

СТИМУЛЯЦИЯ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ОСТЕОБЛАСТИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ОСТЕОГЕННЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ КАК ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ РЕСВЕРАТРОЛА ПРИ ГИПОЭСТРОГЕНИЯ-ИНДУЦИРОВАННОМ ОСТЕОПОРОЗЕ: СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПРОЯВЛЕНИЯ И ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ

© Должиков А.А., Шевченко О.А.

Белгородский государственный национальный исследовательский университет (НИУ «БелГУ») Россия, 308015, Белгородская область, г. Белгород, ул. Победы, д. 85

Цель – исследование изменений микроструктуры и минеральной плотности проксимальных частей бедренной (головка, шейка) и большеберцовой костей при экспериментальном постменопаузальном остеопорозе и его терапии ресвератролом и анализ их возможных механизмов.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 15 самках крыс Вистар. Модель постменопаузального остеопороза создавали двусторонней овариэктомией со сроком наблюдения 56 суток. Терапию ресвератролом в экспериментальной группе проводили его ежедневным внутривнутрибрюшинным введением в дозе 2 мг/кг на протяжении такого же срока наблюдения. Проведены гистологическое исследование с компьютерным анализом изображений и морфометрией, абсорбционная рентгеновская денситометрия проксимального эпифиза бедренной и проксимальной половины большеберцовой костей.

Результаты. Двусторонняя овариэктомия у экспериментальных животных – крыс Вистар, приводит через 8 недель к комплексу структурных изменений проксимальных частей бедренной и большеберцовой костей и снижению в них минеральной плотности костной ткани, которые могут быть экстраполированы на остеопоротическое поражение скелета у человека. Ресвератрол в дозе 2 мг/кг обладает остеопротективным и регенераторным эффектами при экспериментальном постменопаузальном остеопорозе.

Заключение. Ресвератрол в дозе 2 мг/кг обладает цитопротективным для остеоцитов и остеогенных клеток эффектом, проявляет пролиферативное и коммитирующее в остеобластическом направлении действие на костномозговые стромальные предшественники, ингибируя адипоцитарный путь дифференцировки и обеспечивая этим антиостеопоротический эффект при гипоэстрогении. На основе сопоставлений с данными литературы ключевым фактором, реализующим эффекты ресвератрола, вероятнее, является белок sirt1.

Ключевые слова: постменопаузальный остеопороз, ресвератрол, остеопротекция и регенерации костной ткани.

Должиков Александр Анатольевич – д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры анатомии и гистологии человека, НИУ «БелГУ», г. Белгород. ORCID iD: 0000-0001-7425-8416. E-mail: dolzhikov@bsu.edu.ru (автор, ответственный за переписку)

Шевченко Ольга Александровна – ассистент кафедры микробиологии и вирусологии с курсом клинической иммунологии, НИУ «БелГУ», г. Белгород. ORCID iD: 0000-0003-4881-6378. E-mail: olya_dolzhikova@mail.ru

Остеопороз (ОП) является одним из основных метаболических возраст-ассоциированных заболеваний скелета и представляет во всем мире серьезную проблему вследствие увеличения его распространенности и частоты инвалидизирующих осложнений: низкоэнергетических переломов длинных трубчатых костей, компрессионных переломов тел позвонков. Еще с конца прошлого века по оценкам ВОЗ значимость ОП среди неинфекционных заболеваний находилась на четвертом месте после заболеваний сердечно-сосудистой системы, онкологической патологии и сахарного диабета, и поэтому он получил характеристику как «тихая эпидемия».

В России ОП имеют 33,8% женщин и 26,9% мужчин старше 50 лет. По последним данным [1] в связи с существенным постарением населения к 2035 г. прогнозируется значительное увеличение частоты переломов бедренной кости (по расчетной вероятности каждые 3 минуты будет происходить данный перелом). К 2050 году в России ожидается увеличение числа

больных ОП на 1/3. В современных клинических рекомендациях [2], опирающихся на исследования с начала века, приведены показатели тенденции эпидемиологических характеристик заболевания, свидетельствующие о серьезности проблемы. Частота переломов шейки бедренной кости по данным эпидемиологического исследования, проведенного в 16 городах России в 1992-1997 гг., составила 100,9 на 100000 населения. При этом достоверно чаще они зафиксированы у женщин (1155/100000) по сравнению с мужчинами (77,0/100000). В аналогичном исследовании в четырех городах России через 11 лет (2008-2019 гг.) выявлено, что частота переломов проксимального отдела бедренной кости составляет уже 239 случаев на 100000 населения (276 и 175 случаев у женщин и мужчин, соответственно). В структуре не связанного с другой патологией первичного остеопороза преобладают естественно взаимосвязанные постменопаузальный и сенильный [3], что делает проблему особо актуальной для женского населения. Как

стандартные средства терапии, приоритет среди которых принадлежит бифосфонатам [4], так и новейшие методы терапии антителами против конкретных молекулярных мишеней не лишены серьезных осложнений со стороны скелета и висцеральных систем. К тому же иммунотерапевтические средства дорогостоящие и не могут полностью удовлетворить увеличивающийся контингент пациентов со сниженной минеральной плотностью костей. Поэтому по мере расшифровки клеточных и молекулярных механизмов заболевания продолжается разработка фармакотерапевтических средств, направленных на их коррекцию [5, 6]. Важно, что достижения в понимании механизмов заболевания и разработка препаратов, способных воздействовать на них, – это только одна сторона проблемы профилактики и лечения ОП. Другой стороной проблемы является восприятие пациентами длительной терапии синтетическими препаратами, неизбежно имеющими те или иные побочные эффекты. Это отражено в крупных зарубежных руководствах по метаболической патологии костей [7] с акцентом на нередкое игнорирование пациентами того, что перерыв в лечении, а тем более отказ от него, чреватые еще более серьезными последствиями. Причинами прерывания лечения указывается следующее: во-первых, ошибочное мнение, что остеопороз – это нормальная часть старения, а не поддающееся лечению заболевание, и что остеопороз поражает только женщин; во-вторых, тестирование минеральной плотности костей не является общедоступным в силу его высокой стоимости и относительной доступности оборудования для широких слоев населения. Страх перед лекарствами от остеопороза был оценен в исследовании NOF (National osteoporosis foundation) в США, в нем приняли участие 853 (3%) респондента из примерно 28000 пациентов-участников онлайн-сообщества, 38% респондентов не принимали назначенные препараты, и 79% из них заявили, что причиной отказа явился страх перед побочными эффектами. 43% считают, что риск побочных эффектов при лечении остеопороза был больше, чем польза. Поэтому закономерно предположение о возможном нивелировании данного фактора применением препаратов, содержащих фармакологически активное начало из естественных источников (привычных ингредиентов пищи или добавок). Из данной категории препаратов с широким спектром фармакологического действия до настоящего времени внимание уделяется растительным полифенолам, прежде всего ресвератролу, в свое время ставшему главным в объяснении так называемого «французского парадокса» [8]. Имеются данные и о его остеопротективном эффекте, но преимущественно с методическим

