АКТИВНІСТЬ СУКЦИНАТДЕГІДРОГЕНАЗИ МІТОХОНДРІЙ ПЕЧІНКИ ТВАРИН-РЕЦИПІЄНТІВ ЗА ВПЛИВУ АЛОГЕННИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

- Л. В. КЛАДНИЦЬКА**, кандидат ветеринарних наук,
доцент кафедри біохімії і фізіології тварин ім. акад. М. Ф. Гулого,
<https://orcid.org/0000-0002-9360-0587>
Національний університет біоресурсів і природокористування України
- А. Й. МАЗУРКЕВИЧ**, доктор ветеринарних наук, професор кафедри хірургії
і патофізіології ім. акад. І. О. Поваженка,
<http://orcid.org/0000-0002-2409-7703>
Національний університет біоресурсів і природокористування України
- В. А. ТОМЧУК**, доктор ветеринарних наук, завідувач кафедри біохімії
і фізіології тварин ім. акад. М. Ф. Гулого,
<https://orcid.org/0000-0002-9009-5554>
Національний університет біоресурсів і природокористування України
- Л. В. ГАРМАНЧУК**, доктор біологічних наук, професор кафедри біомедицини,
<http://orcid.org/0000-0002-1527-2346>
Національний університет імені Тараса Шевченка, навчально-науковий
центр «Інститут біології та медицини»
- М. О. МАЛЮК**, доктор ветеринарних наук, завідувач кафедри хірургії
і патофізіології ім. акад. І. О. Поваженка,
<http://orcid.org/0000-0003-3019-6035>
Національний університет біоресурсів і природокористування України
- Л. Г. КАЛАЧНЮК**, доктор біологічних наук, професор кафедри біохімії
і фізіології тварин ім. акад. М. Ф. Гулого,
<https://orcid.org/0000-0002-5545-8495>
Національний університет біоресурсів і природокористування України
- С. В. ВЕЛИЧКО**, кандидат біологічних наук, лікар ветеринарної медицини,
<https://orcid.org/0000-0003-1842-5114>
Лікарня ветеринарної медицини
- О. Л. ЛОЗОВА**, кандидат фармакологічних наук, доцент кафедри
фармацевтичної і біологічної хімії, фармакогнозії,
<https://orcid.org/0000-0002-9594-3815>
Київський медичний університет
- В. Б. ДАНИЛОВ**, кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри хірургії
і патофізіології ім. акад. І. О. Поваженка,

<https://orcid.org/0000-0002-2897-5235>

Національний університет біоресурсів і природокористування України
Ю. О. ХАРКЕВИЧ, кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри хірургії і
патофізіології ім. акад. І. О. Поваженка,
<http://orcid.org/0000-0002-7877-8272>

Національний університет біоресурсів і природокористування України
Т. А. ТКАЧЕНКО, кандидат біологічних наук, асистент кафедри біохімії і
фізіології тварин ім. акад. М. Ф. Гулого,
<https://orcid.org/0000-0002-7590-8879>

Національний університет біоресурсів і природокористування України
Р. Р. БОКОТЬКО, асистент кафедри хірургії і патофізіології
ім. акад. І. О. Поваженка,
<https://orcid.org/0000-0002-6217-5266>

Національний університет біоресурсів і природокористування України
Д. А. ШЕЛЕСТ, аспірант кафедри біохімії і фізіології тварин
ім. акад. М. Ф. Гулого,
<https://orcid.org/0000-0002-6920-5640>

Національний університет біоресурсів і природокористування України
E-mail: kladlarisa@ukr.net

Анотація. Дослідження проводили на самцях мишей C57BL/6 віком 2-3 місяці. Отримання алогенних мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) культури жирової тканини і кісткового мозку проводили за стерильних умов у боксі біологічної безпеки 2-го класу. Культури клітин культивували в CO₂ інкубаторі за температури 37 °C, 5 % CO₂ у середовищі DMEM з додаванням 10-15 % фетальної бичачої сироватки, 1 % антибіотика-антимікотика (Sigma-Aldrich, США). Сформовані наступні групи тварин: 1 група - інтактні (контрольні) тварини; 2 група – тварини, яким вводили 0,5 мл 0,89 % розчину NaCl (плацебо); 3 група – тварини, яким вводили 104 алогенних МСК культури жирової тканини в 0,5 мл фосфатного буферного розчину, 4 група – тварини, яким вводили 104 алогенних МСК культури кісткового мозку в 0,5 мл фосфатного буферного розчину. На 12-ту добу після трансплантації МСК у тварин сформованих груп визначали активність сукцинатдегідрогенази в мітохондріях печінки.

