

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ЭФФЕКТА РЕСВЕРАТРОЛА ПРИ ПОСТМЕНОПАУЗАЛЬНОМ ОСТЕОПОРОЗЕ

© 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 морфологических изменений костного мозга, тимуса и селезенки при экспериментальном постменопаузальном остеопорозе и его терапии ресвератролом.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 15 самках крыс Вистар. Модель постменопаузального остеопороза создавали двусторонней овариоэктомией со сроком наблюдения 28 суток. Терапию ресвератролом в экспериментальной группе проводили его ежедневным внутривнутрибрюшинным введением в дозе 2 мг/кг на протяжении такого же срока наблюдения. Проведены гистологическое и денситометрическое исследования проксимальной половины бедренной кости, гистологическое и иммуногистохимическое исследования тимуса, селезенки с компьютерным анализом изображений и морфометрией.

Результаты. Двусторонняя овариоэктомия у экспериментальных животных – крыс Вистар через 4 недели после овариоэктомии вместе с остеопоротическим поражением приводит к усилению пролиферации кортикальных тимоцитов, сопровождаемой активацией ретикулоэпителиального микроокружения, усилением миграции активированных (CD45RO+) тимоцитов в селезенку, активации В-лимфоцитопоэза в костном мозге и селезенке. При терапии ресвератролом уменьшается выраженность морфологических проявлений активации Т- и В-клеточного звеньев иммунной системы.

Заключение. При формировании костных изменений остеопоротического типа, вызванных у экспериментальных животных – крыс Wistar, гипозестрогенной на протяжении 4 недель, в костном мозге, тимусе и селезенке развиваются морфологические изменения, свидетельствующие о Т- и В-клеточной активации в иммунной системе. Терапия ресвератролом на протяжении периода эстрогенной депривации наряду с остеопротективным и остеорепаративным эффектами оказывает негативное модулирующее действие на иммунные структуры, что может быть одним из путей снижения остеорезорбтивной активности остеокластов.

Ключевые слова: постменопаузальный остеопороз; иммунная система; ресвератрол.

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: anatomda@mail.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

Среди проблем и направлений изучения механизмов развития остеопороза (ОП) и разработки соответствующих фармакотерапевтических средств наиболее современными являются исследования роли иммунных механизмов. Хотя первые представления о взаимосвязях костной ткани и иммунной системы возникли еще в 1980-х годах, современные концепции оформились в первое десятилетие нынешнего века. Накопление экспериментальных и клинических данных привело к формированию отдельной области исследований – остеоиммунологии, основополагающей для которой является всего трехстраничная публикация Arron J.R. и Choi Y. [1]. В ней на основе недавних предшествовавших исследований рассмотрена роль Т-лимфоцитов, определяющих баланс между RANK/RANKL, активирующей остеокластическую резорбцию, и развитие факторами, сдерживающими ее чрезмерную активность, и сформулировано само понятие об остеоиммунологии. К настоящему времени накоплен чрезвычайно большой объем информации по частным аспектам участия иммунных механизмов в регуляции костного го-

меостаза и оформились основные концептуальные положения. Однако актуальность сохраняется в направлении исследования иммунных механизмов при нарушениях костного ремоделирования и их фармакокоррекции. Первоначальные исследования были закономерно связаны с воспалительной патологией костей и суставов, а из клеточных мишеней в первую очередь рассматривались и рассматриваются остеокласты, которые, будучи костными представителями моноцитарно-макрофагальной системы, непосредственно или опосредованно через остеобласты или костномозговые элементы регулируются широким спектром иммунных факторов. Имеющиеся данные показывают, что взаимосвязи между костными элементами и иммунными факторами достаточно сложны, и кроме прямых путей влияния на остеокластогенез большее значение могут иметь опосредованные, например, реализуемые через остеобласты [2, 3] Кроме этого, показано, что остеобласты вместе с другими стромальными клетками костного мозга выделяют важные цитокины и факторы роста, которые стимулируют остеокластическую детерми-

нацию гемопоэтических предшественников [4], а дефицит эстрогенов вызывает потерю костной массы за счет усиления выработки цитокинов иммунными клетками [5]. В условиях фармакологических воздействий при остеодеструктивной патологии эти механизмы могут оказаться еще более сложными, да и сами фармакологические эффекты требуют изучения.

Ранее нами установлено влияние растительного полифенола ресвератрола на процессы детерминации и дифференцировки костномозговых предшественников при экспериментальном постменопаузальном остеопорозе [6]. В связи с этим в данной работе поставлена цель изучения структурных проявлений влияния данного фармакологически активного агента на структурные проявления иммунных реакций в центральных (костный мозг, тимус) и периферических (селезенка) органах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на 15 белых крысах-самках Wistar массой 280-300 г, соответствующих биологическому возрасту 6 месяцев – возрасту скелетной зрелости, который рекомендуется для начала подобных экспериментов с моделированием постменопаузального остеопороза [7].

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.

Срок завершения эксперимента 4 недели выбран нами на основании предыдущих исследований [8], в которых показано, что остеопоротическое поражение в данной модели начинает формироваться с четырех недель и достигает полной картины к 8. Хирургические вмешательства выполнены под общей анестезией внутрибрюшинным введением золетила и медитина. На 28-й день 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. После этого животных выводили из эксперимента цервикальной дислокацией под хлоралгидратным нарко-

зом. Исследовали проксимальную часть бедренной кости от головки до середины диафиза, тимус и селезенку. Материал фиксировали в 10% забуференном формалине «Histosafe». Декальцированный в жидкости «Surgipath DecalcifierII» (Leica, Германия) костный материал и органы автоматическим способом заливали в парафин с последующим изготовлением и окраской гистологических срезов толщиной 7 мкм гематоксилином и эозином и по Маллори. Для изучения тимуса и селезенки также применяли иммуногистохимические реакции по стандартным протоколам, используя поли- и моноклональные антитела. В тимусе реакцией на панцитокератин (клон AE1-AE3) выявляли ретикулоэпителиальные клетки. В селезенке реакцией на CD3 (полноклональные антитела) выявляли общую фракцию Т-лимфоцитов, а реакцией на CD45RO (клон UCHL1) субпопуляцию активированных клеток среди них. Основное гистологическое исследование с морфометрией проведено на цифровых аналогах препаратов, полученных с помощью системы сканирования и архивирования микропрепаратов Hamamatsu NanoZoomer-SQ Digital Slide Scanner (Япония). При необходимости детализации препараты изучали обычной световой микроскопией под микроскопом «Ломо» с видеокамерой «DV1000» и программным обеспечением для морфометрии («McrAView 7.3.1.7», ЛОМО-микросистемы, Россия), используя объектив масляной иммерсии со 100-кратным увеличением.

При морфометрии в костях определяли толщину трабекул, доли костномозговых пространств, а в лимфоидных органах линейные параметры и удельные площади структурно-функциональных зон. Количественные данные регистрировали в электронных таблицах MS Excel со статистической обработкой по стандартным формулам. Статистическую значимость отличий в связи с нормальностью распределения признаков оценивали по критерию t Стьюдента при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При макроскопическом и гистологическом исследовании тимуса и селезенки через 4 недели после билатеральной овариоэктомии выявлены изменения, свидетельствующие о влиянии гипоэстрогении на структурно-функциональный статус иммунной системы. Однако в большей степени они проявились и были нами оценены на микроскопическом уровне, чем макроскопически и органометрически. В первую очередь это связано с малочисленностью групп. Но не менее важен фактор морфологических

особенностей данных органов. В тимусе это определяется процессами акцидентальной инволюции с изменением трудно оцениваемого соотношения между паренхиматозым лимфоидным и фиброзно-жировым компонентами, а в селезенке с изменением степени кровенаполнения красной пульпы. Несколько (в 1,3-1,5 раза) увеличились линейные размеры тимуса (рис. 1), но при этом средняя относительная масса возросла всего на 0,8% и недостоверно.