и аналитическим акцентами на эндотелий-зависимые механизмы [9]. Но эндотелий внутрикостных сосудов вряд ли является исключительной мишенью препарата. Как минимум, необходимо учитывать доказанную роль в патогенезе ОП механизмов оксидативного стресса [6, 10], иммунологические механизмы, в силу зависимости остеокластогенеза от баланса про- и противовоспалительных цитокинов, и другие. Еще одной актуальной стороной проблемы, на которую в последние годы вновь обращено внимание, является патогенетическая близость ОП к заболеваниям, входящим в комплекс метаболического синдрома [11, 12]. В начале прошедшего десятилетия зарубежными исследователями эти вопросы обсуждались на специальных научных форумах под общим заголовком: «Питание и здоровое старение». Выделено состояние, обозначенное как эктопическое ожирение [13] – избыточное накопление жиров вне клеток подкожной жировой клетчатки: в гепатоцитах, кардиомиоцитах, скелетных мышцах, с указанием, что это является самым ранним признаком развития сахарного диабета второго типа. Позже патогенетическая близость атеросклероза и остеопороза была обозначена в литературе как основа поиска средств двойной терапии [14]. В клинических обобщающих работах разных периодов убедительно показана связь ожирения и остеопороза [15-17], обусловленная не только сугубо анатомо-биомеханическими, но и более сложными молекулярно-клеточными механизмами. Из всего указанного следует актуальность изучения клеточных событий на территории остеогенных компартментов, которые отражают состояние костного ремоделирования при остеопорозе и его фармакотерапии.

Цель исследования – провести структурно-функциональную оценку клеточных и тканевых костных изменений при экспериментальном эстроген-депривационном остеопорозе, их терапии ресвератролом и представить возможные механизмы фармакологических эффектов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на 15 белых крысах-самках Wistar массой 280-300 г, соответствующей биологическому возрасту 6 месяцев – возрасту скелетной зрелости, который рекомендуется для начала подобных экспериментов с моделированием постменопаузального остеопороза [18]. В качестве объектов исследования выбраны проксимальный эпифиз бедренной кости (головка и шейка) и проксимальная половина большеберцовой кости. Животные были рандомизированы на 3 равные группы.

1. Ложнооперированные, у которых выполняли лапаротомию без каких-либо последующих воздействий.

2. Контрольная с моделированием постменопаузального остеопороза двусторонней овариоэктомией.

3. Экспериментальная с моделью ОП и ежедневным внутрибрюшинным введением ресвератрола на физрастворе в дозе 2 мг/кг.

Хирургические вмешательства выполнены под общей анестезией внутрибрюшинным введением золетила и медитина. По завершении эксперимента на 57-й день перед выведением животных из него на мультифункциональной лабораторной рентгеновской установке IN-VIVO MS FX PRO (Bruker; США) с системой молекулярной визуализации при помощи программного обеспечения – Bone Density Software выполняли денситометрию изучаемых частей скелета с оценкой минеральной плотности кости (г/см³) по показателю BCD (Bone Column Density), характеризующему степень ослабления рентгеновского излучения на единицу глубины материала. После этого животных выводили из эксперимента цервикальной дислокацией под хлоралгидратным наркозом. Для гистологического исследования забирали проксимальные половины бедренных костей и большеберцовые кости от мыщелков до середины диафиза. Для контроля достижения гипоэстрогении гистологически исследовали матки в месте соединения их рогов. Весь материал фиксировали в 10% забуференном формалине «HistoSafe». Костные фрагменты декальцинировали в жидкости «Surgipath Decalcifier II» (Leica, Германия), автоматическим способом заливали в парафин с последующим изготовлением и окраской гистологических срезов толщиной 7 мкм гематоксилином и эозином и по Маллори. Гистологическое исследование с морфометрией проведено двумя способами – обычной световой микроскопией под микроскопом «Ломо» с видеокamerой «DV1000» и программным обеспечением для морфометрии («McrAView 7.3.1.7», ЛОМО-микросистемы, Россия). Кроме этого, создавали цифровые аналоги препаратов с помощью системы сканирования и архивирования изображений Hamamatsu, аналитическим модулем NDP.View 2, с помощью которого проводили измерение линейных параметров костных структур, изготавливали иллюстрации. Удельные площади костных структур и костномозговых пространств оценивали методом точечного счета по Г.Г. Автандилову.

Статистическую обработку данных проводили средствами электронных таблиц MS Excel 2003 и STAISTICA 10.0. Так как распределение данных было нормальным (по критерию Шапиро-Уилка) и дисперсии изучаемых признаков

не отличались, оценку достоверности отличий проводили по t-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При гистологическом исследовании (рис. 1а) у овариоэктомированных животных через 56 суток выявлены изменения эндометрия, характеризующие его атрофический постменопаузальный тип и этим указывающие на наличие системной гипоэстрогении и адекватность воспроизведения модели. В обеих изученных частях скелета выявлены все изменения костных структур, соответствующие патоморфологическим критериям остеопороза: разрежение балочной структуры губчатого вещества, увеличение доли костномозговых пространств (в среднем до 30,5±0,1% после овариоэктомии против 25,0±0,3% в первой группе; $p < 0,05$), очаги пластинчатой дезорганизации межклеточного вещества и наиболее патогномичный признак – микропереломы костных балок. Важными являются изменения остеоцитов, которые можно расценить как апоптотические, а также микрососудистые нарушения. Остеодеструктивные изменения были связаны с активизацией остеокластогенеза и повышением активности остеокластов. В составе костномозговых пространств произошло жировое замещение их стромально-гемопоэтического компонентов, достигавшее субтотальной степени. С учетом гипертрофии адипоцитов (средний диаметр в диафизе большеберцовой кости 39,0±0,2 мкм при остеопорозе против 14,0±0,2 мкм в первой группе; $p < 0,05$) оно является смешанным. В головке бедренной кости у ложнооперированных животных адипоциты немногочисленные, но крупные, после овариоэктомии визуально выявлено преимущественно увеличение их численности.