Визначення активності ферменту проводили у відповідності зі способом, принципом якого є відновлення феррицианіда калію (K₃[Fe(CN)₆]) до фероцианіда калію (K₄[Fe(CN)₆]) сукцинатом із залученням сукцинатдегідрогенази. Активність визначали за обсягом відновленого феррицианіда. Статистичну обробку результатів проводили з використанням програмного забезпечення "Origin 6.1" та t-критерію Стьюдента. Всі дані представлені у вигляді середніх арифметичних і стандартних відхилень.

Встановлено, що на 12-ту добу дослідження активність сукцинатдегідрогенази у третій дослідній групі становила 57,7 ± 1,6 ммоль / л K₃[Fe(CN)₆] / мг*хв (p < 0,001), що було достовірно вище, ніж у тварин першої та другої груп – 45,9 ± 0,7 і 43,3 ± 1,2 ммоль / л K₃[Fe(CN)₆] / мг*хв відповідно. Активність ферменту у тварин

четвертої експериментальної групи була також достовірно вищою порівняно з першими двома групами і становила $53,3 \pm 1,4$ ммоль/л $K_3[Fe(CN)_6]/мг \cdot хв$ ($p < 0,01$). Слід зазначити, що активність мітохондріальної сукцинатдегідрогенази в печінці тварин-реципієнтів після трансплантації МСК культури жирової тканини достовірно вища, ніж після трансплантації МСК культури кісткового мозку ($p < 0,05$).

Таким чином, було визначено достовірне підвищення активності мітохондріальної сукцинатдегідрогенази в печінці тварин-реципієнтів після трансплантації алогенних мезенхімальних стовбурових клітин з культури жирової тканини і кісткового мозку.

Ключові слова. мезенхімальні стовбурові клітини, мітохондрії, сукцинатдегідрогеназа, миші, кістковий мозок, жирова тканина

Актуальність

Всебічні дослідження імуномодуючих та протизапальних механізмів впливу мезенхімальних стовбурових клітин за експериментально змодельованих процесів проводяться на сучасному етапі розвитку клітинної біології. З літературних джерел відомо, що мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) стимулюють відновлення тканин у різних моделях захворювань, включаючи кардіоміопатію, легеневі ушкодження, церебральні ішемічні інсульти та нейродегенеративні порушення, такі як хвороба Альцгеймера та Паркінсона (Danielyan et al., 2014). Було запропоновано декілька механізмів, які опосередковують ці сприятливі ефекти МСК, включаючи пригнічення запалення і вивільнення факторів росту.

Аналіз останніх досліджень та публікацій

Мітохондрії являються цитоплазматичними органелами клітин і функціонують в якості енергетичних станцій для виробництва аденозинтрифосфату (АТФ). Однак, вони додатково беруть участь в різних

клітинних явищах, таких як апоптоз, клітинний цикл, проліферація, диференціювання, перепрограмування і старіння (McCloy et al., 2014). Зміна морфології мітохондрій тісно пов'язана з функціональністю мітохондрій. Останнім часом у літературі багато повідомлень про те, що передача здорових мітохондрій до пошкоджених клітин є важливим механізмом ендогенної регенерації (Ahmad et al., 2014). Наприклад, показано, що астроцити передають мітохондрії до нейронів після ішемічного інсульту у мишей (Donega et al., 2014; Hayakawa et al., 2016; Huo et al., 2018). Мітохондріальна дисфункція викликає старіння, втрату синаптичних нервових клітин і загибель клітин за багатьох неврологічних захворювань (Donega et al., 2013). МСК передають мітохондрії до кардіоміоцитів у моделі антрациклінової кардіоміопатії (Zhao et al., 2008), до альвеол за гострого ураження легенів та дихальних шляхів у мишей (Andres et al., 2014; Islam et al., 2012), до кортикальних нейронів у моделі церебрального інсульту (Babenko et al., 2015) та макрофагів, отриманих з моноцитів людини, а також мишачих альвеолярних макро-