Гистологически в тимусе обнаружены качественные (рис. 2) и морфометрические (рис. 3) изменения, достоверно свидетельствующие об активации Т-лимфоцитопоэза и миграции тимоцитов. Достоверно ($p=0,002$) до $152,2\pm 7,3$ мкм в сравнении с ложноперированными животными ($127\pm 3,3$) увеличилась толщина коркового вещества (рис. 3). Возросла плотность его клеточного состава за счет малых лимфоцитов, среди которых обнаруживались дискретно расположенные апоптотически измененные клетки, что отражает активность негативной селекции как компонента активного Т-лимфоцитопоэза.

Этим изменениям закономерно сопутствовали гиперплазия и функциональная активация ретикулоэпителиального микроокружения, что особенно отчетливо выявлено иммуногистохимически по экспрессии панцитокератина. Многие из РЭК отличались обильной оксифильной очагово вакуолизированной цитоплазмой, эухроматиновыми пузырьковидными ядрами с 1-2 крупными ядрышками, что соответствует фенотипу активированных секреторных клеток. В периферической части цитоплазмы наиболее крупных РЭК обнаруживались малые лимфоци-

ты, что характеризует их как «клетки-няньки». Удельная площадь мозгового вещества, напротив, с пограничной статистической значимостью ($p=0,04$) уменьшилась с $39,4\pm 1,8\%$ до $34,6\pm 1,4$. В нем обнаруживались немногочисленные мелкие эпителиальные тельца. Как признак миграции тимоцитов в кровоток в кортикомедуллярной зоне часто обнаруживались посткапиллярные венулы с картиной прохождения клеток через их стенки.

Селезенка макроскопически изменилась сходным образом. Внешне (рис. 1) она выглядела увеличенной за счет продольного размера. Но относительная средняя масса недостоверно увеличилась всего на 7%. Однако микроскопически (рис. 2f-h) обнаружены значимые особенности изменений ее белой пульпы, свидетельствующие о сдвигах в состоянии как Т-, так и В-клеточного иммунных компонентов, изменения которых оказались гетерогенными. Периартериальные/периартериоллярные лимфоидные муфты (влагалища) количественно изменились в меньшей степени. В серии с остеопорозом их ширина увеличилась всего на 4,8% без статистической значимости. Наиболее выраженные изменения обнаружены в маргинальной зоне. Ее ширина при остеопорозе достоверно ($p<0,01$) увеличилась на 42,1%. Граница с красной пульпой стала нечеткой из-за распространения в нее в виде «шлейфов» клеточных пластов с краев маргинальной зоны. В клеточном составе преобладали элементы с плазмоцитарной морфологией, среди которых обнаруживаются немногочисленные митотические фигуры. Значимые данные получены при иммуногистохимическом исследовании селезенки.



Рис 1. Макроскопические картины тимуса (верхний ряд) и селезенки (нижний ряд) у ложноперированных животных (препараты слева), через 4 недели после овариоэктомии (средние препараты) и через 4 недели после овариоэктомии и терапии ресвератролом (препараты справа).

Fig 1. Macroscopic pictures of thymus (upper row) and spleen (lower row) in sham-operated animals (left pictures), 4 weeks after ovariectomy (middle pictures) and 4 weeks after ovariectomy with resveratrol therapy (right pictures).

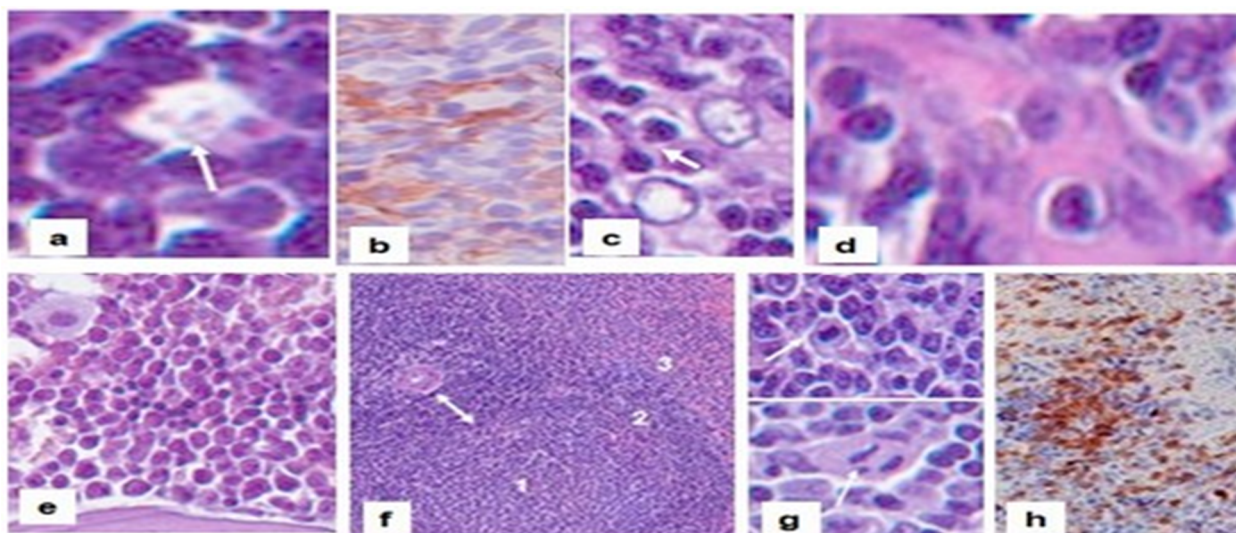


Рис 2. Изменения тимуса (a-d), костного мозга (e) и селезенки (f-h) через 4 недели после двусторонней овариоэктомии: а – повышение клеточной плотности коркового вещества тимуса, апоптоз лимфоцитов (стрелка); b – гиперплазия медуллярных ретикулоэпителиальных клеток; с – гипертрофированная ретикулоэпителиальная клетка типа «клетки-няньки» с внутрицитоплазматическими тимоцитами (стрелка); d – миграция тимоцитов через стенку посткапиллярной вены; e – гиперплазия костного мозга с лимфоцитозом; f – лимфоидный узелок с реактивным центром (1), плотной мантией (2), расширенной маргинальной зоной (3); g – детали реактивного центра: митозы (верхняя часть) и апоптоз (стрелка на нижней) спленоцитов; h – увеличение количества и диффузное распространение активированных Т-лимфоцитов (CD45RO+) в пульпе селезенки. Окр гематоксилином и эозином (a, c, d, fg), иммуногистохимические реакции на пан-цитокератин (b) и CD45RO (h). Сканированные препараты.