Количественным структурным подтверждением формирования у овариоэктомированных животных костных изменений, экстраполируемых на патологию у человека, явились результаты морфометрии трабекул. Их средняя толщина достоверно уменьшилась в обеих костях. В головке бедренной кости она составила 44,1±1,3 мкм у овариоэктомированных животных против 57,4±1,9 мкм в первой группе ($p < 0,05$). В проксимальной части диафиза большеберцовой кости соответственно 56,7±3,4 мкм против 67,4±3,4 мкм ($p < 0,05$). Результаты денситометрии подкрепляют полученные морфологические данные. У овариоэктомированных животных величина BCD в проксимальном эпифизе бедренной кости достоверно ($p < 0,05$) снизилась (2,58±0,2 г/см³) в сравнении с ложнооперированными (2,80±0,01 г/см³) В проксимальной

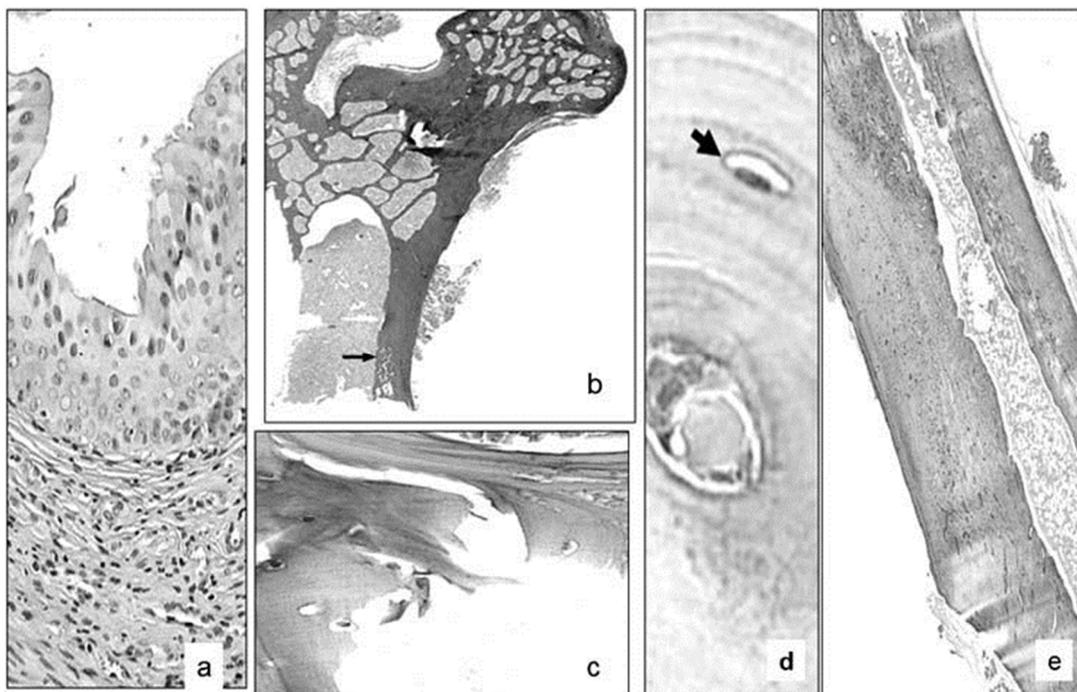


Рис. 1. Морфологические изменения стенки матки (а), в проксимальном эпифизе бедренной кости (b-d) и диафизе большеберцовой (е) через 56 суток после двусторонней овариоэктомии: а – картина атрофического эндометрия в виде фиброза собственной пластинки, атрофии желез, плоскоклеточной метаплазии покровного эпителия; b – разрежение балочной структуры в головке и метафизе кости, расширение костномозговых пространств; с – расщепление пластин эндостальной поверхности кортикальной кости и микроперелом, d – апоптоз остеócита, ниже посткапиллярная венула с гиалиновым тромбом, е – субтотальное жировое замещение костномозгового пространства. Окр. по Маллори (b), гематоксилином и эозином (а, с-d). Сканированные препараты.

Fig. 1. Morphological changes in the uterine wall (a), in the proximal epiphysis of the femur (b-d) and the diaphysis of the tibia (e) 56 days after bilateral ovariectomy: a – picture of atrophic endometrium in the form of fibrosis of its own plate, glandular atrophy, squamous metaplasia of the integumentary epithelium; b – rarefaction of the girder structure in the head bone metaphysis, expansion of bone marrow spaces; c – cleavage of plates of the endosteal surface of the cortical bone and microfracture, d – osteocyte apoptosis, postcapillary venule with hyaline thrombus below, e – subtotal fatty replacement of the bone marrow space. Staining with hematoxylin and eosin (a, c-d), according to Mallory (b). Scanned specimens.

части большеберцовой кости она снизилась с $2,78 \pm 0,03$ г/см³ до $2,08 \pm 0,03$ г/см³, соответственно.

У животных с моделью остеопороза и терапией ресвератролом морфологически и функционально выявлены значимые проявления остеопротекторного и остеорепаративного действия препарата. Прежде всего, необходимо указать на коррекцию минеральной плотности костей, так как она интегративно отражает фармакотерапевтический эффект. Показатель BCD в диафизе большеберцовой кости увеличился до $2,43 \pm 0,16$ г/см³, достоверно ($p < 0,05$) превысив его у овариоэктомированных ($2,08 \pm 0,06$ г/см³) животных и значимо приблизившись к значению у ложнопериовариоэктомированных ($2,78 \pm 0,03$ г/см³). В шейке бедренной кости этот показатель оказался еще демонстративнее – не только достоверно больше у леченых животных ($3,23 \pm 0,12$ г/см³) в сравнении с овариоэктомированными, но даже превысившим его у ложнопериовариоэктомированных ($3,1 \pm 0,02$ г/см³), хотя и без статистической значимости.

Среди морфологических изменений (рис. 2) в первую очередь необходимо отметить обнаружение значимой пролиферативной активности клеток, которые светомикроскопически с большой вероятностью можно идентифицировать как остеобластические. На эндостальных поверхностях костных балок выявлена концентрация уплощенных клеток типа костывыстилающих с наличием в этих пластах митотической активности. Митозы легко обнаруживались и в костномозговых пространствах на небольших расстояниях от костных структур. Тканевым проявлением остеорепарации явилось появление на предсуществующих эндостальных костных поверхностях новообразованных костных пластин с концентрической ориентацией и оформленными цементирующими линиями. Во-вторых, значимо изменился клеточный состав костномозговых пространств, в которых преобладал гемопоэтический компонент, а жировой уменьшен в сравнении с таковым у овариоэктомированных животных как по количеству адипоцитов, так и их объему.

