

**МИТОФАГИЯ И LPS-ИНДУЦИРОВАННАЯ ТОЛЕРАНТНОСТЬ В
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ (ASC52TELO)**

Журавлев А. Д.¹,
Никифоров Н. Г.^{1, 2, 3},
Верхова С. С.¹,
Чегодаев Е. С.¹,
Эрдынеева Д. Б.¹,
Орехов А. Н.¹,
Егоров Е. Е.³

¹ ФГБНУ «Научно-Исследовательский Институт Общей Патологии и Патофизиологии», Москва, Россия.

², ФГБУН Института Биологии Гена РАН, Москва, Россия.

³ ФГБУН Институт Молекулярной Биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия.

MITOPHAGY AND LPS-INDUCED TOLERANCE IN MESENCHYMAL STEM CELLS (ASC52TELO)

Zhuravlev A. D. ^a,
Nikiforov N. G. ^{a, b, c},
Verkhova S. S. ^a,
Chegodaev Ye. S. ^a,
Erdyneeva D. B. ^a,
Orekhov A. N. ^a,
Yegorov Ye. E. ^c

^a Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia.

^b Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia.

^c Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia.

Резюме

Мезенхимальные стволовые клетки рассматриваются как перспективный инструмент клеточной терапии благодаря их регенеративным и иммуномодулирующим свойствам. Однако результаты клинических испытаний остаются неоднозначными: в ряде исследований были отмечены улучшения у участников исследования, тогда как в других не было достоверных отличий от плацебо, более того, у некоторых участников наблюдались побочные эффекты. Одним из направлений повышения эффективности и безопасности МСК-терапий является их целенаправленная предобработка, позволяющая модифицировать секретом. Другим перспективным подходом выступает модуляция митофагии – ключевого механизма контроля качества митохондрий, определяющего стрессоустойчивость и иммунорегуляторные возможности мезенхимальных стволовых клеток. Активная митофагия уменьшает сенесценцию, сохраняет иммуномодулирующие функции мезенхимальных стволовых клеток, благодаря которым они могут способствовать разрешению воспаления. При нарушениях митофагии, могут накапливаться митохондриальные компоненты и АФК, что может усиливать локальное воспаление. Тем самым, терапевтический потенциал мезенхимальных стволовых клеток будет снижаться. Таким образом, целью исследования было сопоставление митофагии и воспалительной толерантности МСК при различных стимуляциях. В настоящем исследовании мы сопоставили оба направления, исследовав митофагический ответ мезенхимальных стволовых клеток на митохондриальный стресс и формирование LPS-индуцированной толерантности. В нашей работе исследована иммортализованная линия адипозо-происхождения ASC52telo в двух экспериментальных схемах. Для анализа митофагии клеткам добавляли FCCP для деполяризации митохондрий. Клетки снимали на конфокальном микроскопе с двойным окрашиванием митохондрий и лизосом. Для оценки толерантности клеткам дважды добавляли LPS и измеряли секрецию цитокинов. Оказалось, что FCCP вызывал выраженную фрагментацию митохондрий и активацию митофагии. Кроме того, секреция TNF и CCL2 значительно снижалась при повторной стимуляции LPS. Таким образом, активация митофагии при остром митохондриальном стрессе и формирование толерантности к эндотоксину LPS в мезенхимальных стволовых клетках представляют собой взаимодополняющие адаптивные механизмы, которые могут быть использованы как мишени для повышения предсказуемости и клинической эффективности МСК-терапий.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, митофагия, толерантность к эндотоксину, воспаление, митохондрии, TNF, CCL2.

