

РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

УДК 577.23;577.121.7

РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА И РОЛЬ РЕДОКС-ФАКТОРОВ В ЭНЕРГЕТИЧЕСКОМ КОНТРОЛЕ ПОКОЯ И ПРОЛИФЕРАЦИИ КРОВЕТВОРНЫХ КЛЕТОК

© 2023 г. М. В. Калашникова^а, Н. С. Полякова^а, А. В. Белявский^а, *

^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: abelyavs@yahoo.com

Поступила в редакцию 26.04.2023 г.

После доработки 13.06.2023 г.

Принята к публикации 21.06.2023 г.

Клеточный метаболизм относится к ключевым регуляторам поддержания гомеостатических стволовых клеток (ГСК). Анаэробный гликолиз используется как основной источник энергии у покоящихся ГСК. При экспансии и дифференцировке в условиях стационарного гомеостаза энергетические потребности активированных ГСК многократно возрастают. Для удовлетворения увеличившихся запросов клетки переходят к митохондриальному окислительному фосфорилированию, при этом возрастает производство активных форм кислорода (АФК). В обзоре рассмотрены молекулярные механизмы поддержания гликолиза в ГСК, а также факторы, определяющие увеличение метаболической активности и переход к митохондриальному биогенезу при активации ГСК. Мы останавливаемся на роли белков HIF (hypoxia-inducible factor) как ключевых медиаторов клеточного ответа на гипоксию, а также рассматриваем явление экстрафизиологического кислородного шока/стресса (ERHOSS), приводящего к форсированной дифференцировке ГСК, и методы его преодоления. Наконец, обсуждается роль окисления жирных кислот (FAO) в гомеостазе. Понимание метаболических потребностей нормальных ГСК и предшественников имеет решающее значение для разработки новых методов лечения заболеваний, связанных с кроветворной и иммунной системами.

Ключевые слова: кроветворение, гомеостатические стволовые клетки, анаэробный гликолиз, стрессовый гомеостаз, митохондриальный биогенез, окисление жирных кислот, HIF, окислительный стресс, редокс-факторы, активные формы кислорода

DOI: 10.31857/S0026898423060095, EDN: REJDYZ

ВВЕДЕНИЕ

Кроветворение — один из наиболее важных механизмов гомеостаза у животных, характеризующийся высокой эффективностью. Например, у человека производится ежедневно до одного триллиона новых клеток крови [1, 2]; при этом кроветворение обладает высокой адаптивностью и способностью тонко реагировать на изменения окружающей среды и физиологического состояния организма. Главная составляющая кроветво-

рения и важнейший резерв организма — способные к самообновлению и мультипотентной дифференцировке гомеостатические стволовые клетки (ГСК). Число этих клеток чрезвычайно мало — около одного миллиона ГСК поддерживает образование зрелых клеток крови на протяжении жизни [3]. Поскольку ГСК в норме находятся в состоянии покоя и крайне редко вступают в клеточный цикл [4, 5], поддержание гомеостатического кроветворения происходит в основном благодаря размножению более дифференцированных коммитированных стволовых клеток и клеток-предшественников [6, 7]. Однако такие клетки не относятся к долгоживущим и имеют ограниченный потенциал самообновления. Соответственно нормальный гомеостаз является поликлональным, то есть представляет собой последовательную смену большого числа клонов [8].

Поддержание гомеостаза для ГСК особенно важно, поскольку эти клетки, по сравнению, например, с гомеостатическими предшественниками, сверхчувствительны к изменению условий.

Сокращения. АФК — активные формы кислорода; ГПК — гомеостатические прогениторные клетки; ГСК — гомеостатические стволовые клетки; МСК — мезенхимальные стволовые клетки; ERHOSS (extra physiologic oxygen shock/stress) — экстрафизиологический кислородный шок/стресс; FAO (fatty acid oxidation) — окисление жирных кислот; FFA (free fatty acids) — свободные жирные кислоты; FIH (factor inhibiting HIF) — фактор, ингибирующий HIF; HIF (hypoxia-inducible factor) — индуцируемый гипоксией фактор; OXPHOS (oxidative phosphorylation) — окислительное фосфорилирование; PDK (pyruvate dehydrogenase kinase) — киназа пируватдегидрогеназы; PHD (prolyl hydroxylases) — пролилгидроксилазы.

Уязвимость этих клеток по отношению к неблагоприятным факторам может сопровождаться потерей основных функций и гибелью [9]. Регуляция решений относительно сохранения состояния покоя, выхода в клеточный цикл и дифференцировки, а также точная настройка по отношению к внутренним и внешним условиям, безусловно, относятся к главным составляющим самоподдержания ГСК [10–14].

Недавно показано, что клеточный метаболизм играет важную регуляторную роль в биологии ГСК. Находясь подавляющую часть времени в фазе G₀ клеточного цикла [4, 5], ГСК нуждаются в относительно низком притоке энергии, который вполне может восполняться за счет анаэробного гликолиза [15, 16]. В то же время для пролиферации клеткам требуется накопление значительного количества макромолекул для дочерних клеток и, следовательно, значительно больше энергии. В связи с этим переход ГСК из покоящегося состояния в активированное сопровождается преимущественным использованием более энергетически продуктивного окислительного фосфорилирования (ОХРНOS). Если основной путь гликолиза на одну молекулу глюкозы генерирует 2 молекулы АТФ, то при ОХРНOS – 36 молекул. Для пролиферации и биосинтеза аминокислот, нуклеотидов и липидов, помимо АТФ, необходим биосинтез анаболических углеводов, который в основном происходит с участием промежуточных продуктов цикла Кребса [17].

В обзоре проанализированы молекулярные механизмы, связанные с ролью метаболизма и редокс-регуляции в гемопоэзе и биологии ГСК. Понимание этих механизмов имеет важное значение как с фундаментальной точки зрения, так и в прикладном аспекте, в частности для разработки условий экспансии ГСК *ex vivo* и регуляции их пластичности с целью получения новых терапевтических клеточных препаратов.

НIF ФАКТОРЫ – ГЛАВНЫЕ СЕНСОРЫ ГИПОКСИИ

Поддержание кислородного гомеостаза в клетках – одно из важнейших условий нормального протекания биологических процессов, нарушение которого приводит к серьезным адаптационным реакциям. Так, снижение уровня кислорода в первую очередь приводит к значительным изменениям в транскрипции генных ансамблей, связанных с ответом на гипоксию. Факторы, индуцируемые гипоксией (НIFs, hypoxia-inducible factors), при этом составляют главный элемент каскада, регулирующего этот ответ [18–20]. НIFs представляют собой гетеродимеры, которые состоят из двух субъединиц: чувствительной к уровню кислорода α -субъединицы и конститутивно экспрессируемой β -субъединицы, представляю-

щей собой ядерный транслокатор арилуглеводородного рецептора (ARNT) [21, 22]. Как НIF- α , так и НIF- β характеризуются наличием отвечающего за олигомеризацию мотива “спираль–петля–спираль” (bHLH), свойственного многим факторам транскрипции, а также сигнала ядерной локализации (NLS) [23]. Специфический для семейства димерных эукариотических факторов транскрипции домен Per/ARNT/Sim (PAS-домен) также общий для обеих субъединиц. N-концевой домен в составе субъединиц отвечает за связывание ДНК, а домены трансактивации на С-конце индуцируют экспрессию генов [24, 25].

В аэробных условиях происходит гидроксилирование двух пролильных остатков НIF- α пролилгидроксилазами (PHD). После этого происходит связывание НIF- α с комплексом белка фон Гиппеля–Линдау (pVHL) и убиквитинлигазы E3, что приводит к убиквитинированию НIF- α и его деградации в протеасомах [26]. Белки PHD имеют различную внутриклеточную локализацию: PHD1 находится в ядре, PHD2 – в цитоплазме, PHD3 – и в ядре, и в цитоплазме [27]. Кроме того, их функции тоже различаются: PHD2 считается главным регулятором уровня НIF- α , в то время как PHD1 и PHD3 участвуют в дополнительной регулировке уровней НIF-1 α и НIF-2 α [28]. Еще один важный регулятор НIF, чувствительный к кислороду, – фактор, ингибирующий НIF (FIH). Взаимодействуя с кислородом, FIH участвует в гидроксилировании остатка Asn НIF- α , тем самым предотвращая рекрутирование CREB-связывающего белка (СВР)/коактиваторов p300 и подавляя транскрипционную активность НIF [29]. Если PHDs контролируют стабильность НIFs и их уровень, то FIH регулирует транскрипционную активность НIFs. Таким образом реализуется двойной контроль активности НIFs. Однако FIH проявляет свою активность и при более низких концентрациях кислорода по сравнению с PHDs и способен ингибировать активность сохранившегося в условиях умеренной гипоксии НIF [30]. Наоборот, инактивация FIH сопровождается рекрутированием СВР/p300 и повышением транскрипционной активности НIF [31, 32].