Результаты проведенного *in vivo* исследования позволяют обсуждать эффекты ресвератрола в аспекте его цитопротективного и дифференцирующего действия на остеогенные клетки, начиная с их предшественников. Явление программирования/перепрограммирования костномозговых стромальных мезенхимальных клеток (кМСК) как механизм фармакотерапевтического эффекта ресвератрола впервые обнаружено Bäckesjö Carl-Magnus et al. [19] в *in vitro* экспериментах. Однако имелись и более ранние исследования на культурах остеобластических клеток, показавшие пролиферативный и дифференцировочный эффекты ресвератрола [20]. Одним из первых в молекулярных механизмах действия на остеогенез полифенолов рассматривались их фитоэстрогенные свойства [21, 22]. В последующем это направление получило развитие в связи с обнаружением и изучением факторов адипогенеза, прежде всего в аспектах коморбидной патологии (атеросклероз, сахарный диабет, ожирение) и биологии старения, связь остеопороза с которыми несомненна. Вы-

явлен и ряд молекулярных факторов – кандидатов в регуляторы внутриклеточных цепочек, достигающих транскрипционного уровня и управляющих метаболизмом, клеточной пролиферацией, дифференцировкой, а в конечном итоге и продолжительностью жизни клеток. Накопившиеся клинические данные указывают на несомненное влияние жирового компонента организма на состояние скелета [16]. Значимые биологические аспекты проблемы следующие: известно, что кМСК являются общими предшественниками и для адипоцитов, и для остеобластов. Еще в начале века идентифицирован ведущий фактор адипогенеза – пролифератор пероксисом PPAR γ , который через ядерные рецепторы способствует дифференцировке кМСК в адипоциты, а не в остеобласты. Его роль доказана в исследованиях Akune T. et al. [23] на гетерозиготных мышах с дефицитом PPAR γ , у которых обнаружена высокая костная масса с усиленным остеобластогенезом, но нормальными функциями остеобластов и остеокластов.

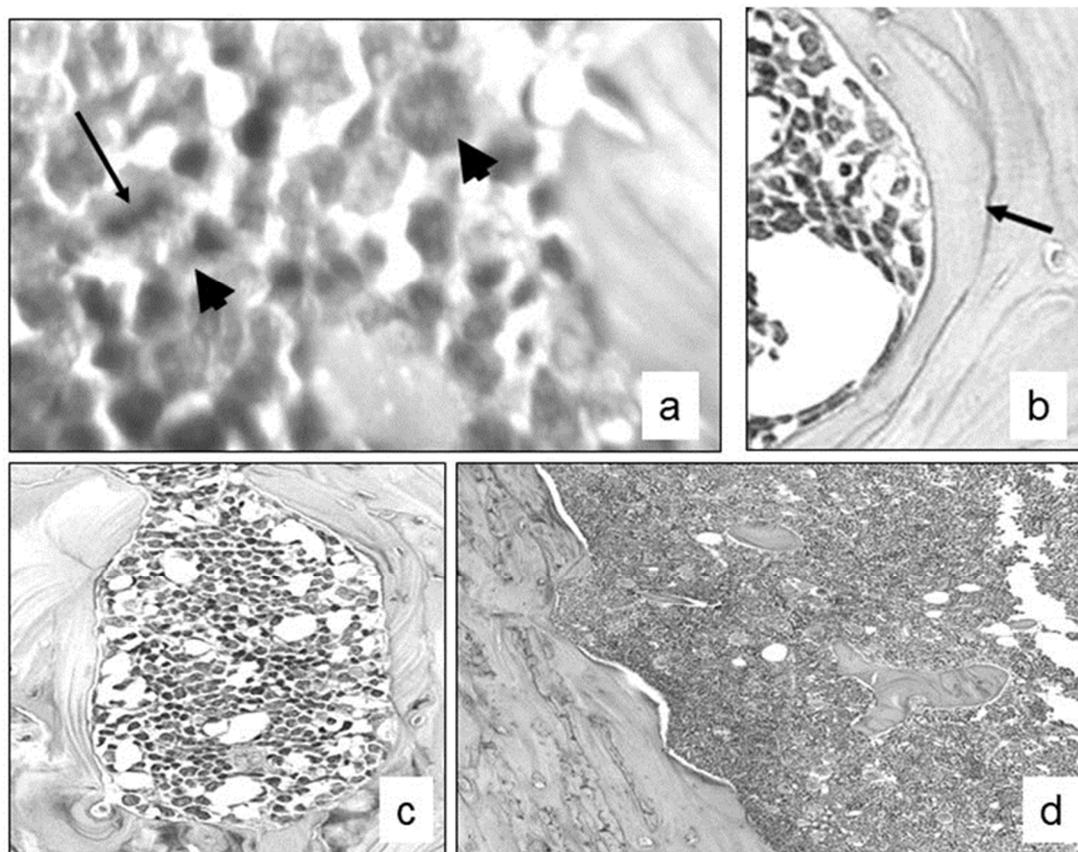


Рис. 2. Изменения в головке бедренной кости (а-с) и в диафизе большеберцовой (d) при терапии ресвератролом: а – митозы остеогенных клеток (метафаза – тонкая стрелка, и анафазы – острия стрелок); б – новообразованные костные пластины с цементирующими линиями (стрелка); с, d – уменьшение доли жирового компонента в костномозговых пространствах. Окр. гематоксилином и эозином. Сканированные препараты.

Fig. 2. Changes in the femoral head (a,-c) and in the tibial diaphysis(d) during resveratrol therapy 6 a – mitosis of osteogenic cells (metaphase-thin arrow, and anaphase- arrowheads); b- newly formed bone plates with cementing lines (arrow); c, d – decrease in the proportion of the fatty component in the bone marrow spaces. Staining with hematoxylin and eosin. Scanned specimens.