Abstract

Mesenchymal stem cells are considered a promising tool for cell therapy because of their regenerative and immunomodulatory properties. However, results from clinical trials remain inconclusive: in some studies participants showed improvements, while in others there were no statistically significant differences from placebo; moreover, some participants experienced adverse effects. One strategy to improve the safety and efficacy of MSC-based therapies is targeted preconditioning to modify their secretome. Another promising approach is modulation of mitophagy – a key mitochondrial quality-control mechanism that determines mesenchymal stem cells stress resilience and immunoregulatory capacity. Active mitophagy reduces senescence and preserves the immunomodulatory functions of mesenchymal stem cells, through which they can promote resolution of inflammation. When mitophagy is impaired, mitochondrial components and reactive oxygen species can accumulate, which may exacerbate local inflammation. As a result, the therapeutic potential of mesenchymal stem cells may be diminished. Thus, the aim of this study was to compare mitophagy and inflammatory tolerance of mesenchymal stem cells under different stimulations. In the present study we compared both strategies by examining the mitophagic response of mesenchymal stem cells to mitochondrial stress and the development of LPS-induced tolerance. We used the hTERT-immortalized adipose-derived line ASC52telo in two complementary experimental schemes. To probe mitophagy, cells were exposed to FCCP to depolarize mitochondria and then imaged by confocal microscopy after dual staining of mitochondria and lysosomes. To assess tolerance, cells were stimulated twice with LPS and cytokine secretion was measured. We found that FCCP induced pronounced mitochondrial fragmentation and activation of mitophagy. In a separate set of experiments, repeated LPS stimulation led to a marked reduction in TNF and CCL2 secretion. Thus, activation of mitophagy in response to acute mitochondrial stress and the establishment of endotoxin (LPS) tolerance in mesenchymal stem cells operate as complementary adaptive mechanisms. These processes may be exploited as targets to increase the predictability and clinical efficacy of MSC-based therapies.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Mitophagy, Endotoxin tolerance, Inflammation, Mitochondria, TNF, CCL2.

1 Введение

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) обладают широким регенеративным и иммуномодулирующим потенциалом: они способны секретировать внеклеточные везикулы, содержащие митохондрии, что способствует восстановлению повреждённых тканей и модулированию воспаления. Эти свойства МСК обуславливают интерес для рассмотрения терапевтического потенциала этих клеток, что легло в основу их доклинических и клинических испытаний в терапии таких заболеваний, как ревматоидный артрит, атеросклероз и др. [1,2]. Однако результаты клинических испытаний МСК оказались неоднозначными: в некоторых работах наблюдался терапевтический эффект, в других – отличий от контроля не было, а также были выявлены побочные эффекты. Это подчёркивает, что практическая реализация МСК-терапий требует более глубокого понимания их внутриклеточной физиологии [3,4].

Одним из направлений повышения эффективности МСК является контролируемая предобработка. Например, LPS-предобработка оказывает влияние на состав секретлируемых везикул, которые в свою очередь способствуют поляризации макрофагов по противовоспалительному фенотипу, что сопровождается снижением секреции провоспалительных цитокинов [5,6].

Было показано, что МСК способны упаковывать фрагменты митохондрий в везикулы и секретировать их другим клеткам. Поэтому для МСК очень важно поддерживать качество митохондрий. Нарушения митохондриальной функции связаны со снижением пролиферативной активности, иммуномодуляторных свойств и устойчивости клеток к стрессу [7,8]. В этой связи особое внимание уделяется митофагии — процессу селективного удаления дисфункциональных митохондрий, который рассматривается как один из главных механизмов поддержания качества клеточного пула. Усиление митофагии экспериментально показано как стратегия для повышения устойчивости МСК к гипоксии, окислительному стрессу и воспалительным стимулам, а также для сохранения их паракринной активности. Таким образом, модуляция митофагии рассматривается как перспективный подход к «подготовке» МСК для терапии [4,9,10].

Таким образом, целью исследования было сопоставление митофагии и воспалительной толерантности МСК при различных стимуляциях.

2 Материалы и методы

В работе использовались иммортализованные мезенхимальные стволовые клетки человека из жировой ткани ASC52elo (hTERT, SCRC-4000™, ATCC).

Клетки поддерживали в среде DMEM с низкой глюкозой, дополненной 10% FBS, 50 Ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина, при 37 °C и 5% CO₂. Плотность посева составляла 8×10⁵ клеток/мл.

Клетки высевали по 800 тыс клеток/мл в 24-луночные планшеты (по 1 мл на лунку). Добавляли LPS (Sigma) в концентрации 1 мкг/мл и инкубировали

4 ч, после чего меняли среду и добавляли LPS снова на 20 ч. В итоге получали 4 образца (К К, К LPS, LPS К, LPS LPS). После отбирали супернатант для анализа секреции цитокинов методом ИФА.

