

МИТОФАГИЯ И LPS-ИНДУЦИРОВАННАЯ ТОЛЕРАНТНОСТЬ В МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ (ASC52telo)

Журавлев А.Д.¹, Никифоров Н.Г.^{1,2,3}, Верховая 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 «Институт биологии гена» Российской академии наук, Москва, Россия

³ ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

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 ми-

Адрес для переписки:

Журавлев Александр Дмитриевич
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей
патологии и патофизиологии»
125315, Россия, Москва, ул. Балтийская, 8.
Тел.: 8 (985) 791-71-98.
Факс: 8 (495) 601-23-66.
E-mail: Zhuravel17@yandex.ru

Address for correspondence:

Alexander D. Zhuravlev
Research Institute of General Pathology and Pathophysiology
8 Baltiyskaya St
Moscow
125315 Russian Federation
Phone: +7 ((985) 791-71-98.
Fax: +7 (495) 601-23-66.
E-mail: Zhuravel17@yandex.ru

Образец цитирования:

А.Д. Журавлев, Н.Г. Никифоров, С.С. Верховая,
Е.С. Чегодаев, Д.Б. Эрдынеева, А.Н. Орехов,
Е.Е. Егоров «Митофагия и LPS-индуцированная
толерантность в мезенхимальных стволовых клетках
(ASC52telo)» // Медицинская иммунология, 2026. Т. 28,
№ 2. С. 451-456. doi: 10.15789/1563-0625-MAL-3295

© Журавлев А.Д. и соавт., 2026

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.D. Zhuravlev, N.G. Nikiforov, S.S. Verkhova,
Ye.S. Chegodaev, D.B. Erdyneeva, A.N. Orekhov,
Ye.E. Yegorov “Mitophagy and LPS-induced Tolerance
in Mesenchymal Stem Cells (ASC52telo)”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2026,
Vol. 28, no. 2, pp. 451-456.
doi: 10.15789/1563-0625-MAL-3295

© Zhuravlev A.D. et al., 2026

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-MAL-3295

тофагии 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

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, Russian Federation

^b Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

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

Abstract. Mesenchymal stem cells (MSC) are considered a promising tool for cell therapy due to their regenerative and immunomodulatory properties. However, results from clinical trials remain inconclusive: clinical improvements have been shown in some studies, while other trials did not reveal statistically significant differences from placebo-treated patients. Moreover, some participants experienced adverse effects. Targeted preconditioning of the cells aimed for modifying of their secretome seems to be a strategy to improve the safety and efficacy of MSC-based therapies. Another promising approach is modulation of mitophagy, a key mitochondrial quality-control mechanism that determines stress resilience and immunoregulatory capacity of MSCs. Active mitophagy reduces senescence and preserves immunomodulatory functions of MSCs, thus promoting resolution of inflammation. When mitophagy is impaired, the mitochondrial components and reactive oxygen species may accumulate, thus exacerbating 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 MSCs under different stimulation regimens. 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 schedules. To probe mitophagy process, the cells were exposed to FCCP to depolarize mitochondria and then subjected to confocal microscopy after dual staining of mitochondria and lysosomes. To assess their tolerance, the 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 establishment of endotoxin (LPS) tolerance in mesenchymal stem cells may be regarded 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

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00273-П).

Введение

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) обладают широким регенеративным и иммуномодулирующим потенциалом: они способны секретировать внеклеточные везикулы, содержащие митохондрии, что способствует восстановлению

поврежденных 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. [5, 9]. 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 подчеркивает, что практическая реализация МСК-терапий требует более глубокого понимания их внутриклеточной физиологии [3, 7].

Одним из направлений повышения эффективности МСК является контролируемая предобработка. Например, LPS-предобработка оказывает влияние на состав секретируемых везикул, которые в свою очередь способствуют поляризации макрофагов по противовоспалительному фенотипу, что сопровождается снижением секреции провоспалительных цитокинов [1, 4].

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 [8, 10]. 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 [6, 7, 11].

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

Материалы и методы

В работе использовались иммортализованные мезенхимальные стволовые клетки человека из жировой ткани ASC52telo (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 °С 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, США)) и 50 нм лизосомального (LysoTracker Deep Red (Thermo Fisher Scientific, США)) зондов на 30 мин. Клетки центрифугировали, промывали PBS и переносили на конфокальные чашки (Jet Biofil). Для индукции митофагии использовали разбавитель митохондриального потенциала FCCP (Sigma, США). 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 $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Чтобы оценить способность мезенхимальных стволовых клеток удалять дисфункциональные митохондрии, клетки обрабатывали 2 мкм FCCP в течение 6 ч. В клетках наблюдалась выраженная фрагментация митохондрий и усиление митофагии (рис. 1, см. 3-ю стр. обложки).

