

УДК 577.1

## МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

### Обзор

© 2020 П.А. Тюрин-Кузьмин<sup>1\*</sup>, А.Ю. Молчанов<sup>2</sup>,  
В.И. Чечехин<sup>1</sup>, А.М. Иванова<sup>1</sup>, К.Ю. Кулебякин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119991 Москва, Россия; электронная почта: tyurinkuzmin.p@gmail.com

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 28.10.2019

После доработки 19.01.2020

Принята к публикации 19.01.2020

Формирование нормальной структуры ткани, поддержание ее гомеостаза и восстановление после повреждений требуют пролиферации и дифференцировки стволовых клеток. Отличительной особенностью данных клеток является уникальная организация метаболических путей, при которой вклад различных путей получения энергии в общий клеточный метаболизм кардинальным образом отличается от такового у дифференцированных клеток. При этом изменение организации метаболизма при дифференцировке как эмбриональных, так и постнатальных стволовых клеток обладает целым рядом закономерностей. Более того, изменение метаболизма стволовых клеток является не просто следствием дифференцировки, но и активным регулятором этого процесса. Метаболические ферменты и интермедиаты регулируют и направляют процессы поддержания клеток в стволовом состоянии, их самообновления и дифференцировки. В данном обзоре рассмотрены закономерности и молекулярные механизмы переключения метаболизма стволовых клеток по мере их перехода из плюрипотентного состояния в дифференцированные клетки. Особый упор сделан на то, как протекающие в клетках метаболические процессы регулируют их функции, способность к дифференцировке и выбор конкретного направления развития стволовых клеток.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** метаболизм, плюрипотентные стволовые клетки, мезенхимные стволовые клетки, гликолиз, окислительное фосфорилирование.

DOI: 10.31857/S0320972520030021

Процесс дифференцировки стволовых клеток является основой индивидуального развития, а также процессов поддержания гомеостаза и обновления тканей взрослого организма. Клетками, обладающими всей полнотой программы развития, т.е. наиболее универсальными стволовыми клетками (СК), можно считать зиготу и бластомеры после первого деления зиготы. Однако уже после нескольких делений бластомеры морулы млекопитающих теряют способ-

ность развиваться в полноценный организм. Далее в процессе эмбрионального развития происходит деление, рост и специализация клеточных популяций. Смена стадий в ходе эмбрионального развития подразумевает увеличение числа клеток организма и появление у них новых качеств, необходимых для выполнения задач и функций формирующихся органов. По мере роста эмбриона, наряду с формированием разнообразных структур, не существовавших на предыдущих этапах, происходит ограничение возможностей дифференцировки клеток. Дифференцировка СК сопровождается существенным изменением особенностей протекания метаболических процессов, причем эти изменения носят закономерный характер. В то же время метаболические ферменты и ключевые участники метаболических путей, такие как NADH или ацетил-кофермент А (АцКоА), играют ключевую роль в регуляции процессов поддержания

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода, АцКоА – ацетил-кофермент А, СК – стволовые клетки, ГСК – гематопозитические стволовые клетки, МСК – мезенхимные стволовые клетки или мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, ПСК – плюрипотентные стволовые клетки, ПДК – пируватдегидрогеназный комплекс, ЦТК – цикл трикарбоновых кислот, ЭпиСК – праймированные мышечные ПСК, ЭСК – эмбриональные стволовые клетки.

\* Адресат для корреспонденции.

клеток в стволовом состоянии (стволовости), самообновления и дифференцировки стволовых клеток. Это позволяет рассматривать метаболические процессы, как отдельную регуляторную систему, определяющую участие СК в формировании ткани и поддержании ее гомеостаза.

В данном обзоре мы сфокусировались на описании закономерностей изменения ключевых метаболических путей получения клетками энергии – путей катаболизма глюкозы, углеродных скелетов аминокислот и жирных кислот – в процессе перехода клетки из состояния плюрипотентности в дифференцированное состояние. На каждом этапе мы рассматривали метаболизм одного конкретного типа стволовых клеток. Из множества СК взрослого организма мы взяли в качестве примера по одному наиболее хорошо изученному примеру тканеспецифичных стволовых клеток (гематопозитические стволовые клетки (ГСК)) и мультипотентных стромальных клеток (МСК) соответственно.

### **ОБЩИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ИХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ**

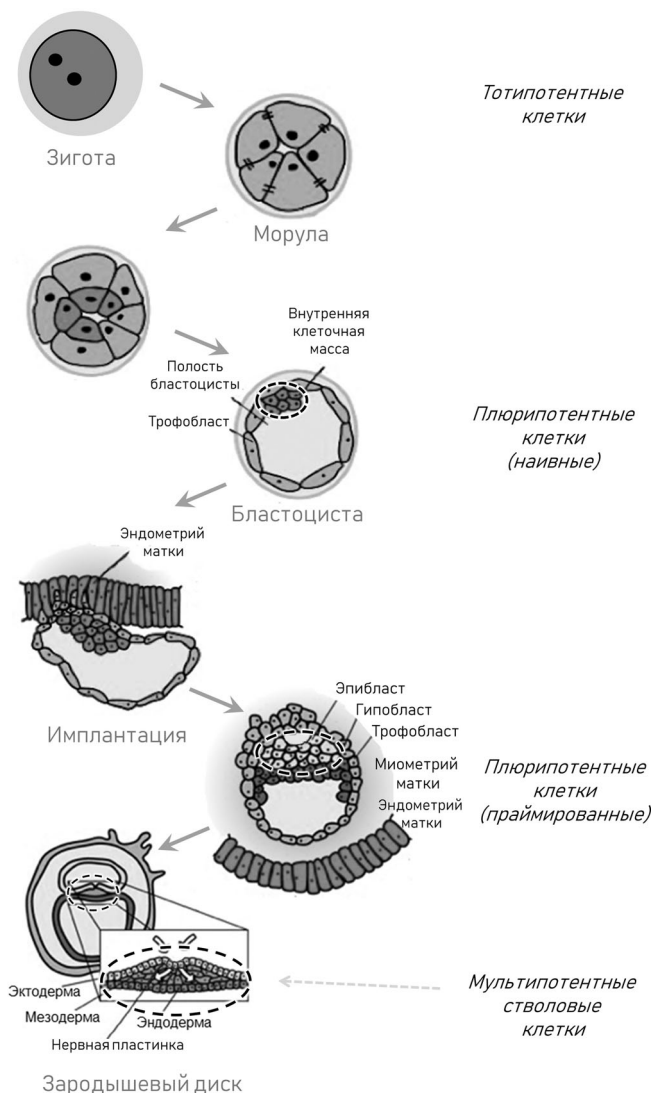
Формирующиеся из зиготы клетки ранней морулы представляют собой тотипотентные клетки – это клетки, которые могут дать начало всем типам клеток зародыша и внезародышевым органам (рис. 1). Сам зародыш преимущественно развивается из клеток, которые находятся внутри морулы (в случае мышинного эмбриона – после 4-го деления, на 16-клеточной стадии) [1]. В процессе формирования бластоцисты, на стадии 64 клеток, единая популяция разделяется на клетки внутренней клеточной массы и клетки трофобласта, после чего переход между этими клеточными типами невозможен [2]. В процессе имплантации бластоцисты в матку из клеток трофобласта развивается хорион, а из клеток внутренней клеточной массы – три зародышевых листка и связанные с ними внезародышевые органы (желточный мешок, аллантоис и амнион). На стадии бластоцисты и имплантации эмбриональные клетки характеризуются как плюрипотентные, поскольку они могут дифференцироваться как в клетки всех трех зародышевых листков, так и в половые клетки. Выделенные в культуру клетки внутренней клеточной массы бластоцисты обозначают как эмбриональные стволовые клетки (ЭСК). В связи с различием функциональных и метаболических свойств ЭСК, полученных из внутренней клеточной массы эмбрионов человека и мы-

ши, о которых будет сказано ниже, мы во всех случаях конкретизируем, какой тип клеток имеется в виду – человеческие (чЭСК) или мышинные (мЭСК). После деления на зародышевые листки стволовые клетки становятся мультипотентными, поскольку способны дифференцироваться только в границах одного зародышевого листка. Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК), выделенные из эмбрионов мышей, существуют в двух функционально различных состояниях. ПСК, полученные из внутренней клеточной массы эмбрионов до имплантации, представляют собой наивные ПСК (naive PSC, mESC, или мЭСК). Клетки, полученные из эпибласта мыши после имплантации эмбриона, получили название праймированные (primed PSC, EpiSC или ЭпиСК). Между ними существует особое функциональное состояние ПСК, именуемое формативные ПСК (formative PSC, Epi-like cells, EpiLC) [3]. И наивные, и формативные, и праймированные ПСК способны к неограниченному росту, дифференцировке в клетки всех трех зародышевых листков *in vitro* и *in vivo* на иммунодефицитных животных, но отличаются в функциональном плане. Если наивные ПСК мыши при подсадке в эмбрион, т.е. в условиях *in vivo*, дают полноценный химерный организм с образованием всех типов клеток, в том числе половых, то у праймированных есть ограничения. Праймированные ПСК не колонизируют эмбрион с образованием химерного организма. Наивные и формативные ПСК, в отличие от праймированных, способны дифференцироваться в половые клетки. Метилирование генома наивных ПСК существенно ниже праймированных, кроме того, различается уровень экспрессии транскрипционных факторов-регуляторов плюрипотентности Nanog, Klf4 и Oct4 (подробнее см. в обзоре Morgani et al. [3]). Различается также и энергетический метаболизм наивных и праймированных ПСК, что будет подробно разобрано ниже [4, 5].

В организме взрослого человека постнатальные СК являются мультипотентными или унипотентными. В последнем случае стволовая клетка способна к самообновлению и дифференцировке только в один определенный вид клеток. Несколько упрощая, постнатальные СК можно разделить на два типа – тканеспецифичные стволовые клетки и мультипотентные стромальные клетки (МСК, также альтернативно называемые мезенхимными стволовыми клетками или мультипотентными мезенхимными стромальными клетками). Тканеспецифичные СК способны к самообновлению и дифференцируются в один или несколько типов клеток определенной ткани. Например, гематопозити-

ческие СК дают начало всем клеткам крови, а эпидермальные СК в течение всей жизни организма дифференцируются в клетки эпидермиса. МСК выявляются в большинстве тканей организма и ключевыми их функциями является формирование стромы органов и тканей, регуляция тканеспецифичных стволовых клеток и дифференцировка в клетки мезенхимального ряда, такие как кость, жир и хрящ. Что интересно, если ПСК являются очень быстро пролиферирующими клетками, то постнатальные СК по большей части находятся в покое, лишь изредка выходя из него для обновления клеток ткани или в случае необходимости репарации и/или регенерации повреждения [5].