фагів у моделях гострого респіраторного дистрес-синдрому (Nayakawa et al., 2016). За експериментально змодельованої черепно-мозкової травми в дослідних тварин було визначено, що внутрішньовенна трансплантація МСК викликала зміни у нервовій тканині, зменшення кількості макрофагів і периферичних інфільтративних лейкоцитів у мікроглії на місці пошкодження, зниження рівня прозапальних цитокінів і посиленням протизапальних цитокінів, можливо, опосередкованих посиленою експресією TSG-6, що може пригнічувати активацію NF-κB сигнального шляху (Galluzzi et al., 2012; Jackson et al., 2016; Zhang et al., 2013). Назальне введення МСК мишам, які отримували цисплатин, відновили когнітивну функцію і нормалізували функцію мітохондрій (Nabila Boukelmoun et al., 2018). Продемонстровано, що МСК також зменшують пошкодження головного мозку, спричинене опроміненням черепа (Kelland, 2007; Mahrouf-Yorgov et al., 2017).

Одним з основних маркерних ферментів мітохондрій, що задіяні в окисному фосфорилуванні, є сукцинатдегідрогеназа (СДГ). Зміна активності цього ферменту спряжена також із змінами регуляції клітинного циклу. Метаболічний фенотип клітин за різних патологій, які характеризуються зростанням мітотичної активності, пригніченням каскадів апоптичної загибелі, порушенням прооксидантно-антиоксидантної рівноваги (Maurodi, 2003), не можливий без змін структури та функцій мембран мітохондрій. Маркерним ферментом внутрішньоклітинної мембрани є сукцинатдегідрогеназа (СДГ) [КФ 1.3.99.1] або сукцинат-убіхінон-редуктаза – фермент класу оксидоре-

дуктаз, відомий також як комплекс II у дихальному ланцюзі мітохондрій. Фермент каталізує шосту реакцію циклу трикарбонових кислот (ЦТК) – окиснення дианіона бурштинової кислоти до дианіона фумарової кислоти. Природними акцепторами електронів у цій реакції виступають убіхінони, нафтохінони, неприродними – гексаціаноферат та ін. СДГ вищих організмів має здатність каталізувати також зворотню реакцію (фумаратредуктазу) – відновлення фумарової кислоти до сукцинату. Донорами у цій реакції є убіхіноли, флавінмононуклеотиди тощо (Sun, 2005; Han, 2017). Активність СДГ є маркерним параметром функціонального стану мітохондрій. Раніше нами було визначено вплив алогенних мезенхімальних клітин на активність основних ферментів в сироватці крові експериментальних тварин за умов пухлинного росту (Kladnytska et al., 2018). Порушення функції мітохондріальних ферментів в печінці може вказувати на загальний метаболічний синдром за даної патології.

Мета даного дослідження полягала у визначенні активності сукцинатдегідрогенази в мембранах мітохондрій, виділених із печінки експериментальних тварин-реципієнтів за впливу алогенних МСК.

Матеріали і методи дослідження

Усі дослідження на тваринах були проведені з дотриманням закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006 р.) та принципів «Міжнародної Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою нау-

ковою метою» (Страсбург, 1986). У досліджах використовували самців мишей C57Bl/6.

Отримання і культивування МСК із жирової тканини (МСК ЖТ) проводили в стерильному ламінарному боксі з дотриманням умов асептики і антисептики. Мишей піддавали евтаназії, зразки абдомінальної жирової тканини тричі промивали стерильним фосфатним буферним розчином з додаванням 1 % антибіотика-антимікотика (Sigma-Aldrich, США). Первинний матеріал поміщали в культуральні чашки, додавали середовище культивування DMEM, 10–15 % фетальної сироватки бичків, 1 % антибіотика-антимікотика (Sigma-Aldrich, США) і культивували в CO₂-інкубаторі за 37 °C і 5 % CO₂. Культуральне середовище частково або повністю змінювали кожні 3 доби під час культивування. Після утворення моношару на 80–90 % клітини переводили у суспензію розчином трипсину з етилендіамінтетраоцтовою кислотою, відмивали фосфатнобуферним розчином і поміщали в чашки Петрі для подальшого культивування. Для зниження гетерогенності культури проводили пасажування клітин 3–4 рази. Для трансплантації були використані МСК ЖТ 4 пасажу.