Fig 2. Changes in the thymus(a-d), bone marrow(e), and spleen(f-h) 4 weeks after bilateral ovariectomy: a – increased cellular density of the thymus cortex, lymphocyte apoptosis (arrow); b – hyperplasia of medullary reticuloepithelial cells; c – hypertrophied reticuloepithelial cells of the "nurse type" with intracytoplasmic thymocytes (arrow); d – migration of thymocytes through the wall of the postcapillary venule; e – bone marrow hyperplasia with lymphocytosis; f – lymphoid nodule with a reactive center (1), dense mantle (2), expanded marginal zone (3), g – details of the reactive center: mitoses (upper part) and apoptosis (arrow on the bottom) of splenocytes; h – an increase in the number and diffuse spread of activated T-lymphocytes (CD45RO+) in the pulp of the spleen. Hematoxylin and eosin (a, c, d, f, g), immunohistochemical reactions for pan-cytokeratin(b) and CD45RO (h). Scanned specimens.

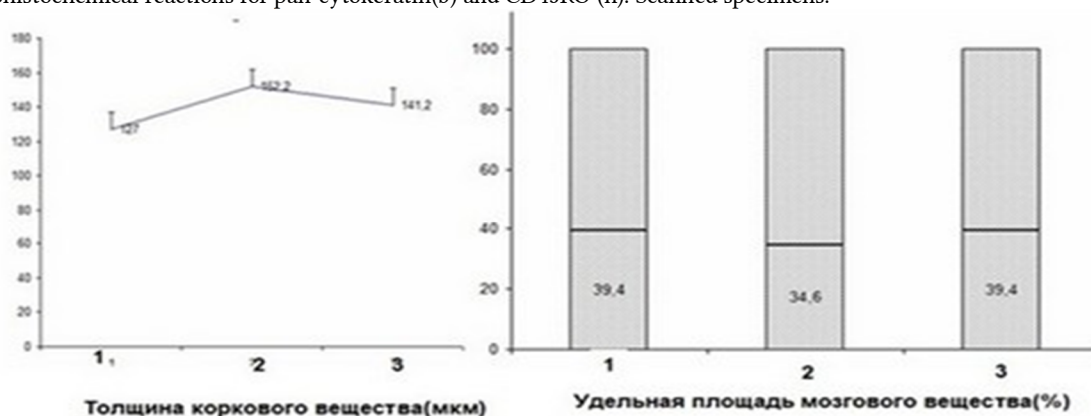


Рис 3. Изменения морфометрических параметров тимуса: 1 – ложнооперированные животные, 2 – P4, 3 – OP4+ресвератрол.

Fig 3. Changes in thymus morphometric parameters: 1 – shame-operated animals, 2 – OP4, 3 – OP4+resveratrol.

Периартериальные зоны оказались представлены плотно расположенными Т-лимфоцитами (CD3+) с иммунофенотипом активированных (CD45RO+). Данные клетки были диффузно представлены в маргинальной зоне и в красной пульпе. О В-клеточной активации убедительно свидетельствует формирование типичных реактивных лимфоидных узелков с наличием в ре-

активных центрах многочисленных митотических и апоптотических клеток. В костномозговых пространствах выявлена гиперплазия миелоидной ткани с лимфоцитозом.

Кроме описанных выше изменений значимо то, что очаги остеокластической резорбции часто содержали плотные лимфоцитарные инфильтраты (рис. 4), что может отражать экспан-

сию активированных лимфоцитов в них и вероятное непосредственное взаимодействие с остеокластами.

Через 4 недели после овариоэктомии и терапии ресвератролом макроскопические, качественные гистологические и морфометрические данные свидетельствуют о его корригирующем эффекте. Прежде всего, необходимо отметить не только ингибирование ресвератролом остеопоротического поражения, но и проявления остеорепарации. Обнаружено достоверное ($p=0,008$) увеличение средней толщины трабекул (до $52,1\pm 1,6$ мкм против $47,1\pm 0,9$), имелись локальные признаки остеопластических процессов в виде дополнительных пластов костных пластин на предсуществующих поверхностях. В сравнении с группой ложноперирированных животных средние относительные массы тимуса оказались практически равны, на уровне контрольных значений у ложноперирированных животных были и морфометрические параметры коркового и мозгового вещества. Гистологически (рис. 5) выявлено уменьшение плотности расположения кортикальных тимоцитов, особенно в подкапсульной зоне. Ретикулоэпителиальные клетки распределены равномерно, только на кортико-медуллярной границе имелись их небольшие группы. Клетки приобрели более компактную внутреннюю структуру, больше соответствуя фенотипу покоящихся. Все это отражает ингибирующий эффект ресвератрола на развивающуюся при формирующемся эстрогендепривационном остеопорозе Т-клеточную активацию. Органометрическая оценка селезенки, как и в предыдущей серии не дала достаточно убедительных результатов. В сравнении с овариоэктомированными животными ее относительная масса уменьшилась незначительно, приняв промежуточное значение ($3,33\pm 0,1$ мг/г), достоверно не отличаясь ни от серии с остеопорозом, ни от ложноперирированных животных.

Тем не менее, гистологические изменения (рис. 5) дали достаточно оснований для оценки фармакологического эффекта ресвератрола. Как и ранее части белой пульпы проявили разную реакцию. Ширина периартериальных лимфоидных муфт уменьшилась на 8% и недостоверно в сравнении с серией с остеопорозом. Ширина же маргинальной зоны достоверно ($p<0,01$) уменьшилась на 23,6%. Одним из наиболее существенных в данной серии эксперимента явилось отсутствие лимфоидных узелков с реактивными центрами. Иммуногистохимически выявлено уменьшение концентрации Т-клеточного компонента в белой пульпе, в том числе субпопуляции активированных (CD45RO+) клеток в его составе.

Полученные нами результаты свидетельствуют о развитии как Т-, так и В-клеточной активации в иммунной системе при эстрогендепривационном остеопорозе и корригирующем эффекте ресвератрола. Об активации Т-лимфоцитопоеза и экспансии активированных клеток в периферические Т-зоны свидетельствуют увеличение толщины и относительного объема коркового вещества тимуса, увеличение его клеточной плотности, апоптоз тимоцитов как индикатор их негативной селекции, реакция ретикулоэпителиального микроокружения, миграция клеток в кровотоки через посткапиллярные вены, изменения периартериальных муфт селезенки. Усиление В-лимфоцитопоеза проявилось лимфоцитозом костного мозга, появлением в селезенке типичных реактивных лимфоидных узелков. Используя данные литературы, приведем соответствующий анализ этих двух аспектов. Первый из них включает вопрос влияния стероидных гормонов на иммунную систему и собственно проблему участия иммунных механизмов в развитии остеопоротических костных изменений.

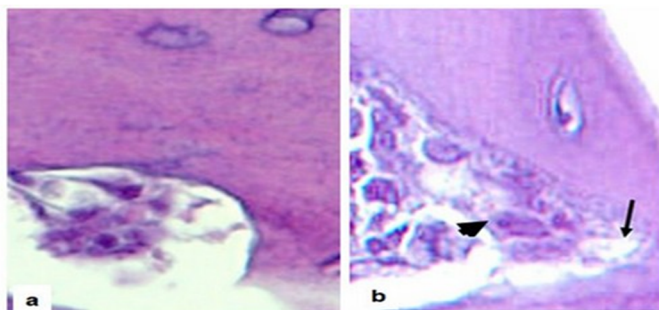


Рис 4. Очаги остеокластической резорбции через 4 недели после овариоэктомии: а – активный остеокласт в глубокой резорбционной лакуне; б – резорбционно активный остеокласт (острие стрелки) в лакуне (стрелка) и сопутствующий лимфогистиоцитарный инфильтрат; выше костная лакунa с апоптотически измененным остеоцитом. Окр. гематоксилином и эозином. Сканированные препараты.

