

Notch-сигнальный путь как механизм регуляции остеогенной дифференцировки

Д.А. Переплетчикова¹, Д.В. Смирнова¹, К.Е. Азаркина¹, В.А. Семенихин²,
А.Б. Малашичева¹

¹ ФГБУН «Институт цитологии Российской академии наук», Россия, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр-т, 4

² ООО «Пальмира Биофарма», Россия, 119021, Москва, Инновационный центр «Сколково», Большой бульвар 42, стр. 1, офис 136

Адрес для корреспонденции: perepletchikova@incras.ru

Аннотация

Остеогенная дифференцировка — ключевой процесс в формировании и регенерации костной ткани, строго контролируемый различными молекулярными механизмами. Одним из важнейших регуляторов этого процесса является сигнальный путь Notch, способный как подавлять, так и стимулировать остеогенез в зависимости от стадии дифференцировки. В данном обзоре рассматриваются основные этапы остеогенной дифференцировки, роль сигнального пути Notch в регуляции активности клеток костной ткани, а также потенциальные подходы в таргетной модуляции этого пути для терапии заболеваний, сопровождающихся нарушением костного ремоделирования и патологической кальцификацией.

Ключевые слова: остеогенная дифференцировка, сигнальный путь Notch, мезенхимные стволовые клетки, остеобласты, патологическая кальцификация

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда 23-15-00320.

Для цитирования: Переплетчикова Д.А., Смирнова Д.В., Азаркина К.Е., Семенихин В.А., Малашичева А.Б. Notch-сигнальный путь как механизм регуляции остеогенной дифференцировки. *Регенерация органов и тканей*. 2024;2(4):68–80. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-4-68-80>

Поступила 11.12.2024

Обработана 23.12.2024

Принята к публикации 24.12.2024

The Notch signaling pathway as a mechanism for regulation of osteogenic differentiation

Daria A. Pereplechikova¹, Daria V. Smirnova¹, Kseniia E. Azarkina¹,
Vyacheslav A. Semenikchin², Anna B. Malashicheva¹

¹ Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Russia, 194064, Saint Petersburg, Tikhoretsky Ave., 4

² Palmira Biopharma LLC, Russia, 119021, Moscow, Skolkovo Innovation Center, Bolshoy Blvd 42, str. 1, office 136

Correspondence address: pereplechikova@incras.ru

Abstract

Osteogenic differentiation is a key process in the formation and regeneration of bone tissue, tightly regulated by various molecular mechanisms. One of the major regulators of this process is the Notch signaling pathway, which can either inhibit or promote osteogenesis depending on the stage of differentiation. This review discusses the main stages of osteogenic differentiation, the role of the Notch signaling pathway in regulating the activity of bone-forming cells, and potential approaches to its targeted modulation for the treatment of diseases associated with impaired bone remodeling and pathological calcification.

Keywords: osteogenic differentiation, Notch signaling pathway, osteoblasts, mesenchymal stem cells, pathological calcification

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: this work was supported by a grant from the Russian Science Foundation 23-15-00320.

For citation: Pereplechikova D.A., Smirnova D.V., Azarkina K.E., Semenikchin V.A., Malashicheva A.B. The Notch signaling pathway as a mechanism for regulation of osteogenic differentiation. *Tissue and organ regeneration*. 2024;2(4):68–80. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-4-68-80>

Received 11.12.2024

Revised 23.12.2024

Accepted 24.12.2024

Список сокращений:

MCK — мезенхимные стволовые клетки

Col1A1 — коллаген I типа

SPP1 — остеопонтин

ALP — щелочная фосфатаза

NICD — внутриклеточный домен рецептора Notch

DAPT — N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester

нкРНК или ncRNA — некодирующие РНК

miRNA — микро-РНК

днРНК или lncRNA — длинные некодирующие РНК

мРНК — матричная РНК

Введение

Костная ткань — высокоорганизованная и метаболически активная система, не только обеспечивающая механическую поддержку организма и защиту внутренних органов, но и играющая важную роль в регуляции минерального обмена и гомеостаза. Поддержание функциональной целостности костной ткани возможно благодаря постоянным процессам ремоделирования и резорбции. Нарушения процессов ремоделирования лежат в основе множества заболеваний, включая остеопороз, остеопению, а также задержку в остеорегенерации при травмах.

Центральное место в формировании костной ткани занимает остеогенная дифференцировка — многоступенчатый процесс, в ходе которого мезенхимные стволовые клетки (МСК) или клетки — предшественники остеобластов последовательно претерпевают ряд морфологических и функциональных изменений и приобретают фенотип зрелых остеобластов [77]. Этот процесс строго регулируется на молекулярном уровне с участием множества сигнальных каскадов, транскрипционных факторов и внешних стимулов, таких как факторы роста, механические нагрузки и микроокружение. Результаты предыдущих исследований, проведенных как в нашей лаборатории, так и другими научными группами, продемонстрировали, что Notch-сигнальный путь является важным фактором, участвующим в регуляции остеогенной дифференцировки [29, 44, 47, 48, 50, 56, 66]. Его роль в биологии костной ткани оказалась более многогранной, чем предполагалось ранее: в зависимости от клеточного контекста и стадии дифференцировки активация Notch может оказывать как стимулирующее, так и ингибирующее воздействие на остеогенную дифференцировку.

Понимание молекулярных механизмов остеогенной дифференцировки и роли сигнального пути Notch в ней представляет собой не только фундаментальный научный интерес, но и практическую значимость для разработки новых подходов к терапии заболеваний костной ткани и созданию биоинженерных конструкций для тканевой регенерации. В настоящем обзоре изложены современные представления о механизмах остеогенной дифференцировки с акцентом на сигнальный путь Notch, а также рассмотрены перспективы его таргетной модуляции при терапии заболеваний, ассоциированных с кальцификацией.