Было подтверждено, что PPAR γ недостаточность усиливает остеобластогенез в культуре клеток костного мозга, но не влияет на культуры дифференцированных остеобластов или клеток линии остеокластов. Лигандами для PPAR γ являются полиненасыщенные жирные кислоты, эйкозаноиды и синтетические противодиабетические препараты тиазолидиндиона (TZD). В этот же период экспериментально установлено активирующее влияние гиперлипидемии на остеокластогенез и активность остеокластов [24]. Поиск молекулярных факторов, ответственных за механизмы эпигенетической регуляции клеточного метаболизма, пролиферации, дифференцировки и выживания, выполненный на организмах разных уровней организации – от кишечной палочки до человека, привел к концентрации внимания на транскрипционных регуляторах, являющихся эволюционно консервативными NAD-зависимыми деацетилазами, известными еще с 1999 г. у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и получившими название сиртуины (от англ. sir – two-ins): «sir» от silent information regulator, а «two» по гомологии с белком sir2 дрожжей. Затем установлено, что сиртуины осуществляют деацетилирование лизина и у многих негистоновых клеточных белков, регулируя их активность.

Соответственно сегодняшнему уровню знаний – это класс из 7 белков с разной локализацией в структурах клеток и специфической биологической активностью. Значительное внимание сиртуины получили в геронтологии в связи с нейродегенеративными заболеваниями [25, 26], в кардиологии [27]. Не осталась без внимания и костно-суставная патология [28]. Наиболее изученным из этих белков является sirt1. Подробный анализ биологической активности этих белков по многим аспектам замедления старения (геронтопротекции) дан в недавнем обзоре отечественных специалистов в геронтологии [29] с общим заключением, что сиртуины играют ключевую роль в обеспечении антиоксидантной защиты, регуляции синтеза активных форм кислорода и репарации ДНК, то есть именно в тех биологических процессах, которые связаны с механизмами старения. Естественным продолжением исследований внутриклеточных регуляторов стал поиск соответствующих лигандов, приведший к формированию представлений о малых регуляторных молекулах, в семейство которых попали и полифенолы. В первых же работах начала века, опубликованных вскоре после открытия сиртуинов, установлен высокий эффект ресвератрола, ингибирующего p53, повышающего стабильность ДНК, в конечном итоге увеличивающего продолжительность жизни дрожжей. Хотя многие опубликованные исследования по обсуждаемой проблеме отно-

сятся к первому десятилетию текущего века, они имеют достаточно высокий методический уровень и дали толчок клеточно-молекулярным исследованиям в данной теме и основания для обобщений накопленных результатов. В одной из таких работ с красноречивым названием «Когда питание взаимодействует с функцией остеобластов: молекулярные механизмы полифенолов» [30] резюмируется, что полифенолы могут воздействовать на клеточные сигналы, такие как митоген-активируемая протеинкиназа (MAPK), костный морфогенетический белок (BMP), рецептор эстрогена и остеопротегерин/активатор рецепторов лиганда NF- κ B (OPG/RANKL), и таким образом могут влиять на функции остеобластов. Однако, как отмечают авторы, важно также учитывать возможное влияние этих соединений на остеокластогенез, почему конечный результат костного остеомоделирования зависит от сложного баланса его остеокластической (резорбтивной) и остеобластической (остеогенной) фаз.

Экспериментально-фармакологические исследования полифенолов *in vivo* с использованием полного набора методов документации костных изменений в последние 10 лет немногочисленны. Из них заслуживает внимания исследование Jing Feng et al. [28] на модели овариоэктомии у достигших скелетной зрелости крыс Sprague-Dawley. Методами *in vivo* и *in vitro* оценены эффекты трех пероральных доз ресвератрола: 5 мг/кг, 25 мг/кг и 45 мг/кг в день с началом введения через 7 суток после овариоэктомии на протяжении 8 недель. Морфологически исследован дистальный конец бедренной кости – мышечки, а компьютерной микротомографией – поясничный отдел позвоночника. Установлено, что активностью обладают средняя (25 мг) и высокая (45 мг) дозы, а низкая (5 мг) проявила малую эффективность по данным инструментальных (рентгенденситометрия, компьютерная микротомография) и *in vitro* клеточных (оценка остеобластической дифференцировки в культуре костномозговых стромальных клеток) методов. Однако по показателям сыровоточного уровня щелочной фосфатазы и остеокальцина умеренный позитивный эффект выявлен при всех испытанных дозах. В части микроструктурных изменений данные ограничены описаниями общего характера в субъективных терминах «тоньше», «меньше», «улучшение», без оценки отдельных костных клеточных элементов, других костных микроструктур и без морфометрии. Тем не менее доказана реализация антиостеопоротического эффекта ресвератрола через повышение экспрессии транскрипционного регулятора sirt1, ведущей к ингибированию фосфорилирования и активности ядерного фактора κ B, а поэтому главного активатора

остеокластогенеза – пути RANKL/RANK. Ресвератрол оценен как агонист sirt1. Мы же установили эффект еще меньшей дозы препарата с количественным морфологическим его подтверждением. В данной дозе ресвератрол является доказанным эндотелиопротектором [32]. В связи с кардиоваскулярным протективным эффектом ресвератрола, известным с начала века [33], современные данные [8] указывают, что наиболее вероятным связующим звеном между эндотелио- и ангиопротекцией является оксид азота (NO). Из современных работ, которые спустя полтора десятилетия подтверждают первоначальные результаты, приведем данные Moon D.K. et al. [34], выполнивших исследование остеобластической дифференцировки и биогенеза митохондрий под влиянием ресвератрола в культуре периостальных клеток человека из челюстей. Не найдено однозначных доказательств повышения жизнеспособности и пролиферативной активности клеток. Но при этом установлено повышение уровня щелочной фосфатазы и минерализации, что свидетельствует о дифференцировочном эффекте. Особенно значимы полученные доказательства повышения биогенеза митохондрий в контексте сформулированных к настоящему времени теорий старения – генетической и клеточных повреждений, так как обе включают рассмотрение роли митохондрий – накопление мутаций митохондриальной ДНК и свободнорадикальных повреждений, соответственно. И в целом митохондриальная дисфункция находится в перечне специфических признаков старения, обоснованных в одной из знаковых публикаций современной биологии и медицины «The hallmarks of aging» [35]. С учетом того, что ограничение калорийности питания является фактором prolongации жизни клеток, значение имеют доказательства того, что сиртуины, а значит, и их активаторы дают позитивный эффект путем «молекулярной мимикрии» голодания [36]. В целом имеющиеся данные о роли ресвератрола в регуляции клеточно-молекулярных событий можно обозначить следующими тезисами. Ресвератрол является активатором sirt1. Ключевыми мишенями этого сиртуина являются триггер апоптоза p53 и ядерный фактор каппа-В с их ингибированием. Повышение экспрессии sirt1 ведет к ингибированию фосфорилирования и активности ядерного фактора – KB, следовательно, к негативной модуляции главного пути стимуляции остеокластогенеза – RANK/RANKL. Эти эффекты расцениваются как механизм антиостеопоротического действия активаторов sirt1 вследствие ингибирования апоптоза остеобластов и остеокластической резорбции кости. Но при рассмотрении сиртуинового пути эффекта ресвератрола необходимо принимать во внимание его веро-

ятную многонаправленность, так как не всегда выявляются все его проявления, а только отдельные. Поэтому морфофункциональные особенности, выявленные нами в серии с терапией ресвератролом, отражают три его эффекта: цитопротективный, регенераторный и дифференцировочный с остеобластическим коммитированием костномозговых предшественников.