Fig 4. Foci of osteoclastic resorption 4 weeks after ovariectomy: a – active osteoclast in a deep resorptive lacuna; b – resorptively active osteoclast (arrowhead) in a lacuna (arrow) and accompanying lymphohistiocytic infiltrate; above, a bone lacuna with an apoptotic osteocyte. H&E stain. Scanned images.

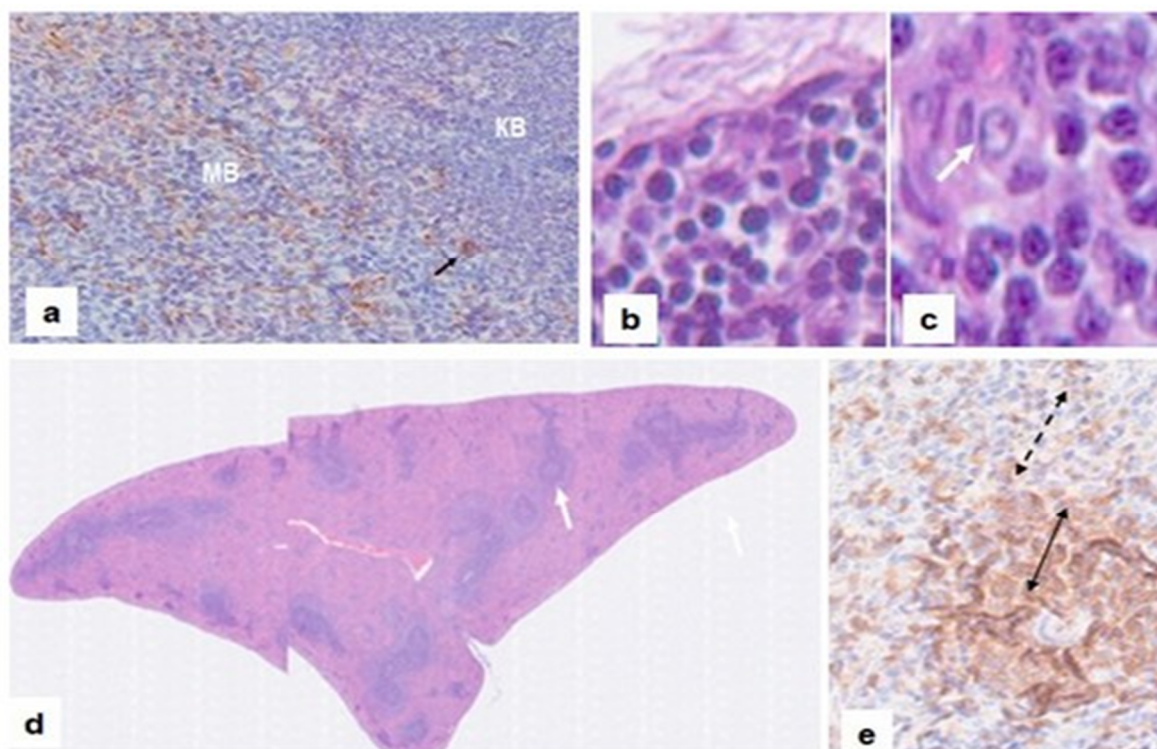


Рис 5. Изменения тимуса (a-c) и селезенки (d,e) через 4 недели после овариоэктоми и терапии ресвератролом: а – рыхлая сеть из умеренного количества ретикулоэпителиальных клеток; b – уменьшение клеточной плотности в подкапсулярной зоне коры тимуса; c – мелкое тельце Гассалья в мозговом веществе; d – белая пульпа без реактивных фолликулов с узкими периартериальными влагалищами (стрелка) и средней шириной маргинальной зоны; e – уменьшение плотности расположения и распространенности CD45RO+ лимфоцитов. Окр. гематоксилином и эозином (a-d), иммуногистохимическая реакция (e). Сканированные препараты.

Fig. 5. Changes in the thymus (a-c) and spleen (d, e) 4 weeks after ovariectomy and resveratrol therapy: a – loose network of a moderate number of reticuloepithelial cells; b – decrease in cell density in the subcapsular zone of the thymus cortex; c – small body of Hassall in the medulla; d – white pulp without reactive nodules with narrow periarterial sheaths (arrow) and an average width of the marginal zone; e – a decrease in the density and expansion of CD45RO+ lymphocytes. Hematoxylin and eosin (a-d), immunohistochemical reaction (e). Scanned specimens.

Специальные литературные обобщения [10] в аспекте проблемы постменопаузального остеопороза постулируют следующие положения о связях между эстрогенным статусом и иммунными механизмами.

1. Гемопоэтические и иммунные клеточные элементы по уровню экспрессии рецепторов эстрогенов группируются в порядке возрастания следующим образом: (гемопоэтические стволовые клетки, моноциты, миелоцитарные дендритные клетки) – (CD4+лимфоциты, CD8+лимфоциты, NK-клетки) – (B-лимфоциты, плазмоцитарные дендритные клетки). В этом ряду надо отметить наиболее высокий уровень экспрессии эстрогеновых рецепторов у B-клеточных элементов в связи с их антиостеопоротической ролью вследствие продукции антагониста RANKL остеопротегерина.

2. Противоостеокластогенное действие эстрогенов оказывают на систему RANKL/RANK/OPG с двух сторон: ингибируют продукцию ключевых факторов остеокластоге-

неза – моноцитарного/макрофагального колониестимулирующего фактора и лиганда рецепторов активаторов – RANKL; стимулируют продукцию протегерина – основного нейтрализатора («молекулярной ловушки») RANKL. Кроме этого, эстрогены обладают проапоптотическим действием на остеокласты.

3. Ключевыми клеточными регуляторами являются T-лимфоциты.

Зависимость иммунных механизмов от стероидных гормонов прямо или косвенно доказывается и при других состояниях организма. Например, установлены половые отличия реакции иммунных органов в постнатальном онтогенезе крыс Вистар при эндотоксинемии [11].

В аспекте собственно остеопоротических поражений роль иммунных механизмов в основном рассматривалась и рассматривается в связи с остеокластогенной системой RANKL/RANK и ее антагонистом – остеопротегерином (OPG). Среди значимых экспериментальных исследований, опубликованных в период становления