Изначально особенности метаболизма СК воспринимались исследователями просто как побочный продукт условий их существования. Действительно, зигота, морула и ранняя бластоциста до имплантации в эндометрий синтезируют АТФ в основном за счет потребления лактата, пирувата, аминокислот и жирных кислот, которые они получают из окружающей среды (жидкости полости матки). При этом тотипотентные клетки, входящие на начальных этапах развития в эмбрион, имеют достаточный доступ к кислороду, а ключевым катаболическим путем, служащим для синтеза АТФ, для них является окислительное фосфорилирование [5, 6]. Высокий уровень окислительного фосфорилирования характерен также и для наивных мЭСК, получаемых из мышечных эмбрионов до их имплантации. После имплантации и до развития плаценты доступ кислорода к эмбриону снижен. Клетки эмбриона переходят на анаэробный метаболизм, так же как и праймированные ПСК, выделяемые из эмбриона на этих стадиях [7]. Что интересно, несмотря на то, что уровень окислительного фосфорилирования в наивных ПСК выше, чем в праймированных, эти клетки, как и ПСК в целом, полагаются в основном на гликолитический путь получения АТФ, а митохондрий у них мало, они развиты слабо, и митохондриальный потенциал снижен по сравнению с дифференцированными клетками [8]. Далее, по мере развития плаценты, доступ кислорода к развивающимся тканям и органам становится достаточным для аэробного дыхания. Клетки организма по мере их дифференцировки все в большей степени переходят к окислительному фосфорилированию как основному источнику АТФ. Во взрослом организме постнатальные СК располагаются в особом микроокружении в тканях, называемых нишами, в которых доступность кислорода и питательных веществ может варьировать в широких пределах. Однако в целом в большинстве типов ниш СК доступ кислорода и

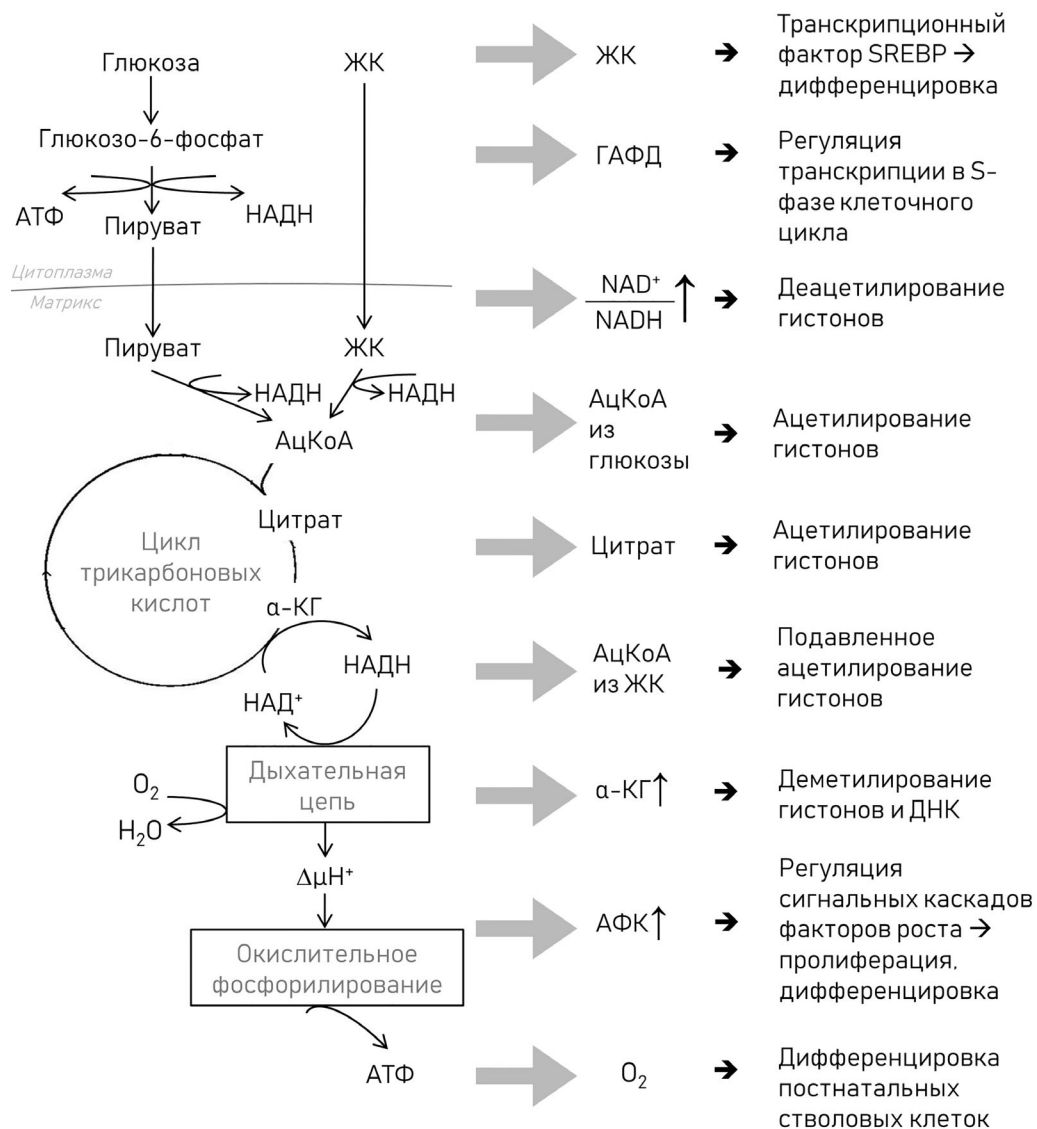


**Рис. 1.** Схематическое изображение начальных этапов эмбрионального развития мыши. Пунктирными линиями отмечены области эмбриона, из которых выделяют стволовые клетки, характеризующиеся различным потенциалом дифференцировки

питательных веществ ограничен [9, 10]. Общей чертой постнатальных СК является высокая роль гликолитического пути получения энергии.

### ПУТИ ВЛИЯНИЯ МЕТАБОЛИЗМА НА ФУНКЦИИ КЛЕТОК

Общей закономерностью изменения метаболизма в процессе дифференцировки клеток является переход от гликолиза, как основного источника АТФ, к окислительному фосфорилированию. В ходе окислительного фосфорилирования пируват, получившийся в процессе глико-



**Рис. 2.** Участники метаболического пути получения энергии из глюкозы регулируют активность генов на эпигенетическом и транскрипционном уровнях. Сокращения: αКГ – альфа-кетоглутарат, АцКоА – ацетил-кофермент А, ГАФД – D-глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа, АФК – активные формы кислорода, ΔμН<sup>+</sup> – трансмембранный электрохимический потенциал митохондрий

лиза, входит в митохондрии и превращается там в АцКоА благодаря работе пируватдегидрогеназного комплекса (ПДК) с участием кофермента NAD<sup>+</sup>, который восстанавливается до NADH. АцКоА входит в цикл трикарбоновых кислот (ЦТК, цикл Кребса, он же цикл лимонной кислоты), где полностью окисляется до двух молекул CO<sub>2</sub>. При этом образуется дополнительно три восстановленных молекулы NADH, одна FADH<sub>2</sub> и одна молекула АТФ или ГТФ. Получившийся во всех этих реакциях NADH отдает свои электроны в дыхательную цепь, где они, проходя по цепи переноса электронов, дают энергию для создания митохондриального по-

тенциала – трансмембранного электрохимического градиента протонов на внутренней мембране митохондрий. Конечным акцептором электронов в дыхательной цепи является кислород (рис. 2).

Путь катаболизма глюкозы в клетках долгое время рассматривался в основном в призме генерации энергии АТФ. В настоящее время показан ряд других функций веществ–участников метаболических процессов. Они влияют на функционирование СК и необходимы в процессе дифференцировки для синтеза строительных блоков. Кроме того, метаболические процессы эпигенетически регулируют экспрессию генов,

влияя на выбор направления дифференцировки СК. Внутриклеточный баланс метаболитов напрямую влияет на эпигеном посредством посттрансляционных модификаций гистонов, ДНК и транскрипционных факторов [5, 11] (рис. 2).

Например показано, что в некоторых случаях искусственное изменение баланса метаболических путей может приводить к приобретению клетками фенотипа стволовых. К примеру, при ангиогенезе капилляров эндотелий формирует 2 типа клеток: верхушечную клетку, определяющую процесс прорастания капилляра в ткани, и клетки «ствола», формирующие стенки прорастающего капилляра. При этом поддержание каждого из данных фенотипов определяется тем, какие метаболические пути преобладают в конкретной клетке. Верхушечная клетка капилляра использует гликолиз как основной источник энергии, а клетки «ствола» используют окислительное фосфорилирование. При этом в случае экспериментальной активации гликолиза в клетках «ствола» достаточно быстро происходила их трансдифференцировка в новые верхушечные клетки и формирование новых точек ветвления капилляров [12]. Таким образом, в организме постоянно идут процессы клеточной дифференцировки и трансдифференцировки, в которых доступность субстратов, скорость продукции АТФ и метаболитов обладает определяющим действием на фенотип клеток.

Регуляция дифференцировки и дедифференцировки клеток при участии метаболитов может осуществляться через несколько специфических механизмов.

1) Активация специфических транскрипционных факторов при изменении концентрации метаболитов. Например, уровень активности транскрипционного фактора SREBP снижается при накоплении в клетке жирных кислот [13], что может происходить при переходе клеток с окислительного фосфорилирования на гликолиз. В свою очередь, SREBP является важным регулятором адипогенной дифференцировки МСК [14].

2) Некоторые метаболические ферменты сами могут выступать в роли транскрипционных факторов. Например, показано прямое участие фермента гликолиза глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (ГАФД) в сборке транскрипционного комплекса, который регулирует транскрипцию гена гистона H2B во время S-фазы клеточного цикла. Формирование этого комплекса ингибируется NADH и стимулируется при повышении уровня NAD<sup>+</sup> [15].

3) Большинство ферментов, осуществляющих транскрипцию и ремоделирование хроматина, требуют для своей активности метаболитические

субстраты, такие как АцКоА, АТФ, NADH и др. Таким образом, эти соединения выступают в роли своеобразных метаболических мессенджеров, способных обеспечивать сопряжение транскрипционной клеточной программы с уровнем активности основных метаболических каскадов.