В ряде работ показано, что регуляция стабильности и транскрипционной активности НIF- α опосредуется не только гидроксилированием, но и другими посттрансляционными модификациями. Kietzmann и соавт. [33] показали, что в регуляции стабильности, транскрипционной активности и ядерной локализации НIF- α важную роль играет его фосфорилирование. Фосфорилирование различных остатков НIF- α достаточно распространено и опосредуется такими киназами, как гликогенсинтаза-3 (GSK-3) [34, 35], Полоподобная киназа-3 (PLK3) [36–38], циклинзависимые киназы (CDK) [39, 40] и протеинкиназа А (PKA) [41, 42]. Не менее важную роль в регуляции

HIF- α играет ацетилирование. Jeong и соавт. [43] выявили важную роль ARD1-опосредованного ацетилирования в обеспечении взаимодействия HIF-1 α и pVHL и в убиквитинировании HIF-1 α .

ГСК ИСПОЛЬЗУЮТ АНАЭРОБНЫЙ ГЛИКОЛИЗ В КОСТНОМЗГОВОЙ НИШЕ

На протяжении жизни как ГСК, так и гемопоэтические прогениторные клетки (ГПК) локализованы, главным образом, в костном мозге [44]. Здесь они находятся под контролем костномозговой ниши, пребывая в тесном контакте с мезенхимальными стромальными клетками и эндотелием, остеобластами, адипоцитами и другими типами клеток, определяющими гомеостаз [45]. В костномозговой нише ГСК и ГПК находятся в условиях низкого содержания кислорода: от 1 до 4% [46–48]. Стоит отметить, что значения местного парциального давления кислорода (pO_2) в костном мозге живых мышей довольно низкие. Так, используя технологию прижизненной двухфотонной фосфоресцентной микроскопии, J. Spencer и соавт. [15] определили, что уровень pO_2 в костном мозге животных не превышает 32 мм рт.ст., в то время как в венах находится в диапазоне 30–40 мм рт.ст. Авторы работы отмечают неоднородность местного pO_2 , обусловленную различной плотностью кровеносных сосудов на разном удалении от кости (латеральный градиент). Так, около эндостальной поверхности кости содержание мелких артерий наибольшее и эта область наименее гипоксична. Небольшие сосуды, расположенные близко к кости, оказались нестинпозитивными и уровень pO_2 в таких сосудах, против ожиданий, оказался выше, чем в нестиннегативных. Здесь стоит отметить, что нестин экспрессируется мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) костного мозга, способствующими поддержанию и определяющими нишу покоящихся ГСК [49, 50].

Важные данные относительно специфики энергетического обмена ГСК получены в исследовании, проведенном T. Simsek и соавт. [16], где с помощью проточной цитометрии определен метаболический фенотип мышинных ГСК. В клетках оценивали флуоресценцию эндогенного восстановленного никотинамидадениннуклеотида (NADH) как показателя уровня митохондриального дыхания. В области клеток с низким митохондриальным потенциалом находилось около 80% одновременно репопулирующих ГСК (ДР-ГСК), фенотипически определяемых поверхностными маркерами: Lin⁻, Sca-1⁺, C-Kit⁺, CD34⁻, Flk2⁻. Для ДР-ГСК мышей характерен низкий уровень митохондриального дыхания и АТФ и повышенный уровень лактата – продукта анаэробного метаболизма глюкозы (гликолиза);

около 89% этих клеток экспрессирует Hif-1 α . Повышенная экспрессия этого фактора выявлена и в других исследованиях [16, 51]. На основании этих данных можно предполагать, что большая часть ГСК для “удовлетворения энергетических потребностей” использует цитоплазматический гликолиз вместо митохондриального ОХРНOS. Метаболический фенотип ГСК, как описано более подробно ниже, связан с активацией гена *Hif1a* как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровнях.

Важно отметить, что метаболический профиль ГСК отличается от более дифференцированных клеток [51–53]. Так, выявлено, что ГСК обладают повышенной пируваткиназной активностью и накапливают большое количество фруктозо-1,6-бисфосфата, что подтверждает предположение о том, что метаболизм ГСК реализуется через активный гликолиз. Данные о том, что ГСК содержат высокие уровни пирувата – продукта заключительной АТФ-генерирующей части гликолизного пути – при низком уровне субстрата – фосфоенолпирувата, – также свидетельствуют в пользу высказанной гипотезы [52].

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ БИОГЕНЕЗ ПРОИСХОДИТ ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ, НО НЕ ПРИ САМООБНОВЛЕНИИ ГСК

Выяснение метаболических механизмов перехода покоящихся ГСК в дифференцировку относится к важным вопросам клеточной биологии. Как отмечено выше, ГСК, вступив на путь дифференцировки, начинают в значительной степени использовать механизм ОХРНOS, что приводит к всплеску митохондриального метаболизма. Возможно, этот механизм получил развитие в ГСК из-за повышенной потребности в энергии для быстрой пролиферации и дифференцировки в ответ на экзогенный стресс.

Как показано в двух работах 2013 года [52, 54], в находящихся в состоянии покоя ГСК митохондриальная активность минимизирована. Зависимость покоящихся ГСК от митохондриальной функции невысока и позволяет поддерживать низкие уровни активных форм кислорода (АФК), так как эти клетки уязвимы для окислительного стресса [17, 55]. Как сказано выше, такие покоящиеся ГСК обладают повышенной способностью к долговременной реконституции как в первичных, так и во вторичных трансплантатах, по сравнению с ГСК с высоким мембранным потенциалом митохондрий. В связи с тем, что митохондрии ГСК практически неактивны [56], уровень АФК, связанный с митохондриальной активностью, ниже в ГСК, чем у более дифференцированных предшественников [57, 58].

Действительно, в гетерогенных размножающихся культурах ГСК *ex vivo* самообновляющиеся клетки сохраняют низкую митохондриальную активность, что резко контрастирует с дифференцирующимися клетками, в которых происходит активация митохондрий. Интересно, что в условиях культивирования, обычно способствующих дифференцировке, химическое разобщение электронтранспортной цепи стимулирует самообновление ГСК, при этом происходит обратимое уменьшение митохондриальной массы за счет аутофагии. Таким образом, изменение метаболической программы ГСК сильно влияет на выбор между самообновлением и дифференцировкой, что вряд ли можно рассматривать как простое следствие перехода из покоящегося состояния в активированное [59]. Кроме того, во время активации остаются ГСК, у которых выход в цикл не начинается, причем существование такого покоящегося пула необходимо для поддержания самообновления и восполнения ГСК без истощения.

С другой стороны, во время стрессового кроветворения метаболизм ГСК быстро переключается с преимущественного использования механизма гликолиза на ОХРНОС, тем самым обеспечивая экспансию, необходимую для ответа и преодоления стресса. К наиболее распространенным триггерам стрессового кроветворения относятся инфекция, вирусная или бактериальная, что широко используют для создания экспериментальных моделей ответа системы кроветворения на стресс [60].

РОЛЬ ФАКТОРОВ HIF-1 α И HIF-2 α В РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА ГСК В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ

Значительную роль в поддержании стационарного состояния ГСК играют подробно описанные выше гетеродимерные факторы HIF-1 и HIF-2 — ключевые медиаторы клеточного ответа на гипоксию [18, 51, 61]. Метаболический фенотип ГСК связан с повышением уровня и активацией HIF-1 α . Оказалось, что дефицит HIF-1 не влияет на стационарное кроветворение, хотя при конкурентной трансплантации ГСК, полученных от мышей с делецией гена *Hif1a* и от нормальных мышей, через 4 месяца количество ГСК от донора с делецией уменьшается [51]. Чрезмерная стабилизация HIF-1 α за счет биаллельной потери VHL, негативного регулятора HIF-1 α , подавляет выход ГСК и предшественников в клеточный цикл, но приводит к нарушению способности к репопуляции при трансплантации. Моноаллельная потеря VHL также способствует состоянию покоя ГСК, однако при этом улучшается приживление костного мозга во время трансплантации [51]. Таким образом, тонкая настройка уровня HIF-1 α необходима для поддержания ГСК.