остеоиммунологии как научного направления, одними из первых следует отразить результаты работы Roggia C. et al. [12] и ряд других работ со сходными авторскими коллективами [13]. В исследовании на бестимусных мышцах C57BL, контрольных C57BLc «диким» генотипом и мышцах без продукции ФНО и отсутствием его рецепторов I (p55) или II (p75) установлено, что овариэктомия не вызывает остеорезорбтивных изменений у животных без Т-клеточного механизма ФНО- α -ФНО-рецепторы, но они возобновляются при восстановлении популяции клеток. В это же время клинически выявлено снижение уровня проокластогенных цитокинов при эстроген-заместительной терапии у постменопаузальных пациенток [14]. Т-лимфоциты и ФНО- α оказались в центре внимания как мощные регуляторы костного ремоделирования. Интерлейкины также не остались без внимания. Их влияние на остеорезорбцию ожидаемо оказалось связано с основным функциональным профилем: провоспалительным или противовоспалительным. Установлено, что посредником остеокластогенного эффекта ИЛ-1 является ФНО [15]. Это подтверждено и клинически антирезорбтивными эффектами рекомбинантного блокатора рецепторов ИЛ-1 – анакинры и ингибитора ФНО- α этанерцепта [16]. Давнюю историю имеет демонстрация роли ИЛ-6 [17]. Он не является ключевым в остеорезорбтивной активации остеокластов, но нокаутные по этому цитокину мыши защищены от индуцируемой овариэктомией потери костной массы. Во-вторых, при постменопаузальном остеопорозе наблюдается повышение уровня ИЛ-6. Это же выявлено при других остеодеструктивных заболеваниях: ревматоидном остеоартрите, болезни Педжета, почечной остеодистрофии. ИЛ-7, будучи активатором В-лимфоцитов и стимулятором миграции тимоцитов и заселения ими тканевых территорий, также расценивается как потенциальный участник регуляции костных изменений. В некоторых исследованиях показано, что этот цитокин оказывает остеокластогенное действие путем повышения продукции других цитокинов, включая RANKL [18], и эти процессы усиливаются дефицитом эстрогенов. *In vivo* блокада ИЛ-7 супрессирует экспансию Т-лимфоцитов, продукцию ФНО- α и гамма-интерферона, предотвращая костные потери при эстрогенной депривации [19]. Относительно современными являются идеи о роли микробиомов организма в развитии патологии с иммунно-воспалительными механизмами. Одной из них является патогенетическая концепция «кишечный микробиом – кости» [20], основанная на установлении роли лимфоцитов с провоспалительным фенотипом, в частности Th17. Но почти десятилетие

до этого значимый остеокластогенный эффект и его нивелирование эстрогенами установлены у для интерлейкин-17 продуцирующих Т-хелперов в *in vivo* и *ex vivo* исследованиях свода черепа и бедренной кости у овариэктомированных мышей [21]. Сходные с экспериментальным дизайном и использованными методами клинические данные малочисленны и поэтому заслуживают быть специально отмеченными. Одной из таких работ является исследование американских авторов [22], выполненное на пациентках после экстирпации матки с придатками по медицинским показаниям в сравнении с пременопаузальными пациентками без вмешательств на яичниках. Фактически данный материал соответствует стандартному дизайну эксперимента с моделированием эстроген-депривационного остеопороза билатеральной овариэктомией у животных. В динамике послеоперационного периода оценены минеральная плотность костей (поясничные позвонки, шейка левой бедренной кости), размеры тимуса (компьютерной томографией), иммунофенотипический и секреторный профили Т-лимфоцитов крови. В течение 3 месяцев послеоперационного наблюдения между группами не обнаружено отличий по соотношению между CD4 и CD8 лимфоцитами. Однако через месяц у овариэктомированных пациенток выявлено достоверно большее содержание активированных CD3+CD69+ Т-клеток и, что особенно значимо, CD3+TNF+ клеток, но без повышения содержания ФНО в среде для кондиционирования лимфоцитов. Через 3 месяца выявлено увеличение на 13% размера тимуса, которое сохранялось до 6 месяцев. Общий итог исследования авторы видят в доказательствах роли Т-клеточного звена иммунной системы в развитии остеорезорбции при эстрогенной депривации, проявлениями которой являются гипертрофия тимуса – признак увеличения Т-клеточной численности, и качественные изменения в виде увеличения фракции проокластогенных Т-клеток, продуцирующих ФНО.

Остеобласты непосредственно вовлечены в эстрогензависимые механизмы остеокластогенеза. Эстрогены участвуют в остеокластогенезе благодаря способности подавлять в ОБ экспрессию цитокинов RANKL и M-CSF, а также усиливать синтез OPG [23]. В исследованиях на клеточных культурах установлено, что эстрогены непосредственно не влияют на предшественников остеокластов, но при кокультивировании с остеобластами ингибировалось образование остеокластов [24]. Это указывало на то, что не прямой путь может играть более важную роль в регуляции влияния эстрогенов на развитие остеокластов. Другие данные свидетельствуют, что остеобласты вместе с другими стромальными

ми клетками костного мозга выделяют важные цитокины и факторы роста, которые стимулируют остеокластическую детерминацию гемопоэтических предшественников [25], а дефицит эстрогенов вызывает потерю костной массы за счет усиления выработки цитокинов иммунными клетками [5].

Таким образом, механизм, по которому дефицит эстрогенов вызывает потерю костной массы, представляется полимодальным, и взаимодействие между дефицитом эстрогенов и иммунными клетками может играть ключевую роль в регуляции костного гомеостаза. В экспериментах на мышах продемонстрировано не меньшее значение В-клеточного звена. Установлено увеличение количества В-лимфоцитов в костном мозге в период 2-4 недель после овариоэктомии [26]. С другой стороны, установлено снижение активности В-лимфоцитопоэза при воздействии как эстрогенов, так и одного из селективных модуляторов эстрогеновых рецепторов – ралоксифена [27]. Интересны и значимы данные о том, что при 20-дневном подкожном введении ИЛ-7 вызывает у мышей костные изменения и активацию В-лимфоцитопоэза аналогичные им при овариоэктомии [28], но они отсутствуют у нокаутных по рецептору данного интерлейкина животных.

Фармакологически активные вещества растительного происхождения давно находятся в поле зрения исследователей в связи с методами традиционной медицины. Так, первые экспериментальные исследования, выявившие иммуномодулирующий эффект ресвератрола, относятся к началу века. Gao X. et al. [29] исследовали его влияние на митоген/антиген-индуцированную пролиферацию лимфоцитов селезенки, индукцию цитотоксических Т-лимфоцитов и лимфокин-активируемых клеток-киллеров, выработку цитокинов (IFN- γ , IL-2, TNF- α и IL-12) и обнаружили, что индуцированная митогеном, IL-2 или аллоантигеном пролиферация лимфоцитов селезенки и выработка антигенспецифических цитотоксических лимфоцитов значительно подавлялись при приеме ресвератрола в дозе 25-50 мкг. Образование киллерных клеток при аналогичных концентрациях было менее чувствительным к подавляющему действию ресвератрола. Подавление клеточной пролиферации и выработки цитотоксических клеток ресвератролом были не только обратимыми, но и в некоторых случаях усиливались после предварительной обработки клеток им. Ресвератрол также ингибировал выработку IFN- γ и IL-2 лимфоцитами селезенки, а также выработку TNF- α и IL-2 перитонеальными макрофагами. Кроме этого, ресвератрол блокировал активацию ядерного фактора транскрипции

NF- κ B, не влияя на его базальную активность. Последний результат позволяет предположить, что ресвератрол ингибирует пролиферацию клеток, клеточно-опосредованную цитотоксичность и выработку цитокинов, по крайней мере, частично, за счет ингибирования активации NF- κ B.

В другом *in vitro* исследовании на спленocyтах мышей [30] при сравнении эффектов ресвератрола и широко распространенного для пищевых и медицинских целей полифенола куркумина сделано 6 основных выводов. Как ресвератрол, так и куркумин подавляют: пролиферацию Т-клеток, секрецию IFN и IL-4, пролиферацию В-клеток и выработку изотипов IgG1 и IgG2a, провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, TNF- α) и при этом усиливают уровень противовоспалительного цитокина IL-10; ресвератрол и куркумин снижают экспрессию CD80 и CD28; куркумин, но не ресвератрол, усиливает экспрессию CTLA-4; как куркумин, так и ресвератрол не способны модулировать CD4+CD25+регуляторные Т-клетки и экспрессию CD40.