Для отримання і культивування МСК з кісткового мозку (МСК КМ) використовували червоний кістковий мозок мишей C57Bl/6. Усі маніпуляції проводили в стерильному ламінарному боксі з дотриманням умов асептики і антисептики. Після евтаназії в мишей відбирали стегнові і великі гомілкові кістки, тричі промивали стерильним фосфатним буферним розчином з додаванням 1 % антибіотика-антимікотика (Sigma-Aldrich, США). З діафізів вимивали червоний кістковий

мозок та поміщали в культуральні чашки, додавали середовище культивування DMEM, 10–15 % фетальної сироватки бичків, 1 % антибіотика-антимікотика (Sigma-Aldrich, США) і культивували в CO₂-інкубаторі за 37° C і 5 % CO₂. Культуральне середовище частково або повністю змінювали на кожні 3 доби під час культивування. Після утворення моношару на 80–90 %, клітини переводили у суспензію розчином трипсину з етилендіамінтетраоцтовою кислотою, відмивали фосфатнобуферним розчином і поміщали в чашки Петрі для подальшого культивування. Для зниження гетерогенності культури проводили пасажування клітин 3–4 рази. Для трансплантації були використані МСК КМ 4 пасажу.

Для проведення експерименту було сформовано наступні групи тварин: 1-ша група – інтактні тварини, 2-га група – тварини, яким було уведено 0,5 мл 0,89 % NaCl ($n = 5$), 3-тя група – тварини, яким було уведено 10⁴ МСК ЖТ у 0,5 мл фосфатно-буферного розчину ($n = 5$), 4-та група – тварини, яким було уведено 10⁴ МСК КМ у 0,5 мл фосфатно-буферного розчину ($n = 5$). На 12-ту добу тварин усіх груп евтаназували та отримували мітохондрії з тканини печінки.

Після евтаназії в тварин відбирали тканину печінки, промивали охолодженим (+ 4 °C) фізіологічним розчином та розтирали первинно у порцеляновій ступці. Процедура виділення проводили, використовуючи попередньо охолоджені реактиви, посуд та інструменти. Надалі тканину печінки поміщали у середовище виділення І (250 мМ сахароза, 3 мМ трилон Б, 20 мМ Трис-НСІ (рН 7,4 за 4 °C) із розрахунку 10 мл на 1 г тканини. Після центрифугування на

холоді за 1500 g протягом 15 хв надосадову рідину фільтрували через 3 шари марлі і центрифугували за 11000 g 20 хв для осадження мітохондрій. Супернатант обережно зливали, а отриманий осад ресуспендували в середовищі виділення II (250 мМ сахароза, 30 мМ Трис-НСІ (рН 7,4 за 4 °С) у невеликому об'ємі (близько 3 мл / 1г вихідної тканини), обережно невеликими порціями доводили об'єм до 10 мл. Далі проводили центрифугування за 11000g 20 хв. Отриманий осад мітохондрій обережно ресуспендували в 1 мл середовища II. Для одержання субмітохондріальних частинок (СМЧ) проводили процедуру дворазового заморожування-відтаювання суспензії мітохондрій, що призводило до порушення цілісності мітохондрій. Після відтаювання, суспензію гомогенізували в невеликому об'ємі середовища II, поступово доводили об'єм середовищем II до 50 мл і центрифугували за 25000-27000 g 30 хв. Осад, який містив фракцію СМЧ (везикули внутрішньої мембрани мітохондрій), ресуспендували в невеликому об'ємі середовища II і надалі використовували в дослідженнях. Аналіз чистоти СМЧ проводили біохімічним методом, оцінюючи активність сукцинатдегідрогенази (сукцинатоксидоредуктаза, КФ 1.3.99.1.) – маркерний фермент внутрішньої мембрани мітохондрій. Активність ферменту пропорційна кількості відновленого ферриціаніду. Реакція протікає за наступною схемою:

Активність сукцинатдегідрогенази визначали за кількістю відновленого в реакції з сукцинатом ферриціаніду калію ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) до

ферроціаніду калію ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) під дією ферменту.