Наиболее хорошо изученным на сегодняшний день механизмом воздействия на дифференцировку клеток при участии метаболитов является регуляция эпигенетических модификаций гистонов и ДНК. Ацетилирование гистонов коррелирует с интенсивностью гликолиза. Пировиноградная кислота превращается в АцКоА, который в виде цитрата выходит из митохондрий, и в ядре разделяется на АцКоА и оксалоацетат. АцКоА выступает донором ацетильной группы для гистоновых ацетилаз [5]. Что интересно, в отсутствие поступления глюкозы в клетку, когда основным донором АцКоА для ЦТК являются жирные кислоты, ацетилирование гистонов не повышается [16]. Это может показаться странным, поскольку в митохондриях точно так же образуется цитрат, а молекулы АцКоА не различаются в зависимости от источника их синтеза. Этот феномен может быть объяснен тем, что оксалоацетат из ядра после высвобождения АцКоА не возвращается в митохондрии, соответственно, ЦТК истощается на свои интермедиаты. В случае поступления глюкозы в клетку недостаток оксалоацетата может компенсироваться путем анаплеротических реакций, связанных с активностью пируваткарбоксилазы, которая синтезирует оксалоацетат путем карбоксилирования пирувата. В том же случае, если источником АцКоА являются жирные кислоты, данный тип анаплеротических реакций не работает, и цитрат не выходит из митохондрий.

Деацетилирование гистонов осуществляется большой группой ферментов, называемых гистон-деацетилазы. Представители III класса гистон-деацетилаз, также известные как белки сиртуины, используют NAD<sup>+</sup> для деацетилирования гистонов. В связи с этим их ферментативная активность зависит от уровня NAD<sup>+</sup> в ядре, который, по-видимому, коррелирует с его уровнем в цитоплазме, а сами сиртуины рассматривают в качестве эндогенных сенсоров, регистрирующих потенциал NAD<sup>+</sup>/NADH в клетке. Изменения в метаболизме между преимущественно гликолитическим путем и окислительным фосфорилированием неизбежно приводят к изменению потенциала NAD<sup>+</sup>/NADH. Чем выше интенсивность гликолиза, тем большая доля NAD находится в восстановленном состоянии. Повышение доли NAD<sup>+</sup> в цитоплазме при пере-

ходе клетки к окислительному фосфорилированию может регистрироваться сиртуинами и конвертироваться ими в эпигенетические модификации гистонов и негистоновых белков, подвергающихся деацетилированию [5, 17, 18].

Деметилирование гистонов и ДНК осуществляется ферментами деметилазами. Лизин-специфичная деметилаза (lysine-specific demethylase 1, LSD1) осуществляет деметилирование гистонов [19] с использованием FAD, который в процессе деметилирования восстанавливается до FADH<sub>2</sub>. Предполагается, что окислительно-восстановительный потенциал FAD/FADH<sub>2</sub> деметилаз, который зависит от метаболического статуса клетки, может влиять на эффективность деметилазной активности LSD1 [20]. Однако ключевые метаболические реакции, в ходе которых происходит восстановление FADH<sub>2</sub>, а именно, окисление жирных кислот и реакции II комплекса дыхательной цепи, происходят в митохондриях. При этом гистон-деметилаза работает в ядре. Учитывая, что FAD – это простетическая группа фермента, которая не выходит из него после совершения реакции, встает вопрос: каким образом потенциал FAD/FADH<sub>2</sub> из митохондрий транслируется в ядро. Вероятнее всего, окислительно-восстановительный потенциал FAD/FADH<sub>2</sub> деметилаз отражает цитоплазматическое соотношение NAD<sup>+</sup>/NADH. Таким образом, можно предположить участие метаболических ферментов в регуляции активности LSD1 [5]. Этот фермент привлекает особое внимание исследователей, поскольку показано, что он вызывает деметилирование гистонов и, как следствие, ингибирование энхансерных регионов генов, критически важных для поддержания стволовости ПСК. Это является одним из важных шагов для успешного направления ПСК в дифференцировку [21]. Таким образом, окислительно-восстановительный потенциал FAD, располагающегося в ферментах деметилазах, напрямую влияет на регуляцию направления ПСК в дифференцировку. В то же время вопрос о том, как он соотносится с соответствующим потенциалом митохондрий и цитоплазмы, т.е. с метаболическим статусом клетки, требует дальнейших исследований.

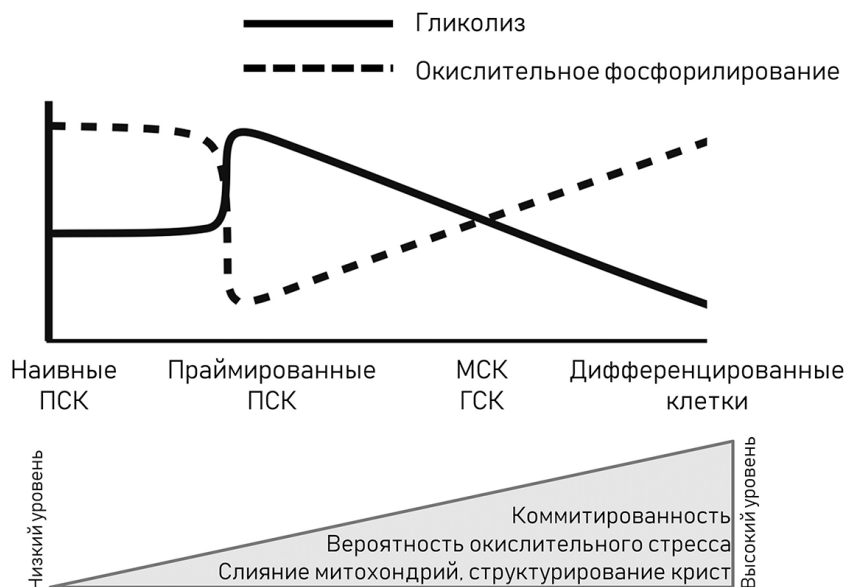
Ряд других деметилаз гистонов (JmJc) и ДНК (TET) в качестве акцептора электронов в окислительно-восстановительной реакции деметилирования используют альфа-кетоглутарат ( $\alpha$ -КГ) [22, 23].  $\alpha$ -КГ образуется в процессе прохождения ЦТК, а также при дезаминировании аминокислот глутамата и глутамина.  $\alpha$ -КГ посредством селективного переносчика может выходить из митохондрий и участвовать в окислительно-восстановительных реакциях деметили-

рования. Введение в кровоток мышей повышенных концентраций глюкозы, глутамата или глутамата приводит к существенному увеличению активности деметилазы TET в ряде органов [23]. С другой стороны, если стволовая клетка пребывает в условиях недостаточной доступности глюкозы, активность деметилаз JmJc и TET может быть подавлена. Аналогично ситуации с ацетилированием гистонов при участии цитрата, если один из участников ЦТК выходит из него, эта утрата должна компенсироваться за счет анаэробных реакций, которые в значительной степени зависят от гликолиза. Таким образом, суммируя вышесказанное, метаболические процессы, протекающие в конкретной стволовой клетке, а также доступность глюкозы и кислорода для дыхания могут влиять на эпигенетические процессы регуляции активности генов, как поддерживающих клетку в состоянии стволовости, так и направляющих ее в дифференцировку.

## ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

Плюрипотентность – это способность клетки к формированию всех трех зародышевых листков в процессе эмбрионального развития организма или при дифференцировке в культуре. В более широком смысле, плюрипотентными называются клетки, которые способны к самообновлению и могут дифференцироваться в ткани, предшественники которых в эмбриональном развитии происходят из разных зародышевых листков. Как было сказано выше, если ПСК из эмбрионов мышцы могут выделяться на двух различных стадиях и, соответственно, находиться в двух функциональных состояниях, в виде наивных и праймированных клеток, то чЭСК, выделенные из бластоцисты человека, соответствуют праймированным мышечным ПСК, т.е. ЭпиСК. Как ЭпиСК, так и чЭСК обладают особенностями метаболизма, которые обусловлены этапами развития эмбриона на стадии плюрипотентности после его имплантации (рис. 3).

Первая отличительная черта праймированных ПСК – это преобладание гликолитического пути получения энергии над окислительным фосфорилированием [7, 24]. В ПСК гликолиз занимает ключевую роль в общем энергетическом метаболизме. ПСК активно делятся и, в среднем, нуждаются в большем количестве энергии для своих синтетических процессов, чем дифференцированные клетки. При этом гликолиз – намного менее энергетически эф-



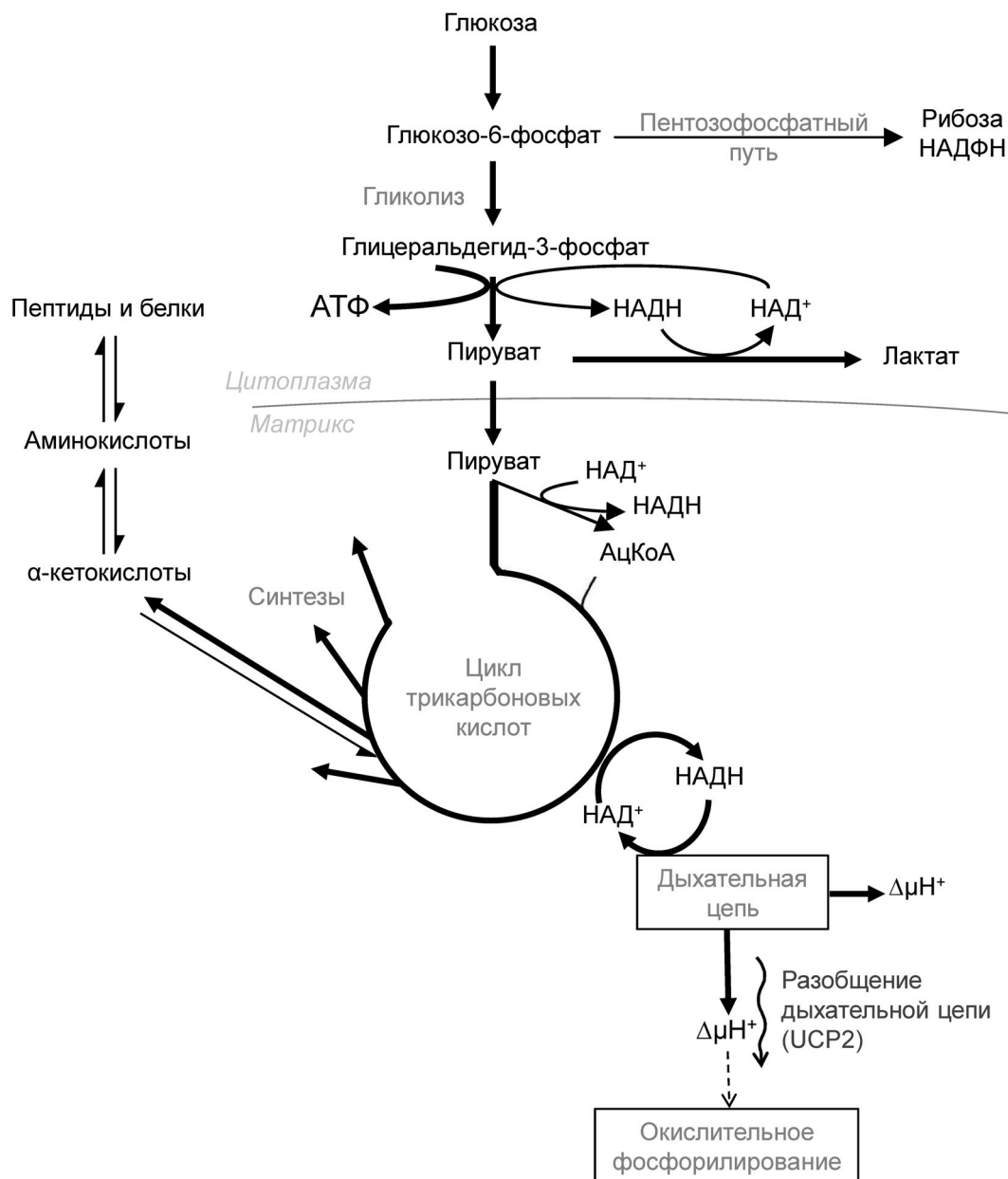
**Рис. 3.** Схематическое изображение закономерностей изменения уровня гликолиза и окислительного фосфорилирования при дифференцировке клеток из плюрипотентного состояния в дифференцированные клетки