Полученные данные и их анализ позволяют заключить, что ресвератрол в дозе 2 мг/кг обладает цитопротективным для остеоцитов и остеогенных клеток эффектом, проявляет пролиферативное и коммитирующее в остеобластическом направлении действие на костномозговые стромальные предшественники, ингибируя адипоцитарный путь дифференцировки и обеспечивая этим антиостеопоротический эффект при гипоэстрогении.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Все эксперименты выполнены в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета ЕС по охране животных, используемых в научных целях.

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРОВ

Должиков А.А. – разработка концепции исследования и плана выполнения эксперимента, анализ морфологических данных, написание первичного варианта статьи; Шевченко О.А. – выполнение экспериментальной части, проведение функциональных исследований и анализ данных, анализ литературы, редактирование рукописи.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Рожинская Л.Я., Луценко А.С. Отчет о международном симпозиуме «Актуальные вопросы лечения пациентов с остеопорозом. *Остеопороз и остеопатии*. 2021;24(3);33–34 [Rozhinskaya L.Y., Lutsenko A.S. Report on the international symposium on osteoporosis. *Osteoporosis and Bone Diseases*. 2021;24(3);33–34 (in Russ)]. EDN: GTXKDU.
2. *Клинические рекомендации «Остеопороз»* 2021; 82с. [Clinical recommendations “Osteoporosis” 2021; 82 p. (in Russ)]. URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/87_4
3. Мельниченко Г.А., Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я., Торопцова Н.В., Алексеева Л.И., Бирюкова Е.В., Гребенникова Т.А., Дзеранова Л.К. и др. Федеральные клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике остеопороза. *Проблемы эндокринологии*. 2017;63(6): 392–426 [Belaya Zh.E., Belova K.YU., Biryukova E.V.,

- Dedov I.I., Dzeranova L.K., Drapkina O.M., Dreval A.V., Dubovitskaya T.A., Dudinskaya E.N., et al. Russian federal clinical guidelines on the diagnostics, treatment, and prevention of osteoporosis. *Problems of endocrinology*. 2017;63(6):392–426 (in Russ)]. DOI: 10.14341/probl2017636392-426. EDN: YNULGQ.
4. Князькова И.И. Клиническая фармакология бисфосфонатов. *Фармакотерапия*. 2014; 5–6(181–182):84–89 [Knjaz'kova I.I. Clinical pharmacology of bisphosphonates. *Farmakoterapiya*. 2014;5-6(181-182):84-89 (in Russ)].
 5. Корокин М.В., Солдатов В.О., Гудырев О.С., Коклин И.С., Таран Э.И., Мишенин М.О., Корокина Л.В., Кочкаров А.А. и др. Роль метаболизма кортизола в реализации патогенетических звеньев развития остеопороза – обоснование поиска новых фармакотерапевтических мишеней (обзор). *Научные результаты биомедицинских исследований*. 2022;8(4):457–473 [Korokin M.V., Soldatov V.O., Gudyrev O.S., Koklin I.S., Taran E.I., Mishenin M.O., Korokina L.V., Kochkarov A.A., et al. The role of cortisol metabolism in the realization of pathogenetic links in the development of osteoporosis - the rationale for the search for new pharmacotherapeutic targets (review). *Research results in biomedicine*. 2022;8(4):457-473 (in Russ)]. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-4-0-5. EDN: GWBHAV
 6. Трунов К.С., Даниленко А.П., Гудырев О.С., Даниленко Л.М., Покровский М.В., Скачилова С.Я., Чередниченко А.А., Романенко Ю.В. и др. Супрамолекулярный комплекс на основе производных 3-гидроксипиридина предотвращает остеопороз, вызванный дефицитом эстрогенов, ингибируя окислительный стресс. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2023;86(2):28–35 [Trunov K.S., Danilenko A.P., Gudyrev O.S., Danilenko L.M., Pokrovsky M.V., Skachilova S.Ya., Cherednichenko A.A., et al. Supramolecular complex based on 3-hydroxypyridine derivatives prevents osteoporosis caused by estrogen deficiency by inhibiting oxidative stress. *Experimental and clinical pharmacology*. 2023;86(2):28-35 (in Russ)]. DOI: 10.30906/0869-2092-2023-86-2-28-35. EDN: JGCGCN.
 7. Samacho P.M. *Metabolic bone diseases. A case based approach*. Springer Switzerland, 2019. 270 p.
 8. Васильев Г.В., Новиков О.О., Кочкаров В.И., Лукашева О.Б., Писарев Д.И., Киселева Т.С., Фадеева Д.А. Фармакологическая характеристика резвератрола. *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»*. 2007;(3):97–104 [Vasilyev G.V., Novikov O.O., Kochkarov V.I., Lukashova O.B., Pisarev D.I., Kiseleva T.S., Fadeyeva D.A. Pharmacological description of resveratrol. *Kursk scientific and practical bulletin "Man and his health"*. 2007;(3):97-104 (in Russ)]. EDN: KCKSRH.
 9. Гудырев О.С., Файтельсон А.В., Покровский М.В., Иванов А.В., Коклина Н.Ю., Стабровская Н.В., Ваныан А.Ш., Нарыков Р.А., и др. Остеопротективное действие эналаприла, лозартана и резвератрола при экспериментальном остеопорозе. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. 2011;22-2(117):9–17 [Gudyrev O.S., Faytelson A.V., Pokrovsky M.V., Ivanov A.V., Koklina N.Yu., Stabrovskaya N.V., Vanyan A.Sh., Narykov R.A. et al. Osteoprotective effect of enalapril, losartan and resveratrol in experimental osteoporosis. *Scientific Bulletin of Belgorod State University. Series: Medicine. Pharmacy*. 2011;22-2(117):9-17 (in Russ)]. EDN: TELGBX.
 10. Manolagas S.C. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocr Rev*. 2010;31(3):266–300. DOI: 10.1210/er.2009-0024.
 11. Вёрткин А.Л., Наумов А.В. *Остеопороз*. Москва: Эксмо, 2015. 272 с. [Vertkin A.L., Naumov A.V. *Osteoporosis*. Moscow: Eksmo, 2015. 272 p. (in Russ)].
 12. Порядин Г.В., Захватов А.Н., Самарина Д.В. Патогенетические механизмы формирования постклимактерического остеопороза и их взаимосвязь с сердечно-сосудистой патологией. *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(1):144–151 [Poryadin G.V., Zakhvatov A.N., Samarina D.V. Pathogenetic mechanisms of postmenopausal osteoporosis formation and their relationship with cardiovascular pathology. *Bulletin of Siberian medicine*. 2022;21(1):144-151 (in Russ)]. DOI: 10.20538/1682-0363-2022-1-144-151. EDN: JJEVEA.
 13. Schrauwen P., Timmers S. Can resveratrol help to maintain metabolic health? *Proc Nutr Soc*. 2014;73(2):271–277. DOI: 10.1017/S0029665113003856.
 14. Долженко А., Рихтер Т., Сагаловски С. Атеросклероз, кальцификация сосудов и понижение плотности костной ткани (остеопороз): Общая сущность патофизиологических механизмов развития заболеваний и поиск новых средств двойной терапии. *Атеросклероз*. 2016;12(4):44–67 [Dolzhenko A., Richter T., Sagalovsky S. Atherosclerosis, vascular calcification and bone loss (osteoporosis): common pathophysiological mechanisms development of the diseases and research novel drugs for dual therapie. *Atherosclerоз*. 2016;12(4):44-67 (in Russ)]. EDN: XQOKOH.
 15. Браилова Н.В., Кузнецова В.А., Дудинская Е.Н., Ткачева О.Н. Старение костной ткани. *Российский журнал гериатрической медицины*. 2020;(2):147–153 [Brailova N.V., Kuznetsova V.A., Dudinskaya E.N., Tkacheva O.N. Aging bone. *Russian journal of geriatric medicine*. 2020;(2):147-153 (in Russ)]. DOI: 10.37586/2686-8636-2-2020-147-153. EDN: UDAFYN.
 16. Шишкова В.Н. Ожирение и остеопороз. *Остеопороз и остеопатии*. 2011;14(1):21–26 [Shishkova V.N., Shishkova V.N. Obesity and osteoporosis. *Osteoporosis and Bone Diseases*. 2011;14(1):21-26 (in Russ)]. DOI: 10.14341/osteo2011121-26.
 17. Reid I.R. Relationships between fat and bone. *Osteoporos Int*. 2008;19(5):595–606. DOI: 10.1007/s00198-007-0492-z.
 18. Yousefzadeh N., Kashfi K., Jeddi S., Ghasemi A. Ovariectomized rat model of osteoporosis: a practical guide. *EXCLI J*. 2020;19:89–107. DOI: 10.17179/excli2019-1990.
 19. Bäckesjö C.M., Li Y., Lindgren U., Haldosén L.A. Activation of Sirt1 decreases adipocyte formation

