом оказывало разнонаправленное действие на синаптические белки SYP и PSD95. Мы не обнаружили изменений экспрессии или локализации белков митохондриальных комплексов I и II (NDUFS3 и SDHB), но выявили влияние mdivi-1 на размеры митохондрий лишь в группе, получавшей внутривенные инъекции. В связи с тем, что сведения о метаболизме и фармакокинетике mdivi-1 в литературе не представлены, неясно, являются ли выявленные в нашей работе отсроченные изменения размеров митохондрий результатом непосредственного блокирования связывания mdivi-1 и Drp1 или это вторичные явления. В дополнение к этому обнаруженное

снижение интенсивности окрашивания на субъединицу АТФ-синтазы АТР5Н указывает на воздействие mdivi-1 на дыхательную цепь митохондрий.

Работы последних лет демонстрируют роль митохондрий в нейрогенезе [4]. Дифференцировка нейральных стволовых клеток, их созревание и миграция сопровождаются активацией деления митохондрий и переключением метаболизма с гликолиза на окислительное фосфорилирование, что обусловлено возрастными потребностями клеток в АТФ [4]. При этом изменения активности комплексов дыхательной цепи митохондрий связаны с балансом митохондриальной динамики, что предполагает ключевую роль слияния и деления митохондрий в определении судьбы клеток.

Обнаруженное нами снижение уровня нейрогенеза в субгранулярной зоне гиппокампа под действием mdivi-1, очевидно, связано с его влиянием на митохондриальные процессы. Вместе с тем действие mdivi-1 на эти органеллы неоднозначно. Основной акцент в изучении активности mdivi-1 как потенциально высокоспецифичного ингибитора ГТФазы Drp1 был сделан на подавление патологической фрагментации митохондрий [11, 15]. В более поздних работах описаны непосредственное связывание и ингибирующий эффект mdivi-1 в отношении митохондриального комплекса I, приводящий к снижению продукции АТФ [12, 13].

Так, в работе N. Marx et al. [13] показано, что *mdivi-1* нарушает сборку комплекса I митохондрий и респираторных суперкомплексов, необходимых для эффективного транспорта электронов. Мы не выявили изменений иммуноокрашивания комплекса I, но обнаружили снижение интенсивности окрашивания на АТФ-синтазу, что может объясняться описанными N. Marx et al. нарушениями работы электрон-транспортной цепи, нарушением продукции АТФ и гомеостаза  $Ca^{2+}$  под действием *mdivi-1*. Отметим, что показанное в нашей работе отсутствие изменений в интенсивности флуоресценции при выявлении NDUF3 не исключает образование дефектных форм комплекса I, как это было продемонстрировано в [13].

Обе предполагаемые мишени *mdivi-1* – как комплекс I митохондрий, так и *Drp1* – тесно связаны с дифференцировкой нейрональных предшественников. Известно, что изменения митохондриальной динамики в дифференцирующихся нейронах сопровождаются увеличением экспрессии *Drp1* [19, 22], а его нокаут подавляет нейрогенез и нарушает дифференцировку нейронов [23]. Было показано, что индукция слияния митохондрий с помощью *mdivi-1* вскоре после деления нейрональных стволовых клеток блокирует их дальнейшую дифференцировку [5]. Другим важным аспектом влияния *Drp1* как мишени для *mdivi-1* может быть его участие в регуляции биогенеза пероксисом [24].

Для нейрональных предшественников в субвентрикулярной зоне ранее описано снижение миграции под действием *mdivi-1*, что согласуется с нашими результатами для субгранулярной зоны гиппокампа. Так, в работе H.J. Kim et al. [22] описано, что миграция нейрональных предшественников сопровождается энергетически зависимым ремоделированием цитоскелета, с чем связана локализация митохондрий у переднего полюса дифференцирующихся нейронов, а ингибирование *Drp1* приводит к перинуклеарной конденсации митохондрий и нарушает миграцию клеток-предшественников. Слияние митохондрий и увеличение их размеров могут препятствовать изменению их распределения в клетке и нарушать миграцию нейрональных предшественников [22]. Эти результаты согласуются с нашими данными об образовании кластеров DCX+ клеток в субгранулярной зоне гиппокампа после введения *mdivi-1*.