Механизмы остеогенной дифференцировки

Процессы остеогенной дифференцировки строго регулируются каскадом молекулярно-клеточных событий и основаны на нескольких последовательных этапах.

На начальном этапе происходит коммитирование МСК в остеогенном направлении [18]. Ключевым регулятором на данном этапе является транскрипционный фактор Runx2, рассматриваемый как мастер-ген остеогенной дифференцировки [4, 5]. Его экспрессия критически необходима для инициации остеогенной программы, поскольку в отсутствие Runx2 МСК склонны к дифференцировке по адипогенному или хондрогенному направлениям [13, 19]. После коммитирования МСК наступает активная фаза пролиферации, за счет которой образуется пул клеток — предшественников остеобластов для последующей дифференцировки. На этом фоне наблюдается постепенное снижение экспрессии транскрипционного фактора Runx2, сопровождающееся повышением уровня экспрессии Osterix (Sp7) — второго по значимости регулятора остеогенной дифференцировки, необходимого для перехода клеток-предшественников в функционально активные остеобласты [3, 27]. Оба транскрипционных фактора — Runx2 и Osterix — считаются основными регуляторами остеогенеза, поскольку у мышей с гомозиготными мутациями в этих генах не происходит образование остеобластов и, как следствие, не формируется костная ткань [26, 42].

После повышения экспрессии Osterix иницируется экспрессия структурных белков внеклеточного матрикса — прежде всего коллагена I типа (Col1A1), остеопонтина (SPP1) и щелочной фосфатазы (ALP). Коллаген I типа представляет собой основной фибриллярный белок костной ткани и необходим для формирования прочного каркаса, служащего матрицей для отложения кристаллов гидроксиапатита [55]. Остеопонтин, в свою очередь, представляет собой гликопротеин, который благодаря своей высокой аффинности к ионам кальция регулирует процессы нуклеации и роста кристаллов гидроксиапатита и участвует в ремоделировании внеклеточного матрикса [17, 49]. Щелочная фосфатаза же участвует в гидролизе фосфатных эфиров, за счет чего повышается локальная концентрация неорганических фосфатов, что является необходимым условием для подготовки матрикса

к минерализации [62]. По мере продвижения остеогенной дифференцировки происходит созревание остеобластов. Активность щелочной фосфатазы достигает пика, начинается накопление кальция и фосфата во внеклеточном матриксе, способствующее минерализации. Повышается уровень экспрессии негликозилированных белков — остеокальцина и остеоонектина, которые регулируют отложение гидроксиапатита, связывая ионы кальция и контролируя рост кристаллов гидроксиапатита [34, 52, 78]. На этом этапе остеобласты достигают полного функционально-зрелого состояния.

После завершения этапа синтеза и минерализации внеклеточного матрикса наступает конечная фаза, на которой зрелые остеобласты либо претерпевают терминальную дифференцировку и становятся остеоцитами — клетками, встроенными в костный матрикс и играющими важную роль в поддержании гомеостаза костной ткани, либо становятся покоящимися клетками (клетками-накопителями), располагающимися на поверхности костной ткани, либо подвергаются апоптозу и завершают свой жизненный цикл [18].

Все этапы остеогенной дифференцировки строго контролируются множеством взаимосвязанных сигнальных каскадов. К числу ключевых молекулярных путей, участвующих в регуляции данного процесса, относятся Wnt, BMP, Hedgehog, TGF- β и Notch [54, 60, 65, 77]. Эти сигнальные системы функционируют в тесной координации и обеспечивают пространственно-временную регуляцию клеточной пролиферации и дифференцировки.

Сигнальный путь Notch

Сигнальный путь Notch — высококонсервативный сигнальный путь, который играет многогранную роль в регулировании широкого спектра жизненно важных функций [6, 59]. Notch координирует ключевые аспекты эмбриогенеза, участвует в определении клеточной судьбы, управляет процессами дифференцировки, пролиферации и клеточной гибели. Кроме того, Notch задействован в поддержании тканевого гомеостаза и активации регенеративных процессов в различных органах и системах [9, 51, 59].

В клетках позвоночных экспрессируются четыре рецептора Notch (Notch 1–4) и пять лигандов

