

## Изучение влияния фитοэкстракта на основе шелухи и зародышевой пленки риса, зеленого чая на функциональные свойства клеток, участвующих в метаболизме костной ткани

Н.А. Ситникова, Н.А. Бондаренко, А.О. Кушнарeнко

НИИ клинической и экспериментальной лимфологии –  
филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН  
630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

### Резюме

Остеопороз – это заболевание, связанное со снижением плотности и качества костной ткани. Костная ткань особенно чувствительна к изменениям содержания микроэлементов в организме. Дефицит макро- и микроэлементов (кремний, кальций, марганец и др.) может привести к развитию остеопороза. Цель исследования – изучение влияния фитοкомплекса НаБиКат на жизнеспособность и функциональную активность фибробластов, мезенхимальных стволовых клеток (МСК), остеобластов и остеокластов, участвующих в метаболизме костной ткани при остеопорозе. **Материал и методы.** В работе использовали водный раствор фитοкомплекса НаБиКат, состоящего из шелухи и зародышевой пленки риса, зеленого чая; содержание в нем базовых химических элементов измеряли с использованием атомно-иммерсионного спектрального анализа. Цитотоксичность фитοэкстракта оценивали на фибробластах, МСК, остеобластах человека с помощью МТТ-теста. Активность митохондрий в клетках определяли методом окраски флуоресцентным красителем ТМРМ. Продукцию внутриклеточных белков в остеобластах, остеокластах оценивали с помощью проточной цитометрии. **Результаты и их обсуждение.** В водном растворе фитοэкстракта обнаруживается в большом количестве натрий, калий, кремний, марганец, магний и небольшое количество кальция, железа. Фитοэкстракт не оказывал цитотоксического действия на фибробласты и стимулировал пролиферацию МСК и остеобластов до 112–128 и 130 % соответственно. В максимальной концентрации фитοкомплекс снижал пролиферацию остеобластов. Активность митохондрий в МСК и остеобластах фитοэкстракт повышал, в фибробластах и остеокластах – уменьшал. Под его влиянием в остеобластах наблюдалось увеличение синтеза белка RANKL, количество коллагена 1 типа не изменялось, а в остеокластах снижалась продукция катепсина К, при этом содержание MMP-9 оставалось прежним. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют о том, что водный фитοэкстракт на основе шелухи и зародышевой пленки риса, листьев зеленого чая является безопасным для МСК, фибробластов, остеобластов, остеокластов человека и способен стимулировать функциональную активность остеобластов, а также снижать активность остеокластов благодаря высокому содержанию макро- и микроэлементов.

**Ключевые слова:** фитοкомплекс, кремний, остеобласты, мезенхимальные стволовые клетки, остеокласты, пролиферация, активность митохондрий, остеопороз.

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

**Финансирование.** Работа выполнена по теме государственного задания № FWNR-2024-0005.

**Автор для переписки:** Ситникова Н.А., e-mail: sitnikovanat9@gmail.com

**Для цитирования:** Ситникова Н.А., Бондаренко Н.А., Кушнарeнко А.О. Изучение влияния фитοэкстракта на основе шелухи и зародышевой пленки риса, зеленого чая на функциональные свойства клеток, участвующих в метаболизме костной ткани. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2024;44(3):142–150. doi: 10.18699/SSMJ20240316

## Study of the effect of phytoextract based on rice husk and germ film, green tea on the functional properties of cells involved in bone tissue metabolism

N.A. Sitnikova, N.A. Bondarenko, A.O. Kushnarenko

Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology –  
Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS  
630060, Novosibirsk, Timakova st., 2

## Abstract

Osteoporosis is a disease associated with a decrease of bone density and quality. Bone tissue is especially sensitive to changes in trace element content in the body. Deficiency of macro- and microelements (silicon, calcium, manganese, etc.) can lead to the development of osteoporosis. The aim of the research was to study the effect of NaBiKat phytoextract on the viability and functional activity of fibroblasts, mesenchymal stem cells (MSCs), osteoblasts and osteoclasts, involved in bone metabolism in osteoporosis. **Material and methods.** An aqueous solution of the NaBiKat phytocomplex consisting of rice husks and germ film, green tea was used in the work; its content of basic chemical elements was measured using atomic immersion spectral analysis. The cytotoxicity of the phytoextract was evaluated on fibroblasts, MSCs, and osteoblasts of humans using the MTT test. The activity of mitochondria in cells was assessed by staining with a fluorescent dye TMRM. The production of intracellular proteins in osteoblasts and osteoclasts was determined using flow cytometry. **Results and discussion.** In an aqueous solution of phytoextract, a large amount of sodium, potassium, silicon, manganese, magnesium and a small amount of calcium, iron are found. The phytoextract did not have a cytotoxic effect on fibroblasts and stimulated proliferation of MSCs and osteoblasts up to 112–128 % and up to 130 %, respectively. At maximum concentration, the phytocomplex reduced osteoblast proliferation. Phytocomplex enhanced mitochondria activity in MSCs and osteoblasts, reduced in fibroblasts and osteoclasts. Under its influence, an increase in RANKL synthesis was observed in osteoblasts, the amount of type 1 collagen did not change, and cathepsin K production decreased in osteoclasts, while it did not significantly affect MMP-9 content. **Conclusions.** The results obtained indicate that an aqueous phytoextract based on rice husk and germ film, green tea leaves is safe for MSCs, fibroblasts, osteoblasts, and osteoclasts in humans and is able to stimulate the functional activity of osteoblasts, as well as reduce the activity of osteoclasts due to the high content of macro- and microelements.