ИФА проводили в 96-луночном планшете (SPL) с использованием наборов DuoSet ELISA Development System (TNF (R&D Systems), IL-6, IL-8, CCL2) согласно протоколу производителя. Оптическую плотность образцов измеряли с помощью планшетного ридера ClarioSTAR. Концентрации цитокинов рассчитывали в пг/мл на основании калибровочной кривой.

Для оценки митофагии клетки инкубировали в присутствии 100 нМ митохондриального (MitoTracker Green (Thermo Fisher Scientific)) и 50 нМ лизосомального (LysoTracker Deep Red (Thermo Fisher Scientific)) зондов на 30 мин. Клетки центрифугировали, промывали PBS и переносили на конфокальные чашки (Jet Biofil). Для индукции митофагии использовали разбавитель митохондриального потенциала FCCP (Sigma). Конфокальные изображения получали на конфокальном микроскопе Leica DMi8 STELLARIS 5.

Статистический анализ проводился с использованием программы IBM SPSS Statistics. Для данных с ненормальным распределением применялся U-критерий Манна-Уитни (для непарных сравнений). Статистически значимым считалось значение $p < 0,05$.

3 Результаты и обсуждение

Чтобы оценить способность мезенхимальных стволовых клеток удалять дисфункциональные митохондрии, клетки обрабатывали 2 μ M FCCP в течение 6 ч. В клетках наблюдалась выраженная фрагментация митохондрий и усиление митофагии (Рис. 1).

Параллельно, мы оценивали способность МСК формировать иммунную толерантность. Клетки подвергались двукратной стимуляции LPS: первая – на 4 ч, вторая – на 24 ч. Секреция TNF и CCL2 после повторной стимуляции достоверно снижалась на 50%, что указывает на формирование толерантности. Снижение IL-6 и IL-8 было примерно на 10% и не достигло статистической значимости (Рис. 2).

МСК способны экстренно реагировать на образование АФК и высвобождение митохондриальных компонентов, что реализуется через активацию механизмов контроля качества митохондрий, включая митофагию [8]. В ряде работ показано, что усиление митофагии сохраняло у МСК способность к дифференцировке и снижало клеточное старение [10,11]. Наши данные о выраженной митофагии после 6-часовой обработки FCCP согласуются с мировой литературой. Кроме внутриклеточной утилизации, МСК используют внеклеточные пути контроля качества митохондрий. Tan Y.L. с соавт. продемонстрировали, что МСК использовали межклеточный перенос дефектных митохондрий через везикулы для митофагии [8]. Phinney с соавт. показали, что упакованные в везикулы дефектные митохондрии затем поглощались макрофагами [7]. Таким образом, МСК располагают как внутри-

88 , так и внеклеточными стратегиями контроля качества, которые совместно
89 ограничивают АФК/мтДНК-опосредованную провоспалительную активацию.

90 Несколько работ показывают, что предобработка МСК (например, LPS)
91 модифицирует их секретом и усиливает иммунорегуляторные свойства. Chen
92 X. с соавт. продемонстрировали, что смертность у мышей с LPS-
93 обработанными МСК при модели PICS была ниже после внутрибрюшинной
94 инъекции LPS [5]. Ко J.H. с соавт. показали, что МСК могли предобучать
95 рецепторные моноциты/макрофаги к толерантности *in vivo* [6]. Наши данные
96 о LPS-толерантности (снижение TNF и CCL2 при повторной стимуляции)
97 МСК согласуются с мировыми исследованиями.