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 [10]. В ряде работ показано, что усиление митофагии сохраняло у МСК способность к дифференцировке и снижало клеточное старение [2, 6]. 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 [10]. Phinney с соавт. показали,

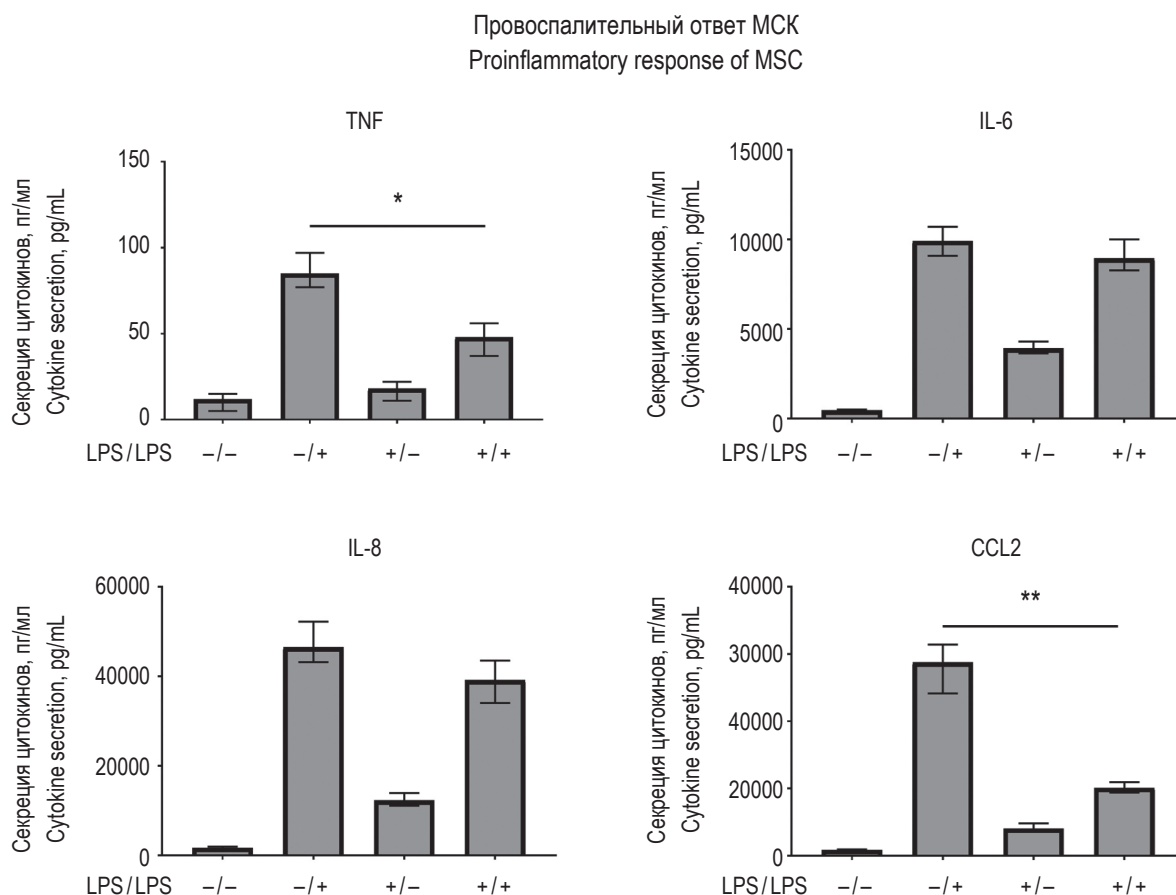


Рисунок 2. Способность MSC формировать иммунную толерантность

Примечание. 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 ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$). $n = 3$, * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ по результатам теста Манна-Уитни.

Figure 2. Capacity of MSC to induce immune tolerance

Note. 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 ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$). $n = 3$. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ (Mann-Whitney U test).

что упакованные в везикулы дефектные митохондрии затем поглощались макрофагами [8]. Таким образом, МСК располагают как внутри-, так и внеклеточными стратегиями контроля качества, которые совместно ограничивают АФК/мтДНК-опосредованную провоспалительную активацию.

Несколько работ показывают, что предобработка МСК (например, LPS) модифицирует их секретом и усиливает иммунорегуляторные свойства. Chen X. с соавт. продемонстрировали, что смертность у мышей с LPS-обработанными МСК при модели PIICS была ниже после внутрибрюшинной инъекции LPS [1]. Ко J.H. с соавт. показали, что МСК могли предобучать рецепторные моноциты/макрофаги к толерантности *in vivo* [4]. Наши данные о LPS-толерантности (снижение TNF и CCL2 при повторной стимуляции) МСК согласуются с мировыми исследованиями.