В исследованиях А. Guitart и соавт. [62] и М. Vukovic и соавт. [63] показано, что для поддержания ГСК совсем не обязательны субъединицы HIF. Продемонстрировано, что ГСК мышей с дефицитом Hif-2 α поддерживают стационарное кроветворение и эффективно восстанавливают гемопоэз при серийных трансплантациях в первичного реципиента. При нарушении гемопоэза, вызванным введением 5-фторурацила, дефицитные по Hif-1 α ГСК также способны к восстановлению [63].

С другой стороны, показано, что делеция *Meis1*, гена транскрипционного активатора HIF-1, приводила к выходу ГСК из состояния покоя и нарушению репопуляции костного мозга после трансплантации [64]. В результате делеции *Meis1* происходило подавление экспрессии как HIF-1 α , так и HIF-2 α . Как следствие, ГСК переходили на митохондриальный метаболизм, сопровождающийся повышенной продукцией АФК и заканчивающийся апоптозом. Эффект нокаута *Meis1* на ГСК вызван воздействием АФК, что подтверждено положительным эффектом антиоксиданта N-ацетилцистеина на мышей *Meis1*^{-/-} [64].

Кроме того, делеция гена *Hif1a* в ГСК мышей приводила к снижению гликолиза и усилению митохондриального метаболизма, в результате чего наступало истощение ГСК [52]. По-видимому, Hif-1 α необходим для функционирования стволовых клеток в гемопоэтической системе. Механизм действия Hif-1 α заключается в стимуляции экспрессии киназ пируватдегидрогеназы: Pdk2 и Pdk4, — которые инактивируют пируватдегидрогеназный комплекс и тем самым блокируют попадание пирувата в цикл трикарбоновых кислот, что приводит к подавлению митохондриального дыхания [52, 53].

РЕГУЛЯЦИЯ ГЛИКОЛИЗА ЧЕРЕЗ ФУНКЦИИ ПИРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Повышенная экспрессия Pdk в ГСК под действием Hif1- α приводит к подавлению поступления гликолитических метаболитов в митохондрии. Сверхэкспрессия *Pdk* в дефектных по гликолизу ГСК мышей останавливала клеточный цикл и восстанавливала естественный обмен и способность к трансплантации. Делеция генов *Pdk2* и *Pdk4* вызывала обратный эффект, снижая гликолиз, покоящееся состояние и способность к трансплантации ГСК. Более того, обработка ГСК миметиком Pdk повышала их выживаемость и трансплантационный потенциал [52].

Стоит отметить, что влияние делеции генов *Pdk2* и *Pdk4* может быть связано с тем, что гликолитический метаболический статус — контрольная точка клеточного цикла, которая модулирует состояние покоя ГСК и потенциал стволовых

клеток [65]. Обнаружено, что делеция гена, кодирующего изоформу M2 пируваткиназы (Pkm2), снижала уровни промежуточных метаболитических продуктов, негативно влияя на функции ГПК мышей. Именно поэтому дефицит Pkm2 не влияет на кроветворение в стабильных условиях, но ухудшает гемопоэз после трансплантации. Делеция гена лактатдегидрогеназы A (*Ldha*) приводила к повышению уровня пирувата в цикле трикарбоновых кислот, а также к усилению митохондриальной активности и продукции АФК, что значительно снижало репопуляционный потенциал как ГСК, так и ГПК. Все эти данные следует рассматривать как еще одно свидетельство существования в ГСК сложной регуляторной сети, связывающей анаэробный и аэробный метаболизм [65].

РОЛЬ NRF В ПОДДЕРЖАНИИ БАЛАНСА МЕЖДУ ПОКОЯЩИМИСЯ И АКТИВНЫМИ ГСК

При активации ГСК изменяется предпочтение вида энергетического обмена: вместо гликолиза, поддерживающего низкий уровень АФК, преимущественно используется ОХPHOS, сопряженный с увеличением продукции АФК. Уровень последних регулируется в частности за счет действия антиоксидантной системы, а именно следующих ферментов: супероксиддисмутазы-2 (SOD2), микросомальной глутатион-S-трансферазы-1 (MGST1) и ядерного фактора-2 эритроидного происхождения (NRF2) [66].

Система, включающая Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок-1 (Kelch-like ECH-associated protein 1; Keap1) и Nrf2, представляет собой защитный механизм против влияния вредных факторов, в частности окислительного стресса и электрофильных токсинов [67]. Nrf2 – ключевой фактор, активирующий транскрипцию ряда цитопротекторных генов, кодирующих антиоксидантные белки и ферменты детоксикации. Keap1 – репрессор Nrf2, отвечающий на окислительно-восстановительные (redox) изменения в клетке [68]. В нормальных условиях Nrf2 полиубиквитинируется белковым комплексом Keap1 и расщепляется в протеасомах. В условиях стресса, индуцирующих окислительно-восстановительные нарушения, Keap1 инактивируется, в результате чего Nrf2 стабилизируется и активирует транскрипцию цитопротекторных генов [69, 70].

При изучении влияния активности Nrf2 на ДР-ГСК [71] обнаружено, что постоянная активация Nrf2 в результате дефицита *Keap1* не изменяет уровень ДР-ГСК, но негативно влияет на их состояние покоя при стабильном кроветворении. Конститутивная активация Nrf2 уменьшает способность ДР-ГСК к репопуляции клеток костного мозга после трансплантации. Следовательно,

Keap1 регулирует активность Nrf2 и влияет на вход ГСК в клеточный цикл и дифференцировку, обеспечивая регенеративный ответ ГСК на стресс, например в случае кровопотери.

ЭКСТРАФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ КИСЛОРОДНЫЙ ШОК/СТРЕСС В БИОЛОГИИ ГСК

Несмотря на то, что ГСК в организме существуют фактически в условиях гипоксии, которые необходимы для сохранения состояния покоя этих клеток, до недавнего времени практически все манипуляции с ГСК проводили в условиях атмосферного уровня кислорода.

Считалось, что относительно кратковременное пребывание ГСК в условиях нормоксии/физиологической гипероксии не вызывает изменений в свойствах этих клеток либо эти изменения обратимы и не оказывают долговременного действия на функции ГСК. Теперь становится понятным, что эти постулаты были ошибочными. Не так давно показано, что даже кратковременное воздействие атмосферного кислорода вызывает дифференцировку ГСК, приводящую к уменьшению их количества с одновременным увеличением числа ГПК [72]. Это явление получило название “экстрафизиологический кислородный шок/стресс” (Extra Physiologic Oxygen Shock/Stress; EPHOSS). Механизм действия EPHOSS обусловлен индукцией продукции митохондриальных АФК, что сопряжено с открытием переходной поры митохондриальной проницаемости (mitochondrial permeability transition pore; MPTP).

Так, еще в 2005 году С. Vaines и др. [73] обнаружили, что делеция гена циклофилина D (*CypD*) предотвращала индукцию MPTP. Авторы исследовали влияние этой делеции на способность защищать ГСК от EPHOSS и повышать их выход из костного мозга мышей. Так, показано, что после сбора и обработки клеток костного мозга мышей в атмосферных условиях число фенотипически и функционально определяемых ГСК значительно больше у *CypD*-негативных, чем у *CypD*-позитивных мышей. При долговременной репопуляции в дефектных по *CypD* ГСК продукция АФК была значимо снижена. В результате проведенных исследований выявлено, что открытие MPTP индуцируют факторы *CypD* и p53, а также экспрессия Hif-1 α и микроРНК miR-210 [72, 74].

Н. Врохтеуер и др. [74] пришли к выводу, что сбор и работа с ГСК костного мозга в условиях гипоксии (3% O₂) значительно повышает количество долговременно репопулирующих ГСК костного мозга мышей (до 5 раз) и выживание животных после трансплантации. Таким образом, для снижения дифференцировки и потерь ГСК при

их выделении следует снижать уровень ERHOS и проводить сбор и обработку костного мозга в условиях гипоксии. Повышение выхода ГСК и сохранение их функциональной активности при работе в условиях пониженного (физиологического) уровня кислорода показано также для ГСК из костного мозга и пуповинной крови человека [75], для мобилизованных ГСК периферической крови [76] и даже для ГСК мышей, нокаутных по *Fanca* и *Fancc*, костный мозг которых дефицитен по ГСК и ГПК [77].