98 **4 Заключение**

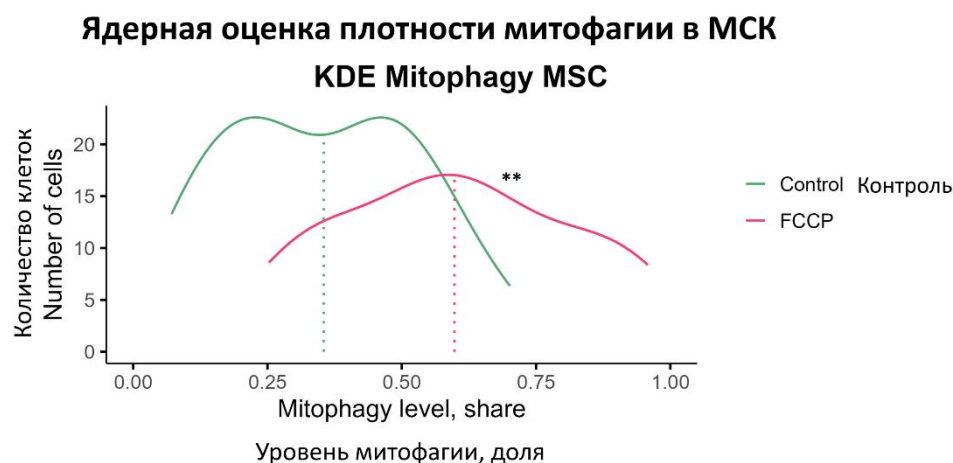
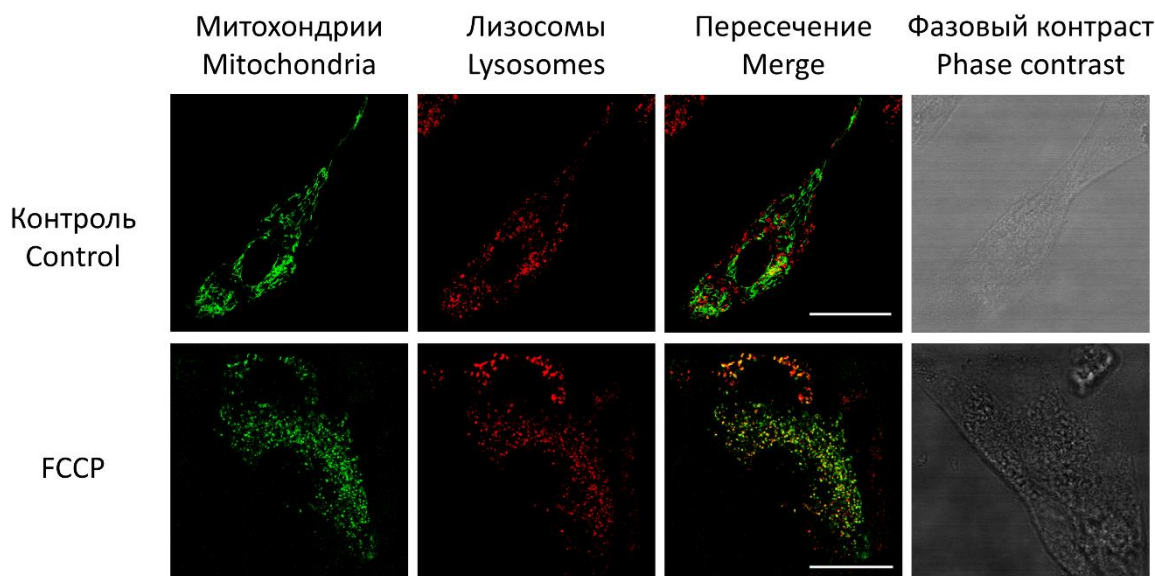
99 В заключение, наши наблюдения демонстрируют, что у ASC52telo
100 выраженная митофагия при остром митохондриальном стрессе и
101 толерантность к эндотоксину LPS выступают как взаимодополняющие
102 механизмы обеспечения устойчивости. Выявление причинно-следственных
103 связей позволит найти конкретные мишени для повышения предсказуемости,
104 безопасности и клинической эффективности МСК-терапий.

105 Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (Грант
106 № 22-15-00273-П).

107 Мы благодарим Центр коллективного пользования ИБГ РАН за
108 возможность использования оборудования, Андрееву Елену Ромуальдовну из
109 ИМБП РАН за предоставленную культуру МСК.