**Key words:** phytocomplex, silicium, osteoblasts, mesenchymal stem cells, osteoclasts, proliferation, mitochondrial activity, osteoporosis.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Financing.** The work was carried out according to state assignment № FWNR-2024-0005.

**Correspondence author:** Sitnikova N.A., e-mail: sitnikovanat9@gmail.com

**Citation:** Sitnikova N.A., Bondarenko N.A., Kushnarenko A.O. Study of the effect of phytoextract based on rice husk and germ film, green tea on the functional properties of cells involved in bone tissue metabolism. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal* = *Siberian Scientific Medical Journal*. 2024;44(3):142–150. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20240316

## Введение

При остеопорозе (заболевание, связанное со снижением плотности и качества костной ткани) кости становятся хрупкими, что значительно увеличивает риск переломов. Основной причиной остеопороза помимо старения является образ жизни современного человека: малоподвижность, однообразное питание, ожирение, дефицит витаминов и микроэлементов, что служит причиной нарушения обмена веществ в организме [1]. Прочность костей определяют их минеральная плотность кости и качество, а именно архитектура, минерализация матрикса и состав коллагена [2]. Костная ткань подвергается обновлению за счет ремоделирования, контролируемого остеокластами, остеобластами и остеоцитами; дисбаланс между резорбцией и образованием костной ткани во время ремоделирования остается основной причиной остеопороза [3].

Костная ткань особенно чувствительна к изменениям содержания микроэлементов в организме. При этом она является основным местом депонирования некоторых микроэлементов; так, в костях содержится 60–65 % магния (частич-

но – на их поверхности для поддержания внеклеточной концентрации), 43 % марганца, до 90 % кальция [4, 5]. Магний необходим для работы большого количества ферментов, в том числе участвующих в процессах ремоделирования костной ткани. Показано, что при недостатке внеклеточного магния (в результате снижения уровня 1,25-дигидроксивитамина D3 в плазме крови) и кальция стимулируется образование и активность остеокластов [4, 5], а следовательно, разрушение межклеточного вещества костной ткани и его высвобождение в кровь. В свою очередь медь является кофактором лизилоксидазы, осуществляющей кросс-линкинг между нитями коллагена и эластина, а цинк необходим для активного функционирования остеобластов [6]. Показано, что у женщин после менопаузы, имеющих остеопороз, наблюдалось значимое снижение концентрации данных микроэлементов в плазме крови [5, 7, 8]. Показано, что при уменьшении потребления и падении содержания микроэлементов Mn, Zn и Cu уровень Ca в плазме крови повышается, при этом снижаясь в костной ткани [6].

Значимую роль в профилактике и лечении остеопороза также играет кремний, поскольку

улучшает качество костного матрикса и способствует минерализации костей. Показано, что повышенное потребление биодоступного кремния связано с увеличением минеральной плотности костей, так как кремний играет важную роль в образовании поперечных связей между коллагеном и протеогликанами [9]. Таким образом, дефицит любого из представленных макро- и микроэлементов независимо друг от друга может привести к развитию остеопороза [7].

Современные методы лечения остеопороза направлены на ингибирование резорбции кости и снижение ее ремоделирования. Используемые лекарственные препараты улучшают минеральную плотность костей, но их длительное применение сопряжено с различными побочными эффектами [3, 10]. В связи с этим продолжается поиск новых препаратов, направленных на восстановление микроэлементного состава в организме, что будет препятствовать разрушению костной ткани и стимулировать образование межклеточного вещества и его минерализацию [11]. Цель исследования – изучение влияния водного раствора фитоэкстракта на основе шелухи и зародышевой пленки риса, зеленого чая на жизнеспособность и функциональную активность фибробластов, мезенхимальных стволовых клеток (МСК), остеобластов и остеокластов, участвующих в метаболизме костной ткани при остеопорозе.

## Материал и методы

В работе использованы культуры МСК костного мозга человека, фибробластов легких человека (клеточная линия MRC-5), остеобластов человека (клеточная линия U2-OS), а также первичная линия остеокластов человека. Все культуры клеток культивировались в среде DMEM (Sigma-Aldrich, США), содержащей 10 % FBS (Gibco, США), смесь антибиотика-антимикотика (а/а) в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора (5 % CO<sub>2</sub>, 95 % влажности, 37 °C). Остеокласты человека получали путем дифференцировки мононуклеаров крови человека. Мононуклеары выделяли из крови донора, давшего информированное согласие, протокол исследования одобрен этическим комитетом НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН (протокол № 184 от 20.10.2023). Мононуклеары выделяли из крови на градиенте плотности фикола, дважды отмывали фосфатно-солевым буфером (PBS). Клетки высаживали в 6-луночные планшеты по 1×10<sup>6</sup> клеток/луночку в среде α-MEM, 20 % FBS, а/а + 25 нг/мл MSC-F (Atagenix; Китай). Через 24 ч среду заменяли на α-MEM, 10 % FBS, а/а + 25 нг/мл MSC-F +

+ 75 нг/мл белка RANKL (Elabscience, США). Дифференцировка проводилась в течение 12 дней в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора со сменой среды каждые четыре дня.