В пробірки вносили середовище інкубації: 10 мМ фосфатного буферу (рН = 7,8), 5 мМ бурштинової кислоти, 1,25 мМ ЕДТА, 7,5 мМ натрію азиду. До проб додавали по 0,2 мг білка суспензії мітохондріальних мембран. Проби інкубували за кімнатної температури впродовж 5 хв для інгібування цитохромоксидази азидом натрію. Реакцію розпочинали додаванням до проб 1,25 мМ розчину калію ферриціаніду. Проби інкубували впродовж 10 хв за температури +30 °С. Після інкубації реакцію зупиняли зниженням температури проб до 0 °С шляхом опускання проб у лід і додаванням 0,1 % додецилсульфату натрію (ДСН). В контрольні проби, які містять всі компоненти інкубаційної суміші, ДСН додавали перед внесенням суспензії мітохондріальних мембран. Після зупинки реакції і охолодження проби фотометрували на спектрофотометрі СФ-46 за довжини хвилі 420 нм проти зразка з дистильованою водою. Для визначення вмісту ферриціаніду в пробах, що містили від 100 до 1000 мкг ферриціаніду в 4 мл розчину, будували калібрувальну криву. За різницею в показнику екстинції ($E_{\text{пр}} - E_{\text{к}}$), застосовуючи калібрувальну криву, розраховували кількість ферриціаніду, який відновлювався за час інкубації. Статистичну обробку результатів проводили з використанням «Origin 6,1» і t-критерія Стюдента. Усі дані приведені у вигляді середніх арифметичних та стандартних відхилень.

Результати та їх обговорення

В процесі культивування культури жирової тканини та кісткового мозку було отримано аlogenні МСК ЖТ та

Рис. 1. Мезенхімальні стовбурові клітини культури жирової тканини та кісткового мозку, 4 пасаж, х 100

МСК КМ четвертого пасажу від мишей C57Bl/6 (рис. 1). Клітини мали фібробластоподібну морфологію, у культурі клітини кісткового мозку зустрічалися клітини з трьома відростками.

За визначення маркерного ферменту мітохондріальних мембран в групах експериментальних тварин було показано підвищення активності СДГ в мітохондріях гепатоцитів тварин за впливу МСК з жирової тканини в 1,3 та МСК з кісткового мозку в 1,2 раза порівняно з групою інтактних тварин (табл. 1)

Було встановлено, що на 12-ту добу дослідження активність СДГ в тварин третьої дослідної групи складала $57,7 \pm 1,6$ мкмоль $K_3[Fe(CN)_6]$ / мг*хв ($p < 0,001$), що достовірно вище за показники тварин першої та другої

контрольних груп, які становили $45,9 \pm 0,7$ та $43,3 \pm 1,2$ мкмоль $K_3[Fe(CN)_6]$ / мг*хв відповідно.

Активність СДГ в тварин четвертої дослідної групи була достовірно вищою за показники контрольних груп і становила $53,3 \pm 1,4$ мкмоль $K_3[Fe(CN)_6]$ / мг*хв ($p < 0,01$).

Треба зазначити, що показник активності СДГ мітохондрій печінки тварин-реципієнтів за впливу МСК ЖТ достовірно вищий від такого за впливу МСК КМ ($p < 0,05$). На нашу думку такі результати можуть пояснюватися неоднаковим вмістом жирних кислот у ліпідах МСК КМ та МСК ЖТ. За даними (Sun, 2005), $\omega 3$ жирні кислоти гальмують проліферацію клітин, затримуючи їх у G1 фазі клітинного циклу. За результа-

1. Активність сукцинатдегідрогенази внутрішньої мембрани мітохондрій печінки тварин-реципієнтів за впливу алогенних мезенхімальних стовбурових клітин, $M \pm m$, $n = 25$, мкмоль $K_3[Fe(CN)_6]$ / мг*хв