эффективный путь катаболизма глюкозы по сравнению с окислительным фосфорилированием. При полном окислении глюкозы с участием окислительного фосфорилирования образуется 32–34 молекулы АТФ на одну молекулу глюкозы, в гликолизе же — только 2 молекулы. Сначала в раковых клетках, а потом в плюрипотентных и некоторых постнатальных стволовых клетках (например, гематопоетических) был обнаружен эффект перехода метаболизма преимущественно на гликолитический путь даже при высокой концентрации кислорода. При этом подавляется окислительное фосфорилирование и усиливается продукция лактата. Этот способ получения энергии получил название аэробного гликолиза или эффекта Варбурга по фамилии его первооткрывателя (рис. 4) [25, 26]. Предполагается, что необходимость перехода на гликолитический путь производства АТФ связана со скоростью процесса: гликолиз, хотя и является существенно более затратным путем, проходит намного быстрее, чем окислительное фосфорилирование. Вследствие этого суммарный выход АТФ в единицу времени оказывается выше [26]. При дифференцировке ПСК идет переключение метаболических путей, происходит переход от гликолиза к окислительному фосфорилированию в качестве основного и более эффективного пути образования энергии [27].

Клетки, переходящие на аэробный гликолиз, отличаются крайне высокой скоростью пролиферации. Соответственно, второй отличительной чертой ПСК является их быстрая

пролиферация. Это вторая причина, по которой в ПСК наблюдается крайне высокая активность гликолиза, который играет ключевую роль не только в производстве энергии, но и в прохождении ускоренных биосинтетических процессов в активно пролиферирующих клетках. Для активной пролиферации требуется синтез большого количества нуклеотидов, фосфолипидов и аминокислот; некоторые клетки крайне активно синтезируют белки внеклеточного матрикса или сигнальные молекулы. Метаболические процессы играют ключевую роль в образовании строительных блоков для синтезов новых веществ, требуемых для деления и дифференцировки. Существенная часть субстратов для синтеза всех этих молекул происходит из гликолиза и ЦТК (рис. 4). 3-Фосфоглицерат выводится из гликолиза; АцКоА — после ПДК; оксалоацетат, цитрат, альфа-кетоглутарат и сукцинил-КоА выводятся из ЦТК, и все это используется для синтезов [28]. Для компенсации недостающих компонентов цикла Кребса используются анаплеротические реакции, ключевой из которых является реакция пируваткарбоксилазы, которая из пирувата делает оксалоацетат. При этом цикл Кребса оказывается как бы разомкнутым.

Крайне высокий уровень пролиферации в ПСК характеризуется укороченным клеточным циклом. При этом по сравнению с дифференцированными клетками существенно большая часть ПСК находится в S-фазе [29]. В то же время высокая пролиферативная активность ПСК не приводит к их выходу из состояния плюрипо-



**Рис. 4.** Изменение ключевых метаболических путей катаболизма глюкозы при активной пролиферации ПСК. В активно пролиферирующих и синтезирующих клетках интермедиаты ЦТК выводятся из цикла и выступают в качестве предшественников синтезируемых веществ – аминокислот, гема, нуклеотидов и др. Недостаток участников ЦТК компенсируется за счет анаплеротических реакций – превращения пирувата в оксалоацетат пируваткарбоксилазой и синтеза  $\alpha$ КГ из глутамата и глутамина. Образующиеся при этом молекулы NADH утилизируются частично за счет окислительного фосфорилирования, частично – за счет работы разобщающего белка дыхательной цепи – uncoupling protein 2 (UCP2)

тентности благодаря способности к самообновлению. Самообновление поддерживается уникальными эпигенетическими модификациями хроматина и транскрипционными факторами – регуляторами плюрипотентности Oct4, Nanog и Sox2 [30]. Таким образом, быстрый приток строительных блоков для активно пролиферирующих и синтезирующих ПСК обеспечивается выведением интермедиатов из метаболических ре-

акций и анаплеротическими реакциями [31–33].

В-третьих, в ПСК митохондрии фрагментированные и разрозненные, а уровень окислительного фосфорилирования крайне низок. При этом направление ПСК в дифференцировку характеризуется структурированием митохондрий и их выстраиванием в длинные филаментные структуры [24]. Ультраструктура крист тоже раз-



личается — если в дифференцированных клетках в активно работающих митохондриях линейные ровные кристы расположены упорядоченными стопками, то в ПСК кристы — разрозненные и слабоупорядоченные. При этом нормализованное на общий белок количество митохондрий, а также нормализованная активность цитрат-синтазы существенно не изменяются [24]. Ряд данных свидетельствует о том, что в плюрипотентных клетках меньше плотность и количество митохондрий по сравнению с дифференцированными клетками. Однако, скорее всего, это ошибочное заключение связано с тем, что ПСК имеют меньший объем цитоплазмы при приблизительно равном размере ядра, то есть имеют более высокий показатель ядерно-цитоплазматического индекса, и при равной плотности расположения митохондрий имеют меньшее их число.

Четвертой характерной чертой ПСК является крайне высокая чувствительность к проапоптотическим стимулам и, одновременно с этим, мощная защита от этих стимулов: высокая концентрация антиоксидантов и наличие системы стабилизации митохондриального мембранного потенциала [31–33]. Несмотря на слабое развитие системы митохондрий, клетки поддерживают высокие значения митохондриального потенциала. Это объясняется тем, что АТФ-синтаза в ПСК работает в значительной степени в направлении гидролиза АТФ для продукции протонного градиента. Это также подтверждается низким уровнем экспрессии ингибиторного фактора 1 (IF1), который в дифференцированных клетках препятствует гидролазной активности АТФ-синтазы [24, 34]. Этим же свойством АТФ-синтазы митохондрий можно объяснить тот факт, что в ПСК уровень дыхания является максимально возможным даже при крайне слабом окислительном фосфорилировании. Это продемонстрировали с использованием разобщителя дыхательной цепи FCCP. При его появлении электрохимический митохондриальный потенциал падает, и клетка, пытаясь компенсировать его, разгоняет дыхание на максимально возможный для конкретных клеток уровень. Если в дифференцированных фибробластах уровень дыхания после добавления FCCP вырастает более чем вдвое, то ПСК — вообще не показывает прироста. Таким образом, низкий уровень дыхания, который наблюдается в ПСК, является максимально возможным для слабоорганизованной митохондриальной системы этих клеток, а АТФ-синтаза за счет гидролазной активности поддерживает высокий уровень электрохимического потенциала митохондрий [24].

Величина электрохимического потенциала митохондрий в ПСК регулируется при помощи разобщающего белка дыхательной цепи UCP2. UCP2 является гомологом белка UCP1 (термогенина), который разобщает дыхательную цепь митохондрий в клетках бурой жировой ткани для производства тепла. Уровень экспрессии UCP2 существенно повышен в ПСК по сравнению с дифференцированными клетками [24]. Например, по сравнению с фибробластами уровень UCP2 в плюрипотентных клетках повышен в 5–10 раз. Другие изоформы разобщителей митохондриального мембранного потенциала UCP1 и UCP3 в ПСК экспрессируются на существенно более низких уровнях. UCP2, в отличие от UCP1, не сбрасывает потенциал до низких значений, а обеспечивает «подтекание» протонов через внутреннюю мембрану митохондрий. Одной из ключевых его функций, как считается, является регулирование уровня электрохимического потенциала митохондрий для защиты от чрезмерно высоких его значений. Эта функция осуществляется за счет того, что активность UCP2 зависит от уровня активных форм кислорода (АФК). При повышении трансмембранного потенциала митохондрий дыхательная цепь замедляется, что приводит к образованию повышенного уровня АФК. АФК активируют UCP2, который сбрасывает излишки протонного градиента. Дыхательная цепь ускоряется, продукция АФК снижается, UCP2 инактивируется. Таким образом, UCP2 выполняет роль своеобразного клапана электрохимического потенциала митохондрий, который служит для предотвращения электрического пробоя «биологического конденсатора» — внутренней мембраны митохондрий [35, 36]. Механизм действия UCP основан на его способности переносить анионы органических кислот из матрикса митохондрий в межмембранное пространство, в результате чего происходит компенсация электрохимического потенциала. В том случае, если переносятся жирные кислоты, они протонируются в межмембранном пространстве и, в результате флип-флоп перехода, могут возвращаться на матриксную сторону мембраны, где дополнительно отдают протон [37].