А. Aljoufi и др. [78], исследуя Tet2 (ten-eleven translocation 2) – α -кетоглутарат, железо- и кислородзависимую диоксигеназу, катализирующую превращение 5-метилцитозина в 5-гидроксиметилцитозин, – обнаружили, что делеция *Tet2* в ГСК приводила к нечувствительности ГСК и ГПК к изменению уровня кислорода при выделении из костного мозга [78]. Использование физиологических уровней кислорода при работе с клетками костного мозга также позволило выявить, что Ca^{2+} /кальмодулинзависимая киназа киназы-2 (*Camkk2*) – первичный внутриклеточный рецептор Ca^{2+} – регулирует переход ГСК в ГПК, при этом нокаутные по *Camkk2* клетки были достаточно устойчивы к воздействию ERHOS [79]. Интересно, что выделение и манипуляции с клетками костного мозга старых мышей в среде 3%-ного кислорода обеспечивают более высокий выход ГСК по сравнению с молодыми мышами при атмосферном уровне кислорода. Более того, соотношение миелоидно-лимфоидной дифференцировки клеток, полученных от старых животных в условиях внешней гипоксии, сравнялось с таковым для клеток от молодых мышей, собранных как в нормальной, так и гипоксической атмосфере [80].

Несмотря на явные преимущества, с точки зрения сохранения физиологии и свойств ГСК, манипуляции с этими клетками в гипоксических условиях представляют большую сложность и, кроме того, дорогостоящи. Условия гипоксии можно смоделировать, используя ингибитор СурD циклоспорин А, который препятствует индукции МРТР [75]. Использование циклоспоринона тоже сопряжено с определенными трудностями, так как это соединение токсично действует на клетки при длительном контакте. В связи с этим опробованы другие способы сбора ГСК – с использованием комбинации ингибиторов эпигенетических ферментов и сочетания антиоксидантов N-ацетилцистеина и 2-фосфат-L-аскорбиновой кислоты [81]. Их применение позволило значительно увеличить выход клеток при выделении, улучшить приживаемости при трансплантации и снизить содержание ГПК. Конечно, интересно проверить новые сочетания антиоксидантов и других факторов для выявления вариантов,

наиболее подходящих для сохранения свойств и функции ГСК при работе в стандартных атмосферных условиях.

ОТ ПОКОЯ К ПРОЛИФЕРАЦИИ: МЕХАНИЗМЫ ТОНКОЙ НАСТРОЙКИ МЕТАБОЛИЗМА

Значительную роль в переходе ГСК от состояния покоя к пролиферации играет ответ на несвернутые белки в митохондриях (mitochondrial unfolded protein response, UPRmt). М. Mohrin и соавт. [82] привели доказательства того, что UPRmt активируется при переключении метаболизма ГСК из покоящегося состояния в активное. После стимуляции ГСК цитокинами или полицитидиловой кислотой клетки начинали активно размножаться, что сопровождалось увеличением митохондриальной массы, повышением экспрессии генов OXPHOS и транскрипцией генов протеаз и шаперонов митохондрий. Авторы пришли к выводу, что с помощью UPRmt сохранность митохондрий активно контролируется в фазе G₀/G₁ клеточного цикла, что необходимо для обеспечения метаболической готовности ГСК перед началом пролиферации. При переходе от покоя к пролиферации дисрегуляция UPRmt приводит к гибели, нарушению самообновления и уменьшению популяции ГСК [83, 84]. Один из факторов индукции UPRmt – повышенная экспрессия NAD-зависимой деацетилазы сиртуин-7 (SIRT7). SIRT7 относится к ключевым компонентам UPRmt, так как подавляет митохондриальный биогенез, что способствует сохранению пула ГСК при стрессе [85]. SIRT7 снижает стресс, вызываемый несвернутыми белками в митохондриях, за счет подавления в них активности NRF1 и трансляции, снижает активность митохондрий и пролиферацию клеток, тем самым увеличивая время, необходимое для восстановления последних. С возрастом SIRT7 инактивируется, что приводит к усилению влияния стресса через несвернутые белки в митохондриях и снижению функциональности ГСК [83].

Интересные результаты получены при делеции гена *Tsc1* комплекса туберозного склероза (TSC) [86]. TSC негативно регулирует mTORC1 (mTOR complex 1) – ключевой регулятор клеточного метаболизма. Так, делеция *Tsc1* в ГСК переводила клетки из состояния покоя в пролиферацию, сопровождающуюся усилением митохондриального биогенеза и повышением уровня АФК. Проведенные конкурентные и серийные трансплантации костного мозга показали, что в ГСК, дефицитных по *Tsc1*, значительно снижена скорость процессов гемопоэза и самообновления; при этом лечение *in vivo* антагонистом АФК рапамицином останавливало размножение ГСК и восстанавливало их функции. Таким образом,

путь TSC1–mTOR поддерживает ГСК в покоем состоянии за счет подавления продукции АФК. Негативный эффект активированных АФК на сохранение метаболически активных ГСК объясняется связью между фундаментальными свойствами стволовых клеток и состоянием покоя [86].

Не так давно была опубликована работа [87], в которой показано, что локус *Dlk1–Gtl2* играет критическую роль в сохранении ДР-ГСК. Этот локус импринтинга млекопитающих продуцирует множество некодирующих РНК (ncРНК) из хромосомного аллеля, унаследованного от матери. Транскриптомный анализ 17 типов гемопоэтических клеток показал, что ncРНК, экспрессируемые локусом *Dlk1–Gtl2*, представлены как в ГСК в составе эмбриональной печени, так в популяции ДР-ГСК взрослых и необходимы для поддержания функциональности ГСК. В этом случае весь путь PI3K–mTOR подавляется мегакластером микроРНК в локусе *Dlk1–Gtl2*, что приводит к подавлению митохондриального биогенеза и защищает ДР-ГСК от чрезмерной продукции АФК.

ИЗМЕНЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА ГСК ПРИ СТРЕССЕ КРОВЕТВОРНОЙ СИСТЕМЫ

К важным вопросам регуляции системы гемопоэза относится выяснение механизмов ее ответа на инфекции и воспаление. В случае инфекции многократно увеличивается оборот нейтрофилов и других иммунных клеток. В ответ на возросшие требования по защите организма система кроветворения реагирует быстрым переключением со стационарного кроветворения на экстренный гранулопоэз. Этот переход включает взаимодействие как гемопоэтических, так и некроветворных клеток микроокружения костного мозга, включая в том числе обмен цитокинами и факторами роста [88, 89]. Так, во время воспалительных состояний стромальные клетки костного мозга поддерживают возросшую потребность в кроветворении, предотвращая истощение ГСК [90]. Еще до того, как ГСК активируют митохондриальный биогенез в ответ на бактериальную инфекцию, стромальные клетки костного мозга передают им часть своих митохондрий [91]. Увеличение митохондриальной массы в ГСК и ГПК через 2 ч после заражения не сопровождалось увеличением митохондриального транскрипционного фактора А (TFAM), что говорит об отсутствии перехода к митохондриальному биогенезу. Процесс передачи митохондрий из стромальных клеток в ГСК регулируется супероксидом и позволяет быстро реализовать переход от гликолитического состояния покоя к OXPHOS, обеспечивая гранулоцитарный ответ в случае заражения. Стоит еще раз отметить, что энергетические по-

требности ГСК во время дифференцировки и экспансии в результате инфекции огромны и требуют быстрого и эффективного производства энергии. Во время дифференцировки ГСК покидают гипоксическую нишу и в процессе циркуляции могут перемещаться в зоны костного мозга с более высоким уровнем кислорода. В результате этого ГПК начинают использовать OXPHOS для выработки АТФ [92].