- during osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res.* 2006;21(7):993–1002. DOI: 10.1359/jbmr.060415.
20. Mizutani K., Ikeda K., Kawai Y., Yamori Y. Resveratrol stimulates the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;253(3):859–863. DOI: 10.1006/bbrc.1998.9870.
 21. Bennetau-Pelissero C., Latonnelle K., Sequeira A., Lamothe V. Phytoestrogens, endocrine disrupters from food. *Analisis.* 2000;28:763–775. DOI: 10.1051/analisis:2000280763.
 22. Meng-Yao S., Ying Y., Ling X., Khalid R., Wei X., Hong Z. Dadzein: A review of pharmacological effects. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2016;13(3):117–132. DOI: 10.4314/ajtcam.v13i3.15.
 23. Akune T., Ohba S., Kamekura S., Yamaguchi M., Chung U.I., Kubota N., Terauchi Y., Harada Y., et al. PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest.* 2004;113(6):846–855. DOI: 10.1172/JCI19900.
 24. Tintut Y., Morony S., Demer L.L. Hyperlipidemia promotes osteoclastic potential of bone marrow cells ex vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(2):e6–10. DOI: 10.1161/01.ATV.0000112023.62695.7f.
 25. Pukhalskaia A.E., Dyatlova A.S., Linkova N.S., Kozlov K.L., Kvetnaia T.V., Koroleva M.V., Kvetnoy I.M. Sirtuins as Possible Predictors of Aging and Alzheimer's Disease Development: Verification in the Hippocampus and Saliva. *Bull Exp Biol Med.* 2020;169(6):821–824. DOI: 10.1007/s10517-020-04986-4.
 26. Пухальская А.Э., Дятлова А.С., Линькова Н.С., Кветной И.М. Сиртуины: роль в регуляции окислительного стресса и патогенезе нейродегенеративных заболеваний. *Успехи физиологических наук.* 2021;52(1):90–104 [Pukhalskaia A.E., Diatlova A.S., Linkova N.S., Kvetnoy I.M. Sirtuins: the role in oxidative stress regulation and pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Progress in physiological science.* 2021;52(1):90–104 (in Russ)]. DOI: 10.31857/S0301179821010082. EDN: WNNKMK.
 27. Айтбаев К.А., Муркамилов И.Т., Муркамилова Ж.А., Кудайбергенова И.О., Юсупов Ф.А. Эпигенетические механизмы кардиопротекции: В фокусе – активация сиртуинов. *Архивъ внутренней медицины.* 2021;11(6):424–432 [Aitbaev K.A., Murkamilov I.T., Murkamilova Zh.A., Kudaibergenova I.O., Yusupov F.A. Epigenetic mechanisms of cardioprotection: focus is on activation of sirtuins. *Arkhiv vnutrenney meditsiny.* 2021;11(6):424–432 (in Russ)]. DOI: 10.20514/2226-6704-2021-11-6-424-432. EDN: TPUAJV.
 28. Almeida M., Porter R.M. Sirtuins and FoxOs in osteoporosis and osteoarthritis. *Bone.* 2019;121:284–292. DOI: 10.1016/j.bone.2019.01.018.
 29. Пухальская А.Э., Кветной И.М., Линькова Н.С., Дятлова А.С., Гутоп Е.О., Козлов К.Л., Пальцев М.А. Сиртуины и старение. *Успехи физиологических наук.* 2022;53(1):16–27 [Pukhalskaia A.E., Kvetnoy I.M., Linkova N.S., Diatlova A.S., Gutop E.O., Kozlov K.L., Paltsev M.A. Sirtuins and aging. *Progress in physiological science.* 2022;53(1):16–27 (in Russ)]. DOI: 10.31857/S0301179821040056. EDN: KUNLXB.
 30. Trzeciakiewicz A., Habauzit V., Horcajada M.N. When nutrition interacts with osteoblast function: molecular mechanisms of polyphenols. *Nutr Res Rev.* 2009;22(1):68–81. DOI: 10.1017/S095442240926402X.
 31. Feng J., Liu S., Ma S., Zhao J., Zhang W., Qi W., Cao P., Wang Z., et al. Protective effects of resveratrol on postmenopausal osteoporosis: regulation of SIRT1 NF-κB signaling pathway. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2014;46(12):1024–1033. DOI: 10.1093/abbs/gmu103.
 32. Кочкарров, В.И. Сравнительное исследование эндотелио- и кардиопротективных эффектов резвератрола и его комбинаций с эналаприлом и лозартаном калия при гипоэстроген-индуцированной эндотелиальной дисфункции. *Кубанский научно-медицинский вестник.* 2008;(5):86–90 [Kochkarov V.I. Comparative research of endothelio- and cardioprotective effects resveratrole and its combinations with enalapril and losartan at hypoestrogen the induced experimental dysfunction of an endothelium. *Kuban scientific medical bulletin.* 2008;(5):86–90 (in Russ)]. EDN: KKPDSO.
 33. Bradamante S., Barenghi L., Villa A. Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovasc Drug Rev.* 2004;22(3):169–188. DOI: 10.1111/j.1527-3466.2004.tb00139.x.
 34. Moon D.K., Kim B.G., Lee A.R., In Choe Y., Khan I., Moon K.M., Jeon R.H., Byun J.H., et al. Resveratrol can enhance osteogenic differentiation and mitochondrial biogenesis from human periosteum-derived mesenchymal stem cells. *J Orthop Surg Res.* 2020;15(1):203. DOI: 10.1186/s13018-020-01684-9.
 35. López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013;153(6):1194–1217. DOI: 10.1016/j.cell.2013.05.039.
 36. Wood J.G., Rogina B., Lavu S., Howitz K., Helfand S.L., Tatar M., Sinclair D. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature.* 2004;430(7000):686–689. DOI: 10.1038/nature02789.