UCP2 играет важную роль в регуляции метаболического статуса плюрипотентных стволовых клеток. При дифференцировке ПСК происходит снижение экспрессии UCP2, и, вероятно, связанные с этим повышение общего содержания АФК и увеличение мембранного потенциала митохондрий. Эктопическая экспрессия UCP2 приводит к поддержанию стволовости клеток, приводя к снижению экспрессии генов, активируемых при дифференцировке [24]. Роль

UCP2 в поддержании метаболического статуса плюрипотентных клеток не ограничивается только редокс-зависимым сбросом мембранного потенциала для защиты от окислительного стресса. Сброс излишков протонного градиента необходим при существенном повышении синтетической активности клеток, когда ЦТК работает в основном на синтез предшественников синтезируемых веществ. Анаэробные реакции в этом случае пополняют выводимые из ЦТК интермедиаты, а NADH, как побочный продукт, «сжигается» в дыхательной цепи. Третья возможная роль UCP2 в поддержании гликолитического метаболизма ПСК связана с их способностью переносить из митохондрий анионы органических кислот, в том числе, пируват. В результате этой активности UCP2 выводит пируват из матрикса митохондрий, лишая ПДК субстрата. В дифференцированных клетках это приводит к переключению метаболизма на катаболизм жирных кислот, а в ПСК, в комплексе с другими факторами – к переключению метаболизма на аэробный гликолиз [38].

Лимитирующей скоростью стадией в метаболизме глюкозы в ПСК является не вход глюкозы в клетку, а именно способность клетки ее усвоить [24]. В ПСК достаточное количество глюкозных транспортеров и высокий уровень гексокиназы II, благодаря которой входящая в клетку глюкоза фосфорилируется и задерживается в цитоплазме. С другой стороны, в этих клетках снижена активность пируватдегидрогеназного комплекса, который вводит пируват в ЦТК. Кроме того, в ПСК активна киназа пируватдегидрогеназы, фосфорилирование которой дополнительно снижает активность ПДК [39].

Функции ПСК регулируются также продуктами обмена аминокислот. Важную роль в этом процессе играет катаболизм треонина. С одной стороны, он ведет к образованию S-аденозилметионина (SAM), который является основным донором метильных групп при метилировании ДНК и гистонов. При этом изменения в уровне SAM могут приводить к значительному изменению уровня метилирования гистонов [40], что определяет эпигенетическое регулирование клеток при изменении метаболизма и скорости катаболизма аминокислот. С другой стороны, треонин является важным регулятором самообновления эмбриональных стволовых клеток. Катаболизм треонина, осуществляемый треонин-дегидрогеназой, приводит к образованию АцКоА и глицина в митохондриях, служащих для синтезов и получения энергии. АцКоА входит в ЦТК и используется для получения клеточной энергии. Глицин является ключевым промежуточным соединением синтеза гемов, входя-

щих в цитохромы, и антиоксидантного агента глутатиона [28]. Глутатион необходим ПСК для поддержания мощной антиоксидантной системы и новых синтезов для быстрой пролиферации клеток. Ингибирование треонин-дегидрогеназы тормозит процесс самообновления ПСК, а избыточная экспрессия способствует индуцированной плюрипотентности [41].

Таким образом, метаболизм ПСК характеризуется ключевой ролью гликолиза в выработке энергии, а ЦТК в основном работает на продукцию строительных блоков для синтезов. Это связано с крайне высокой скоростью пролиферации этих клеток и их синтетической активностью, а также слабым развитием митохондриальной системы.

### ПОСТНАТАЛЬНЫЕ МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

Дифференцировка ПСК в направлении одного из зародышевых листков, мезодермы, эктодермы или энтодермы приводит к превращению плюрипотентных клеток в мультипотентные. В эмбриональном развитии на этой стадии уже начинает образовываться плацента, в результате чего доступ кислорода к эмбриону, который был затруднен после имплантации, возобновляется. В целом, как в процессе эмбрионального развития, так и в культуре, по мере дифференцировки ПСК, все больший вклад в энергетический метаболизм начинает вносить окислительное фосфорилирование. Митохондрии из разрозненных точечных образований превращаются в длинные разветвленные структуры с упорядоченными кристами [24, 42]. Однако в процессе дифференцировки ПСК переход от гликолиза к окислительному фосфорилированию осуществляется не во всех случаях. Например, эктодермальное направление дифференцировки ПСК значительно в меньшей степени приводит к переходу на окислительное фосфорилирование, в отличие от мезодермального и энтодермального направлений [43]. Таким образом, за некоторыми исключениями, переход клеток к мультипотентности сопровождается усилением функций митохондрий и окислительного фосфорилирования в синтезе АТФ.

Постнатальные СК, являющиеся либо мультипотентными, либо унипотентными, проявляют достаточно большую гетерогенность по относительному вкладу окислительного фосфорилирования и аэробного гликолиза в продукцию АТФ. Однако, в среднем, эти клетки занимают промежуточное положение между ПСК и большинством дифференцированных клеток, а за-

кономерности связи стволового потенциала клеток и их метаболического статуса справедливы и для постнатальных СК. Так, локальное микроокружение играет существенную роль в регуляции их функций. Компоненты ниши могут ограничивать доступ кислорода и/или питательных веществ к СК, поддерживая ее в покоем состоянии [10, 44]. На примере двух представителей постнатальных СК рассмотрим особенности энергетического метаболизма стволовых клеток взрослого организма и связанные с этим функции.

Гематopoэтические стволовые клетки наравне с базальными клетками эпителия и эпидермиса являются наиболее активными тканеспецифичными постнатальными СК. ГСК дают начало всем клеткам крови и локализуются в костном мозге. Вследствие ограниченной доступности кислорода в нише костного мозга ГСК постоянно находятся в гипоксических условиях. Гипоксия активирует экспрессию HIF-1 $\alpha$ , что приводит к усилению анаэробного гликолиза. Преимущественно гликолитический метаболический статус ГСК подтверждается низким ми-

тохондриальным потенциалом, продукцией большого количества лактата и низким уровнем АТФ и NADH [45]. Доступность кислорода и связанные с этим доминирующие пути синтеза АТФ играют критическую роль в регуляции функциональной активности ГСК. В костном мозге выявляют два типа ниш ГСК: эндостальную и периваскулярную (рис. 5). Периваскулярная ниша располагается рядом с сосудами и, как следствие, уровень кислорода в ней достаточно высокий. Эндостальная ниша располагается по периферии от периваскулярной, ближе к костной ткани, в ней доступность кислорода существенно ниже. В этих двух нишах располагаются разные по пролиферативному потенциалу и дифференцировочным свойствам ГСК. В эндостальной нише находятся покоящиеся ГСК, которые медленно делятся, характеризуются высоким уровнем HIF-1 $\alpha$  и повышенным анаэробным гликолизом. При переходе ГСК в периваскулярную нишу уровень HIF-1 $\alpha$  снижается, клетки начинают быстрее пролиферировать и направляются в дифференцировку. Выделяют 3 варианта деления ГСК. Покоящиеся ГСК в эн-

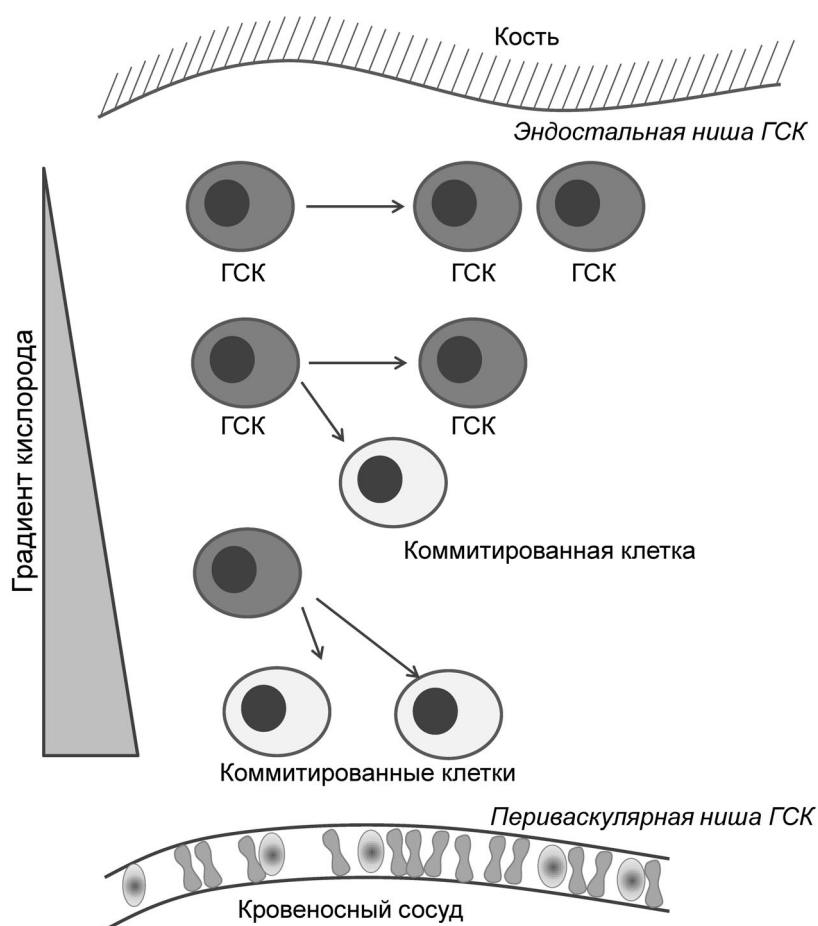
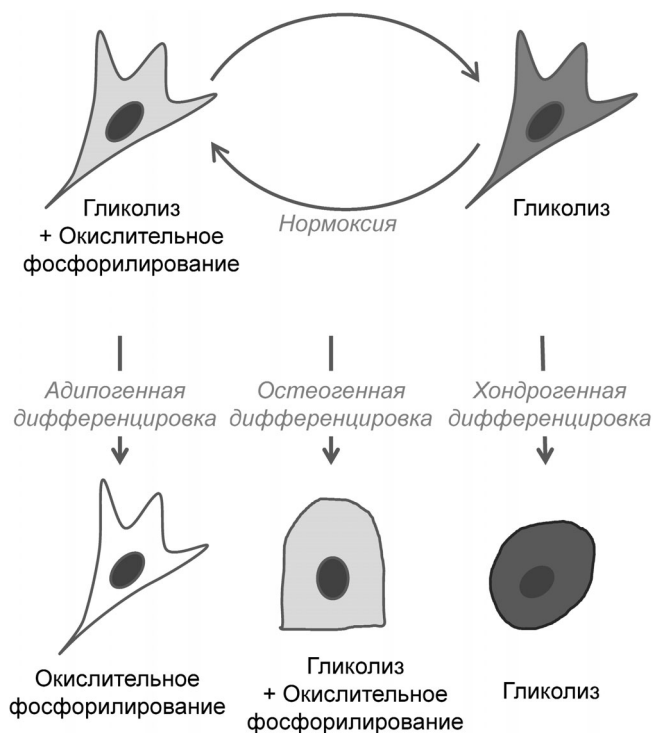