Поскольку *Drp1*-зависимая фрагментация митохондрий связана с поздними стадиями апоптоза, возникает вопрос о влиянии *mdivi-1* на нейрогенез через антиапоптотические механизмы. Участие *Drp1* в индукции апоптоза дифференцирующихся клеток неоднозначно, например в плюрипотентных стволовых клетках оверэкспрессия *Drp1* предотвращала апоптоз, усиливая митофагию, и наоборот, при их дифференцировке уменьшение активности *Drp1* снижало митофагию и усиливало апоптоз [25]. Работ, посвященных влиянию *mdivi-1* на апоптоз в гранулярной извилине гиппокампа в норме, мы не обнаружили, хотя есть данные о снижении под действием *mdivi-1* апоптоза ней-

рональных предшественников на генетической модели болезни Дауна [26] и уменьшении активации каспазы-3 наряду со снижением высвобождения цитохрома-С в культуре нейрональных стволовых клеток при окислительном стрессе [27]. Кроме того, в литературе обсуждается роль апоптотических белков для обеспечения специфических нейрональных процессов, например участие каспаз в росте и прунинге аксонов и синаптической пластичности [28]. *mdivi-1*, ингибируя *Drp1*, вероятно, может действовать на эти процессы, влияя и на регуляцию апоптотических каскадов.

При нейрогенезе в зрелом мозге важную роль играет отбор нейронов путем апоптоза при их включении в уже существующие нейронные сети. По-видимому, в связи с этим на этапе дифференцировки и раннего синаптогенеза отмечается потеря 30–70% незрелых нейронов в нейрогенных зонах в зрелом мозге грызунов [29]. По данным оценки нейрогенеза, в зрелом мозге крыс количество BrdU+ клеток в зубчатой извилине наиболее выражено снижается начиная со 2-й недели после введения BrdU, достигая 62% от начального количества к 4-й неделе, после чего не меняется [30]. Снижение числа NeuN- (незрелых) клеток происходит между 1-й и 4-й неделями, причем наибольшее снижение отмечается до 2-й недели, а к четырем неделям NeuN- клеток не остается. Прирост числа NeuN+ нейронов происходит в аналогичном объеме и временном интервале, что указывает на то, что многие NeuN клетки в этот период дифференцируются в нейроны [30].

Таким образом, усиление деления митохондрий в нейрональных предшественниках, связанное с переключением клеток с гликолиза на окислительное фосфорилирование, а также на более поздних этапах с ростом дендритов [31], по-видимому, предшествует этапу наиболее выраженной апоптотической гибели вновь образованных нейронов. Можно предположить, что вероятное снижение под действием *mdivi-1* уровня апоптоза и его нейропротективное действие нивелировались в нашем эксперименте нарушениями на более ранних этапах нейрогенеза, ассоциированными с ремоделированием митохондрий, а также влиянием *mdivi-1* на митохондриальные комплексы, что приводило к выявленному снижению плотности DCX+ нейрональных предшественников и количества NeuN+/BrdU+ клеток в гранулярном слое. Оценка влияния *mdivi-1* на апоптоз в нейрогенных нишах и регуляцию численности вновь образованных нейронов требует дальнейших исследований.

Чтобы оценить влияние *mdivi-1* на созревание нейронов гранулярного слоя, мы провели анализ выраженности ветвления дендритов DCX+ клеток в молекулярном слое. В нейронах гранулярного слоя ЗИ гиппокампа наиболее многочисленными и сложно организованными являются митохондрии дендритных шипиков, что, вероятно, обусловлено их участием в обеспечении синаптической передачи. Показано, что в ходе постнатального нейрогенеза в ЗИ дендритные митохондрии изначально фрагментированы [32], что может быть

необходимо для их распределения вдоль растущих дендритов. По мере интеграции вновь образованных нейронов в существующие нейрональные сети происходит усложнение формы митохондрий. В нашем исследовании морфологическая оценка DCX<sup>+</sup> предшественников показала снижение количества DCX<sup>+</sup> клеток с длинными, разветвленными дендритами под влиянием mdivi-1, что указывает на нарушения формирования фенотипа зрелых гранулярных нейронов.