В работе исследовали сухой фитокомплекс НаБиКат, который производится из растительных компонентов (рисовой шелухи, зародышевой пленки риса и листьев зеленого чая) в ООО «Центр внедрения технологий» (г. Новосибирск). Фитокомплекс получали путем механического измельчения, ферментации и хелатирования кремниевых соединений в биодоступную форму по запатентованной технологии [12]. Для получения водного экстракта его разводили в дистиллированной воде (200 мг/мл), инкубировали 24 ч при 37 °C и фильтровали через фильтр 220 нм. Определение химического состава водного раствора фитоэкстракта выполняли с помощью атомно-иммерсионного спектрального анализа на спектрометре iCAP-6500 (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве референтного препарата использовали биологически активную добавку «Экстракт бамбука (кремний)» ООО «Биофарм», содержащую 25 мг кремния. Содержимое одной капсулы растворяли в 1 мл дистиллированной воды и пропускали через фильтр 220 нм.

Цитотоксичность фитоэкстракта изучали методом МТТ-теста. Клетки были посажены в 96-луночные планшеты по 5×10<sup>3</sup> кл/луночку, через 24 ч водный раствор фитоэкстракта (5 мг/мл) добавляли с дальнейшим шагом разведения в 2 раза, инкубировали в течение 3 сут в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора. Поглощение растворенных кристаллов формазана измеряли при длине волны 540 нм на спектрофотометре Multiskan Sky (Thermo Fisher Scientific, США).

Активность митохондрий в клетках исследовали с помощью флуоресцентного красителя тетраметилродамина (ТМРМ) (Invitrogen, США). Клетки высаживали в 12-луночные планшеты по 25×10<sup>3</sup> кл/луночку. Через 5 ч добавляли водный раствор фитоэкстракта в концентрации 2,5 мг/мл для МСК, фибробластов и в концентрации 0,625 мг/мл для остеобластов и остеокластов. Клетки инкубировали в течение 3 сут, добавляли ТМРМ в концентрации 200 нМ и через 30 мин исследовали на флуоресцентном инвертированном микроскопе Axio Observer (Carl Zeiss, Германия).

Пролиферативную активность остеобластов исследовали с помощью набора Click-iT EdU-488 Cell Proliferation Detection Kit (Servicebio, Китай). Клетки рассаживали по 5×10<sup>3</sup> клеток в 96-луночный планшет, фитоэкстракт и референтный препарат добавляли в концентрации 0,625 мг/мл. Через 72 ч вносили 5-этинил-2'-деоксиуридин (EdU), еще через 2 ч – Hoescht 33342. Спустя

30 мин производили фиксацию и проявление окраски согласно инструкции производителя. Долю пролиферирующих клеток вычисляли как соотношение количества EdU-позитивных (пролиферирующих) к количеству Hoescht 33342-позитивных клеток (общее количество) в зрительном поле.

Функциональную активность остеобластов и остеокластов изучали по уровню внутриклеточных белков, определяемому с помощью проточной цитометрии. Остеобласты высаживали в 6-луночные планшеты по  $1 \times 10^5$  клеток на лунку. Дифференцированные остеокласты активировали добавлением 75 нг/мл RANKL. Через 24 ч в лунки вносили фитоэкстракт в концентрации 0,625 мг/мл и инкубировали 3 дня. Далее клетки промывали PBS, осаждали центрифугированием в течение 5 минут при 1200 g, фиксировали 4%-м раствором параформальдегида в течение 15 мин, затем пермеабелизировали 0,1%-м раствором сапонины в течение 5 мин. Клетки инкубировали в течение 30 мин в блок-буфере (PBS + 10 % козьей сыворотки), после чего добавляли первичные антитела в буфере (3 % BSA в PBS) в течение 60 мин в темноте. Использовали первичные антитела к катепсину К (rabbit-anti-human) (PAA-267Hu02, Cloud-Clone Corp., США), RANKL (mouse-anti-human) (FAA855Hu02, Cloud-Clone Corp.), матричному металлопротеину-9 (MMP-9) (mouse-anti-human) (BF0560, Affinity Biosciences, США), коллагену 1 типа (ab34710, Великобритания). После первичных антител клетки промывали, добавляли вторичные антитела Alexa fluor 488 Goat Anti-Rabbit IgG H&L, Alexa Fluor 647 Goat anti-mouse IgG H&L (Thermo Fisher Scientific) на 30 мин в темноте, затем вновь промывали, разводили в 500 мкл PBS и анализировали в течение 60 мин.

Переменные представлены в виде среднего арифметического и среднеквадратического отклонения ( $M \pm SD$ ). Оценка данных по критерию

Колмогорова – Смирнова показала, что распределение отличалось от нормального, и для оценки различий использовали критерий Манна – Уитни. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы ( $p$ ) принимали равным 0,05.

## Результаты

С помощью атомно-иммерсионного спектрального анализа определено содержание базовых химических элементов водного раствора фитоэкстракта (таблица). В исследуемом водном растворе фитоэкстракта в наибольшем количестве присутствуют ионы натрия и калия, что связано с добавками карбоната натрия в качестве гидролизующего агента при производстве фитокомплекса [12]. Также отмечается высокое содержание магния, кремния и марганца, небольшое количество кальция и железа.