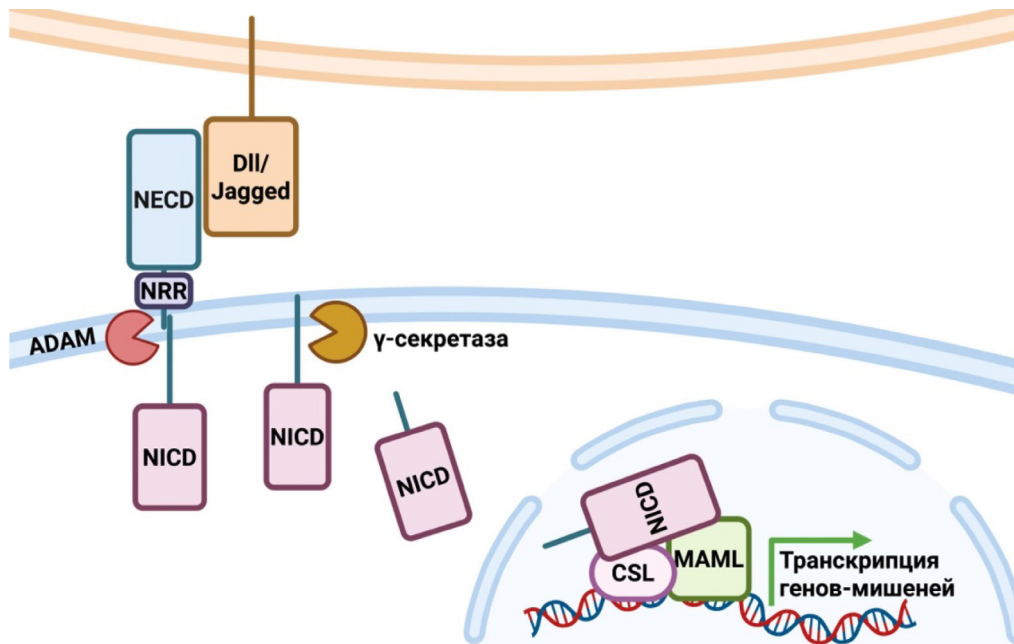


Рис. 1. Механизм активации сигнального пути Notch. Лиганды DII (Delta-like ligand) и Jagged связываются с внеклеточным доменом рецептора Notch (NECD — Notch extracellular domain), запускается протеолиз в области отрицательно регуляторного домена NRR (Negative Regulation Region) с участием ADAM-протеиназы (A Disintegrin and Metalloprotease), за которым следует расщепление рецептора γ -секретазой, высвобождающее внутриклеточный домен Notch (NICD — Notch intracellular domain). NICD перемещается в ядро, где вместе с коактиваторами CSL (CBF-1, Su(H), Lag-1) и MAML (Mastermind-like proteins) формирует транскрипционный комплекс, активирующий транскрипцию генов-мишеней. Создано в BioRender (<https://BioRender.com/io2tp42>)

(Dll1, 3, 4 и Jagged1, 2) [2, 59]. Рецептор Notch представляет собой трансмембранный белок, который имеет несколько высококонсервативных структурных доменов: NECD — внеклеточный домен, который отвечает за прямое связывание рецептора с лигандом, инициируя каскад внутриклеточных событий; NRR — регуляторный домен, который поддерживает рецептор в неактивном состоянии до тех пор, пока не произойдет соответствующего связывания лиганда с рецептором; и NICD — внутриклеточный домен, который при активации рецептора транслоцируется в ядро и выполняет роль транскрипционного регулятора, модулируя экспрессию генов — мишеней Notch [75] (рис. 1).

Сигнальный путь Notch активируется при взаимодействии лигандов Notch с рецепторами Notch на поверхности клетки [14]. Это инициирует регулируемый внутримембранный протеолиз, при котором рецептор Notch в области домена NRR расщепляется металлопротеиназой семейства ADAM. Это расщепление делает рецептор чувствительным к дальнейшему расщеплению γ -секретазным комплексом, высвобождающим внутриклеточную часть рецептора Notch (NICD). Затем NICD перемещается в ядро, образуя комплекс активации транскрипции с фактором транскрипции CSL (также известным как RBPJ) и коактиваторами семейства Mastermind (MAML1, 2 и 3). Этот комплекс дополнительно привлекает ряд других коактиваторов, что в совокупности приводит к активации транскрипции генов — мишеней пути Notch. К числу ключевых транскрипционных мишеней относятся представители семейства HES и HEY [59]. Белки HES и HEY, в свою очередь, регулируют экспрессию широкого спектра генов, участвующих в контроле клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза, тем самым опосредуют биологические эффекты сигнального пути Notch.

Точная и тонкая регуляция сигнального пути Notch имеет фундаментальное значение для обеспечения нормального развития и функционирования организма на протяжении всей жизни.

Сигнальный путь Notch и его роль в остеогенной дифференцировке

Notch сигнальный путь является многогранным регулятором дифференцировки клеток, способным оказывать различные, порой противоположные эффекты, в зависимости от клеточного контекста и микроокружения [48, 58]. И в насто-

ящее время становится понятно, что в контексте остеогенной дифференцировки Notch сигнальный путь имеет различные модели влияния в зависимости от типа клеток и стадии их дифференцировки [20, 48, 71] (рис. 2). Современные исследования указывают на то, что активация или инактивация Notch-сигнала может приводить как к остеосупрессивному, так и остеоиндуктивному эффекту [46, 47]. Эта двойственная роль обусловлена в том числе пространственно-временными особенностями регуляции сигнального пути в процессе остеогенной дифференцировки.

На ранних этапах остеогенной дифференцировки активация Notch играет преимущественно остеосупрессивную роль — способствует поддержанию пула пролиферирующих МСК и клеток-предшественников, ингибирует их переход по остеогенному направлению и тем самым временно подавляет начало остеогенной дифференцировки. Так, было показано, что активация сигнального пути Notch с помощью модифицированного лиганда Dll4 (E12) у взрослых мышей способствует расширению популяции мезенхимных стволовых клеток и снижает экспрессию транскрипционного фактора Runx2 [66]. А в исследовании Youngstrom и др. продемонстрировано, что Jag1 препятствует остеогенной дифференцировке клеток-предшественников [69]. При этом ингибирование компонента сигнального пути Notch — *NOTCH1* в МСК снижает пролиферацию и индуцирует остеогенную дифференцировку [16]. В другом независимом исследовании было показано, что ингибирование сигнального пути Notch в клетках — предшественниках остеобластов приводит к снижению их пролиферации, уменьшает васкуляризацию и значительно ухудшает процессы регенерации костной ткани [64].