Очевидно, что переход от стационарного кроветворения к экстренному “предъявляет” определенные метаболические требования к кроветворной системе. В условиях стрессового кроветворения основным источником АТФ для некоторых иммунных клеток может быть гликолиз. Во время стресса кислотность костного мозга повышается из-за увеличения продукции лактата как побочного продукта гликолиза [93]. И наоборот, введение мышам молочной кислоты стимулировало эритропоэз в костном мозге. Также в костном мозге находится большое количество триглицеридсодержащих адипоцитов, способных высвобождать свободные жирные кислоты и глицерин в ответ на стресс [94]. Показано, что в процессе активации иммунные клетки могут использовать как OXPHOS, так и гликолиз [95]. Так, нейтрофилы, макрофаги M1 (классически активированные) и активированные дендритные клетки предпочитают гликолиз, Т-клетки используют как гликолиз, так и OXPHOS, в то время как макрофаги M2 (альтернативно активированные), регуляторные Т-лимфоциты и Т-клетки памяти – механизм OXPHOS [95].

Дать ответ на вопрос, почему при стрессовом гемопоэзе клетки используют как гликолиз, так и OXPHOS, позволяет тот факт, что при гликолизе АТФ генерируется быстрее, чем при OXPHOS [96], хотя выход АТФ (количество АТФ на моль субстрата) при OXPHOS намного выше. Таким образом, оба метаболических пути могут быть энергетически выгодными при экспансии клеток.

РОЛЬ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ГЕМОПОЭЗЕ

Известно, что окисление жирных кислот (Fatty Acid Oxidation; FAO) в процессе кроветворения используется в качестве источника энергии как ГСК, так и более специализированными клетками-предшественниками. Механизм FAO важен для поддержания стволовых клеток в недифференцированном состоянии. Учитывая сложность биохимических путей и реакций, происходящих в митохондриях, можно прийти к предположению о существовании множества метаболических контрольных точек, которые регулируют судьбу клетки. К. Ito и др. [97] показали, что процесс FAO в митохондриях, опосредованный осью промиелоцитарный лейкозный белок (PML)–рецептор- δ активатора пролиферации пероксисом

(PPAR δ), необходим для самообновления ГСК путем стимулирования асимметричного клеточного деления.

Любопытно, что анализ на уровне единичных клеток показал, что FAO играет решающую роль в экспансии ГСК [98]. Однако в целом механизм, с помощью которого FAO способствует самообновлению ГСК, остается неизвестным.

Недавно показано, что ГСК поглощают и метаболизуют свободные жирные кислоты (FFA) при острой бактериальной инфекции. Это способствует переходу ГСК от гликолиза к β -окислению и выходу в клеточный цикл, что имеет решающее значение для ответа на инфекцию [99]. Расщепление жирных кислот с образованием АТФ происходит в основном в митохондриях. Поглощение FFA происходит после увеличения уровня мРНК CD36 – транспортера FFA. Кроме того, установлено, что ГСК, на поверхности которых отсутствуют молекулы CD36, медленно вступают в клеточный цикл и не способны переключиться на FAO [100].

Стоит отметить, что поглощение FFA в настоящее время общепризнано важным процессом, поддерживающим метаболизм как в злокачественных, так и в нормальных клетках. В обычных условиях для покоящихся ГСК характерен высокий уровень FAO, а ингибирование этого процесса приводит к дисфункции клеток [97].

Важно также отметить, что в экспериментах с использованием *Drosophila melanogaster* в качестве модельной системы кроветворения показано, что FAO в митохондриях имеет решающее значение для дифференцировки прогениторных клеток крови, которая становится невозможной в отсутствие FAO [101]. Таким образом, ГСК, как и многие другие виды клеток, зависят от FAO.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования последних десятилетий существенно расширили знания о метаболическом регулировании судьбы ГСК. Используя анаэробный гликолиз для производства энергии, стволовые кроветворные клетки ограничивают OXPHOS и продукцию АФК, что позволяет им поддерживать состояние покоя, оставаясь в недифференцированном состоянии, а также минимизировать мутации в геноме. Раскрытие механизмов функционирования и роли гетеродимерных факторов HIF-1 и HIF-2 позволило получить новую информацию о регуляции состояния ГСК и ГПК и значении ниши ГСК в этих процессах и, как следствие, сформулировать новые стратегии репрограммирования окислительного метаболизма и модуляции свойств ГСК.

Изучение механизмов ERHOSS позволило оценить влияние атмосферного кислорода при

выделении ГСК и выявить связь между гипоксией, SurD и MPTP в передаче сигналов. Понимание влияния ERHOSS на состояние выделяемых ГСК и их дальнейшую судьбу привело к пересмотру большого массива данных по свойствам ГСК и их дифференцировке, которые были получены в условиях атмосферных уровней кислорода. Кроме того, учет влияния ERHOSS позволит избежать артефактов при выделении ГСК, что особенно актуально для препаратов ГСК из пуповинной крови.

В обзоре также рассмотрена функция FAO и значение этого механизма для пролиферации ГСК и их реакции на стресс. Тем не менее механизмы, задействованные при изменении метаболических путей ГСК при стрессе, остаются не до конца ясными и требуют дополнительных исследований.

Понимание тонких настроек метаболизма ГСК в покое и при входе в клеточный цикл открывает новые возможности для трансплантации гемопоэтических клеток при лечении онкологических заболеваний и разработки препаратов нового поколения для репрограммирования клеток при лечении инфекционных заболеваний, различных патологий и при старении.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ госрегистрации темы – 122092200053-8).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kaushansky K. (2006) Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N. Engl. J. Med.* **354**(19), 2034–2045.
2. Doulatov S., Notta F., Laurenti E., Dick J.E. (2012) Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell.* **10**(2), 120–136.
3. Watson C.J., Papula A.L., Poon G.Y.P., Wong W.H., Young A.L., Druley T.E., Fisher D.S., Blundell J.R. (2020) The evolutionary dynamics and fitness landscape of clonal hematopoiesis. *Science.* **367**(6485), 1449–1454.
4. Cheshier S.H., Morrison S.J., Liao X., Weissman I.L. (1999) *In vivo* proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**(6), 3120–3125.
5. Cheng T., Rodrigues N., Shen H., Yang Y.G., Dombkowski D., Sykes M., Scadden D.T. (2000) Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21^{cip1/waf1}. *Science.* **287**(5459), 1804–1809.
6. Yamamoto R., Morita Y., Ooehara J., Hamanaka S., Onodera M., Rudolph K.L., Ema H., Nakauchi H.