Выявленные нами на морфологическом уровне изменения локализации и экспрессии синаптических белков дополняются данными литературы о влиянии mdivi-1 на синаптические процессы. Так, на экспериментальных моделях нейродегенеративных заболеваний выявляли повышение синаптической активности под действием mdivi-1, что связывают с восстановлением митохондриальных функций [17, 18]. Например, mdivi-1 снижал фрагментацию митохондрий и восстанавливал экзоцитоз синаптических везикул, сниженный под действием бета-амилоида [33]. Этим данным противоречит упомянутая ранее публикация N. Marx et al. [13], в которой в нормальных условиях выявили снижение нейротрансмиссии под влиянием mdivi-1.

Мы предполагаем, что влияние Drp1 на синаптическую передачу не ограничивается вкладом в аксональную биоэнергетику, что может приводить к неоднозначности в экспериментальных данных. Являясь потенциальной мишенью для mdivi-1, динаминподобный белок Drp1 помимо обеспечения деления митохондрий участвует в механизмах эндоцитоза и оборота синаптических везикул, что подтверждают многочисленные исследования на генетических моделях. Кроме того, вызывает интерес сообщение о различии влияния mdivi-1 на морфологию митохондрий нейронов и астроцитов, что может иметь значение для глияльной поддержки нейротрансмиссии [34]. У мышей с дефицитом Drp1 были снижены синаптическая передача нейронов гиппокампа и биоэнергетические функции аксональных митохондрий [35, 36], уменьшалось число пресинаптических митохондрий и наблюдалась потеря дендритных шипиков [37]. При этом в более ранней работе у гетерозиготных нокаутных по Drp1 мышей изменения локализации и экспрессии синаптических белков не обнаружены [38]. Последнее не согласуется с выявленным нами снижением окрашивания на белок постсинаптической плотности PSD95 под действием mdivi-1 и подчеркивает, что результаты, получаемые на нокаутных животных, ограниченно применимы для объяснения эффектов фармакологического ингибирования Drp1 в силу компенсаторных процессов. Полученные в настоящей работе результаты могут объясняться как увеличением синтеза PSD95 в ответ на нарушения синаптической передачи, вызываемой mdivi-1, так и структурными изменениями области постсинаптического уплотнения, что требует дальнейших исследований.

По недавно опубликованным данным [39], активация Drp1 необходима для созревания синапсов.

Согласно ряду работ, Drp1 вносит вклад в формирование везикулярного пула в развивающихся синапсах и регулирует оборот синаптических везикул в пресинаптических и постсинаптических окончаниях гиппокампальных нейронов [16, 40]. Эти работы на нокаутных по Drp1 животных, демонстрирующие нарушение оборота синаптических везикул при недостаточности Drp1, согласуются с данными N. Marx et al. [13], которыми на культуре нейронов было показано снижение под действием mdivi-1 нейрональной активности и экспрессии синтаксина-4, белка SNARE комплекса, обеспечивающего слияние везикул с пресинаптической мембраной. Впрочем, последние авторы объясняют нарушением энергетической функции митохондрий, а не влиянием mdivi-1 на везикулярный эндоцитоз.

Снижение иммуноокрашивания на синаптофизин, выявленное в нашей работе, может быть ассоциировано с влиянием mdivi-1 как на эндоцитоз везикул, так и на аксональную энергетику. Помимо этого, обнаруженное снижение синаптофизина в молекулярном слое может быть связано с уменьшением нейрогенеза и синаптогенеза нейронов гиппокампа.