Напротив, на среднем и позднем этапах остеогенной дифференцировки при активации Notch проявляются остеоиндуктивные свойства, что способствует запуску остеогенной программы: стимулируется остеогенная дифференцировка остеобластов, повышается их анаболическая функция и усиливается экспрессия остеомаркеров и компонентов внеклеточного матрикса, что по итогу приводит к минерализации костной ткани. Так, в исследовании Xu и др. было показано, что активация сигнального пути Notch способствует увеличению экспрессии остеогенных маркеров ALP, OCN и BSP в первичных

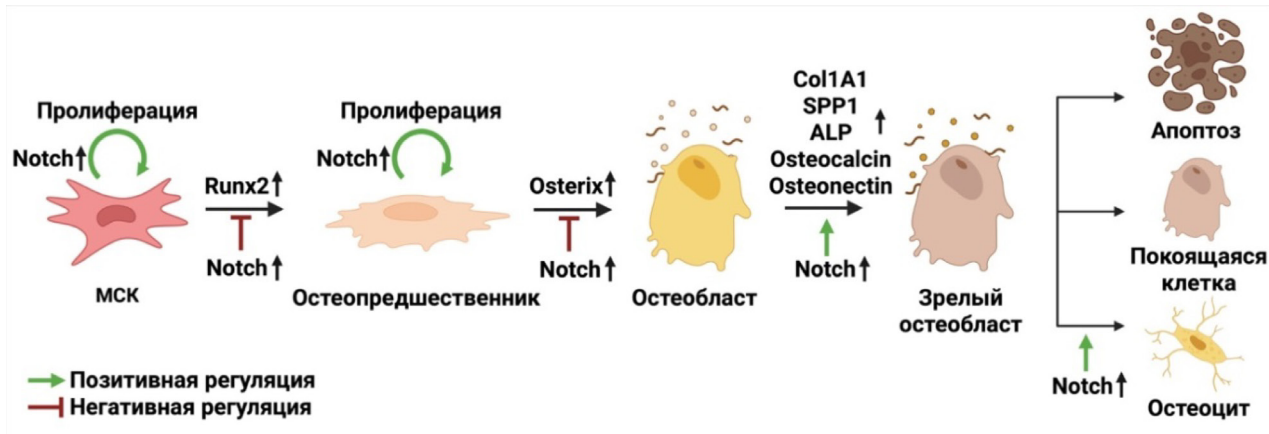


Рис. 2. Механизмы остеогенной дифференцировки и роль сигнального пути Notch в этом процессе. Остеогенная дифференцировка регулируется последовательной активацией транскрипционных факторов Runx2 и Osterix и сопровождается экспрессией белков внеклеточного матрикса. Сигнальный путь Notch модулирует эти процессы и на ранних стадиях поддерживает пролиферацию и ингибирует дифференцировку, а на поздних этапах способствует дифференцировке клеток и минерализации внеклеточного матрикса. Создано в BioRender (<https://BioRender.com/2d7gmkl>)

культурах остеобластов крыс [67]. В другой работе на первичных остеобластах человека было показано, что иммобилизованный Jagged1 способствует увеличению экспрессии остеогенных маркеров *ALPL*, *BGLAP* и *COL1A1* и значительно ускоряет минерализацию внеклеточного матрикса, что подтверждает роль Notch в стимулировании остеогенеза на поздних стадиях дифференцировки [22]. А в исследовании Liu и коллег показано, что у мышей при сверхэкспрессии внутриклеточного домена NICD в остеобластах наблюдается усиление минерализации внеклеточного матрикса [36].

Сигнальный путь Notch и его роль в патологической кальцификации

Патологическая кальцификация — аномальное отложение солей кальция в тканях организма, которые в норме не подвергаются физиологической минерализации. К ним относят сосудистые стенки, клапаны сердца, хрящи и др. Так, при определенных патологических состояниях — атеросклерозе, хронической почечной недостаточности, диабете, ревматоидном артрите — активируются те же сигнальные каскады, что и при нормальной остеогенной дифференцировке [11, 30, 33, 41]. В результате клетки сосудистой стенки, клапанов сердца или соединительной ткани начинают приобретать остеобластоподобный фенотип и инициировать минерализацию [11, 53]. Наиболее ярким примером этого процесса является остеогенная трансформация гладкомышечных клеток сосудов и интерстициальных клеток клапанов. При такой трансформации наблюдается повышение

экспрессии остеогенных маркеров (Runx2, ALP, BMP2); увеличение продукции компонентов внеклеточного матрикса, характерных для костной ткани, и повышение активности ферментов, участвующих в минерализации [30, 43].

Одним из ключевых молекулярных механизмов, участвующих в развитии патологической кальцификации, является сигнальный путь Notch. Он играет важную роль в модуляции фенотипа клеток сосудистой стенки и сердечных клапанов, а также в регуляции их остеогенной трансформации [1, 24, 63]. Известно, что наследственные гетерозиготные мутации в гене *NOTCH1* приводят к тяжелой форме кальцинированного аортального стеноза [12], а мутации в генах *NOTCH2* и *JAGGED1*, ассоциированные с синдромом Аллажиля, приводят не только к кальцификации сосудов, но и к выраженным скелетным аномалиям, что подчеркивает двойственную роль сигнального пути Notch в регуляции процессов остеогенной дифференцировки [23, 40]. Кроме того, установлено, что в двустворчатых аортальных клапанах (врожденной аномалии развития) возникает повышенное механическое напряжение, формируется атипичная гемодинамическая среда, на фоне которой нарушается регуляция сигнального каскада Notch1/NICD/Runx2, что, в свою очередь, способствует развитию сосудистой кальцификации [32].

Однако примечательно, что в ряде наших недавних исследований, направленных на изучение механизмов остеогенной дифференцировки, как нормальной, так и патологической, мы не обнаружили признаков активации компонентов сигнального

пути Notch в монокультурах клеток мезенхимного происхождения [37, 38, 57]. Это может свидетельствовать о том, что изолированное изучение клеток вне их естественного микроокружения значительно ограничивает проявление сигнальной активности Notch, особенно если не происходит взаимодействия с другими клеточными популяциями. Это гипотеза подтверждается другими нашими исследованиями, в которых было показано, что при прямом сокультивировании клеток мезенхимного происхождения и эндотелиальных клеток увеличивается экспрессия компонентов сигнального пути Notch и усиливается остеогенная дифференцировка [28, 29, 47].