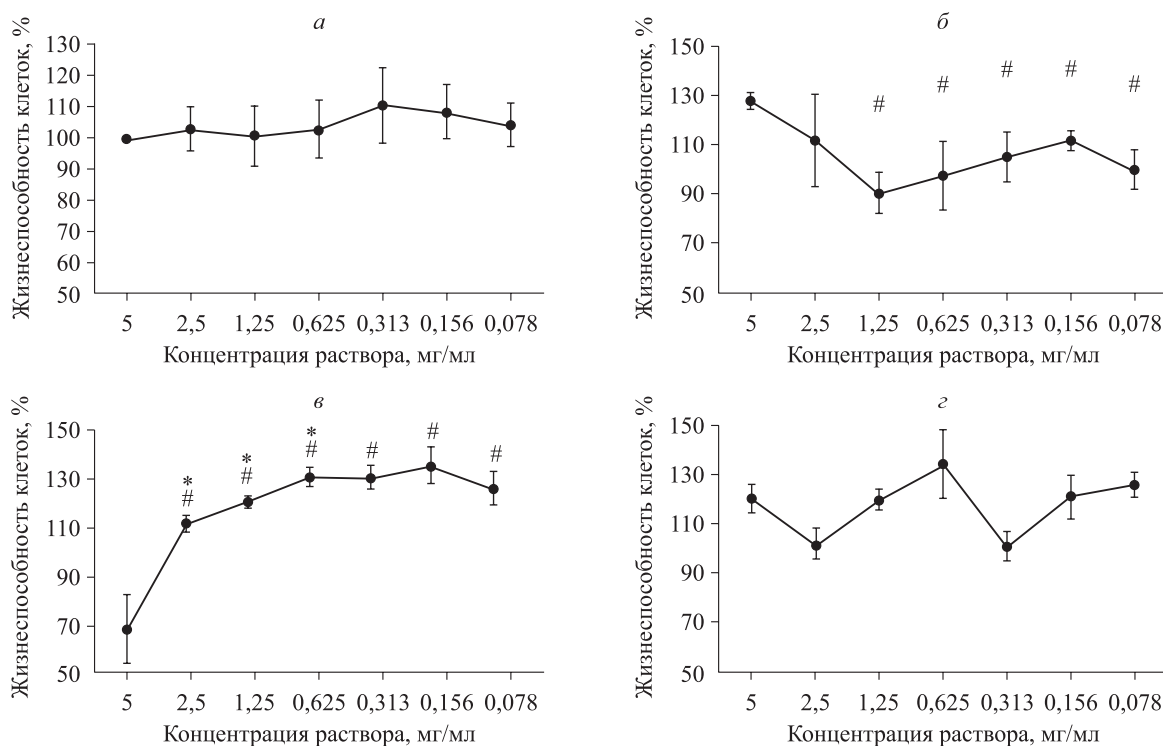
На первом этапе исследования была оценена цитотоксичность фитоэкстракта на клетках соединительной ткани человека. Так, во всех исследуемых концентрациях фитоэкстракт не оказывал цитотоксического влияния на фибробласты, жизнеспособность клеток была выше 100 % (рис. 1, а). МСК при инкубировании с фитоэкстрактом в концентрации 5 и 0,156 мг/мл демонстрировали увеличение пролиферативной активности (рис. 1, б). Жизнеспособность остеобластов, напротив, снижалась до 69 % при концентрации раствора 5 мг/мл, а при ее уменьшении – увеличивалась (рис. 1, в). Максимальное увеличение жизнеспособности остеобластов до 130 % наблюдалось при воздействии фитоэкстракта в концентрации 0,625 мг/мл, которая была выбрана для дальнейшей работы с клетками. Референтный препарат оказал стимулирующее воздействие на остеобласты во всех концентрациях, с максимальным увеличением пролиферативной активности в дозе 0,625 мг/мл (рис. 1, г).

Влияние фитопрепарата на пролиферацию клеток также исследовано с помощью окрашива-

*Элементный состав водного раствора фитоэкстракта, полученного из сухого фитокомплекса НаБиКат, n = 5*

*Elemental composition of an aqueous solution of phytoextract obtained from the dry phytocomplex NaBiKat, n = 5*

| Химический элемент | Содержание, мкг/мл | Химический элемент | Содержание, мкг/мл | Химический элемент | Содержание, мкг/мл |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Na                 | 8675,0 ± 795,17    | Mn                 | 16,4 ± 1,33        | Zn                 | 2,1 ± 0,66         |
| K                  | 2700,0 ± 40,82     | Ca                 | 15,3 ± 0,86        | B                  | 1,0 ± 0,11         |
| Si                 | 119,3 ± 5,71       | Fe                 | 5,7 ± 0,87         | Sr                 | 0,4 ± 0,06         |
| Mg                 | 116,3 ± 11,35      | Al                 | 5,0 ± 0,55         | Ba                 | 0,1 ± 0,0          |
| P                  | 73,0 ± 0,58        | Rb                 | 2,4 ± 0,45         | Cu                 | 0,1 ± 0,01         |