РИСУНКИ

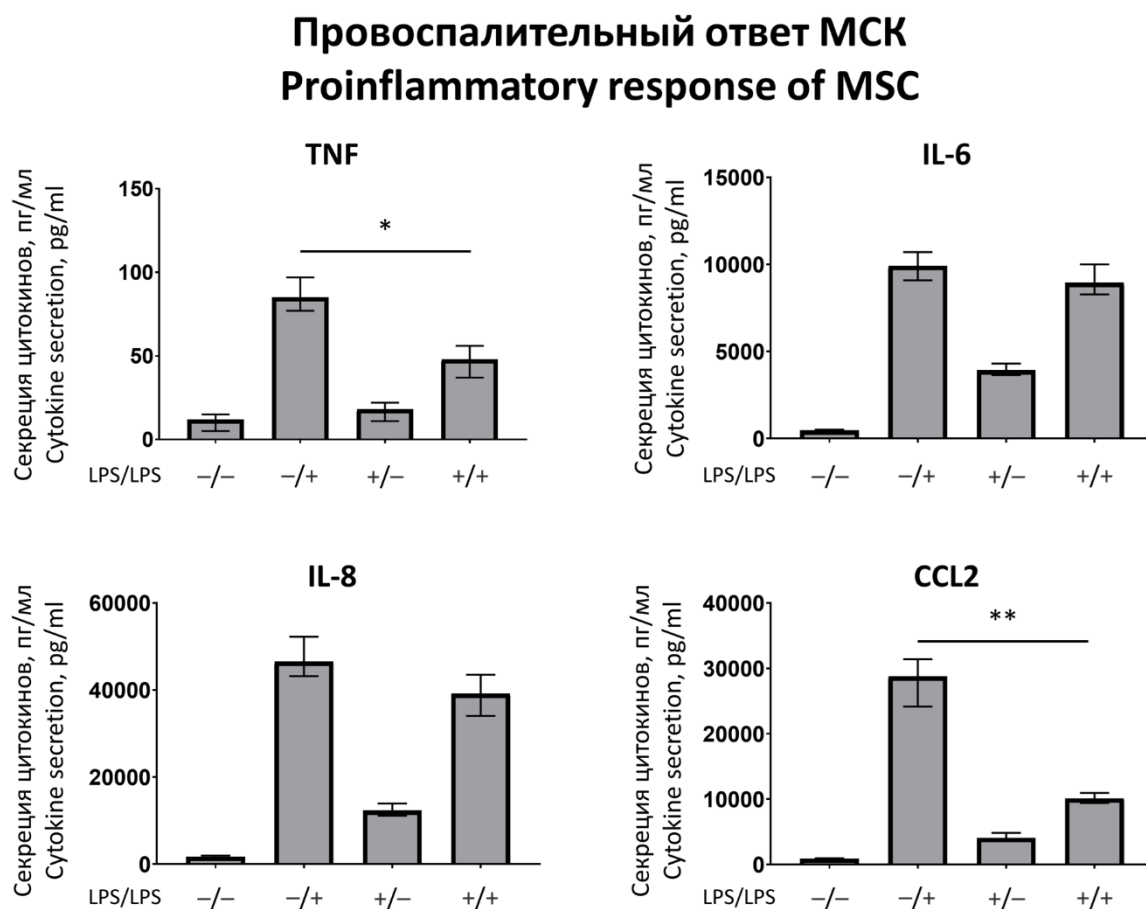
Рисунок 1. Оценка митофагии в МСК.
Figure 1. Assessment of mitophagy in MSCs.



Конфокальные изображения мезенхимальных стволовых клеток в контроле и после обработки FCCP. Слева направо показаны митохондрии (MitoTracker Green), лизосомы (LysoTracker Deep Red), наложение каналов и фазовый контраст. В нижней части представлено распределение уровня митофагии для контрольных клеток (зелёная кривая) и клеток, обработанных FCCP (красная кривая). Шкала 10 μm . Медианы отмечены пунктирными линиями. ** – $p < 0.01$ по результатам теста Манна-Уитни.

Confocal images of mesenchymal stem cells in control and after FCCP treatment. From left to right: mitochondria (MitoTracker Green), lysosomes (LysoTracker Deep Red), merged channels, and phase-contrast. The lower panel shows the distribution of mitophagy levels for control cells (green curve) and FCCP-treated cells (red curve). Scale bar – 10 μm . Medians are indicated by dashed lines. ** $P < 0.01$ (Mann–Whitney U test).

Рисунок 1. Способность MSC формировать иммунную толерантность.
Figure 1. Capacity of MSC to induce immune tolerance.