Во втором десятилетии нынешнего века исследования влияния полифенолов на иммунные механизмы появились и в отечественной литературе [31]. В одной из работ этого периода [32] в *in vitro* эксперименте на мононуклеарных клетках периферической крови здоровых доноров выявлено дозозависимое влияние полифенольных комплексов календулы лекарственной, крапивы двудомной и рябины обыкновенной на индуцированный синтез цитокинов и иммуноглобулинов. Культивирование митогенстимулированных мононуклеарных клеток с полифенольным комплексом календулы в дозе 500 мкг/мл приводило к снижению синтеза ИЛ-2, интерферона- γ , IgM и IgG, тогда как в дозе 50 мкг/мл не влияло на данные показатели. Аналогичное действие наблюдали при применении полифенольных соединений крапивы. Однако инкубация клеток с изучаемыми соединениями в дозе 50 мкг/мл вызывала снижение уровня IgG. Полифенольные соединения рябины в обеих концентрациях оказывали выраженное подавляющее действие на выработку ИЛ-2, IFN γ , IgM и IgG митоген-активированными клетками. Изучаемые полифенольные комплексы в выбранных концентрациях не влияли на спонтанную и стимулированную продукцию ИЛ-4.

Новейшие работы [33] выявили влияние полифенолов (кверцетина и лютеонина) и на неспецифические механизмы врожденного иммунитета, реализуемые нейтрофилами.

За прошедшие два десятилетия опубликованы сотни работ. В Pubmed имеются 969 публикаций, посвященных не полифенолам вообще, а

только ресвератролу. В другой базе полнотекстовых публикаций различные, в том числе иммуотропные эффекты рассмотрены в 6690 обзорных публикациях. Мы кратко приведем выводы двух относительно недавних обзоров влияния полифенолов. В первом из них, датированным 2018 годом [34], проанализированы данные 218 публикаций. Сделано следующее заключение. Полифенолы регулируют иммунитет, влияя на регуляцию иммунных клеток, синтез провоспалительных цитокинов и экспрессию генов. Они инактивируют NF-Kb, модулируют митоген-активируемую протеинкиназу (МАРК) и арахидоновые кислоты. Полифенольные соединения ингибируют фосфатидилинозитид-3-киназу/протеинкиназу В (PI3K/AkT), ингибитор каппа-киназы/аминоконцевых киназ c-Jun (IKK/JNK), мишень рапамицинового комплекса 1 (mTORC1), который является белковым комплексом, контролирующим синтез белка, и JAK/STAT. Они могут подавлять экспрессию toll-подобных рецепторов (TLR) и провоспалительных генов. Их антиоксидантная активность и способность ингибировать ферменты, участвующие в производстве эйкозаноидов, также способствуют их противовоспалительным свойствам. Они ингибируют ферменты, участвующие в образовании активных форм кислорода: ксантиноксидаза и NADPH-оксидаза (NOX), усиливают регуляцию других эндогенных антиоксидантов. В другом обзоре 138 публикаций, посвященном только ресвератролу [35], приведены принципиально сходные обобщения. А именно, свидетельства того, что ресвератрол может играть полезную роль в профилактике и прогрессировании хронических заболеваний, связанных с воспалением, таких как диабет, ожирение, сердечно-сосудистые заболевания, нейродегенерация и других. Он регулирует иммунитет, вмешиваясь в регуляцию иммунных клеток, синтез провоспалительных цитокинов и экспрессию генов. На молекулярном уровне он воздействует на сиртуин, аденозинмонофосфаткиназу, NF-kB, воспалительные цитокины, антиоксидантные ферменты, а также на ключевые внутриклеточные процессы, такие как глюконеогенез, метаболизм липидов, биогенез митохондрий, ангиогенез и апоптоз. В контексте нашего исследования ресвератрола приведем данные о другом фармакологическом агенте из этой же группы – дайдзеине, химически сходном с ресвератролом и также являющимся фитоэстрогеном. Он содержится в бобовых культурах: соевых бобах, бобах мунг, произрастающих и используемых как пищевые компоненты в среднеазиатских странах и Индии, применяется в традиционной китайской медицине. Не приводя широкий спектр его фармакологических эффектов, ограничимся данными

одной из наиболее интересных для нашего исследования публикаций. В экспериментах на мышах Balb/c Tyagi A.M. et al [36] изучили влияние дайдзеина на значительное количество показателей через 6 недель после овариоэктомии. Установлены следующие эффекты терапии в дозе 0,01 мг/кг в день: предотвращение увеличения массы тимуса и селезенки, произошедшего у овариоэктомированных животных, уменьшение продукции активных кислородных радикалов, что расценено как значимый фактор предотвращения гиперпродукции ФНО, 50% снижение экспансии CD4+ клетками костного мозга и селезенки, такое же снижение количества В-лимфоцитов (CD20+ клеток) в костном мозге, снижение уровня циркулирующего TNF и его mPНК в CD4+ клетках костного мозга. В итоге выделены три ключевых антиостеопоротических эффекта дайдзеина: 1) ингибирование пролиферации ФНО-продуцирующих CD4+CD28-T-клеток; 2) предупреждение преждевременного старения T-клеток путем увеличения уровня mPНК нуклеолина; 3) ингибирование индуцированного дефицитом эстрогенов В-лимфоцитопоэза.

Резюмируя проанализированные литературные данные, можно заключить, что иммунная регуляция костного гомеостаза и ее участие в остеодеструктивных патологических процессах представляет собой сложную систему полимодальных взаимосвязей между клеточными участниками и гуморальными факторами. Первые представлены остеобластами, остеокластами, предшественниками обоих клеток и обоими типами лимфоцитов. Вторые – всем спектром цитокинов, центральное место среди которых занимает ФНО, являющийся и самостоятельным, первично действующим регулятором и медиатором действия интерлейкинов. Тем или иным путем иммунные влияния имеют целью регуляторную систему RANK/RANKL/OPG. Остеопротективный эффект как эстрогенов, так и препаратов, корригирующих их дефицит, реализуется двусторонним влиянием на эту систему: ингибированием остеокластогенной связи RANKL-RANK и усилением действия OPG. Полимодальность иммунных регуляторов проявляется как на уровне продуцируемых лимфоцитами цитокинов, так и на уровне межклеточных взаимодействий, прежде всего на территории костномозговых стромальных элементов с балансом прорезорбтивных и антирезорбтивных факторов, механизмы переключения в котором зависят от путей активации клеток.

В сопоставлении с литературными сведениями полученные нами данные позволяют сделать следующие выводы.

При формировании костных изменений остеопоротического типа, вызванных у экспериментальных животных – крыс Wistar, гипострогией на протяжении 4 недель, в костном мозге, тимусе и селезенке развиваются морфологические изменения, свидетельствующие о Т- и В-клеточной активации в иммунной системе с увеличением численности активированных тимоцитов с их миграцией в системный кровотоки и экспансией в белую пульпу селезенки и очаги остеокластической резорбции костных структур. В-клеточная активация проявляется лимфоцитозом костного мозга и формированием в белой пульпе селезенки реактивных лимфоидных узелков с признаками активного лимфоцитоза в виде как пролиферации лимфоидных клеток, так и их негативной селекции апоптозом.