- (2013) Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell*. **154**(5).
7. Höfer T., Rodewald H.R. (2018) Differentiation-based model of hematopoietic stem cell functions and lineage pathways. *Blood*. **132**(11), 1106–1113.
 8. Sun J., Ramos A., Chapman B., Johnnidis J.B., Le L., Ho Y.J., Klein A., Hofmann O., Camargo F.D. (2014) Clonal dynamics of native haematopoiesis. *Nature*. **514**(7522), 322–327.
 9. Jang Y.Y., Sharkis S.J. (2007) A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood*. **110**(8), 3056–3063.
 10. Chen Y., Fang S., Ding Q., Jiang R., He J., Wang Q., Jin Y., Huang X., Liu S., Capitano M.L., Trinh T., Teng Y., Meng Q., Wan J., Broxmeyer H.E., Guo B. (2021) ADGRG1 enriches for functional human hematopoietic stem cells following *ex vivo* expansion-induced mitochondrial oxidative stress. *J. Clin. Invest.* **131**(20).
 11. D'Souza L.C., Kuriakose N., Raghu S.V., Kabekko-du S.P., Sharma A. (2022) ROS-directed activation of Toll/NF- κ B in the hematopoietic niche triggers benzene-induced emergency hematopoiesis. *Free Radic. Biol. Med.* **193**(Pt. 1), 190–201.
 12. Jakubison B.L., Sarkar T., Gudmundsson K.O., Singh S., Sun L., Morris H.M., Klarmann K.D., Keller J.R. (2022) ID2 and HIF-1 α collaborate to protect quiescent hematopoietic stem cells from activation, differentiation, and exhaustion. *J. Clin. Invest.* **132**(13), e152599.
 13. Guan B., Li C., Yang Y., Lu Y., Sun Y., Su L., Shi G., Bai L., Liu J., Meng A. (2023) Effect of spermidine on radiation-induced long-term bone marrow cell injury. *Int. Immunopharmacol.* **114**, 109557.
 14. Aires R., Porto M.L., de Assis L.M., Pereira P.A.N., Carvalho G.R., Côco L.Z., Vasquez E.C., Pereira T.M.C., Campagnaro B.P., Meyrelles S.S. (2021) DNA damage and aging on hematopoietic stem cells: impact of oxidative stress in ApoE^{-/-} mice. *Exp. Gerontol.* **156**, 111607.
 15. Spencer J.A., Ferraro F., Roussakis E., Klein A., Wu J., Runnels J.M., Zaher W., Mortensen L.J., Alt C., Turcotte R., Yusuf R., Côté D., Vinogradov S.A., Scadden D.T., Lin C.P. (2014) Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature*. **508**(7495), 269.
 16. Simsek T., Kocabas F., Zheng J., Deberardinis R.J., Mahmoud A.I., Olson E.N., Schneider J.W., Zhang C.C., Sadek H.A. (2010) The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell*. **7**(3), 380–390.
 17. Suda T., Takubo K., Semenza G.L. (2011) Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell*. **9**(4), 298–310.
 18. Semenza G.L. (2001) Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol. Med.* **7**(8), 345–350.
 19. Gonzalez-Flores A., Aguilar-Quesada R., Siles E., Pozo S., Rodríguez-Lara M.I., López-Jiménez L., López-Rodríguez M., Peralta-Leal A., Villar D., Martín-Oliva D., Del Peso L., Berra E., Oliver F.J. (2014) Interaction between PARP-1 and HIF-2 α in the hypoxic response. *Oncogene*. **33**(7), 891–898.
 20. Zhang P., Yao Q., Lu L., Li Y., Chen P.J., Duan C. (2014) Hypoxia-inducible factor 3 is an oxygen-dependent transcription activator and regulates a distinct transcriptional response to hypoxia. *Cell Rep.* **6**(6), 1110–1121.
 21. Semenza G.L., Wang G.L. (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via *de novo* protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell Biol.* **12**(12), 5447–5454.
 22. Wang G.L., Semenza G.L. (1993) Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J. Biol. Chemistry*. **268**(29), 21513–21518.
 23. Wang G.L., Jiang B.H., Rue E.A., Semenza G.L. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**(12), 5510–5514.
 24. Semenza G.L. (2004) Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)*. **19**(4), 176–182.
 25. Schödel J., Ratcliffe P.J. (2019) Mechanisms of hypoxia signalling: new implications for nephrology. *Nat. Rev. Nephrol.* **15**(10), 641–659.
 26. Jaakkola P., Mole D.R., Tian Y.M., Wilson M.I., Gielbert J., Gaskell S.J., Von Kriegsheim A., Hebestreit H.F., Mukherji M., Schofield C.J., Maxwell P.H., Pugh C.W., Ratcliffe P.J. (2001) Targeting of HIF- α to the von Hippel–Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. **292**(5516), 468–472.
 27. Schödel J., Klanke B., Weidemann A., Buchholz B., Bernhardt W., Bertog M., Amann K., Korbmayer C., Wiesener M., Warnecke C., Kurtz A., Eckardt K.U., Willam C. (2009) HIF-prolyl hydroxylases in the rat kidney: physiologic expression patterns and regulation in acute kidney injury. *Am. J. Pathol.* **174**(5), 1663–1674.
 28. Appelhoffl R.J., Tian Y.M., Raval R.R., Turley H., Harris A.L., Pugh C.W., Ratcliffe P.J., Gleadle J.M. (2004) Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J. Biol. Chem.* **279**(37), 38458–38465.
 29. Lando D., Peet D.J., Whelan D.A., Gorman J.J., Whitelaw M.L. (2002) Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science*. **295**(5556), 858–861.
 30. Koivunen P., Hirsilä M., Günzler V., Kivirikko K.I., Myllyharju J. (2004) Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *J. Biol. Chem.* **279**(11), 9899–9904.
 31. Kaelin W.G., Ratcliffe P.J. (2008) Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol. Cell*. **30**(4), 393–402.

32. Arany Z., Huang L.E., Eckner R., Bhattacharya S., Jiang C., Goldberg M.A., Bunn H.F., Livingston D.M. (1996) An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**(23), 12969–12973.
33. Kietzmann T., Mennerich D., Dimova E.Y. (2016) Hypoxia-inducible factors (HIFs) and phosphorylation: impact on stability, localization, and transactivity. *Front. Cell Dev. Biol.* **4**, 11.
34. Mottet D., Dumont V., Deccache Y., Demazy C., Ninane N., Raes M., Michiels C. (2003) Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α protein level during hypoxic conditions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3 β pathway in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* **278**(33), 31277–31285.
35. Du S.C., Zhu L., Wang Y.X., Liu J., Zhang D., Chen Y.L., Peng Q., Liu W., Liu B. (2019) SENP1-mediated deSUMOylation of USP28 regulated HIF-1 α accumulation and activation during hypoxia response. *Cancer Cell Int.* **19**, 4.
36. Xu D., Yao Y., Lu L., Costa M., Dai W. (2010) Plk3 functions as an essential component of the hypoxia regulatory pathway by direct phosphorylation of HIF-1 α . *J. Biol. Chem.* **285**(50), 38944–38950.
37. Li C., Park S., Zhang X., Dai W., Xu D. (2017) Mutual regulation between Polo-like kinase 3 and SIAH2 E3 ubiquitin ligase defines a regulatory network that fine-tunes the cellular response to hypoxia and nickel. *J. Biol. Chem.* **292**(27), 11431–11444.
38. Aquino Perez C., Palek M., Stolarova L., von Morgen P., Macurek L. (2020) Phosphorylation of PLK3 is controlled by protein phosphatase 6. *Cells*. **9**(6), 1506.
39. Warfel N.A., Dolloff N.G., Dicker D.T., Malysz J., El-Deiry W.S. (2013) CDK1 stabilizes HIF-1 α via direct phosphorylation of Ser668 to promote tumor growth. *Cell Cycle*. **12**(23), 3689–3701.
40. Neckers L. (2022) Oxygen-independent, CDK4/CDK6-dependent degradation of hypoxia-inducible factor-1 α takes cancers' breath away. *Oncotarget*. **13**, 16–17.
41. Bullen J.W., Tchernyshyov I., Holewinski R.J., Devine L., Wu F., Venkatraman V., Kass D.L., Cole R.N., Van Eyk J., Semenza G.L. (2016) Protein kinase A-dependent phosphorylation stimulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor 1. *Sci. Signal.* **9**(430), ra56.
42. Lucia K., Wu Y., Garcia J.M., Barlier A., Buchfelder M., Saeger W., Renner U., Stalla G.K., Theodoropoulou M. (2020) Hypoxia and the hypoxia inducible factor 1 α activate protein kinase A by repressing RII beta subunit transcription. *Oncogene*. **39**(16), 3367–3380.
43. Jeong J.W., Bae M.K., Ahn M.Y., Kim S.H., Sohn T.K., Bae M.H., Yoo M.A., Song E.J., Lee K.J., Kim K.W. (2002) Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell*. **111**(5), 709–720.
44. Zhang J., Niu C., Ye L., Huang H., He X., Tong W.G., Ross J., Haug J., Johnson T., Feng J.Q., Harris S., Wiedemann L.M., Mishina Y., Li L. (2003) Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*. **425**(6960), 836–841.
45. Calvi L.M., Adams G.B., Weibrecht K.W., Weber J.M., Olson D.P., Knight M.C., Martin R.P., Schipani E., Divieti P., Bringham F.R., Milner L.A., Kronenberg H.M., Scadden D.T. (2003) Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. **425**(6960), 841–846.
46. Mohyeldin A., Garzón-Muvdi T., Quiñones-Hinojosa A. (2010) Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell*. **7**(2), 150–161.
47. Nombela-Arrieta C., Pivarnik G., Winkel B., Canty K.J., Harley B., Mahoney J.E., Park S.Y., Lu J., Prottopopov A., Silberstein L.E. (2013) Quantitative imaging of hematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nat. Cell Biol.* **15**(5), 533.
48. Parmar K., Mauch P., Vergilio J.A., Sackstein R., Down J.D. (2007) Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**(13), 5431–5436.
49. Kunisaki Y., Bruns I., Scheiermann C., Ahmed J., Pinho S., Zhang D., Mizoguchi T., Wei Q., Lucas D., Ito K., Mar J.C., Bergman A., Frenette P.S. (2013) Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature*. **502**(7473), 637–643.
50. Méndez-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., Frenette P.S. (2010) Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. **466**(7308), 829–834.
51. Takubo K., Goda N., Yamada W., Iriuchishima H., Ikeda E., Kubota Y., Shima H., Johnson R.S., Hirao A., Suematsu M., Suda T. (2010) Regulation of the HIF-1 α level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. **7**(3), 391–402.
52. Takubo K., Nagamatsu G., Kobayashi C.I., Nakamura-Ishizu A., Kobayashi H., Ikeda E., Goda N., Rahimi Y., Johnson R.S., Soga T., Hirao A., Suematsu M., Suda T. (2013) Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. **12**(1), 49–61.
53. Ito K., Suda T. (2014) Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**(4), 243.
54. Yu W.M., Liu X., Shen J., Jovanovic O., Pohl E.E., Gerson S.L., Finkel T., Broxmeyer H.E., Qu C.K. (2013) Metabolic regulation by the mitochondrial phosphatase PTPMT1 is required for hematopoietic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell*. **12**(1), 62–74.
55. Ito K., Hirao A., Arai F., Matsuoka S., Takubo K., Hamaguchi I., Nomiyama K., Hosokawa K., Sakurada K., Nakagata N., Ikeda Y., Mak T.W., Suda T. (2004) Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. **431**(7011), 997–1002.
56. Norddahl G.L., Pronk C.J., Wahlestedt M., Sten G., Nygren J.M., Ugale A., Sigvardsson M., Bryder D. (2011) Accumulating mitochondrial DNA mutations drive premature hematopoietic aging phenotypes dis-