**Рис. 1.** Цитотоксичность фитоэкстракта в отношении фибробластов легких (а), МСК (б), остеобластов (в), референтного препарата в отношении остеобластов (з). Обозначены статистически значимые ( $p < 0,05$ ) отличия от величин соответствующих показателей: \* – предыдущего значения концентрации; # – концентрации 5 мг/мл

**Fig. 1.** Cytotoxicity of the phytoextract against lung fibroblasts (a), MSCs (б), osteoblasts (в), and of the reference drug against osteoblasts (з). \* – compared to the previous concentration value; # – compared to 5 mg/ml

ния EdU. В отличие от референтного препарата фитоэкстракт в концентрации 0,625 мг/мл достоверно увеличивал пролиферативную активность остеобластов относительно контрольных значений, доля делящихся клеток составила  $43,20 \pm 0,82$ ,  $48,55 \pm 1,80$  и  $40,75 \pm 1,44$  % соответственно (количество полей при подсчете – 20) (рис. 2).

Активность митохондрий под воздействием фитоэкстракта в клетках изменялась по-разному. В культуре фибробластов количество ТМРМ-позитивных клеток под влиянием фитоэкстракта снизилось до  $84 \pm 2,5$  % относительно контроля, который был взят за 100 % ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует о некотором уменьшении функциональной активности митохондрий. Воздействие фитоэкстракта приводило к существенному повышению числа ТМРМ-позитивных МСК и остеобластов (соответственно до  $152 \pm 2,8$  и  $157 \pm 9,3$  %,  $p < 0,05$ ), в то время как количество ТМРМ-позитивных остеокластов снизилось (до  $59,9 \pm 1,3$  %,  $p < 0,05$ ).

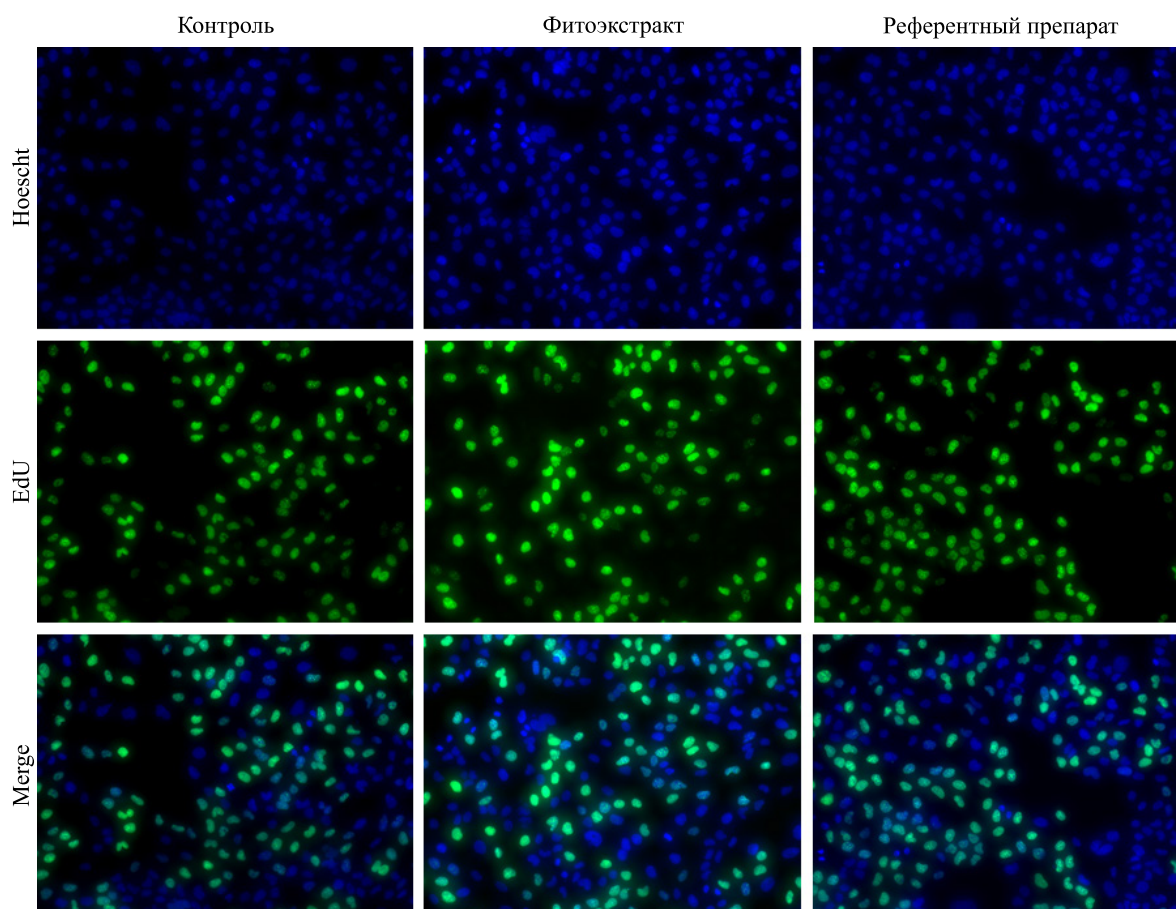
При исследовании влияния фитоэкстрактов на активность синтеза ключевых белков и ферментов, которые непосредственно участвуют в

метаболизме костной ткани, обнаружено увеличение содержания RANKL в остеобластах (рис. 3, а) и снижение уровня катепсина К в остеокластах (рис. 3, б), количество клеток, экспрессирующих MMP-9 и коллаген 1 типа, не изменилось (см. рис. 3).