Терапия ресвератролом на протяжении периода эстрогенной депривации наряду с остеопротективным и остеорепаративным эффектами оказывает негативное модулирующее действие на иммунные структуры, что может быть одним из путей снижения остеорезорбтивной активности остеокластов.

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.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

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. Arron J.R, Choi Y. Bone versus immune system. *Nature*. 2000;408(6812):535-536. DOI: 10.1038/35046196.
2. Michael H., Härkönen P.L., Väänänen H.K., Hentunen T.A. Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibit osteoclastogenesis and bone resorption. *J Bone Miner Res*. 2005;20(12):2224-2232. DOI: 10.1359/JBMR.050803.
3. Pacifici R. The immune system and bone. *Arch Biochem Biophys*. 2010;503(1):41-53. DOI: 10.1016/j.abb.2010.05.027.
4. Nakashima T., Takayanagi H. Osteoimmunology: crosstalk between the immune and bone systems. *J Clin Immunol*. 2009;29(5):555-567. DOI: 10.1007/s10875-009-9316-6.
5. Breuil V., Ticchioni M., Testa J., Roux C.H., Ferrari P., Breittmayer J.P., Albert-Sabonnadière C., Durant J., et al. Immune changes in post-menopausal osteoporosis: the Immunos study. *Osteoporos Int*. 2010;21(5):805-814. DOI: 10.1007/s00198-009-1018-7.
6. Должиков А.А., Шевченко О.А. Стимуляция пролиферации и остеобластической дифференцировки остеогенных предшественников как фармакологические эффекты ресвератрола при гипострогенном индуцированном остеопорозе: структурно-функциональные проявления и возможные механизмы. *Человек и его здоровье*. 2024;27(3):109–118. [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 (in Russ.)]. DOI: 10.21626/vestnik/2024-3/12. EDN: XMAUWW
7. 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.
8. Должиков А.А., Шевченко О.А., Должикова И.Н. Динамика структурно-функциональных изменений в проксимальном эпифизе бедренной кости при экспериментальном постменопаузальном остеопорозе и терапии ресвератролом. *Modern Science*. 2024;(7-1):42-50 [Dolzhikov A.A., Shevchenko O.A., Dolzhikova I.N. Dynamics of structural and functional changes in the proximal epiphysis of the femur in experimental postmenopausal osteoporosis and resveratrol therapy. *Modern Science*. 2024;(7-1):42-50 (in Russ.)]. EDN: MMYALY
9. Майлян Э.А., Камсадзе И.Г., Беседина Е.И., Костецкая Н.И., Зяблицев Д.В., Колесниченко Д.А., Ворожко А.А., Межова О.К. и др. Роль эстрогенов в регуляции иммунных факторов, участвующих в патогенезе постменопаузального остеопороза (обзор литературы). *Медико-социальные проблемы семьи*. 2021;26(3):124-130 [Majljan Je.A., Kamsadze I.G., Besedina E.I., Kosteckaja N.I., Zjableciv D.V., Kolesnichenko D.A., Vorozhko A.A., Mezhoval O.K., et al. The role of estrogens in the regulation of immune factors involved in the postmenopausal osteoporosis pathogenesis (literature review). *Medikosocial'nye problemy sem'i*. 2021;26(3):124-130 (in Russ.)]. EDN: WWXGBC.
10. Поворознюк В.В., Резниченко Н.А., Майлян Э.А. Иммунологические аспекты остеопороза. *Боль. Суставы. Позвоночник*. 2013;(3):21-26 [Povoroznjuk V.V., Reznichenko N.A., Majljan Je.A. Immunologic aspects of postmenopausal osteoporosis. *Bol'. Sustavy. Pozvonochnik*. 2013;(3):21-26 (in Russ.)]. DOI: 10.22141/2224-1507.3.11.2013.82325. EDN: RSAQBR.

11. Косырева А.М., Макарова О.В. Половые различия морфофункциональных изменений иммунной системы у крыс Вистар разных возрастных групп при экспериментальной эндотоксинемии. *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»*. 2020;(2):65–73 [Kosyreva A.M., Makarova O.V. Sex differences in morphofunctional changes in the immune system in Wistar rats of different age groups with experimental endotoxemia. *Kursk Scientific and Practical Bulletin "Man and His Health"*. 2020;2:65–73 (in Russ.)]. DOI: 10.21626/vestnik/2020-2/09. EDN: RYQYDO.
12. Roggia C., Gao Y., Cenci S., Weitzmann M.N., Toraldo G., Isaia G., Pacifici R. Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(24):13960-13965. DOI: 10.1073/pnas.251534698.
13. Cenci S., Weitzmann M.N., Roggia C., Namba N., Novack D., Woodring J., Pacifici R. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *J Clin Invest*. 2000;106(10):1229-1237. DOI: 10.1172/JCI11066.
14. Rogers A., Eastell R. The effect of 17beta-estradiol on production of cytokines in cultures of peripheral blood. *Bone*. 2001;29(1):30-34. DOI: 10.1016/s8756-3282(01)00468-9.
15. Wei S., Kitaura H., Zhou P., Ross F.P., Teitelbaum S.L. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest*. 2005;115(2):282-290. DOI: 10.1172/JCI23394.
16. Charatcharoenwithaya N., Khosla S., Atkinson E.J., McCready L.K., Riggs B.L. Effect of blockade of TNF-alpha and interleukin-1 action on bone resorption in early postmenopausal women. *J Bone Miner Res*. 2007;22(5):724-729. DOI: 10.1359/jbmr.070207.
17. Zheng S.X., Vrindts Y., Lopez M., De Groote D., Zangerle P.F., Collette J., Franchimont N., Geenen V., et al. Increase in cytokine production (IL-1 beta, IL-6, TNF-alpha but not IFN-gamma, GM-CSF or LIF) by stimulated whole blood cells in postmenopausal osteoporosis. *Maturitas*. 1997;26(1):63-71. DOI: 10.1016/s0378-5122(96)01080-8.
18. Giuliani N., Colla S., Sala R., Moroni M., Lazzaretti M., La Monica S., Bonomini S., Hojden M., et al. Human myeloma cells stimulate the receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) in T lymphocytes: a potential role in multiple myeloma bone disease. *Blood*. 2002;100(13):4615-4621. DOI: 10.1182/blood-2002-04-1121.
19. Ryan M.R., Shepherd R., Leavey J.K., Gao Y., Grassi F., Schnell F.J., Qian W.P., Kersh G.J., et al. An IL-7-dependent rebound in thymic T cell output contributes to the bone loss induced by estrogen deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(46):16735-16740. DOI: 10.1073/pnas.0505168102.
20. Ibáñez L., Rouleau M., Wakkach A., Blin-Wakkach C. Gut microbiome and bone. *Joint Bone Spine*. 2019;86(1):43-47. DOI: 10.1016/j.jbspin.2018.02.008.
21. Tyagi A.M., Srivastava K., Mansoori M.N., Trivedi R., Chattopadhyay N., Singh D. Estrogen deficiency induces the differentiation of IL-17 secreting Th17 cells: a new candidate in the pathogenesis of osteoporosis. *PLoS One*. 2012;7(9):e44552. DOI: 10.1371/journal.pone.0044552.
22. Adeel S., Singh K., Vydareny K.H., Kumari M., Shah E., Weitzmann M.N., Tangpricha V. Bone loss in surgically ovariectomized premenopausal women is associated with T lymphocyte activation and thymic hypertrophy. *J Invest Med*. 2013;61(8):1178-1183. DOI: 10.2310/JIM.0000000000000016.
23. Tella S.H., Gallagher J.C. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014;142:155-170. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2013.09.008.
24. Michael H., Härkönen P.L., Väänänen H.K., Hentunen T.A. Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibit osteoclastogenesis and bone resorption. *J Bone Miner Res*. 2005;20(12):2224-2232. DOI: 10.1359/JBMR.050803.
25. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(4):292-304. DOI: 10.1038/nri2062.
26. Miyaura C., Onoe Y., Kusano K., Ohta H., Nozawa S., Suda T. Estrogen deficiency stimulates B lymphopoiesis in mouse bone marrow. *J Clin Invest*. 1994;94(3):1090-1097. DOI: 10.1172/JCI117424.
27. Onoe Y., Miyaura C., Ito M., Ohta H., Nozawa S., Suda T. Comparative effects of estrogen and raloxifene on B lymphopoiesis and bone loss induced by sex steroid deficiency in mice. *J Bone Miner Res*. 2000;15(3):541-549. DOI: 10.1359/jbmr.2000.15.3.541.
28. Miyaura C., Onoe Y., Inada M., Maki K., Ikuta K., Ito M., Suda T. Increased B-lymphopoiesis by interleukin 7 induces bone loss in mice with intact ovarian function: similarity to estrogen deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(17):9360-9365. DOI: 10.1073/pnas.94.17.9360.
29. Gao X., Xu Y.X., Janakiraman N., Chapman R.A., Gautam S.C. Immunomodulatory activity of resveratrol: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production. *Biochem Pharmacol*. 2001;62(9):1299-1308. DOI: 10.1016/s0006-2952(01)00775-4.
30. Sharma S., Chopra K., Kulkarni S.K., Agrewala J.N. Resveratrol and curcumin suppress immune response through CD28/CTLA-4 and CD80 co-stimulatory pathway. *Clin Exp Immunol*. 2007;147(1):155-163. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2006.03257.x.
31. Борсук О.С., Масная Н.В., Шерстобоев Е.Ю., Исайкина Н.В., Калинкина Г.И. Сравнительная характеристика влияния полифенольных и полисахаридных соединений, выделенных из растений Сибири и Дальнего востока на систему иммунитета. *Российский аллергологический журнал*. 2011;(S4-1):60–61 [Borsuk O.S., Masnaja N.V., Sherstoboev E.Ju., Isajkina N.V., Kalinkina G.I. Comparative characteristics of the effect of polyphenolic and polysaccharide compounds isolated from plants of Siberia and the Far East on the immune system. *Russian journal of allergy*. 2011;(S4-1):60–61 (in Russ.)]. EDN: UPUEAF.
32. Шукшина Ю.Г., Масная Н.В., Исайкина И.В., Шерстобоев Е.Ю., Калинкина Г.И. Влияние растительных полифенольных комплексов на активность иммунокомпетентных клеток. *Иммунология*.