Групи тварин	Інтактні тварини	тварини за введення 0,89% NaCl	тварини за введення МСК жирової тканини	тварини за введення МСК кісткового мозку
СДГ-активність	$45,9 \pm 0,7$	$43,3 \pm 1,2$	$57,7 \pm 1,6^{***\wedge\wedge}$	$53,3 \pm 1,4^{***\wedge\wedge}$

Примітка: * - $P < 0,05$, ** - $P < 0,01$, *** - $P < 0,001$ у порівнянні з показниками тварин інтактної групи; $\wedge$ - $P < 0,05$, $\wedge\wedge$ - $P < 0,01$, $\wedge\wedge\wedge$ - $P < 0,001$ – у порівнянні з показниками тварин, яким вводили 0,89 % NaCl.

тами попередніх наших досліджень достовірно вищим є вміст $\omega 3$ жирних кислот у ліпідах зразків МСК ЖТ, ніж в МСК КМ. Вміст $\omega 6$ жирних кислот у цих зразках, навпаки, достовірно нижчий.

Також це перебивається з особливостями перебігу клітинного циклу МСК ЖТ та МСК КМ. МСК ЖТ на пізніх пасажах характеризуються достовірно вищим вмістом клітин проліферативної фази на відміну від МСК КМ. Тоді як серед МСК КМ переважає вісотковий вміст клітин у фазі спокою.

На нашу думку, це може бути пов'язано з мітохондріальним транспортом від трансплантованих МСК до клітин печінки тварин-реципієнтів за трансплантації МСК ЖТ та МСК КМ.

Висновки і перспективи

Показано достовірне зростання активності сукцинатдегідрогенази внутрішніх мембран мітохондрій печінки тварин-реципієнтів за трансплантації алогенних мезенхімальних клітин з культури жирової тканини і кісткового мозку.

На 12-ту добу дослідження активність СДГ внутрішніх мембран мітохондрій печінки тварин-реципієнтів за трансплантації алогенних мезенхімальних клітин з жирової тканини становила $57,7 \pm 1,6$ ($p < 0,001$), проти контролю $45,9 \pm 0,7$ мкмоль $K_3[Fe(CN)_6]$ / мг*хв

На 12-ту добу дослідження активність СДГ внутрішніх мембран мітохондрій печінки тварин-реципієнтів за трансплантації алогенних мезенхімальних клітин з кісткового мозку становила $53,3 \pm 1,4$ ($p < 0,01$), проти контролю $45,9 \pm 0,7$ мкмоль $K_3[Fe(CN)_6]$ / мг*хв.

References

- Ahmad, T., Mukherjee, S., Pattnaik, B., Kumar, M., Singh, S., Kumar, M., Rehman, R., Tiwari, B.K., Jha, K.A., Barhanpurkar, (2014). Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport & enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy. *EMBO J.*, 33:994–1010. doi.org/10.1002/embj.201386030
- Andres, A. L., Gong, X., Di, K., Bota, D. A. (2014). Low-doses of cisplatin injure hippocampal synapses: a mechanism for 'chemo' brain? *Exp Neurol*, 255:137–144. doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.02.020
- Babenko, V. A., Silachev, D. N., Zorova, L. D., Pezvner, I. B., Khutornenko, A. A., Plotnikov, E. Y., Sukhikh, G. T., Zorov, D. B. (2015). Improving the post-stroke therapeutic potency of mesenchymal multipotent stromal cells by Cocultivation with cortical neurons: the role of crosstalk between cells. *Stem Cells. Transl. Med.*, 4: 1011–1020. doi.org/10.5966/sctm.2015-0010
- Danielyan, L., Beer-Hammer, S., Stolzinger, A., Schafer, R., Siegel, G., Fabian, C., Kahle, P., Biedermann, T., Lourhmati, A., Buadze, M. (2014). Intranasal delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells, macrophages, and microglia to the brain in mouse models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Cell. Transplant.*, 23(1):123–139. doi.org/10.3727/096368914X684970
- Donega, V., Nijboer, C. H., Braccioli, L., Slaper-Cortenbach, I., Kavelaars, A., van Bel, F., Heijnen, C. J. (2014). Intranasal administration of human MSC for ischemic brain injury in the mouse: in vitro and in vivo neuroregenerative functions. *PLoS. One.*, 9:112–339. doi.org/10.1371/journal.pone.0112339
- Donega, V., Nijboer, C. H., van Tilborg, G., Dijkhuizen, R. M., Kavelaars, A., Heijnen, C. J. (2014). Intranasally administered mesenchymal stem cells promote a regenerative niche for repair of neonatal ischemic brain injury. *Exp. Neurol.*, 261:53–64. doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.06.009