Таким образом, сигнальный путь Notch следует рассматривать не только как автономный регулятор остеогенной дифференцировки, но и как важный медиатор межклеточной коммуникации, в частности между эндотелиальными клетками и клетками мезенхимного происхождения. Это особенно актуально при изучении сосудистой и клапанной кальцификации, где структурная организация ткани критически влияет на сигнальную активность.

Сигнальный путь Notch как потенциальная терапевтическая мишень для регуляции остеогенной дифференцировки

Сигнальный путь Notch является многообещающей мишенью при разработке лекарств для лечения заболеваний, ассоциированных с костной тканью [8]. В настоящее время изучают широкий спектр различных терапевтических и фармакологических подходов регуляции сигнального пути Notch. Исследуемые стратегии включают в себя: применение селективных ингибиторов и активаторов компонентов Notch-сигнального пути; модуляция сигнального пути Notch через различные некодирующие РНК; разработку терапевтических антител, специфичных к рецепторам или лигандам Notch и др. Важно отметить, что так же активно изучается регуляция сигнального пути Notch посредством влияния на эндотелий, поскольку известно, что эндотелиальные клетки являются неотъемлемой частью костного микроокружения и могут обеспечить дополнительные возможности для терапевтического вмешательства [44, 47, 48].

Ингибиторы Notch

Одними из наиболее широко используемых ингибиторов Notch-сигнального пути являются ингибиторы гамма-секретазного комплек-

са [15], ответственного за протеолитическое расщепление трансмембранного рецептора Notch и высвобождение его внутриклеточного домена NICD, который затем транслоцируется в ядро и активирует транскрипцию целевых генов. Одним из таких ингибиторов является DAPT (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester) — синтетическое соединение, которое эффективно подавляет активность гамма-секретазного комплекса. В исследовании Zhao и соавторов было продемонстрировано, что ингибирование пути Notch1-Dll4 при помощи ингибитора γ -секретазы DAPT подавляет остеогенную дифференцировку МСК человека и стимулирует их пролиферацию в сфероидах [74]. Однако следует отметить, что DAPT обладает токсичностью и может вызывать серьезные побочные эффекты. Так, в исследованиях на планариях показано, что использование DAPT приводит к нарушению баланса между клеточной пролиферацией и апоптозом, что существенно влияет на процессы регенерации тканей [10]. В рамках наших собственных исследований мы использовали другой селективный ингибитор γ -секретазы — кренигацестат, который в настоящее время проходит клинические испытания в качестве противоопухолевого средства. Полученные нами данные показали, что кренигацестат эффективно подавляет остеогенную дифференцировку интерстициальных клеток аортального клапана как в культурах *in vitro*, так и в моделях *ex vivo* [21, 39].

Активаторы Notch

Известно, что в растворимой форме рекомбинантные лиганды выступают преимущественно в качестве сигнальных антагонистов, связываясь с Notch-рецепторами и блокируя их активацию [25]. Однако рекомбинантные лиганды Notch обладают способностью активировать Notch-сигнализацию и действовать как агонисты, когда они находятся на поверхности клетки или прикреплены к планшету для культивирования либо другому биоматериалу. Так, было установлено, что рекомбинантный Jagged1, иммобилизованный на поверхности культурального пластика, стимулирует минерализацию внеклеточного матрикса и повышает уровень экспрессии остеогенных маркеров *COL1A1* и *ALPL* [45].

Подобные результаты были продемонстрированы в работе Youngstrom et al., где было показано, что интраоперационное введение крысам

рекомбинантного белка Jagged1, иммобилизованного на коллагеновых матрицах, положительно влияет на процессы остеогенеза и способствует регенерации костной ткани при дефектах апендикулярного и краниального скелета [70]. Более того, было установлено, что включение Jagged1 в состав биосовместимого гидрогеля не только индуцирует остеогенную дифференцировку клеток, но и значительно усиливает васкуляризацию, что в совокупности приводит к значительному улучшению регенерации костной ткани [72]. Это подчеркивает роль Notch-лигандов не только как остео- и ангиогенных факторов, но и как элементов, способных модулировать микроокружение и межклеточные взаимодействия при регенерации тканей. Кроме Jagged1, внимание исследователей привлекает и другой важный лиганд Notch сигнального пути — Dll4. В работе Xu и соавторов продемонстрировано, что введение высокоаффинного белка Dll4, способного избирательно связываться с костной тканью благодаря полиаспартатному мотиву, способствует регенерации костной ткани и не оказывает токсического действия на другие органы [66].

Некодирующие РНК и их взаимодействие с сигнальным путем Notch

Некодирующие РНК (нкРНК или ncRNA) — разнообразная группа молекул РНК, которые не кодируют белки, но играют важную роль в регуляции экспрессии генов. Среди нкРНК выделяют два основных класса: микроРНК (miRNA) и длинные некодирующие РНК (днРНК или lncRNA), каждый из которых использует различные механизмы регуляции [31]. На транскрипционном уровне днРНК регулирует экспрессию генов путем взаимодействия с промоторами, влияя на активность транскрипционных факторов, что может приводить к активации или подавлению транскрипции конкретных генов. На посттранскрипционном уровне днРНК и микроРНК могут контролировать экспрессию генов двумя основными способами: либо путем прямого связывания с матричной РНК (мРНК) и блокирования синтеза белка, либо путем направленного разрушения целевых мРНК.