Наряду с морфологическими изменениями mdivi-1 в проведенном исследовании оказывал влияние на тревожноподобное поведение грызунов. При интравентрикулярном введении mdivi-1 наблюдалась тенденция к увеличению времени нахождения в открытом рукаве в Т-образном лабиринте и центральной зоне в тесте «Открытое поле», что свидетельствует о снижении тревожности. Важно отметить, что при интраперитонеальном введении mdivi-1 такой эффект не наблюдался, что может быть связано с различиями в биодоступности mdivi-1 для структур мозга при разных способах введения и в целом подтверждается данными нашего исследования, в котором ряд изменений наблюдался в группе, получавшей mdivi-1 интраперитонеально, только на уровне тенденции. При этом наблюдаемые эффекты mdivi-1 на поведение не сопровождалось изменениями в общей двигательной активности животных, что исключает возможность седативного действия препарата. Эти результаты согласуются с данными других немногочисленных исследований влияния mdivi-1 на поведение. Так, в работе по моделированию черепно-мозговой травмы указано [41], что внутрибрюшинное введение mdivi-1 контрольным животным не вызывало изменений в пройденной дистанции в тесте «Открытое поле».

Что касается влияния нокаута Drp1 на поведение, при частичном нокауте у мышей не было обнаружено отличий в двигательной активности и тесте распознавания объекта [42], а в другой работе [43] описаны различия нокаутных животных от мышей дикого типа по показателям в тесте Морриса, что может указывать на изменения функций гиппокампа. Интересно, что воздействие mdivi-1 отличалось по поведенческим эффектам от менее селективного ингибитора Drp1 – динасора (Dynasore), ингибитора ГТФаз, для которого показаны сходные с mdivi-1 антиоксидативные и нейропротек-

торные эффекты, а также подавление нейрональной миграции [44, 45]. Введение динасора в стриатум ослабляло двигательную активность мышей в тесте «Открытое поле», но не влияло на тревожноподобное поведение [45]. Различия в эффектах mdivi-1 и динасора могут объясняться тем, что динасор ингибирует действие и других ГТФаз, участвующих в различных клеточных процессах.

Таким образом, в проведенном исследовании удалось продемонстрировать влияние mdivi-1 на митохондрии нейронов гранулярного слоя ЗИ гиппокампа, снижение нейрогенеза и дифференцировки нейрональных предшественников в субгранулярной зоне гиппокампа под действием mdivi-1, что сопровождалось изменениями иммуноокрашивания на синаптические белки в ЗИ гиппокампа, а также изменениями поведения животных.

Эффекты краткосрочного применения mdivi-1 сохранялись через 14 дней, а снижение дифференцировки нейрональных предшественников в гиппокампе незначительно зависело от способа введения препарата. Нельзя исключить, что помимо непосредственного влияния mdivi-1 выявленные перестройки синаптических структур в гиппокампе объясняются и ответом на подавление нейрогенеза в ЗИ, что требует дальнейшего изучения.

## Заключение

Множественность эффектов mdivi-1 и его влияние на нейрогенез следует учитывать при рассмотрении этого и подобных ингибиторов Drp1 в качестве потенциальных фармакологических препаратов и нейрорепротекторов при неврологических заболеваниях. Как показало наше исследование, ингибирование Drp1 вызывает перестройки биоэнергетики и морфологии митохондрий, изменяет организацию синаптических структур в гиппокампе, оказывает воздействие на дифференцировку и созревание нейронов, что может существенно влиять на ожидаемые эффекты препаратов, направленных на регуляцию митохондриальной динамики.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Д.Н. Воронков, А.В. Ставровская, А.В. Егорова, А.К. Павлова, Е.Н. Федорова, В.С. Сухоруков.

Сбор и обработка материала – Д.Н. Воронков, А.В. Ставровская, А.К. Павлова, А.В. Егорова, Е.Н. Федорова, М.С. Рябова.

Написание текста – Д.Н. Воронков, Е.Н. Федорова, А.В. Егорова, А.К. Павлова.

Редактирование – В.С. Сухоруков, Д.Н. Воронков.

## Author contribution

Conceived the study and designed the experiment – D.N. Voronkov, A.V. Stavrovskaya, A.V. Egorova, A.K. Pavlova, E.N. Fedorova, V.S. Sukhorukov.

Collected the data and performed the analysis – D.N. Voronkov, A.V. Stavrovskaya, A.K. Pavlova, A.V. Egorova, E.N. Fedorova, M.S. Ryabova.

Wrote the paper – D.N. Voronkov, E.N. Fedorova, A.V. Egorova, A.K. Pavlova.

Edited the manuscript – V.S. Sukhorukov, D.N. Voronkov.