Столбцы отражают секрецию цитокинов при двукратной стимуляции клеток LPS (первая стимуляция / вторая стимуляция): -/-, -/+, +/-, +/+. На графиках изображена секреция цитокинов TNF, IL-6, IL-8, CCL2, которую оценивали с помощью ИФА. Данные представлены, как медиана (Q1-Q3). N=3, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ по результатам теста Манна-Уитни.

Bars show cytokine secretion after two consecutive LPS stimulations (first stimulation / second stimulation): -/-, -/+, +/-, +/+. Plotted are levels of TNF, IL-6, IL-8 and CCL2 measured by ELISA. Data are presented as median (Q1-Q3). N = 3. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Mann-Whitney U test).

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДАННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Журавлев Александр Дмитриевич, младший научный сотрудник лаборатории ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП, Москва, Россия;

адрес: 125315, ул. Балтийская, дом 8, Москва, Россия;

телефон: +79857917198;

факс: +7-495-601-2366;

e-mail: Zhuravel17@yandex.ru

Alexander D. Zhuravlev, Junior Researcher Fellow of Laboratory of Angiopathology, Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia;

telephone: +79857917198;

fax: +7-495-601-2366;

e-mail: Zhuravel17@yandex.ru

Блок 2. Информация об авторах

Никифоров Никита Геннадьевич, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП; старший научный сотрудник лаборатории разработки новых инструментов геномного редактирования ФГБУН ИБГ РАН, Москва, Россия, старший инженер лаборатории клеточных основ развития злокачественных заболеваний ФГБУН ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия;

Nikita G. Nikiforov, PhD, Leading Researcher of Laboratory of Angiopathology, Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia; Senior Researcher of Laboratory for the Development of New Tools for Genome Editing, Institute of Gene Biology of Russian Academy of Science, Moscow, Russia; Senior Engineer of Laboratory of Cancer Cell Biology, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow, Russia.

Верхова Светлана Сергеевна, старший лаборант лаборатории ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП, Москва, Россия;

Svetlana S. Verkhova, Senior Assistant of Laboratory of Angiopathology, Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia;

Чегодаев Егор Сергеевич, младший научный сотрудник лаборатории ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП, Москва, Россия;

Yegor S. Chegodaev, Junior Researcher Fellow of Laboratory of Angiopathology, Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia;

Эрдынеева Даяна Батоевна, старший лаборант лаборатории ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП;

Daiana B. Erdyneeva, Senior Assistant of Laboratory of Angiopathology, Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia;

Орехов Александр Николаевич, профессор, д.б.н., заведующий лаборатории ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП, Москва, Россия;
Alexander N. Orekhov, Prof., PhD, The Head of Laboratory of Angiopathology, Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia.

Егоров Егор Евгеньевич, профессор, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных основ развития злокачественных заболеваний ФГБУН ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия;
Yegor E. Yegorov, Prof., PhD, Leading Researcher of Laboratory of Cancer Cell Biology, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow, Russia.

Блок 3. Метаданные статьи

МИТОФАГИЯ И LPS-ИНДУЦИРОВАННАЯ ТОЛЕРАНТНОСТЬ В
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ (ASC52TELO)
MITOPHAGY AND LPS-INDUCED TOLERANCE IN MESENCHYMAL STEM
CELLS (ASC52TELO)

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

МИТОФАГИЯ И ТОЛЕРАНТНОСТЬ В МСК
MITOPHAGY AND TOLERANCE IN MSC

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, митофагия, толерантность к эндотоксину, воспаление, митохондрии, TNF, CCL2.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Mitophagy, Endotoxin tolerance, Inflammation, Mitochondria, TNF, CCL2.

Краткие сообщения.

Количество страниц текста – 3,

Количество таблиц – 0,

Количество рисунков – 2.