Регуляция экспрессии генов влияет на различные клеточные процессы, и на сегодняшний день все больше внимания уделяется роли нкРНК в процессах остеогенной дифференцировки и регенерации костной ткани. Появляются различные исследования, которые демонстрируют, что нкРНК оказыва-

ют значительное влияние на ключевые сигнальные каскады, регулирующие остеогенез, такие как TGF- β /BMP, MAPK, Wnt/ β -катенин и Notch [31, 35, 76]. В исследовании Zhang и др. было показано, что при индукции остеогенной дифференцировки в клеточной линии преостеобластов мышей MC3T3-E1 уровень нкРНК lnc-Evf2 коррелирует с уровнем экспрессии остеогенных маркеров *ALP*, *BGLAP*, *RUNX2*, *BSP*, *SP7* и *COL1A1* [73].

Более того, интересно, что при добавлении шпилечной конструкции lnc-Evf2 наблюдалось резкое снижение экспрессии белков Notch2, Notch3 и Hes1, которые играют важную роль в регуляции дифференцировки клеток, в то время как уровень их мРНК оставался неизменным [73]. Это указывает на возможную роль lnc-Evf2 в посттранскрипционной регуляции сигнального пути Notch. В статье Chen и др. было установлено, что miRNA-34a контролирует пролиферацию MCK и подавляет их остеогенную дифференцировку путем взаимодействия с лигандом сигнального пути Notch — Jagged1 [7]. В другом исследовании на MCK из костного мозга *in vitro* и *in vivo* было показано, что при повышении экспрессии miRNA-34a наблюдается подавление экспрессии гена *NOTCH1*, что, в свою очередь, приводит к усилению остеогенной дифференцировки. Кроме того, на мышинной модели с кальцинированным стенозом аортального клапана показано, что ингибитор miRNA-34a препятствует кальцификации аортального клапана путем регуляции экспрессии *NOTCH1-RUNX2* [61]. В исследовании Yang было обнаружено, что miR-497~195 высоко экспрессируется в костных сосудах типа H, способствует активации Notch и инициирует остеогенную дифференцировку [68]. Примечательно, что в этом же исследовании было показано, что внутривенное введение аптамера miR-195 приводит к стимуляции экспрессии miR-195 в эндотелиальных клетках, что, в свою очередь, оказывает положительное влияние на процессы ангиогенеза и остеогенеза, способствуя образованию новых кровеносных сосудов и костной ткани [68].

Заключение

Таким образом, сигнальный путь Notch представляет собой сложный и динамически регулируемый механизм, играющий важную роль в процессе остеогенной дифференцировки, как нормальной, так и патологической.

Его влияние неоднозначно и определяется как стадией развития клеток, так и особенностями микроокружения, что обуславливает возможность как ингибирования, так и индукции остеогенной дифференцировки. Понимание пространственно-временных закономерностей активации Notch позволит определить

ключевые точки регуляции остеогенной дифференцировки, что делает сигнальный путь Notch привлекательной мишенью для разработки новых терапевтических стратегий в контексте регенеративной медицины, а также при лечении заболеваний костной ткани и сердечно-сосудистой системы.

Литература

1. Ali A, Yun S. Multifaceted Role of Notch Signaling in Vascular Health and Diseases. *Bio-medicines*. 2025;4(13):837.
2. Arias AM, Fiuza U-M. Cell and molecular biology of Notch. *J Endocrinol*. 2007;3(194):459–474.
3. Artigas N, et al. Mitogen-activated Protein Kinase(MAPK)-regulated Interactions between Osterix and Runx2 Are Critical for the Transcriptional Osteogenic Program. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;39(289):27105–27117.
4. Azarkina K, Gromova E, Malashicheva A. “A Friend Among Strangers” or the Ambiguous Roles of Runx2. *Biomolecules*. 2024;11(14):1392.
5. Bixel MG, et al. Angiogenesis is uncoupled from osteogenesis during calvarial bone regeneration. *Nature Communications*. 2024;1(15):4575.
6. Bray SJ, Bigas A. Modes of Notch signalling in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2025.
7. Chen L, et al. MicroRNA-34a Inhibits Osteoblast Differentiation and In Vivo Bone Formation of Human Stromal Stem Cells. *Stem Cells*. 2014;4(32):902–912.
8. Dilawar M, et al. Notch signaling pathway in osteogenesis, bone development, metabolism, and diseases. *The FASEB Journal*. 2025;4(39).
9. Dishowitz MI, et al. Notch signaling components are upregulated during both endochondral and intramembranous bone regeneration. *Journal of Orthopaedic Research*. 2012;2(30):296–303.
10. Dong Z, et al. Gamma-Secretase Inhibitor(DAPT), a potential therapeutic target drug, caused neurotoxicity in planarian regeneration by inhibiting Notch signaling pathway. *Science of The Total Environment*. 2021;(781):146735.
11. Driscoll K, Cruz AD, Butcher JT. Inflammatory and Biomechanical Drivers of Endothelial-Interstitial Interactions in Calcific Aortic Valve Disease. *Circulation Research*. 2021;9(128):1344–1370.
12. Garg V, et al. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature*. 2005;7056(437):270–274.
13. Giuliani N, et al. New Insights into Osteogenic and Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Their Potential Clinical Applications for Bone Regeneration in Pediatric Orthopaedics. *Stem Cells International*. 2013;(2013):1–11.
14. Gordon WR, Arnett KL, Blacklow SC. The molecular logic of Notch signaling — a structural and biochemical perspective. *Journal of Cell Science*. 2008;19(121):3109–3119.
15. Groth C, Fortini ME. Therapeutic approaches to modulating Notch signaling: Current challenges and future prospects. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2012;4(23):465–472.
16. He Y, Zou L. Notch-1 inhibition reduces proliferation and promotes osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2019.
17. Iline-Vul T, et al. Osteopontin regulates biomimetic calcium phosphate crystallization from disordered mineral layers covering apatite crystallites. *Scientific Reports*. 2020;1(10):15722.