## Благодарность

Авторы выражают благодарность Алине Вадимовне Чаплыгиной, научному сотруднику Института биофизики клетки Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального исследовательского центра «Пушчинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», за помощь в проведении исследования.

## Acknowledgements

The authors would like to thank Alina Vadimovna Chaplygina, Research Associate at the Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, a separate division of Federal Research Center “Pushchino Research Center for Biological Studies, Russian Academy of Sciences” for her assistance in conducting the study.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Disclosure.** The authors declare no conflict of interest.

## Литература/References

1. Chen W, Zhao H, Li Y. Mitochondrial dynamics in health and disease: mechanisms and potential targets. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8(1):333. DOI: 10.1038/s41392-023-01547-9.
2. Fedorova EN, Egorova AV, Voronkov DN, Mudzhiri NM, Baranich TI, Glinkina VV et al. DRP1 regulation as a potential target in hypoxia-induced cerebral pathology. *J Mol Pathol.* 2023;4(4):333–48. DOI: 10.3390/jmp4040027.
3. Choi HW, Kim JH, Chung MK, Hong YJ, Jang HS, Seo BJ et al. Mitochondrial and metabolic remodeling during reprogramming and differentiation of the reprogrammed cells. *Stem Cells Dev.* 2015;24(11):1366–73. DOI: 10.1089/scd.2014.0561.
4. Khacho M, Slack RS. Mitochondrial dynamics in the regulation of neurogenesis: from development to the adult brain. *Dev Dyn.* 2018;247(1):47–53. DOI: 10.1002/dvdy.24538.
5. Iwata R, Casimir P, Vanderhaeghen P. Mitochondrial dynamics in postmitotic cells regulate neurogenesis. *Science.* 2020;369(6505):858–62. DOI: 10.1126/science.aba9760.
6. Kleele T, Rey T, Winter J, Zaganelli S, Mahecic D, Perreten Lambert H et al. Distinct fission signatures predict mitochondrial degradation or biogenesis. *Nature.* 2021;593(7859):435–9. DOI: 10.1038/s41586-021-03510-6.
7. Tagaya M, Arasaki K. Regulation of mitochondrial dynamics and autophagy by the mitochondria-associated membrane. *Adv Exp Med Biol.* 2017;997:33–47. DOI: 10.1007/978-981-10-4567-7\_3.
8. Luo TT, Dai CQ, Wang JQ, Wang ZM, Yang Y, Zhang KL et al. Drp1 is widely, yet heterogeneously, distributed in the mouse central nervous system. *Mol Brain.* 2020;13(1):90. DOI: 10.1186/s13041-020-00628-y.
9. Егорова А.В., Воронков Д.Н., Федорова Е.Н., Баранич Т.И., Глинкина В.В., Сухоруков В.С. Особенности строения и функции митохондрий в нейронах и глиоцитах различных отделов головного мозга лабораторных грызунов. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2023;12(2):5–13. DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.5-13.
10. Egorova AV, Voronkov DN, Fedorova EN, Baranich TI, Glinkina VV, Sukhorukov VS. Structural and functional features of mitochondria in neurons and gliocytes of various cerebral regions of laboratory rodents. *Clinical and experimental morphology.* 2022;12(2):5–13. DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.5-13.
11. Cassidy-Stone A, Chipuk JE, Ingeman E, Song C, Yoo C, Kuwana T et al. Chemical inhibition of the mitochondrial divi-