Поступила в редакцию 17.04.2024

Подписана в печать 25.11.2024

Для цитирования: Должиков А.А., Шевченко О.А. Стимуляция пролиферации и остеобластической дифференцировки остеогенных предшественников как фармакологические эффекты ресвератрола при гипоэстроген-индуцированном остеопорозе: структурно-функциональные проявления и возможные механизмы. *Человек и его здоровье.* 2024;27(3):109–118. DOI: 10.21626/vestnik/2024-3/10. EDN: XMAUWW.

STIMULATION OF PROLIFERATION AND OSTEOBLASTIC DIFFERENTIATION OF OSTEOGENIC PRECURSORS AS PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF RESVERATROL IN HYPOESTROGENISM-INDUCED OSTEOPOROSIS: STRUCTURAL AND FUNCTIONAL MANIFESTATIONS AND POSSIBLE MECHANISMS

© Dolzhikov A.A., Shevchenko O.A.

Belgorod State University (BelSU)

85, Pobeda Str., Belgorod, Belgorod region, 308015, Russian Federation

Objective – investigation of changes in the microstructure and mineral density of the proximal parts of the femur (head, neck) and tibia in experimental postmenopausal osteoporosis and its therapy with resveratrol and analysis of their possible mechanisms.

Materials and methods. The study was performed on 15 female Wistar rats. A model of postmenopausal osteoporosis was created by bilateral ovariectomy with a follow-up period of 56 days. Resveratrol therapy in the experimental group was performed by its daily intraperitoneal administration at a dose of 2 mg / kg during the same observation period. Histological examination with image analysis and morphometry, absorption X-ray densitometry of the proximal epiphysis of the femur and proximal half of the tibia were performed.

Results. Bilateral ovariectomy in experimental animals – Wistar rats, leads after 8 weeks to a complex of structural changes in the proximal parts of the femur and tibia and a decrease in bone mineral density in them, which can be extrapolated to osteoporotic skeletal damage in humans. Resveratrol at a dose of 2 mg/kg has osteoprotective and regenerative effects in experimental postmenopausal osteoporosis.

Conclusion. Resveratrol at a dose of 2 mg/kg has a cytoprotective effect for osteocytes and osteogenic progenitor cells, exhibits a proliferative and osteoblastic committal effect on bone marrow stromal precursors, inhibiting the adipocytic differentiation pathway and thereby providing an anti-osteoporotic effect in hypoestrogenism. Based on comparisons with literature data, the key factor realizing the effects of resveratrol is most likely the sirt1 protein.

Keywords: postmenopausal osteoporosis; resveratrol; osteoprotection and bone regeneration.

Dolzhikov Alexander A. – Dr. Sci. (Med), Professor, Professor at the Department of Human Anatomy and Histology, BelSU, Belgorod, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0001-7425-8416. E-mail: dolzhikov@bsu.edu.ru (corresponding author)

Shevchenko Olga A. – Assistant at the Department of Microbiology and Virology with a course in Clinical Immunology, BelSU, Belgorod, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0003-4881-6378. E-mail: olya_dolzhikova@mail.ru

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

SOURCE OF FINANCING

The authors state that there is no funding for the study.

COMPLIANCE WITH PRINCIPLES OF ETHICS

All experiments were carried out in accordance with Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes.

AUTHORS CONTRIBUTION

Dolzhikov A.A. – development of the research concept and design, participation in the experimental part, morphological research, intellectual final approval for publication of the manuscript; Shevchenko O.A. – experimental modeling, analysis of literature data, participation in morphological research, primary densitometric research and statistical analysis, correction of primary manuscript.

Received 17.04.2024

Accepted 25.11.2024

For citation: Dolzhikov A.A., Shevchenko O.A. Stimulation of proliferation and osteoblastic differentiation of osteogenic precursors as pharmacological effects of resveratrol in hypoestrogenism-induced osteoporosis: structural and functional manifestations and possible mechanisms. *Humans and their health*. 2024;27(3):109–118. DOI: 10.21626/vestnik/2024-3/11. EDN: XMAUWW.