- tinct from physiological stem cell aging. *Cell Stem Cell*. **8**(5), 499–510.
57. Piccoli C., D'Aprile A., Scrima R., Ripoli M., Boffoli D., Tabilio A., Capitanio N. (2007) Role of reactive oxygen species as signal molecules in the pre-commitment phase of adult stem cells. *Ital. J. Biochem.* **56**(4), 295–301.
 58. Inoue S.I., Noda S., Kashima K., Nakada K., Hayashi J.I., Miyoshi H. (2010) Mitochondrial respiration defects modulate differentiation but not proliferation of hematopoietic stem and progenitor cells. *FEBS Lett.* **584**(15), 3402–3409.
 59. Vannini N., Girotra M., Naveiras O., Nikitin G., Campos V., Giger S., Roch A., Auwerx J., Lutolf M.P. (2016) Specification of haematopoietic stem cell fate via modulation of mitochondrial activity. *Nat. Commun.* **7**, 13125.
 60. Mistry J.J., Bowles K., Rushworth S.A. (2023) HSC-derived fatty acid oxidation in steady-state and stressed hematopoiesis. *Exp. Hematol.* **117**, 1–8.
 61. Kim J.W., Tchernyshyov I., Semenza G.L., Dang C.V. (2006) HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* **3**(3), 177–185.
 62. Guitart A.V., Subramani C., Armesilla-Diaz A., Smith G., Sepulveda C., Gezer D., Vukovic M., Dunn K., Pollard P., Holyoake T.L., Enver T., Ratcliffe P.J., Kranc K.R. (2013) Hif-2 α is not essential for cell-autonomous hematopoietic stem cell maintenance. *Blood*. **122**(10), 1741–1745.
 63. Vukovic M., Sepulveda C., Subramani C., Guitart A.V., Mohr J., Allen L., Panagopoulou T.I., Paris J., Lawson H., Villacreces A., Armesilla-Diaz A., Gezer D., Holyoake T.L., Ratcliffe P.J., Kranc K.R. (2016) Adult hematopoietic stem cells lacking Hif-1 α self-renew normally. *Blood*. **127**(23), 2841–2846.
 64. Kocabas F., Zheng J., Thet S., Copeland N.G., Jenkins N.A., DeBerardinis R.J., Zhang C., Sadek H.A. (2012) Meis1 regulates the metabolic phenotype and oxidant defense of hematopoietic stem cells. *Blood*. **120**(25), 4963–4972.
 65. Wang Y.H., Israelsen W.J., Lee D., Yu V.W.C., Jeanson N.T., Clish C.B., Cantley L.C., Vander Heiden M.G., Scadden D.T. (2014) Cell-state-specific metabolic dependency in hematopoiesis and leukemogenesis. *Cell*. **158**(6), 1309–1323.
 66. Morganti C., Cabezas-Wallscheid N., Ito K. (2022) Metabolic regulation of hematopoietic stem cells. *Hemasphere*. **6**(7), e740.
 67. Motohashi H., Yamamoto M. (2004) Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol. Med.* **10**(11), 549–557.
 68. Okawa H., Motohashi H., Kobayashi A., Aburatani H., Kensler T.W., Yamamoto M. (2006) Hepatocyte-specific deletion of the *keap1* gene activates Nrf2 and confers potent resistance against acute drug toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **339**(1), 79–88.
 69. Goto M., Kitamura H., Alam M.M., Ota N., Haseba T., Akimoto T., Shimizu A., Takano-Yamamoto T., Yamamoto M., Motohashi H. (2015) Alcohol dehydrogenase 3 contributes to the protection of liver from non-alcoholic steatohepatitis. *Genes Cells*. **20**(6), 464–480.
 70. Honkura Y., Matsuo H., Murakami S., Sakiyama M., Mizutani K., Shiotani A., Yamamoto M., Morita I., Shinomiya N., Kawase T., Katori Y., Motohashi H. (2016) NRF2 is a key target for prevention of noise-induced hearing loss by reducing oxidative damage of cochlea. *Sci. Rep.* **6**, 19329.
 71. Murakami S., Suzuki T., Harigae H., Romeo P.-H., Yamamoto M., Motohashi H. (2017) NRF2 activation impairs quiescence and bone marrow reconstitution capacity of hematopoietic stem cells. *Mol. Cell Biol.* **37**(19), e00086-17.
 72. Mantel C.R., O'Leary H.A., Chitteti B.R., Huang X., Cooper S., Hangoc G., Brustovetsky N., Srouf E.F., Lee M.R., Messina-Graham S., Haas D.M., Falah N., Kapur R., Pelus L.M., Bardeesy N., Fitamant J., Ivan M., Kim K.S., Broxmeyer H.E. (2015) Enhancing hematopoietic stem cell transplantation efficacy by mitigating oxygen shock. *Cell*. **161**(7), 1553–1565.
 73. Baines C.P., Kaiser R.A., Purcell N.H., Blair N.S., Osinska H., Hambleton M.A., Brunskill E.W., Sayen M.R., Gottlieb R.A., Dorn G.W., Bobbins J., Molkenstein J.D. (2005) Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*. **434**(7033), 658–662.
 74. Broxmeyer H.E., O'Leary H.A., Huang X., Mantel C. (2015) The importance of hypoxia and extra physiologic oxygen shock/stress for collection and processing of stem and progenitor cells to understand true physiology/pathology of these cells *ex vivo*. *Curr. Opin. Hematol.* **22**(4), 273–278.
<https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000144>
 75. Broxmeyer H.E. (2016) Enhancing the efficacy of engraftment of cord blood for hematopoietic cell transplantation. *Transfus. Apher. Sci.* **54**(3), 364.
 76. Aljoufi A., Cooper S., Broxmeyer H.E. (2020) Collection and processing of mobilized mouse peripheral blood at lowered oxygen tension yields enhanced numbers of hematopoietic stem cells. *Stem Cell Rev. Rep.* **16**(5), 946.
 77. Broxmeyer H.E., Capitanio M.L., Cooper S., Potchanant E.S., Clapp D.W. (2021) Numbers of long-term hematopoietic stem cells from bone marrow of *fanca* and *fancc* knockout mice can be greatly enhanced by their collection and processing in physioxia conditions. *Blood Cells Mol. Dis.* **86**, 102492.
 78. Aljoufi A., Zhang C., Ropa J., Chang W., Palam L.R., Cooper S., Ramdas B., Capitanio M.L., Broxmeyer H.E., Kapur R. (2022) Physioxia-induced downregulation of *Tet2* in hematopoietic stem cells contributes to enhanced self-renewal. *Blood*. **140**(11), 1263–1277.
 79. Broxmeyer H.E., Ropa J., Capitanio M.L., Cooper S., Racioppi L., Sankar U. (2022) CaMKK2 knockout bone marrow cells collected/processed in low oxygen (Physioxia) suggests CaMKK2 as a hematopoietic stem to progenitor differentiation fate determinant. *Stem Cell Rev. Rep.* **18**(7), 2513.