- sion dynamin reveals its role in bax/bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Dev Cell*. 2008;14(2):193–204. DOI: 10.1016/j.devcel.2007.11.019.
11. Liu X, Song L, Yu J, Huang F, Li Y, Ma C. Mdivi-1: a promising drug and its underlying mechanisms in the treatment of neurodegenerative diseases. *Histol Histopathol*. 2022;37(6):505–12. DOI: 10.14670/HH-18-443.
  12. Bordt EA, Zhang N, Waddell J, Polster BM. The non-specific Drp1 inhibitor mdivi-1 has modest biochemical antioxidant activity. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(3):450. DOI: 10.3390/antiox11030450.
  13. Marx N, Ritter N, Disse P, Seebohm G, Busch KB. Detailed analysis of Mdivi-1 effects on complex I and respiratory supercomplex assembly. *Sci Rep*. 2024;14(1):19673. DOI: 10.1038/s41598-024-69748-y.
  14. Reddy PH, Reddy TP, Manczak M, Calkins MJ, Shirendeb U, Mao P. Dynamin-related protein 1 and mitochondrial fragmentation in neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev*. 2011;67(1-2):103–18. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2010.11.004.
  15. Nhu NT, Li Q, Liu Y, Xu J, Xiao SY, Lee SD. Effects of Mdivi-1 on neural mitochondrial dysfunction and mitochondria-mediated apoptosis in ischemia-reperfusion injury after stroke: a systematic review of preclinical studies. *Front Mol Neurosci*. 2021;14:778569. DOI: 10.3389/fnmol.2021.778569.
  16. Li H, Alavian KN, Lazrove E, Mehta N, Jones A, Zhang P et al. A Bcl-xL–Drp1 complex regulates synaptic vesicle membrane dynamics during endocytosis. *Nat Cell Biol*. 2013;15(7):773–85. DOI: 10.1038/ncb2791.
  17. Bido S, Soria FN, Fan RZ, Bezard E, Tieu K. Mitochondrial division inhibitor-1 is neuroprotective in the A53T- $\alpha$ -synuclein rat model of Parkinson's disease. *Sci Rep*. 2017;7(1):7495. DOI: 10.1038/s41598-017-07181-0.
  18. Wang W, Yin J, Ma X, Zhao F, Siedlak SL, Wang Z et al. Inhibition of mitochondrial fragmentation protects against Alzheimer's disease in rodent model. *Hum Mol Genet*. 2017;26(21):4118–31. DOI: 10.1093/hmg/ddx299.
  19. Voronkov DN, Egorova AV, Fedorova EN, Stavrovskaya AV, Lebedeva OS, Olshanskiy AS et al. Mitochondrial dynamics and metabolic remodeling in a xenograft of human iPSC-derived neural precursors. *J Evol Biochem Physiol*. 2024;60(3):920–9. DOI: 10.1134/S0022093024030062.
  20. Kendall TJ, Duff CM, Thomson AM, Iredale JP. Integration of geoscience frameworks into digital pathology analysis permits quantification of microarchitectural relationships in histological landscapes. *Sci Rep*. 2020;10(1):17572. DOI: 10.1038/s41598-020-74691-9.
  21. Plümpe T, Ehninger D, Steiner B, Klempin F, Jessberger S, Brandt M et al. Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC Neurosci*. 2006;7:77. DOI: 10.1186/1471-2202-7-77.
  22. Kim HJ, Shaker MR, Cho B, Cho HM, Kim H, Kim JY et al. Dynamin-related protein 1 controls the migration and neuronal differentiation of subventricular zone-derived neural progenitor cells. *Sci Rep*. 2015;5:15962. DOI: 10.1038/srep15962.
  23. Vantaggiato C, Castelli M, Giovarelli M, Orso G, Bassi MT, Clementi E et al. The fine tuning of Drp1-dependent mitochondrial remodeling and autophagy controls neuronal differentiation. *Front Cell Neurosci*. 2019;13:120. DOI: 10.3389/fncel.2019.00120.
  24. Kamerkar SC, Kraus F, Sharpe AJ, Pucadyil TJ, Ryan MT. Dynamin-related protein 1 has membrane constricting and severing abilities sufficient for mitochondrial and peroxisomal fission. *Nat Commun*. 2018;9(1):5239. DOI: 10.1038/s41467-018-07543-w.
  25. Pernaute B, Pérez-Montero S, Sánchez Nieto JM, Di Gregorio A, Lima A, Lawlor K et al. DRP1 levels determine the apoptotic threshold during embryonic differentiation through a mitophagy-dependent mechanism. *Dev Cell*. 2022;57(11):1316–30.e7. DOI: 10.1016/j.devcel.2022.04.020.
  26. Valenti D, Rossi L, Marzulli D, Bellomo F, De Rasmio D, Signorile A et al. Inhibition of Drp1-mediated mitochondrial fission improves mitochondrial dynamics and bioenergetics stimulating neurogenesis in hippocampal progenitor cells from a Down syndrome mouse model. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017;1863(12):3117–27. DOI: 10.1016/j.bbdis.2017.09.014.
  27. Kim S, Kim C, Park S. Mdivi-1 protects adult rat hippocampal neural stem cells against palmitate-induced oxidative stress and apoptosis. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9):1947. DOI: 10.3390/ijms18091947.
  28. Hollville E, Romero SE, Deshmukh M. Apoptotic cell death regulation in neurons. *FEBS J*. 2019;286(17):3276–98. DOI: 10.1111/febs.14970.
  29. Ryu JR, Hong CJ, Kim JY, Kim EK, Sun W, Yu SW. Control of adult neurogenesis by programmed cell death in the mammalian brain. *Mol Brain*. 2016;9:43. DOI: 10.1186/s13041-016-0224-4.
  30. Snyder JS, Choe JS, Clifford MA, Jeurling SI, Hurley P, Brown A et al. Adult-born hippocampal neurons are more numerous, faster maturing, and more involved in behavior in rats than in mice. *J Neurosci*. 2009;29(46):14484–95. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1768-09.2009.
  31. Bonzano S, Dallorto E, Bovetti S, Studer M, De Marchis S. Mitochondrial regulation of adult hippocampal neurogenesis: insights into neurological function and neurodevelopmental disorders. *Neurobiol Dis*. 2024;199:106604. DOI: 10.1016/j.nbd.2024.106604.
  32. Kochan SMV, Malo MC, Jevtic M, Jahn-Kelleter HM, Wani GA, Ndoci K et al. Enhanced mitochondrial fusion during a critical period of synaptic plasticity in adult-born neurons. *Neuron*. 2024;112(12):1997–2014.e6. DOI: 10.1016/j.neuron.2024.03.013.
  33. Baek SH, Park SJ, Jeong JI, Kim SH, Han J, Kyung JW et al. Inhibition of Drp1 ameliorates synaptic depression, A $\beta$  deposition, and cognitive impairment in an Alzheimer's disease model. *J Neurosci*. 2017;37(20):5099–110. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2385-16.2017.
  34. Chaplygina AV, Zhdanova DY. Effects of mitochondrial fusion and fission regulation on mouse hippocampal primary cultures: relevance to Alzheimer's disease. *Aging Pathobiol Ther*. 2024;6(1):08–17. DOI: 10.31491/APT.2024.03.132.
  35. Shields LY, Kim H, Zhu L, Haddad D, Berthet A, Pathak D et al. Dynamin-related protein 1 is required for normal mitochondrial bioenergetic and synaptic function in CA1 hippocampal neurons. *Cell Death Dis*. 2015;6(4):e1725. DOI: 10.1038/cddis.2015.94.
  36. Divakaruni SS, van Dyke AM, Chandra R, LeGates TA, Contreras M, Dharmasri PA et al. Long-term potentiation requires a rapid