- Donega, V., van Velthoven, C. T., Nijboer, C. H., van Bel, F., Kas, M. J., Kavelaars, A., Heijnen, C. J. (2013). Intranasal mesenchymal stem cell treatment for neonatal brain damage: long-term cognitive and sensorimotor improvement. *PLoS One.*, 8:51–253. doi.org/10.1371/journal.pone.0051253
- Galluzzi, L., Kepp, O., Kroemer, G. (2012). Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 13:780–788. doi.org/10.1038/nrm3479
- Hayakawa, K., Esposito, E., Wang, X., Terasaki, Y., Liu, Y., Xing, C., Ji, X., Lo, E. H. (2016). Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature.*, 535:551–555. doi.org/10.1038/nature18928
- Huo, X., Reyes, T. M., Heijnen, C. J., Kavelaars, A. (2018). Cisplatin treatment induces attention deficits and impairs synaptic integrity in the prefrontal cortex in mice. *Sci. Rep.*, 8:17–400. doi.org/10.1038/s41598-018-35919-x
- Islam, M. N., Das, S. R., Emin, M. T., Wei, M., Sun, L., Westphalen, K., Rowlands, D. J., Quadri, S. K., Bhattacharya, S., Bhattacharya, J. (2012). Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat. Med.*, 18:759–765. doi.org/10.1038/nm.2736
- Jackson, M. V., Morrison, T. J., Doherty, D. F., McAuley, D. F., Matthay, M. A., Kissenpfennig, A., O’Kane, C. M., Krasnodembskaya, A. D. (2016). Mitochondrial transfer via tunneling nanotubes is an important mechanism by which mesenchymal stem cells enhance macrophage phagocytosis in the in vitro and in vivo models of ARDS. *Stem. Cells.*, 34:2210–2223. doi.org/10.1002/stem.2372
- Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer.*, 7:573–584. doi.org/10.1038/nrc2167
- Kladnytska, L. V., Mazurkevych, A. Y., Maluk, M. O., Tomchuk, V. A., Garmanchuk, L. V., Velychko, S. V., Danilov, V. B., Kharkevych, Iu. O., Melnyk, O. O., Shelest, D. V., Velychko, V. S. (2018). Influence of transplanted allogenic bone marrow and adipose derived mesenchymal stromal cells on the biochemical parameters of C57Bl/6 mice blood // *Ukr. Biochem. J.*, 90 (79): 2409-4943.
- Mahrouf-Yorgov, M., Augeul, L., Da Silva, C. C., Jourdan, M., Rigolet, M., Manin, S., Ferreira, R., Ovize, M., Henry, A., Guguin, A. et al., (2017). Mesenchymal Stem Cells sense mitochondria released from damaged cells as danger signals to activate their rescue properties. *Cell. Death. Differ.*, 24:1224–1238. doi.org/10.1038/cdd.2017.51
- Maurodi, S. (2003). Mitochondrial, respiratory-chain diseases *N. Engl. J. Med.*, 34: 82–85.
- McCloy, R. A., Rogers, S., Caldon, C. E., Lorca, T., Castro, A., Burgess, A. (2014). Partial inhibition of Cdk1 in G2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell. Cycle.*, 13:1400–1412. doi.org/10.4161/cc.28401
- Nabila Boukelmoune, Gabriel, S. Chiu, Annemieke Kavelaars and Cobi J. (2018). Heijnen Mitochondrial transfer from mesenchymal stem cells to neural stem cells protects against the neurotoxic effects of cisplatin // *Acta Neuropathologica Communications*, 6:139. doi.org/10.1186/s40478-018-0644-8
- Zhang, R., Liu, Y., Yan, K., Chen, L., Chen, X. R., Li, P., Chen, F. F., Jiang, X. D. (2013). Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cell transplantation in experimental traumatic brain injury. *J. Neuroinflammation*, 10:106. doi.org/10.1186/1742-2094-10-106
- Zhao, C., Deng, W., Gage, F. H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell.*, 132:645–660. doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.033
- Zhuying Wei1, Dongfang Li, Lin Zhu, Lei Yang, Chen Chen, Chunling Bai1, and Guang-peng Li Wei et al. (2018). Omega 3 polyunsaturated fatty acids inhibit cell proliferation by regulating cell cycle in fad3b transgenic mouse embryonic stem cells