## Обсуждение

При анализе химического состава водного раствора фитоэкстракта выявлено, что в наибольшем количестве в нем содержатся натрий и калий, так как соединения данных элементов являются водорастворимыми и в полной мере переходят в водный раствор из сухого вещества. Отмечается, что более высокое потребление натрия сопровождается значительно меньшим количеством переломов бедра [13]; ежедневное потребление калия связано со снижением риска остеопороза поясничного отдела позвоночника у женщин в постменопаузе [14].

Фитоэкстракт содержит большое количество кремния, и по имеющимся данным в сухом веществе содержание кремния составляет около 16 %, часть которого представлена хелатированной,

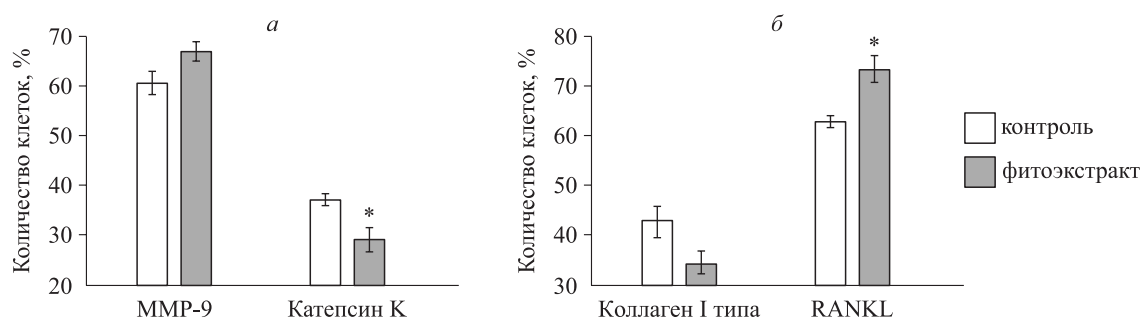


**Рис. 2.** Проллиферативная активность остеобластов при инкубации с фитоэкстрактом и референтным препаратом; окраска EdU (зеленый) и Hoescht 33342 (синий)

**Fig. 2.** Proliferative activity of osteoblasts during incubation with phytoextract and reference drug; staining with EdU (green) and Hoescht 33342 (blue)

биодоступной формой [15]. Показано, что кремний участвует в процессах образования и минерализации костной ткани. Это особенно важно для формирования и восстановления длинных трубчатых костей и увеличения плотности костной ткани, что необходимо при остеопорозе [16,

17]. Точный механизм действия кремния еще не изучен, однако показано, что он способен связываться с некоторыми гликозаминогликанами, гиалуроновой кислотой, полиуронидами – компонентами соединительной ткани [18]. Необходимо отметить, что в составе рисовой шелухи,



**Рис. 3.** Содержание внутриклеточных белков под влиянием фитоэкстракта в остеокластах (а) и остеобластах (б); \* – отличие от величины соответствующего показателя группы контроля статистически значимо при  $p < 0,05$

**Fig. 3.** Content of intracellular proteins under the influence of phytoextract in osteoclasts (a) and osteoblasts (б); \* –  $p < 0.05$  compared to control

входящей в фитокомплекс, диоксид кремния в основном находится в гидрированной аморфной форме, которая усваивается в организме человека [19, 20].

Содержание в изучаемом фитоэкстракте кальция, магния и железа достаточно невелико относительно среднесуточной потребности организма взрослого человека, и данные химические элементы могут оказывать лишь незначительное влияние на организм. В силу значительного содержания в водном растворе фитоэкстракта марганец способен оказать стимулирующее действие на клетки костной ткани, поскольку он играет роль кофактора во многих ферментативных реакциях окисления в митохондриях, а также в образовании внеклеточного матрикса [6]. Все представленные химические элементы, в частности марганец, содержатся в листьях зеленого чая (*Camellia sinensis*), которые входят в состав фитокомплекса и переходят в водный раствор [21].

Фитоэкстракт не токсичен для фибробластов. Все типы клеток (МСК, остеобласты, фибробласты) увеличивают свою жизнеспособность и пролиферативную активность при добавлении низких концентраций фитоэкстракта, что можно объяснить действием кремния, так как референтный препарат также оказывает схожий стимулирующий эффект на пролиферацию остеобластов. При этом содержание кремния в сухом веществе исследуемого фитоэкстракта больше, чем в референтном препарате (соответственно 16 и 6,8 %). В исследовании показано, что кремний, магний и цинк способны усиливать пролиферацию остеобластов и МСК, так как являются необходимыми компонентами для синтеза ДНК [22]; МСК же являются предшественниками остеобластов в организме и способны дифференцироваться в них под влиянием сигнальных молекул [23]. В свою очередь цитотоксичность фитопрепарата в высоких концентрациях (5 и 2,5 мг/мл) может быть объяснена действием кремния, поскольку имеются данные о его способности в больших дозах провоцировать гибель клеток путем апоптоза [24].