Рис. 5. Дифференцировочная судьба ГСК зависит от доступности кислорода



**Рис. 6.** МСК проявляют метаболическую пластичность, переключаясь на анаэробный гликолиз в условиях гипоксии и возвращаясь к исходному состоянию при нормализации доступа кислорода. При направлении в дифференцировку характер изменения метаболизма клеток зависит от направления дифференцировки

достальной нише делятся редко и живут за счет анаэробного гликолиза. При этом деление симметричное, на выходе образуются две стволовые клетки. ГСК, попадающие в периваскулярную нишу, делятся одним из двух вариантов. Либо асимметрично, в результате чего образуется одна стволовая клетка и одна клетка, коммитированная в дифференцировку. Либо симметрично, но на выходе из деления образуются две коммитированные в дифференцировку клетки. Выбор между двумя последними типами деления ГСК зависит от энергетического метаболизма делящихся клеток [46]. Если в ГСК активен путь  $\beta$ -окисления жирных кислот, то СК подвергаются асимметричному делению с поддержанием самообновления. Если же этот путь либо подавлен физиологическими стимулами, либо подавлен фармакологически, то стволовая клетка делится на две коммитированные гематopoэтические клетки [47]. Дифференцирующиеся ГСК используют для получения энергии окислительное фосфорилирование и делятся с образованием только более дифференцированных клеток. Любые воздействия, активирующие окислительное фосфорилирование, в ГСК приводят к дифференцировке клеток [46]. Таким образом, метабо-

лизм является одним из ключевых регуляторов направления дифференцировки ГСК.

Мультипотентные стромальные клетки представляют собой постнатальные СК, встречающиеся в большинстве тканей организма, которые могут дифференцироваться в ряд типов клеток мезенхимного направления, таких как адипоциты, остеобласты и хондробласты, но, по-видимому, *in vivo* делают это крайне редко [48, 49]. Более важной их функцией является организация комплекса компонентов микроокружения и регуляции тканеспецифичных стволовых и дифференцированных клеток, что можно назвать понятием «строма» в широком смысле этого слова. Например, МСК костного мозга являются ключевыми и необходимыми посредниками между симпатической регуляцией кроветворения и ГСК [50]. МСК преимущественно располагаются периваскулярно, регистрируют гормональный фон организма и получают сигналы от симпатической нервной системы [51, 52]. МСК конвертируют эти сигналы в спектр паракринных факторов и регуляторных микровезикул, благодаря чему выступают ключевыми факторами поддержания гомеостаза ткани и регуляторами процессов репарации и регенерации [53, 54], а также регулируют функционирование иммунных клеток в ткани [55].

МСК проявляют очень высокую пластичность в способности переключаться между окислительным фосфорилированием и гликолизом для выбора наиболее оптимального пути получения энергии (рис. 6). При этом в МСК в условиях нормоксии активны как окислительное фосфорилирование, так и гликолитический путь получения энергии. По некоторым оценкам, в культуре МСК вклад окислительного фосфорилирования в продукцию АТФ составляет ~30%, а остальное – аэробный гликолиз [56]. МСК можно перевести в 3D-культуру путем их культивирования при низкой плотности посадки и определенном составе среды. При этом МСК самоорганизуются в клональные мезенсферы, внутри которых популяция СК поддерживается существенно дольше, чем в расплавленной культуре клеток [50]. После перехода МСК в 3D-культуру в них существенно снижается общий уровень метаболизма. Уменьшается как продукция лактата, так и уровень потребления кислорода, нормированные на количество клеток [56]. Проявляя метаболическую пластичность, МСК оказываются устойчивы к гипоксии, переходя на анаэробный гликолиз. При этом МСК не теряют своих способностей к дифференцировке, а сам переход носит обратимый характер [57]. Считается, что метаболическая пластичность необходима МСК для успешного

функционирования в условиях ишемии после повреждения ткани, когда МСК должны производить репарацию повреждения.

Преимущественно гликолитический метаболизм, даже в условиях достаточного поступления кислорода, играет существенную роль в поддержании пролиферации, секреторной функции и выбора направления дифференцировки МСК [58]. При гипоксии происходит активация HIF-1 $\alpha$ , что приводит к повышению экспрессии ферментов анаэробного гликолиза и снижению уровня окислительного фосфорилирования за счет ингибирования ПДК [59]. Однако и в условиях нормоксии МСК продолжают поддерживать высокий уровень гликолиза за счет сохранения экспрессии HIF-1 $\alpha$ . Это необходимо для поддержания высокой синтетической активности клеток, а также продукции антиоксидантов для предотвращения окислительного стресса. Кроме того, невысокая активность митохондрий дополнительно снижает вероятность образования АФК [58, 60]. Совместно мощная антиоксидантная защита и низкий уровень продукции АФК приводят к тому, что МСК проявляют крайне высокую устойчивость к апоптозу [61]. Направление МСК в дифференцировку, так же, как и в случае ПСК, изменяет метаболический статус клеток. При этом характер изменения метаболизма зависит от того, в какой тип клеток дифференцируются МСК. При адипогенной дифференцировке происходит переключение МСК с преимущественно гликолитической продукции АТФ на окислительное фосфорилирование. При этом существенно снижается продукция лактата, повышается потребление кислорода. В то же время значительно повышается экспрессия белков-разобщителей митохондрий (UCP1, UCP2 и UCP3) [62]. Это может свидетельствовать о том, что ЦТК работает не только на обеспечение энергетических нужд, но и для снабжения дифференцирующихся клеток необходимыми для синтезов интермедиатами аналогично тому, как ПСК используют интермедиаты ЦТК (рис. 2). Блокирование дыхательной цепи или помещение клеток в условия гипоксии приводит к подавлению адипогенной дифференцировки [62]. При хондрогенной дифференцировке МСК сохраняется преимущественно гликолитический путь получения АТФ. Это может быть связано с особенностями хрящевой ткани, которая не снабжается кровью, в связи с чем хондробласты функционируют в условиях гипоксии [56]. Данные по поводу изменения метаболизма МСК в процессе остеогенной дифференцировки разнятся. Ряд авторов утверждает, что клетки при этом переходят на аэробный метаболизм с преобладанием

окислительного фосфорилирования [63]. Другие же показали, что дифференцирующиеся МСК сохраняют высокий уровень гликолиза и его значительное участие в продукции АТФ [64]. Эти противоречия могут быть вызваны тем, что в процессе остеогенной дифференцировки клеточный энергетический метаболизм изменяется нелинейно. Так, на первом этапе дифференцировки МСК активно пролиферируют, при этом в них доминирует гликолитический путь получения энергии, а ЦТК используется как источник метаболитов для синтеза структур в делящихся клетках. Далее, когда клетки переходят непосредственно к остеогенной дифференцировке, для синтеза энергии используется преимущественно окислительное фосфорилирование [65]. Таким образом, МСК, в отличие от тканеспецифичных мультипотентных клеток, проявляют существенную метаболическую пластичность, которая позволяет им эффективно выполнять свои функции как в условиях нормального снабжения ткани кислородом, так и в условиях гипоксии.

### МЕТАБОЛИЗМ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Как было показано выше, в процессе дифференцировки СК происходят существенные изменения метаболических путей получения энергии клетками. Более того, интермедиаты метаболических процессов сами влияют на эффективность дифференцировки. Таким образом, метаболический статус клеток и их стволовый потенциал являются взаимосвязанными и обоюдно зависимыми признаками. С практической точки зрения было бы полезно научиться управлять дифференцировочными свойствами СК для их контролируемого применения в регенеративной медицине. Например, для большинства стволовых клеток актуально стоит вопрос о как можно более однородной дифференцировке в нужном направлении без побочных продуктов. А для использования индуцированных ПСК в медицине на первых же этапах встает еще более серьезный вопрос о вероятном образовании тератом в том случае, если в популяции останутся хотя бы небольшие группы плюрипотентных клеток. Ниже будут рассмотрены некоторые примеры того, как, воздействуя на метаболизм СК, можно влиять на их способность к дифференцировке.

Величина митохондриального мембранного потенциала является фактором, регулирующим стволовый и дифференцировочный потенциал ПСК. Для демонстрации этого мышинные ЭСК

культивировали в метастабильном состоянии в среде, содержащей LIF, но без ингибиторов сигнальных путей MAPK и Gsk3, которые промотируют переход наивных мышинных ЭСК в праймированное состояние. В этом состоянии ПСК демонстрируют гетерогенность по митохондриальному мембранному потенциалу. Клетки разделили при помощи клеточного сортера на клетки с высоким и низким митохондриальным потенциалом. Такие клетки не различаются внешне и по экспрессии маркеров и факторов плюрипотентности, но отличаются функционально. Клетки с высоким мембранным потенциалом имеют существенно повышенный уровень метаболизма, поскольку у них повышен как уровень потребления кислорода, так и продукции лактата, что свидетельствует о том, что у них усилен и гликолиз, и дыхание. Эти клетки крайне плохо направляются в мезодермальную дифференцировку, но при подсадке *in vivo* образуют тератомы с формированием клеток всех трех зародышевых листков. Клетки с пониженным мембранным потенциалом эффективно направляются в мезодермальную дифференцировку [66]. Можно предположить, что клетки с высоким потенциалом митохондрий находятся в состоянии наивных мЭСК, у которых повышен уровень окислительного фосфорилирования, а клетки с низким митохондриальным потенциалом схожи с праймированными ЭпиСК.

Искусственное воздействие на митохондриальный потенциал также изменяет дифференцировочные характеристики ПСК. Так, если культивировать мЭСК или чЭСК в среде, содержащей митохондриальный разобщитель CCCP, уровень пролиферации падает, а экспрессия транскрипционных факторов плюрипотентности Oct4, Nanog и Sox2 растет. Это сопровождается снижением уровня дыхания и повышением активности анаэробного гликолиза, сопровождающегося продукцией лактата [67]. Если направить мЭСК в дифференцировку в присутствии CCCP, то, несмотря на то что экспрессия транскрипционных факторов плюрипотентности снижается так же, как и в необработанных клетках, в популяции сохраняются клетки, способные образовывать тератомы. При подсадке мыши дифференцированных мЭСК, обработанных CCCP, частота образования тератом су-

щественно выросла по сравнению с необработанными клетками [67].