08.09.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1	Rayat Pisheh, H.; Sani, M. Mesenchymal Stem Cells Derived Exosomes: A New Era in Cardiac Regeneration. <i>Stem Cell Res. Ther.</i> 2025 , 16, 16	-	10.1186/s13287-024-04123-2
2	Kouchakian, M.R.; Baghban, N.; Moniri, S.F.; Baghban, M.; Bakhshalizadeh, S.; Najafzadeh, V.; Safaei, Z.; Izanlou, S.; Khoradmehr, A.; Nabipour, I.; et al. The Clinical Trials of Mesenchymal Stromal Cells Therapy. <i>Stem Cells Int.</i> 2021 , 2021, 1634782	-	10.1155/2021/1634782
3	Kahrizi, M.S.; Mousavi, E.; Khosravi, A.; Rahnama, S.; Salehi, A.; Nasrabadi, N.; Ebrahimzadeh, F.; Jamali, S. Recent Advances in Pre-Conditioned Mesenchymal Stem/Stromal Cell (MSCs) Therapy in Organ Failure; a Comprehensive Review of Preclinical Studies. <i>Stem Cell Res. Ther.</i> 2023 , 14, 155	-	10.1186/s13287-023-03374-9
4	Mukkala, A.N.; Jerkic, M.; Khan, Z.; Szaszi, K.; Kapus, A.; Rotstein, O. Therapeutic Effects of Mesenchymal Stromal Cells Require Mitochondrial Transfer and Quality Control. <i>Int. J. Mol. Sci.</i> 2023 , 24, 15788	-	10.3390/ijms242115788
5	Chen, X.; Chen, M.; Yang, Y.; Xu, C.; Lu, H.; Xu, Y.; Li, X.; Wei, Y.; Zhu, Z.; Ding, Y.; et al. LIPOPOLYSACCHARIDE-PRECONDITIONED MESENCHYMAL STEM CELL TRANSPLANTATION ATTENUATES CRITICAL	-	10.1097/SHK.0000000000001993

	PERSISTENT INFLAMMATION IMMUNE SUPPRESSION AND CATABOLISM SYNDROME IN MICE. <i>Shock Augusta Ga</i> 2022 , 58, 417–425		
6	Ko, J.H.; Lee, H.J.; Jeong, H.J.; Kim, M.K.; Wee, W.R.; Yoon, S.-O.; Choi, H.; Prockop, D.J.; Oh, J.Y. Mesenchymal Stem/Stromal Cells Precondition Lung Monocytes/Macrophages to Produce Tolerance against Allo- and Autoimmunity in the Eye. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 2016 , 113, 158–163	-	10.1073/pnas.1522905113
7	Phinney, D.G.; Di Giuseppe, M.; Njah, J.; Sala, E.; Shiva, S.; St Croix, C.M.; Stolz, D.B.; Watkins, S.C.; Di, Y.P.; Leikauf, G.D.; et al. Mesenchymal Stem Cells Use Extracellular Vesicles to Outsource Mitophagy and Shuttle microRNAs. <i>Nat. Commun.</i> 2015 , 6, 8472	-	10.1038/ncomms9472
8	Tan, Y.L.; Eng, S.P.; Hafez, P.; Abdul Karim, N.; Law, J.X.; Ng, M.H. Mesenchymal Stromal Cell Mitochondrial Transfer as a Cell Rescue Strategy in Regenerative Medicine: A Review of Evidence in Preclinical Models. <i>Stem Cells Transl. Med.</i> 2022 , 11, 814–827	-	10.1093/stcltm/szac044
9	Zhang, F.; Peng, W.; Zhang, J.; Dong, W.; Wu, J.; Wang, T.; Xie, Z. P53 and Parkin Co-Regulate Mitophagy in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Promote the Repair of Early Steroid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head. <i>Cell Death Dis.</i> 2020 , 11, 42	-	10.1038/s41419-020-2238-1
10	Liu, F.; Yuan, Y.; Bai, L.; Yuan, L.; Li, L.; Liu, J.; Chen, Y.; Lu, Y.; Cheng, J.; Zhang, J. LRRc17 Controls BMSC Senescence via Mitophagy and Inhibits the Therapeutic Effect	-	10.1016/j.redox.2021.101963

	of BMSCs on Ovariectomy-Induced Bone Loss. <i>Redox Biol.</i> 2021 , 43, 101963		
11	Feng, X.; Yin, W.; Wang, J.; Feng, L.; Kang, Y.J. Mitophagy Promotes the Stemness of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. <i>Exp. Biol. Med. Maywood NJ</i> 2021 , 246, 97–105	-	10.1177/1535370220964394