18. Infante A, Rodríguez CI. Osteogenesis and aging: lessons from mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2018;1(9):244.
19. James AW. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica*. 2013;(2013):1–17.
20. Ji Y, Ke Y, Gao S. Intermittent activation of notch signaling promotes bone formation. *American journal of translational research*. 2017;6(9):2933–2944.
21. Kachanova OS, et al. Ex vivo model of pathological calcification of human aortic valve. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2024;(11).
22. Kamalakara A, et al. Delivery of a Jagged1-PEG-MAL hydrogel with pediatric human bone cells regenerates critically sized craniofacial bone defects. *eLife*. 2024;(13).
23. Kamath BM, et al. NOTCH2 mutations in Alagille syndrome. *Journal of Medical Genetics*. 2012;2(49):138–144.
24. Kang J-H, et al. Vascular calcification and cellular signaling pathways as potential therapeutic targets. *Life Sciences*. 2024;(336):122309.
25. Klose R, et al. Soluble Notch ligand and receptor peptides act antagonistically during angiogenesis. *Cardiovascular Research*. 2015;1(107):153–163.
26. Komori T, et al. Targeted Disruption of Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturational Arrest of Osteoblasts. *Cell*. 1997;5(89):755–764.
27. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2006;5(99):1233–1239.
28. Kostina A, et al. Different Notch signaling in cells from calcified bicuspid and tricuspid aortic valves. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2018;(114):211–219.
29. Kostina A, et al. Human aortic endothelial cells have osteogenic Notch-dependent properties in co-culture with aortic smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2019;2(514):462–468.
30. Kraler S, et al. Calcific aortic valve disease: from molecular and cellular mechanisms to medical therapy. *European Heart Journal*. 2022;7(43):683–697.
31. Lanzillotti C, et al. Long Non-coding RNAs and MicroRNAs Interplay in Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;(9).
32. Li G, et al. Abnormal mechanical stress on bicuspid aortic valve induces valvular calcification and inhibits Notch1/NICD/Runx2 signal. *PeerJ*. 2023;(11):e14950.
33. Liang X, et al. Key regulators of vascular calcification in chronic kidney disease: Hyperphosphatemia, BMP2, and RUNX2. *PeerJ*. 2024;(12):e18063.
34. Lin X, et al. The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration. *Frontiers in Pharmacology*. 2020;(11).
35. Liu J, et al. The management of bone defect using long non-coding RNA as a potential biomarker for regulating the osteogenic differentiation process. *Molecular Biology Reports*. 2022;3(49):2443–2453.
36. Liu P, et al. Anabolic actions of Notch on mature bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;15(113).
37. Lobov A, et al. Mesenchymal Cells Retain the Specificity of Embryonal Origin During Osteogenic Differentiation. *Stem Cells*. 2024;1(42):76–89.
38. Lobov A, et al. Similar, but not the same: multiomics comparison of human valve interstitial cells and osteoblast osteogenic differentiation expanded with an estimation of data-dependent and data-independent PASEF proteomics. *GigaScience*. 2025;(14).
39. Lobov AA, et al. Crenigacestat(LY3039478) inhibits osteogenic differentiation of human valve interstitial cells from patients with aortic valve calcification in vitro. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2022;(9).
40. McDaniel R, et al. NOTCH2 Mutations Cause Alagille Syndrome, a Heterogeneous Disorder of the Notch Signaling Pathway. *The American Journal of Human Genetics*. 2006;1(79):169–173.
41. Menon V, Lincoln J. The Genetic Regulation of Aortic Valve Development and Calcific Disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2018;(5).

42. Nakashima K, et al. The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell*. 2002;1(108):17–29.
43. Niu Z, et al. Vascular Calcification: New Insights Into BMP Type I Receptor A. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;(13).
44. Novak S, et al. Endothelial to mesenchymal Notch signaling regulates skeletal repair. *JCI insight*. 2024;12(9).
45. Osathanon T, et al. Jagged1 promotes mineralization in human bone-derived cells. *Archives of Oral Biology*. 2019;(99):134–140.
46. Pakvasa M, et al. Notch signaling: Its essential roles in bone and craniofacial development. *Genes & Diseases*. 2021;1(8):8–24.
47. Perepletchikova D, et al. Endothelial-mesenchymal crosstalk drives osteogenic differentiation of human osteoblasts through Notch signaling. *Cell Communication and Signaling*. 2025;1(23):100.
48. Perepletchikova D, Malashicheva A. Communication between endothelial cells and osteoblasts in regulation of bone homeostasis: Notch players. *Stem Cell Research & Therapy*. 2025;1(16):56.
49. Qu Y, et al. The crucial role of SPP1 in osteoporosis, osteoarthritis, and cancer. *Pharmaceutical Science Advances*. 2025;(3):100074.
50. Ramasamy SK, et al. Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone. *Nature*. 2014;7492(507):376–380.
51. Remark LH, et al. Loss of Notch signaling in skeletal stem cells enhances bone formation with aging. *Bone Research*. 2023;1(11):50.
52. Rosset EM, Bradshaw AD. SPARC/osteonectin in mineralized tissue. *Matrix Biology*. 2016. (52–54):78–87.
53. Rutkovskiy A, et al. Valve Interstitial Cells: The Key to Understanding the Pathophysiology of Heart Valve Calcification. *Journal of the American Heart Association*. 2017;9(6).
54. Salhotra A, et al. Mechanisms of bone development and repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020;11(21):696–711.
55. Selvaraj V, et al. Type 1 collagen: Synthesis, structure and key functions in bone mineralization. *Differentiation*. 2024;(136):100757.
56. Semenova D, et al. Dose-dependent mechanism of Notch action in promoting osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell and Tissue Research*. 2020;1(379):169–179.
57. Semenova D, et al. Multi-omics of in vitro aortic valve calcification. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2022;(9).
58. Singh M, et al. Molecular Signaling Pathways and MicroRNAs in Bone Remodeling: A Narrative Review. *Diseases*. 2024;10(12):252.
59. Sprinzak D, Blacklow S. Biophysics of Notch Signaling. *Annual Review of Biophysics*. 2021; 1(50):157–189.
60. Thomas S, Jaganathan BG. Signaling network regulating osteogenesis in mesenchymal stem cells. *Journal of Cell Communication and Signaling*. 2022;1(16):47–61.
61. Toshima T, et al. Therapeutic inhibition of microRNA-34a ameliorates aortic valve calcification via modulation of Notch1-Runx2 signalling. *Cardiovascular Research*. 2019.
62. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*. 2020;(754):144855.
63. Wang Y, et al. NOTCH Signaling in Aortic Valve Development and Calcific Aortic Valve Disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2021;(8).
64. Wilson HM, et al. Notch signaling in osteoblast progenitor cells is required for BMP-induced bone formation. *Bone*. 2025;(194):117425.
65. Wu Z, et al. Regulation of bone homeostasis: signaling pathways and therapeutic targets. *MedComm*. 2024;8(5).
66. Xu C, et al. Induction of osteogenesis by bone-targeted Notch activation. *eLife*. 2022;(11).
67. Xu Y, et al. Notch activation promotes osteoblast mineralization by inhibition of apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*. 2018;10(233):6921–6928.