В линиях ПСК, а также на начальных этапах направления их в дифференцировку, одним из основных питательных веществ является глутамин. Он обеспечивает анаэробные реакции ЦТК в активно пролиферирующих клетках, превращаясь в глутамат и метаболиты ЦТК. Кроме того, глутамин активирует UCP2, который, как было сказано выше, является важным регулятором метаболизма ПСК. Депривация клеток в питательной среде без глутамина приводит к значительному снижению количества метаболитов ЦТК, при этом пируват не компенсирует этот недостаток [43]. Таким образом, регулируя доступность глутамина для ПСК, можно пробовать останавливать процесс самоподдержания плюрипотентных клеток при направлении их в дифференцировку.

Использование стволовых плюрипотентных и мультипотентных клеток в регенеративной медицине открывает крайне широкие возможности для восстановления тканей и целых органов человека. Однако до того, как эти клетки смогут использоваться в широкой практике, требуется существенно расширить наши знания о механизмах функционирования и регуляции этих клеток. Причем, метаболизм СК является не только маркером их стволового статуса, но и активным действующим лицом, воздействуя на которое потенциально можно управлять процессом дифференцировки стволовых клеток.

**Финансирование.** Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 18-015-00421), (П.А.Т.-К.) в части регуляции метаболизма плюрипотентных стволовых клеток, а также Российским научным фондом (грант № 19-75-30007) в части регуляции метаболизма постнатальных стволовых клеток (К.Ю.К.). П.А.Т.-К. поддержан стипендией Президента России для молодых ученых СП-2903.2019.4.

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

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследований.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pedersen, R.A., Wu, K., and Balakier, H. (1986) Origin of the inner cell mass in mouse embryos: cell lineage analysis by microinjection, *Dev. Biol.*, **117**, 581–595, doi: 10.1016/0012-1606(86)90327-1.
2. Гилберт С.Ф. (2010) *Биология развития*, Политехника, Санкт-Петербург.
3. Morgani, S., Nichols, J., and Hadjantonakis, A.K. (2017) The many faces of Pluripotency: *in vitro* adaptations of a

- continuum of *in vivo* states, *BMC Dev. Biol.*, **17**, 7, doi: 10.1186/s12861-017-0150-4.
4. Weinberger, L., Ayyash, M., Novershtern, N., and Hanna, J.H. (2016) Dynamic stem cell states: naive to primed pluripotency in rodents and humans, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **17**, 155.
  5. Ryall, J.G., Cliff, T., Dalton, S., and Sartorelli, V. (2015) Metabolic reprogramming of stem cell epigenetics, *Cell Stem Cell*, **17**, 651–662, doi: 10.1016/j.stem.2015.11.012.
  6. Martin, K.L., and Leese, H.J. (1995) Role of glucose in mouse preimplantation embryo development, *Mol. Reprod. Dev.*, **40**, 436–443, doi: 10.1002/mrd.1080400407.
  7. Houghton, F.D., Thompson, J.G., Kennedy, C.J., and Leese, H.J. (1996) Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo, *Mol. Reprod. Dev.*, **44**, 476–485, doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199608)44:4<476::AID-MRD7>3.0.CO;2-I.
  8. Prigione, A., and Adjaye, J. (2010) Modulation of mitochondrial biogenesis and bioenergetic metabolism upon *in vitro* and *in vivo* differentiation of human ES and iPS cells, *Int. J. Dev. Biol.*, **54**, 1729–1741, doi: 10.1387/ijdb.103198ap.
  9. Morrison, S.J., and Spradling, A.C. (2008) Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life, *Cell*, **132**, 598–611, doi: 10.1016/j.cell.2008.01.038.
  10. Нибирицкий П., Сагарадзе Г., Ефименко А., Макаревич П., Ткачук В. (2018) Ниша стволовой клетки, *Цитология*, **60**.
  11. Moussaieff, A., Kogan, N.M., and Aberdam, D. (2015) Concise review: energy metabolites: key mediators of the epigenetic state of pluripotency, *Stem Cells*, **33**, 2374–2380, doi: 10.1002/stem.2041.
  12. Rivera, L.B., and Bergers, G. (2014) Angiogenesis. Targeting vascular sprouts, *Science*, **344**, 1449–1450, doi: 10.1126/science.1257071.
  13. Kim, H.J., Miyazaki, M., Man, W.C., and Ntambi, J.M. (2002) Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) as regulators of lipid metabolism: polyunsaturated fatty acids oppose cholesterol-mediated induction of SREBP-1 maturation, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **967**, 34–42, doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04261.x.
  14. Inoue, J., Kumagai, H., Terada, T., Maeda, M., Shimizu, M., and Sato, R. (2001) Proteolytic activation of SREBPs during adipocyte differentiation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **283**, 1157–1161, doi: 10.1006/bbrc.2001.4915.
  15. Zheng, L., Roeder, R.G., and Luo, Y. (2003) S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component, *Cell*, **114**, 255–266, doi: 10.1016/s0092-8674(03)00552-x.
  16. Wellen, K.E., Hatzivassiliou, G., Sachdeva, U.M., Bui, T.V., Cross, J.R., and Thompson, C.B. (2009) ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation, *Science*, **324**, 1076–1080, doi: 10.1126/science.1164097.
  17. Ryall, J.G. (2012) The role of sirtuins in the regulation of metabolic homeostasis in skeletal muscle, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, **15**, 561–566, doi: 10.1097/MCO.0b013e3283590914.
  18. Canto, C., Menzies, K.J., and Auwerx, J. (2015) NAD(+) Metabolism and the control of energy homeostasis: a balancing act between mitochondria and the nucleus, *Cell Metab.*, **22**, 31–53, doi: 10.1016/j.cmet.2015.05.023.
  19. Shi, Y.J., Matson, C., Lan, F., Iwase, S., Baba, T., and Shi, Y. (2005) Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors, *Mol. Cell*, **19**, 857–864, doi: 10.1016/j.molcel.2005.08.027.
  20. Hirano, K., and Namihira, M. (2017) FAD influx enhances neuronal differentiation of human neural stem cells by facilitating nuclear localization of LSD1, *FEBS Open Bio*, **7**, 1932–1942, doi: 10.1002/2211-5463.12331.
  21. Whyte, W.A., Bilodeau, S., Orlando, D.A., Hoke, H.A., Frampton, G.M., Foster, C.T., Cowley, S.M., and Young, R.A. (2012) Enhancer decommissioning by LSD1 during embryonic stem cell differentiation, *Nature*, **482**, 221–225, doi: 10.1038/nature10805.
  22. Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P., and Zhang, Y. (2006) Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins, *Nature*, **439**, 811–816, doi: 10.1038/nature04433.
  23. Yang, H., Lin, H., Xu, H., Zhang, L., Cheng, L., Wen, B., Shou, J., Guan, K., Xiong, Y., and Ye, D. (2014) TET-catalyzed 5-methylcytosine hydroxylation is dynamically regulated by metabolites, *Cell Res.*, **24**, 1017–1020, doi: 10.1038/cr.2014.81.
  24. Zhang, J., Khvorostov, I., Hong, J.S., Oktay, Y., Vergnes, L., Nuebel, E., Wahjudi, P.N., Setoguchi, K., Wang, G., Do, A., Jung, H.J., McCaffery, J.M., Kurland, I.J., Reue, K., Lee, W.N., Koehler, C.M., and Teitell, M.A. (2011) UCP2 regulates energy metabolism and differentiation potential of human pluripotent stem cells, *EMBO J.*, **30**, 4860–4873, doi: 10.1038/emboj.2011.401.
  25. Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E. (1927) The metabolism of tumors in the body, *J. Gen. Physiol.*, **8**, 519–530, doi: 10.1085/jgp.8.6.519.
  26. Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation, *Science*, **324**, 1029–1033, doi: 10.1126/science.1160809.
  27. Rodimova, S.A., Meleshina, A.V., Kalabusheva, E.P., Dashinimaev, E.B., Reunov, D.G., Torgomyan, H.G., Vorotelyak, E.A., and Zagaynova, E.V. (2019) Metabolic activity and intracellular pH in induced pluripotent stem cells differentiating in dermal and epidermal directions, *Methods Appl. Fluoresc.*, **7**, 044002, doi: 10.1088/2050-6120/ab3b3d.
  28. Nelson, D.L., and Cox, M.M. (2005) *Lehninger principles of biochemistry*, WH Freeman and Company, New York, pp. 1216.
  29. Becker, K.A., Ghule, P.N., Therrien, J.A., Lian, J.B., Stein, J.L., van Wijnen, A.J., and Stein, G.S. (2006) Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase, *J. Cell. Physiol.*, **209**, 883–893, doi: 10.1002/jcp.20776.
  30. Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., Gifford, D.K., Melton, D.A., Jaenisch, R., and Young, R.A. (2005) Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells, *Cell*, **122**, 947–956, doi: 10.1016/j.cell.2005.08.020.
  31. Madden, D.T., Davila-Kruger, D., Melov, S., and Bredesen, D.E. (2011) Human embryonic stem cells express elevated levels of multiple pro-apoptotic BCL-2 family members, *PLoS One*, **6**, e28530, doi: 10.1371/journal.pone.0028530.
  32. Setoguchi, K., TeSlaa, T., Koehler, C.M., and Teitell, M.A. (2016) P53 Regulates rapid apoptosis in human pluripotent stem cells, *J. Mol. Biol.*, **428**, 1465–1475, doi: 10.1016/j.jmb.2015.07.019.
  33. Saretzki, G., Armstrong, L., Leake, A., Lako, M., and von Zglinicki, T. (2004) Stress defense in murine embryonic stem cells is superior to that of various differentiated murine cells, *Stem Cells*, **22**, 962–971, doi: 10.1634/stemcells.22-6-962.
  34. Dahan, P., Lu, V., Nguyen, R.M.T., Kennedy, S.A.L., and Teitell, M.A. (2019) Metabolism in pluripotency: both driver and passenger? *J. Biol. Chem.*, **294**, 5420–5429, doi: 10.1074/jbc.TM117.000832.