Полученные данные указывают на повышенную продукцию энергии митохондриями МСК и остеобластов, что имеет большое значение для остеопороза, при котором происходит снижение функциональной активности клеток, продуцирующих межклеточный матрикс. Кроме того, факторы, запускающие процесс минерализации, также изначально продуцируются в митохондриях [25]; именно остеобласты синтезируют компоненты межклеточного вещества кости, которых недостаточно при остеопорозе [26]; магний и марганец стимулируют синтез межклеточного вещества кости, для этого требуется энергия [5, 8].

В то же время фитоэкстракт снижал активность митохондрий в остеокластах, что имеет значение для остеопороза, поскольку при данном заболевании возрастает функциональная активность остеокластов, резорбирующих костную ткань [3].

Под действием фитоэкстракта содержание коллагена 1 типа – основного компонента костной ткани – статистически значимо не изменяется, при этом увеличивается количество белка RANKL. Данный белок является лигандом к рецептору RANK на остеокластах, активация которого необходима для дифференцировки остеокластов и повышения их активности. Существует несколько способов блокировки взаимодействия RANKL и RANK, к примеру, влияние эстрогена на остеокласты, конкурентное связывание RANKL с остеопротегерином [27], и в данном исследовании мы не можем в полной мере оценить влияние фитоэкстракта на повышение уровня RANKL. Как сказано выше, поскольку остеокласты являются клетками, разрушающими костную ткань, при остеопорозе их активность возрастает. Под влиянием исследуемого фитоэкстракта мы наблюдали снижение в остеокластах количества катепсина К, который участвует в разрушении межклеточного вещества костной ткани [27]. Существует необходимость контролировать активность остеокластов для предотвращения развития остеопороза, при этом нельзя допустить ее полного ингибирования, так как без разрушения межклеточного вещества кости не будет происходить обновление костной ткани.

## Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что водный фитоэкстракт на основе шелухи и зародышевой пленки риса, листьев зеленого чая не оказывает токсического эффекта на МСК, фибробласты, остеобласты человека и безопасен для дальнейших исследований. Фитоэкстракт способен стимулировать пролиферацию, активность митохондрий МСК и остеобластов, а также снижать функциональную активность остеокластов благодаря высокому содержанию макро- и микроэлементов, в частности кремния в биодоступной форме. Таким образом, данный состав является перспективным для дальнейшего изучения в качестве биологически активной добавки для профилактики развития и лечения остеопороза.

## Список литературы / References

1. Cosman F., de Beur S.J., LeBoff M.S., Lewiecki E.M., Tanner B., Randall S., Lindsay R.; National Osteoporosis Foundation. Clinician's guide to