80. Capitano M.L., Mohamad S.F., Cooper S., Guo B., Huang X., Gunawan A.M., Sampson C., Ropa J., Srour E.F., Orschell C.M., Broxmeyer H.E. (2021) Mitigating oxygen stress enhances aged mouse hematopoietic stem cell numbers and function. *J. Clin. Invest.* **131**(1), e140177.
81. Cai Q., Capitano M., Huang X., Guo B., Cooper S., Broxmeyer H.E. (2018) Combinations of antioxidants and/or of epigenetic enzyme inhibitors allow for enhanced collection of mouse bone marrow hematopoietic stem cells in ambient air. *Blood Cells Mol. Dis.* **71**, 23.
82. Mohrin M., Widjaja A., Liu Y., Luo H., Chen D. (2018) The mitochondrial unfolded protein response is activated upon hematopoietic stem cell exit from quiescence. *Aging Cell.* **17**(3), e12756.
83. Mohrin M., Shin J., Liu Y., Brown K., Luo H., Xi Y., Haynes C.M., Chen D. (2015) Stem cell aging. A mitochondrial UPR-mediated metabolic checkpoint regulates hematopoietic stem cell aging. *Science.* **347**(6228), 1374.
84. Zhang H., Ryu D., Wu Y., Gariani K., Wang X., Luan P., D'Amico D., Ropelle E.R., Lutolf M.P., Aebersold R., Schoonjans K., Menzies K.J., Auwerx J. (2016) NAD⁺ repletion improves mitochondrial and stem cell function and enhances life span in mice. *Science.* **352**(6292), 1436–1443.
85. Naka K., Muraguchi T., Hoshii T., Hirao A. (2008) Regulation of reactive oxygen species and genomic stability in hematopoietic stem cells. *Antioxid. Redox Signal.* **10**(11), 1883–1894.
86. Chen C., Liu Y., Liu R., Ikenoue T., Guan K.L., Liu Y., Zheng P. (2008) TSC–mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species. *J. Exp. Med.* **205**(10), 2397–2408.
87. Qian P., He X.C., Paulson A., Li Z., Tao F., Perry J.M., Guo F., Zhao M., Zhi L., Venkatraman A., Haug J.S., Parmely T., Li H., Dobrowsky R.T., Ding W.X., Kono T., Ferguson-Smith A.C., Li L. (2016) The *Dlk1–Gtl2* locus preserves LT-HSC function by inhibiting the PI3K–mTOR pathway to restrict mitochondrial metabolism. *Cell Stem Cell.* **18**(2), 214–228.
88. Boettcher S., Manz M.G. (2017) Regulation of inflammation- and infection-driven hematopoiesis. *Trends Immunol.* **38**(5), 345–357.
89. Silberstein L., Goncalves K.A., Kharchenko P. V., Turcotte R., Kfoury Y., Mercier F., Baryawno N., Severe N., Bachand J., Spencer J.A., Papazian A., Lee D., Chitteti B.R., Srour E.F., Hoggatt J., Tate T., Lo Celso C., Ono N., Nutt S., Heino J., Sipilä K., Shioda T., Osawa M., Lin C.P., Hu G.F., Scadden D.T. (2016) Proximity-based differential single-cell analysis of the niche to identify stem/progenitor cell regulators. *Cell Stem Cell.* **19**(4), 530–543.
90. Ziegler P., Boettcher S., Takizawa H., Manz M.G., Brümmerdorf T.H. (2016) LPS-stimulated human bone marrow stroma cells support myeloid cell development and progenitor cell maintenance. *Ann. Hematol.* **95**(2), 173–178.
91. Mistry J.J., Marlein C.R., Moore J.A., Hellmich C., Wojtowicz E.E., Smith J.G.W., Macaulay I., Sun Y., Morfakis A., Patterson A., Horton R.H., Divekar D., Morris C.J., Haestier A., Palma F. Di, Beraza N., Bowles K.M., Rushworth S.A. (2019) ROS-mediated PI3K activation drives mitochondrial transfer from stromal cells to hematopoietic stem cells in response to infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **116**(49), 24610–24619.
92. Kiel M.J., Yilmaz Ö.H., Iwashita T., Yilmaz O.H., Terhorst C., Morrison S.J. (2005) SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell.* **121**(7), 1109–1121.
93. Luo S.T., Zhang D.M., Qin Q., Lu L., Luo M., Guo F.C., Shi H.S., Jiang L., Shao B., Li M., Yang H.S., Wei Y.Q. (2017) The promotion of erythropoiesis via the regulation of reactive oxygen species by lactic acid. *Sci. Rep.* **7**(1), 38105.
94. Horton E.S., Beisel W.R. (1994) The metabolic responses to stress and physical activity. In: *Food Components to Enhance Performance: An Evaluation of Potential Performance-Enhancing Food Components for Operational Rations*. Ed. Marriott B.M. Washington: Natl. Acad. Press, p. 529.
95. Pearce E.L., Pearce E.J. (2013) Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity.* **38**(4), 633–643.
96. Pfeiffer T., Schuster S., Bonhoeffer S. (2001) Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science.* **292**(5516), 504–507.
97. Ito K., Carracedo A., Weiss D., Arai F., Ala U., Avigan D.E., Schafer Z.T., Evans R.M., Suda T., Lee C.H., Pandolfi P.P. (2012) A PML–PPAR- δ pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. *Nat. Med.* **18**(9), 1350–1358.
98. Ito K., Turcotte R., Cui J., Zimmerman S.E., Pinho S., Mizoguchi T., Arai F., Runnels J.M., Alt C., Teruya-Feldstein J., Mar J.C., Singh R., Suda T., Lin C.P., Frenette P.S., Ito K. (2016) Self-renewal of a purified Tie2⁺ hematopoietic stem cell population relies on mitochondrial clearance. *Science.* **354**(6316), 1156.
99. Mistry J.J., Hellmich C., Moore J.A., Jibril A., Macaulay I., Moreno-Gonzalez M., Di Palma F., Beraza N., Bowles K.M., Rushworth S.A. (2021) Free fatty-acid transport via CD36 drives β -oxidation-mediated hematopoietic stem cell response to infection. *Nat. Commun.* **12**(1), 7130.
100. Takakuwa T., Nakashima Y., Koh H., Nakane T., Nakamae H., Hino M. (2019) Short-term fasting induces cell cycle arrest in immature hematopoietic cells and increases the number of naïve T cells in the bone marrow of mice. *Acta Haematol.* **141**(3), 189–198.
101. Tiwari S.K., Toshniwal A.G., Mandal S., Mandal L. (2020) Fatty acid β -oxidation is required for the differentiation of larval hematopoietic progenitors in *Drosophila*. *Elife.* **9**, e53247.

Regulation of Metabolism and the Role of Redox Factors in the Energy Control of Quiescence and Proliferation of Hematopoietic Cells

M. V. Kalashnikova¹, N. S. Polyakova¹, and A. V. Belyavsky¹, *

¹*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: abelyavs@yahoo.com*

One of the key regulators of hematopoietic stem cell (HSC) maintenance is cellular metabolism. Resting HSCs use anaerobic glycolysis as the main source of energy. During expansion and differentiation under conditions of steady state hematopoiesis, the energy needs of activated HSC increase many fold. To meet the increased demands, cells switch to mitochondrial oxidative phosphorylation, which is accompanied by the increase in reactive oxygen species (ROS) production. Here, the molecular mechanisms maintaining glycolysis in HSCs as well as the factors determining the increase in metabolic activity and the transition to mitochondrial biogenesis during HSC activation are considered. We focus on the role of HIF (hypoxia-inducible factor) proteins as key mediators of the cellular response to hypoxia, and also consider the phenomenon of extraphysiological oxygen shock (EPHOSS), leading to the forced differentiation of HSCs as well as methods of overcoming it. Finally, the role of fatty acid oxidation (FAO) in hematopoiesis is discussed. Understanding the metabolic needs of normal HSCs and precursors is crucial for the development of new treatments for diseases related to the hematopoietic and immune systems.

Keywords: hematopoiesis, hematopoietic stem cells, anaerobic glycolysis, stress hematopoiesis, mitochondrial biogenesis, fatty acid oxidation, HIF, oxidative stress, redox factors, reactive oxygen species