- Lipids in Health and Disease, 17:210. doi. org/10.1186/s12944-018-0862-x
- Sun, F. (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell.*, 121 (7): 1043-1057.
- Han, X. (2017). Involvement of mitochondrial dynamics in the antineoplastic activity of cisplatin in murine leukemia L1210 cells *Oncol Rep.*, 38(2): 985–992.

Kladnytska L.V., Mazurkevych A. Y., Tomchuk V. A., Garmanchuk L. V., Maluk M.O., Kalachnyk L.G., Velychko S.V., Lozova O.V., Danilov V.B., Kharkevych Iu.O., Tkachenko T.A., Bokotco R.R., Shelest D.A. (2019).

THE EFFECT OF ALLOGENEIC MESENCHYMAL STEM CELL TRANSPLANTATION ON THE ACTIVITY OF MITOCHONDRIAL SUCCINATE DEHYDROGENASE IN THE LIVER OF RECIPIENT ANIMALS. *Ukrainian Journal of Veterinary Sciences*, 9(3): 4–13, <https://doi.org/10.31548/ujvs2019.03.001>.

Abstract. The studies were conducted on 2-3-months-old males of C57BL/6 mice weighing 20-24 g. Obtaining of allogenic bone marrow and adipose derived MSCs were carried out in a sterile laminar box. Cells were cultivated in a CO₂-incubator at 37 °C and 5 % CO₂ in DMEM with 10-15 % of fetal bovine serum, 1 % of antibiotic-antimycotic solution (Sigma-Aldrich, USA). The following groups of animals were formed: 1 group – intact (control) animals; 2 group – animals, to whom 0.5 ml of 0.89 % NaCl solution (placebo) were injected into the caudal vein; 3 group – animals, to whom 10⁴ of allogenic AD MSCs in 0.5 ml of phosphate buffer solution were injected into the caudal vein, 4 group – animals, to whom 10⁴ of allogenic BM MSCs in 0.5 ml of phosphate buffer solution were injected into the caudal vein. On 12th day after transplantation of MSCs activity of succinate dehydrogenase in animals were determined.

The determination of the activity of the enzyme was carried out in accordance with the method, the principle of which is the restoration of potassium ferricyanide (K₃[Fe(CN)₆]) to potassium ferrocyanide (K₄[Fe(CN)₆]) by succinate with involvement of succinate dehydrogenase. Activity was determined by the volume of recovered ferricyanide. Statistical processing of the results was performed with using of "Origin 6.1" software and Student's t-criterion. All data are presented in the form of arithmetic average and standard deviations.

It was found that at the 12 day of the study, the activity of the succinate dehydrogenase in the third experimental group was 57.7 ± 1.6 mmol / l K₃[Fe (CN)₆] / mg * min (p < 0.001), which is significantly higher than in the animals of the first and second group (45.9 ± 0.7 and 43.3 ± 1.2 mmol / l K₃[Fe (CN)₆] / mg * min, respectively). The activity of the enzyme in animal of the fourth experimental groups was also reliable higher compared to the first two groups and was 53.3 ± 1.4 mmol/l K₃[Fe(CN)₆] / mg * min (p < 0.01).

It should be noted that mitochondrial succinate dehydrogenase activity in the liver of recipient animals after transplantation of MSCs from adipose tissue is significantly higher than after transplantation of MSCs, obtained from bone marrow (p < 0.05). Thus, reliable raising of mitochondrial succinate dehydrogenase activity in the liver of recipient animals after transplantation of allogenic mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow has been determined.

Keywords: mesenchymal stem cells, mitochondria, succinate dehydrogenase, mice, bone marrow, fatty tissue