- prevention and treatment of osteoporosis. *Osteoporos. Int.* 2014;25(10):2359–2381. doi: 10.1007/s00198-014-2794-2
2. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA.* 2001;285(6):785–795. doi: 10.1001/jama.285.6.785
3. Kim B., Cho Y., Lim W. Osteoporosis therapies and their mechanisms of action (Review). *Exp. Ther. Med.* 2021;22(6):1379. doi: 10.3892/etm.2021.10815
4. Zofková I., Nemcikova P., Matucha P. Trace elements and bone health. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013;51(8):1555–1561. doi: 10.1515/cclm-2012-0868
5. Belluci M.M., Schoenmaker T., Rossa-Junior C., Orrico S.R., de Vries T.J., Everts V. Magnesium deficiency results in an increased formation of osteoclasts. *J. Nutr. Biochem.* 2013;24(8):1488–1498. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.12.008
6. Saltman P.D., Strause L.G. The role of trace minerals in osteoporosis. *J. Am. Coll. Nutr.* 1993;12(4):384–389. doi: 10.1080/07315724.1993.10718327
7. Okyay E., Ertugrul C., Acar B., Sisman A.R., Onvural B., Ozaksoy D. Comparative evaluation of serum levels of main minerals and postmenopausal osteoporosis. *Maturitas.* 2013;76(4):320–325. doi: 10.1016/j.maturitas.2013.07.015
8. Wang L., Yu H., Yang G., Zhang Y., Wang W., Su T., Ma W., Yang F., Chen L., He L., Ma Y., Zhang Y. Correlation between bone mineral density and serum trace element contents of elderly males in Beijing urban area. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015;8(10):19250–19257.
9. Price C.T., Koval K.J., Langford J.R. Silicon: A review of its potential role in the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Int. J. Endocrinol.* 2013;2013:316783. doi: 10.1155/2013/316783
10. Pavone V., Testa G., Giardina S.M.C., Vescio A., Restivo D.A., Sessa G. Pharmacological therapy of osteoporosis: A systematic current review of literature. *Front. Pharmacol.* 2017;8:803. doi: 10.3389/fphar.2017.00803
11. Cooper C., Ferrari S. IOF compendium of osteoporosis. 2nd Edition. Int. Osteoporos Found., 2019. 92 p.
12. Иванов В.В., Маркузе И.Ю., Копылов В.М., Криволапова О.В., Кирилин А.Д. Способ получения аминоксилкисленосодержащего олигоалкоксилосилана и самоэмульгирующиеся композиции на его основе. Пат. 2389734 РФ; опубл. 20.05.2010.
- Ivanov V.V., Markuze I.J., Kopylov V.M., Krivolapova O.V., Kirilin A.D. A method for producing aminoalkylene-containing oligoalkoxysiloxane and self-emulsifying compositions based on it. Patent 2389734 RF; published 20.05.2010. [In Russian].
13. Carbone L., Johnson K.C., Huang Y., Pettinger M., Thomas F., Cauley J., Crandall C., Tinker L., LeBoff M.S., Wactawski-Wende J., Bethel M., Li W., Prentice R. Sodium intake and osteoporosis. Findings from the women's health initiative. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2016;101(4):1414–1421. doi: 10.1210/jc.2015-4017
14. Ha J., Kim S.A., Lim K., Shin S. The association of potassium intake with bone mineral density and the prevalence of osteoporosis among older Korean adults. *Nutr. Res. Pract.* 2020;14(1):55–61. doi: 10.4162/nrp.2020.14.1.55
15. Андреев Л., Комарова В. НаБиКат с хелатом кремния. *Животноводство России.* 2020;(2): 14–16.
- Andreenko L., Komarova V. NaBiCat with silicon chelate. *Zhivotnovodstvo Rossii = Livestock Farming in Russia.* 2020;(2):14–16. [In Russian].
16. Jugdaohsingh R., Calomme M.R., Robinson K., Nielsen F., Anderson S.H.C., d'Haese P., Geusens P., Loveridge N., Thompson R.P.H., Powell J.J. Increased longitudinal growth in rats on a silicon-depleted diet. *Bone.* 2008;43(3):596–606. doi: 10.1016/j.bone.2008.04.014
17. Jugdaohsingh R., Tucker K.L., Qiao N., Cupples L.A., Kiel D.P., Powell J.J. Dietary silicon intake is positively associated with bone mineral density in men and premenopausal women of the framingham offspring cohort. *J. Bone Miner. Res.* 2004;19(2):297–307. doi: 10.1359/JBMR.0301225
18. Schwarz K. A bound form of silicon in glycosaminoglycans and polyuronides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1973;70(5):1608–1612. doi: 10.1073/pnas.70.5.1608
19. Yalçın N., Sevinç V. Studies on silica obtained from rice husk. *Ceram. Int.* 2001;27(2):219–224. doi: 10.1016/S0272-8842(00)00068-7
20. He C., Ma J., Wang L. A hemicellulose-bound form of silicon with potential to improve the mechanical properties and regeneration of the cell wall of rice. *New Phytol.* 2015;206(3):1051–1062. doi: 10.1111/nph.13282
21. Parish M., Massoud G., Hazimeh D., Segars J., Islam M.S. Green tea in reproductive cancers: could treatment be as simple? *Cancers (Basel).* 2023;15(3). doi: 10.3390/cancers15030862
22. Dong M., Jiao G., Liu H., Wu W., Li S., Wang Q., Xu D., Li X., Liu H., Chen Y. Biological silicon stimulates collagen type 1 and osteocalcin synthesis in human osteoblast-like cells through the BMP-2/Smad/RUNX2 signaling pathway. *Biol. Trace Elem. Res.* 2016;173(2):306–315. doi: 10.1007/s12011-016-0686-3
23. Nedjari S., Awaja F., Guarino R., Gugutkov D., Altankov G. Establishing multiple osteogenic differentiation pathways of mesenchymal stem cells through different scaffold configurations. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2020;14(10):1428–1437. doi: 10.1002/term.3108
24. Shie M.Y., Ding S.J., Chang H.C. The role of silicon in osteoblast-like cell proliferation and apoptosis. *Acta Biomater.* 2011;7(6):2604–2614. doi: 10.1016/j.actbio.2011.02.023

25. Ji K., Ding L., Chen X., Dai Y., Sun F., Wu G., Lu W. Mesenchymal stem cells differentiation: mitochondria matter in osteogenesis or adipogenesis direction. *Curr. Stem. Cell Res. Ther.* 2020;15(7):602–606. doi: 10.2174/1574888x15666200324165655
26. Czekanska E.M., Stoddart M.J., Richards R.G., Hayes J.S. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *Eur. Cells. Mater.* 2012;24:1–17. doi: 10.22203/eCM.v024a01
27. Florencio-Silva R., Sasso G.R.D.S., Sasso-Cerri E., Simões M.J., Cerri P.S. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed. Res. Int.* 2015;2015:421746. doi: 10.1155/2015/421746

#### **Сведения об авторах:**

**Ситникова Наталья Александровна**, ORCID: 0000-0002-8226-8996, e-mail: sitnikovanat9@gmail.com  
**Бондаренко Наталья Анатольевна**, к.б.н., ORCID: 0000-0002-8443-656X, e-mail: bond802888@yandex.ru  
**Кушнаренко Андрей Олегович**, ORCID: 0000-0002-6670-7370, e-mail: aokushnarenko@mail.ru

#### **Information about the author:**

**Natalya A. Sitnikova**, ORCID: 0000-0002-8226-8996, e-mail: sitnikovanat9@gmail.com  
**Natalya A. Bondarenko**, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-8443-656X, e-mail: bond802888@yandex.ru  
**Andrey O. Kushnarenko**, ORCID: 0000-0002-6670-7370, e-mail: aokushnarenko@mail.ru

*Поступила в редакцию 24.10.2023*

*После доработки 22.02.2024*

*Принята к публикации 23.02.2024*

*Received 24.10.2023*

*Revision received 22.02.2024*

*Accepted 23.02.2024*