- 2014;35(3):138-142 [Shukshina Ju.G., Massnaja N.V., Isajkina I.V., Sherstoboev E.Ju., Kalinkina G.I. Influence of vegetative polyphenolic complexes on the functional activity of immunocompetent cells *in vitro*. *Immunologija*. 2014;35(3):138-142 (in Russ.)]. EDN: SJUZON.
33. Долгих О.В., Дианова Д.Г., Ширинкина А.С., Бомбела Т.В. Иммуномодулирующие свойства растительных полифенолов в экспериментальной модели *in vitro*. *Медицинская иммунология*. 2024;26(1):143-150 [Dolgikh O.V., Dianova D.G., Shirinkina A.S., Bombela T.V. Immunomodulatory properties of plant polyphenols shown in an *in vitro* experimental model. *Meditinskaya immunologiya*. 2024;26(1):143-150 (in Russ.)]. DOI: 10.15789/1563-0625-IPO-2655. EDN: FQZKER.
34. Yahfoufi N., Alsadi N., Jambi M., Matar C. The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. *Nutrients*. 2018;10(11):1618. DOI: 10.3390/nu10111618.
35. Malaguarnera L. Influence of Resveratrol on the Immune Response. *Nutrients*. 2019;11(5):946. DOI: 10.3390/nu11050946.
36. Tyagi A.M., Srivastava K., Sharan K., Yadav D., Maurya R., Singh D. Daidzein prevents the increase in CD4+CD28null T cells and B lymphopoiesis in ovariectomized mice: a key mechanism for anti-osteoclastogenic effect. *PLoS One*. 2011;6(6):e21216. DOI: 10.1371/journal.pone.0021216.

Поступила в редакцию 14.12.2024

Подписана в печать 25.10.2025

Для цитирования: Должиков А.А., Шевченко О.А. Морфологические проявления иммуномодулирующего эффекта ресвератрола при экспериментальном постменопаузальном остеопорозе. *Человек и его здоровье*. 2025;28(4):94–106. DOI: 10.21626/vestnik/2025-4/11. EDN: PSCAGP.

MORPHOLOGICAL MANIFESTATIONS OF THE IMMUNOMODULATORY EFFECT OF RESVERATROL IN POSTMENOPAUSAL OSTEOPOROSIS

© Dolzhikov A.A., Shevchenko O.A.

Belgorod State National Research University (NRU "BelsU")

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

Objective – the research of morphological changes in bone marrow, thymus, and spleen in experimental postmenopausal osteoporosis and its treatment with resveratrol.

Material 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 28 days. Resveratrol therapy in the experimental group was administered daily intraperitoneally at a dose of 2 mg/kg for the same period of observation. Histological and densitometric examinations of the proximal femur, as well as histological and immunohistochemical examinations of the thymus and spleen with computer image analysis and morphometry, were performed.

Results. Bilateral ovariectomy in experimental animals, Wistar rats, 4 weeks after ovariectomy, together with osteoporotic lesions, leads to increased proliferation of cortical thymocytes, accompanied by activation of the reticuloepithelial microenvironment, increased migration of activated (CD45RO+) thymocytes to the spleen, and activation of B-lymphocytopoiesis in the bone marrow and spleen. Resveratrol therapy reduces the severity of morphological manifestations of T- and B-cell activation in the immune system.

Conclusion. In experimental animals, Wistar rats, hypoestrogenism for 4 weeks caused morphological changes in the bone marrow, thymus, and spleen, indicating T- and B-cell activation in the immune system. Resveratrol therapy during the period of estrogen deprivation, along with its osteoprotective and osteoreparative effects, has a negative modulatory effect on immune structures, which may be one of the ways to reduce the osteoresorptive activity of osteoclasts.

Keywords: postmenopausal osteoporosis; immune system; resveratrol.

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

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

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.

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 claim that there are no sources of funding.

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 14.12.2024

Accepted 25.10.2025

For citation: Dolzhikov A.A., Shevchenko O.A. Morphological manifestations of the immunomodulatory effect of resveratrol in postmenopausal osteoporosis. *Humans and their health*. 2025;28(4):94–106. DOI: 10.21626/vestnik/2025-4/11. EDN: PSCAGP.