35. Krauss, S., Zhang, C.Y., and Lowell, B.B. (2005) The mitochondrial uncoupling-protein homologues, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 248–261, doi: 10.1038/nrm1572.
36. Diano, S., and Horvath, T.L. (2012) Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in glucose and lipid metabolism, *Trends Mol. Med.*, **18**, 52–58, doi: 10.1016/j.molmed.2011.08.003.
37. Berardi, M.J., and Chou, J.J. (2014) Fatty acid flippase activity of UCP2 is essential for its proton transport in mitochondria, *Cell Metab.*, **20**, 541–552, doi: 10.1016/j.cmet.2014.07.004.
38. Bouillaud, F. (2009) UCP2, not a physiologically relevant uncoupler but a glucose sparing switch impacting ROS production and glucose sensing, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 377–383, doi: 10.1016/j.bbabi.2009.01.003.
39. Varum, S., Rodrigues, A.S., Moura, M.B., Momcilovic, O., Easley, C.A. 4th, Ramalho-Santos, J. Van Houten, B., and Schatten, G. (2011) Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts, *PLoS One*, **6**, e20914.
40. Zee, B.M., Levin, R.S., Xu, B., LeRoy, G., Wingreen, N.S., and Garcia, B.A. (2010) In vivo residue-specific histone methylation dynamics, *J. Biol. Chem.*, **285**, 3341–3350, doi: 10.1074/jbc.M109.063784.
41. Chen, G., and Wang, J. (2019) A regulatory circuitry locking pluripotent stemness to embryonic stem cell: interaction between threonine catabolism and histone methylation, *Semin. Cancer Biol.*, **57**, 72–78, doi: 10.1016/j.semcancer.2019.01.005.
42. Cho, Y.M., Kwon, S., Pak, Y.K., Seol, H.W., Choi, Y.M., Park, D.J., Park, K.S., and Lee, H.K. (2006) Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **348**, 1472–1478, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.08.020.
43. Lu, V., Dahan, P., Ahsan, F.M., Patananan, A.N., Roy, I.J., Torres, A. Jr., Nguyen, R.M.T., Huang, D., Braas, D., and Teitell, M.A. (2019) Mitochondrial metabolism and glutamine are essential for mesoderm differentiation of human pluripotent stem cells, *Cell Res.*, **29**, 596–598, doi: 10.1038/s41422-019-0191-2.
44. Novoseletskaya, E.S., Grigorieva, O.A., Efimenko, A.Y., and Kalinina, N.I. (2019). Extracellular matrix in the regulation of stem cell differentiation, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 232–240.
45. Simsek, T., Kocabas, F., Zheng, J., Deberardinis, R.J., Mahmoud, A.I., Olson, E.N., Schneider, J.W., Zhang, C.C., and Sadek, H.A. (2010) The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche, *Cell Stem Cell*, **7**, 380–390, doi: 10.1016/j.stem.2010.07.011.
46. Oburoglu, L., Romano, M., Taylor, N., and Kinet, S. (2016) Metabolic regulation of hematopoietic stem cell commitment and erythroid differentiation, *Curr. Opin. Hematol.*, **23**, 198–205, doi: 10.1097/MOH.0000000000000234.
47. Ito, K., Carracedo, A., Weiss, D., Arai, F., Ala, U., Avigan, D.E., Schafer, Z.T., Evans, R.M., Suda, T., Lee, C.H., and Pandolfi, P.P. (2012) A PML-PPAR- $\delta$  pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance, *Nat. Med.*, **18**, 1350–1358, doi: 10.1038/nm.2882.
48. Kalinina, N.I., Sysoeva, V.Y., Rubina, K.A., and Tkachuk, V.A. (2011) Mesenchymal stem cells in tissue growth and repair, *Acta Naturae*, **3**, 32–39.
49. Murray, I.R., West, C.C., Hardy, W.R., James, A.W., Park, T.S., Nguyen, A., Tawonsawatruk, T., Lazzari, L., Soo, C., and Peault, B. (2014) Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels, *Cell. Mol. Life Sci.*, **71**, 1353–1374, doi: 10.1007/s00018-013-1462-6.
50. Mendez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., Mazloom, A.R., Macarthur, B.D., Lira, S.A., Scadden, D.T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G.N., and Frenette, P.S. (2010) Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche, *Nature*, **466**, 829–834, doi: 10.1038/nature09262.
51. Kotova, P.D., Sysoeva, V.Y., Rogachevskaja, O.A., Bystrova, M.F., Kolesnikova, A.S., Tyurin-Kuzmin, P.A., Fadeeva, J.I., Tkachuk, V.A., and Kolesnikov, S.S. (2014) Functional expression of adrenoreceptors in mesenchymal stromal cells derived from the human adipose tissue, *Biochim. Biophys. Acta*, **1843**, 1899–1908, doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.002.
52. Tyurin-Kuzmin, P.A., Fadeeva, J.I., Kanareikina, M.A., Kalinina, N.I., Sysoeva, V.Y., Dyikanov, D.T., Stambolsky, D.V., and Tkachuk, V.A. (2016) Activation of beta-adrenergic receptors is required for elevated alpha1A-adrenoreceptors expression and signaling in mesenchymal stromal cells, *Sci. Rep.*, **6**, 32835, doi: 10.1038/srep32835.
53. Sysoeva, V.Y., Ageeva, L.V., Tyurin-Kuzmin, P.A., Sharonov, G.V., Dyikanov, D.T., Kalinina, N.I., and Tkachuk, V.A. (2017) Local angiotensin II promotes adipogenic differentiation of human adipose tissue mesenchymal stem cells through type 2 angiotensin receptor, *Stem Cell Res.*, **25**, 115–122, doi: 10.1016/j.scr.2017.10.022.
54. Lopatina, T., Bruno, S., Tetta, C., Kalinina, N., Porta, M., and Camussi, G. (2014) Platelet-derived growth factor regulates the secretion of extracellular vesicles by adipose mesenchymal stem cells and enhances their angiogenic potential, *Cell Commun. Signal.*, **12**, 26, doi: 10.1186/1478-811X-12-26.
55. Rubtsov, Y.P., Suzdaltseva, Y.G., Goryunov, K.V., Kalinina, N.I., Sysoeva, V.Y., and Tkachuk, V.A. (2012) Regulation of immunity via multipotent mesenchymal stromal cells, *Acta Naturae*, **4**, 23–31.
56. Pattappa, G., Heywood, H.K., de Bruijn, J.D., and Lee, D.A. (2011) The metabolism of human mesenchymal stem cells during proliferation and differentiation, *J. Cell. Physiol.*, **226**, 2562–2570, doi: 10.1002/jcp.22605.
57. Mylotte, L.A., Duffy, A.M., Murphy, M., O'Brien, T., Samali, A., Barry, F., and Szegezdi, E. (2008) Metabolic flexibility permits mesenchymal stem cell survival in an ischemic environment, *Stem Cells*, **26**, 1325–1336, doi: 10.1634/stemcells.2007-1072.
58. Liu, Y., and Ma, T. (2015) Metabolic regulation of mesenchymal stem cell in expansion and therapeutic application, *Biotechnol. Prog.*, **31**, 468–481, doi: 10.1002/btpr.2034.
59. Hsu, Y.C., Wu, Y.T., Yu, T.H., and Wei, Y.H. (2016) Mitochondria in mesenchymal stem cell biology and cell therapy: from cellular differentiation to mitochondrial transfer, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **52**, 119–131, doi: 10.1016/j.semcdb.2016.02.011.
60. Palomaki, S., Pietila, M., Laitinen, S., Pesala, J., Sormunen, R., Lehenkari, P., and Koivunen, P. (2013) HIF-1 $\alpha$  is upregulated in human mesenchymal stem cells, *Stem Cells*, **31**, 1902–1909, doi: 10.1002/stem.1435.
61. Рылова Ю., Андреева Е., Гогвадзе В., Животовский Б., Буравкова Л. (2012) Этопозид и гипоксия не активируют апоптоз мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток *in vitro*, *Клеточные технологии в биологии и медицине*, **3**, 148–151.
62. Zhang, Y., Marsboom, G., Toth, P.T., and Rehman, J. (2013) Mitochondrial respiration regulates adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *PLoS One*, **8**, e77077, doi: 10.1371/journal.pone.0077077.
63. Chen, C.T., Shih, Y.R.V., Kuo, T.K., Lee, O.K., and Wei, Y.H. (2008) Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation



- of human mesenchymal stem cells, *Stem Cells*, **26**, 960–968.
64. Esen, E., Chen, J., Karner, C.M., Okunade, A.L., Patterson, B.W., and Long, F. (2013) WNT-LRP5 signaling induces Warburg effect through mTORC2 activation during osteoblast differentiation, *Cell Metab.*, **17**, 745–755, doi: 10.1016/j.cmet.2013.03.017.
65. Shum, L.C., White, N.S., Mills, B.N., Bentley, K.L., and Eliseev, R.A. (2016) Energy metabolism in mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation, *Stem Cells Dev.*, **25**, 114–122, doi: 10.1089/scd.2015.0193.
66. Schieke, S.M., Ma, M., Cao, L., McCoy, J.P. Jr., Liu, C., Hensel, N.F., Barrett, A.J., Boehm, M., and Finkel, T. (2008) Mitochondrial metabolism modulates differentiation and teratoma formation capacity in mouse embryonic stem cells, *J. Biol. Chem.*, **283**, 28506–28512, doi: 10.1074/jbc.M802763200.
67. Mandal, S., Lindgren, A.G., Srivastava, A.S., Clark, A.T., and Banerjee, U. (2011) Mitochondrial function controls proliferation and early differentiation potential of embryonic stem cells, *Stem Cells*, **29**, 486–495.

## METABOLIC REGULATION OF MAMMALIAN STEM CELLS DIFFERENTIATION

### Review

P. A. Tyurin-Kuzmin<sup>1\*</sup>, A. Yu. Molchanov<sup>2</sup>, V. I. Chechekhin<sup>1</sup>,  
A. M. Ivanova<sup>1</sup>, and K. Yu. Kulebyakin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Fundamental Medicine, Department of Biochemistry and Molecular Medicine, 119991 Moscow, Russia; E-mail: tyurinkuzmin.p@gmail.com

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Department of Embryology, 119234 Moscow, Russia

Received October 28, 2019

Revised January 19, 2020

Accepted January 19, 2020

Proliferation and differentiation of stem cells are required for the formation of a normal tissue structure, for the maintenance of its homeostasis, and for the repair from damage. A distinctive feature of these cells is the unique organization of metabolic pathways, in which the contribution of various energy production pathways to the general cellular metabolism is radically different from that of differentiated cells. Changes in metabolism during the differentiation of both embryonic and postnatal stem cells have several specific features. Moreover, changes in stem cell metabolism are not just a consequence of differentiation, but also an active regulator of this process. Metabolic enzymes and intermediates regulate and direct the processes of maintaining stemness, self-renewal and differentiation of stem cells. Here we discuss the patterns and molecular mechanisms of switching of stem cells' metabolism on their transition from a pluripotent to differentiated state with particular emphasis on how metabolic processes in cells regulate their functions, their ability to differentiate, and the choice of a specific direction of stem cell development.

**Keywords:** metabolism, pluripotent stem cells, mesenchymal stem cells, glycolysis, oxidative phosphorylation