- burst of dendritic mitochondrial fission during induction. *Neuron*. 2018;100(4):860–75.e7. DOI: 10.1016/j.neuron.2018.09.025.
37. Park G, Lee JY, Han HM, An HS, Jin Z, Jeong EA et al. Ablation of dynamin-related protein 1 promotes diabetes-induced synaptic injury in the hippocampus. *Cell Death Dis*. 2021;12(5):445. DOI: 10.1038/s41419-021-03723-7.
  38. Manczak M, Sesaki H, Kageyama Y, Reddy PH. Dynamin-related protein 1 heterozygote knockout mice do not have synaptic and mitochondrial deficiencies. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822(6):862–74. DOI: 10.1016/j.bbadis.2012.02.017.
  39. Gao Q, Tian R, Han H, Slone J, Wang C, Ke X et al. PINK1-mediated Drp1<sup>S616</sup> phosphorylation modulates synaptic development and plasticity via promoting mitochondrial fission. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):103. DOI: 10.1038/s41392-022-00933-z.
  40. Itoh K, Murata D, Kato T, Yamada T, Araki Y, Saito A et al. Brain-specific Drp1 regulates postsynaptic endocytosis and dendrite formation independently of mitochondrial division. *Elife*. 2019;8:e44739. DOI: 10.7554/eLife.44739.
  41. Song Y, Li T, Liu Z, Xu Z, Zhang Z, Chi L et al. Inhibition of Drp1 after traumatic brain injury provides brain protection and improves behavioral performance in rats. *Chem Biol Interact*. 2019;304:173–85. DOI: 10.1016/j.cbi.2019.03.013.
  42. Fan RZ, Sportelli C, Lai Y, Salehe SS, Pinnell JR, Brown HJ et al. A partial Drp1 knockout improves autophagy flux independent of mitochondrial function. *Mol Neurodegener*. 2024;19(1):26. DOI: 10.1186/s13024-024-00708-w.
  43. Kandimalla R, Manczak M, Pradeepkiran JA, Morton H, Reddy PH. A partial reduction of Drp1 improves cognitive behavior and enhances mitophagy, autophagy and dendritic spines in a transgenic Tau mouse model of Alzheimer disease. *Hum Mol Genet*. 2022;31(11):1788–805. DOI: 10.1093/hmg/ddab360.
  44. Chen Y, Xu S, Wang N, Ma Q, Peng P, Yu Y et al. Dynasore suppresses mTORC1 activity and Induces autophagy to regulate the clearance of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Neurotox Res*. 2019;36(1):108–16. DOI: 10.1007/s12640-019-00027-9.
  45. Feng ST, Wang ZZ, Yuan YH, Wang XL, Guo ZY, Hu JH et al. Inhibition of dynamin-related protein 1 ameliorates the mitochondrial ultrastructure via PINK1 and Parkin in the mice model of Parkinson's disease. *Eur J Pharmacol*. 2021;907:174262. DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.174262.