Заключение

Наши наблюдения демонстрируют, что у ASC52telо выраженная митофагия при остром митохондриальном стрессе и толерантность к эндотоксину LPS выступают как взаимодополняющие механизмы обеспечения устойчивости. Выявление причинно-следственных связей позволит найти конкретные мишени для повышения предсказуемости, безопасности и клинической эффективности МСК-терапий.

Благодарности

Авторы благодарят Центр коллективного пользования ИБГ РАН за возможность использования оборудования, Андрееву Елену Ромуальдовну из ИМБП РАН за предоставленную культуру МСК.

Список литературы / References

1. Chen X., Chen M., Yang Y., Xu C., Lu H., Xu Y., Li X., Wei Y., Zhu Z., Ding Y., Yu W. Lipopolysaccharide-preconditioned mesenchymal stem cell transplantation attenuates critical persistent inflammation immune suppression and catabolism syndrome in mice. *Shock*, 2022, Vol. 58, no. 5, pp. 417-425.
2. Feng X., Yin W., Wang J., Feng L., Kang Y.J., Mitophagy promotes the stemness of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 2021, Vol. 246, no. 1, pp. 97-105.
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. *Stem Cell Res. Ther.*, 2023, Vol. 14, no. 1, 155. doi: 10.1186/s13287-023-03374-9.
4. 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2016, Vol. 113, no. 1, pp. 158-163.
5. Kouchakian M.R., Baghban N., Moniri S.F., Baghban M., Bakhshalizadeh S., Najafzadeh V., Safaei Z., Izanlou S., Khoradmehr A., Nabipour I., Shirazi R., Tamadon A. The Clinical trials of mesenchymal stromal cells therapy. *Stem. Cells Int.*, 2021, 2001, 1634782. doi: 10.1155/2021/1634782.
6. 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 of BMSCs on ovariectomy-induced bone loss. *Redox Biol.*, 2021, Vol. 43, 101963. doi: 10.1016/j.redox.2021.101963.
7. Mukkala A.N., Jerkic M., Khan Z., Szasz K., Kapus A., Rotstein O. Therapeutic effects of mesenchymal stromal cells require mitochondrial transfer and quality control. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, Vol. 24, no. 21, 15788. doi: 10.3390/ijms242115788.
8. 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., Kolls J., Riches D.W.H., Deilulis G., Kaminski N., Boregowda S.V., McKenna D.H., Ortiz L.A. Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs. *Nat. Commun.*, 2015, Vol. 6, 8472. doi: 10.1038/ncomms9472.
9. Rayat Pisheh H., Sani M. Mesenchymal stem cells derived exosomes: a new era in cardiac regeneration. *Stem. Cell Res. Ther.*, 2025, Vol. 16, no. 1, 16. doi: 10.1186/s13287-024-04123-2.
10. 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. *Stem. Cells Transl. Med.*, 2022, Vol. 11, no. 8 pp. 814-827.
11. 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. *Cell Death Dis.*, 2020, Vol. 11, no. 1, 42. doi: 10.1038/s41419-020-2238-1.

Авторы:

Журавлев А.Д. — младший научный сотрудник лаборатории ангиопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

Никифоров Н.Г. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории ангиопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; старший научный сотрудник лаборатории разработки новых инструментов геномного редактирования ФГБНУ «Институт биологии гена» Российской академии наук; старший инженер лаборатории клеточных основ развития злокачественных заболеваний ФГБНУ «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Верхова С.С. — старший лаборант лаборатории ангиопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

Authors:

Zhuravlev A.D., Junior Research Associate, Laboratory of Angiopathology, Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation

Nikiforov N.G., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Angiopathology, Institute of General Pathology and Pathophysiology; Senior Research Associate, Laboratory for Development of Novel Genome Editing Tools, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Science; Senior Engineer, Laboratory of Cancer Cell Biology, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Verkhova S.S., Senior Laboratory Assistant, Laboratory of Angiopathology, Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation

Чегодаев Е.С. — младший научный сотрудник лаборатории ангиопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

Эрдынеева Д.Б. — старший лаборант лаборатории ангиопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

Орехов А.Н. — д.б.н., профессор, заведующий лабораторией ангиопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

Егоров Е.Е. — д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных основ развития злокачественных заболеваний ФГБНУ «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Chegodayev Ye.S., Junior Research Associate, Laboratory of Angiopathology, Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation

Erdynееva D.B., Senior Laboratory Assistant, Laboratory of Angiopathology, Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation

Orekhov A.N., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of Angiopathology, Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation

Yegorov Ye.E., PhD, MD (Biology), Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Cancer Cell Biology, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Поступила 05.09.2025

Отправлена на доработку 23.09.2025

Принята к печати 25.09.2025

Received 05.09.2025

Revision received 23.09.2025

Accepted 25.09.2025