68. Yang M, et al. MiR-497-195 cluster regulates angiogenesis during coupling with osteogenesis by maintaining endothelial Notch and HIF-1 α activity. *Nature Communications*. 2017;1(8):16003.
69. Youngstrom DW, et al. Jagged1 expression by osteoblast-lineage cells regulates trabecular bone mass and periosteal expansion in mice. *Bone*. 2016;(91):64–74.
70. Youngstrom DW, et al. Intraoperative delivery of the Notch ligand Jagged-1 regenerates appendicular and craniofacial bone defects. *npj Regenerative Medicine*. 2017;1(2):32.
71. Youngstrom DW, Hankenson KD. Contextual Regulation of Skeletal Physiology by Notch Signaling. *Current Osteoporosis Reports*. 2019;4(17):217–225.
72. Zhang S, et al. Notch Signaling Hydrogels Enable Rapid Vascularization and Promote Dental Pulp Tissue Regeneration. *Advanced Science*. 2024.
73. Zhang Z, et al. Preosteoblast-enriched Inc-Evf2 facilitates osteogenic differentiation by targeting Notch. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2021;2(53):179–188.
74. Zhao Y, et al. Probing Notch1-Dll4 signaling in regulating osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells using single cell nanobiosensor. *Scientific Reports*. 2022;1(12):10315.
75. Zhou B, et al. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2022;1(7):95.
76. Zhou Z, Hossain MS, Liu D. Involvement of the long noncoding RNA H19 in osteogenic differentiation and bone regeneration. *Stem Cell Research & Therapy*. 2021;1(12):74.
77. Zhu S, et al. Cell signaling and transcriptional regulation of osteoblast lineage commitment, differentiation, bone formation, and homeostasis. *Cell Discovery*. 2024;1(10):71.
78. Zoch ML, Clemens TL, Riddle R. New insights into the biology of osteocalcin. *Bone*. 2016;(82):42–49.

Об авторах

Переpletчикова Дарья Александровна — м.н.с. Лаборатории регенеративной биомедицины Института цитологии РАН

Смирнова Дарья Владимировна — м.н.с. Лаборатории регенеративной биомедицины Института цитологии РАН

Азаркина Ксения Евгеньевна — ст. лаб.-исслед. Лаборатории регенеративной биомедицины Института цитологии РАН

Семенихин Вячеслав Алексеевич — гендиректор ООО «Пальмира Биофарма»

Малашичева Анна Борисовна — д.б.н., г.н.с., зав. Лаборатории регенеративной биомедицины Института цитологии РАН

Authors

Perepletchikova Daria Aleksandrovna — Junior Researcher, Laboratory of Regenerative Biomedicine, Institute of Cytology of the Russian Academy of Science

Smirnova Daria Vladimirovna — Junior Researcher, Laboratory of Regenerative Biomedicine, Institute of Cytology of the Russian Academy of Science

Azarkina Kseniia Evgenievna — Laboratory Assistant, Laboratory of Regenerative Biomedicine, Institute of Cytology of the Russian Academy of Science

Semenikhin Viacheslav Alexeyevich — CEO & Founder of Palmira Biopharma LLC

Malashicheva Anna Borisovna — Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher, Head of the Laboratory of Regenerative Biomedicine, Institute of Cytology of the Russian Academy of Science

Переpletчикова Д.А. и соавт.

Notch-сигнальный путь как механизм регуляции остеогенной дифференцировки

Вклад авторов

Д.А. Переpletчикова — анализ литературы, написание текста.

Д.В. Смирнова — анализ литературы.

К.Е. Азаркина — анализ литературы.

В.А. Семенихин — редактирование статьи.

А.Б. Малашичева — редактирование статьи.

Author contribution statement:

Daria A. Perepletchikova — collecting and analyzing literary sources, writing of the article.

Daria V. Smirnova — collecting and analyzing literary sources.

Kseniia E. Azarkina — collecting and analyzing literary sources.

Vyacheslav A. Semenikhin — editing of the article.

Anna. B. Malashicheva — editing of the article.