#### Информация об авторах

Дмитрий Николаевич Воронков – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории нейроморфологии Научного центра неврологии.

Алла Вадимовна Ставровская – кандидат биологических наук, заведующая лабораторией экспериментальной патологии нервной системы и фармакологии Научного центра неврологии.

Анастасия Кирилловна Павлова – лаборант-исследователь лаборатории экспериментальной патологии нервной системы и фармакологии Научного центра неврологии.

Анна Валериевна Егорова – кандидат медицинских наук, доцент, научный сотрудник лаборатории нейроморфологии Научного центра неврологии, доцент кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

Евгения Николаевна Федорова – лаборант-исследователь лаборатории нейроморфологии Научного центра неврологии, ассистент кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

Мария Сергеевна Рябова – лаборант-исследователь лаборатории нейроморфологии Научного центра неврологии.

Владимир Сергеевич Сухоруков – доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией нейроморфологии Научного центра неврологии, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

#### Author information

Dmitry N. Voronkov – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Neuromorphology, Research Center of Neurology. <https://orcid.org/0000-0001-5222-5322>

Alla V. Stavrovskaya – Cand. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Experimental Pathology of Nervous System and Neuropharmacology, Research Center of Neurology. <https://orcid.org/0000-0002-8689-0934>

Anastasia K. Pavlova – Research Assistant, Laboratory of Experimental Pathology of Nervous System and Neuropharmacology, Research Center of Neurology. <https://orcid.org/0009-0006-5653-5524>

Anna V. Egorova – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Researcher, Laboratory of Neuromorphology, Research Center of Neurology; Associate Professor, Department of Histology, Embryology and Cytology, Pirogov Russian National Research Medical University. <https://orcid.org/0000-0001-7112-2556>

Evgenia N. Fedorova – Research Assistant, Laboratory of Neuromorphology, Research Center of Neurology; Assistant, Department of Histology, Embryology and Cytology, Pirogov Russian National Research Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-2128-9056>

Maria S. Ryabova – Research Assistant, Laboratory of Neuromorphology, Research Center of Neurology. <https://orcid.org/0009-0003-5596-7630>

Vladimir S. Sukhorukov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Laboratory of Neuromorphology, Research Center of Neurology; Professor, Department of Histology, Embryology and Cytology, Pirogov Russian National Research Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-0552-6939>