

*На правах рукописи*

Бреславец Дмитрий Игоревич

**Механизмы регуляции проницаемости монослоя клеток  
назального эпителия RPMI 2650 при моделировании воспаления  
фактором некроза опухоли- $\alpha$**

1.5.4. Биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Рязань – 2026

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, доцент **Абаленихина Юлия Владимировна**

**Официальные оппоненты:**

**Павлюченко Иван Иванович**, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой нормальной физиологии

**Федорова Арина Александровна**, кандидат биологических наук, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», старший преподаватель кафедры общей физиологии

**Ведущая организация:** федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «\_\_»\_\_\_\_\_2026 г. в \_\_ на заседании диссертационного совета 21.2.060.02, созданного на базе ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России по адресу: 390026 г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9

С диссертацией можно ознакомиться в библиоцентре ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (390026, г. Рязань, ул. Шевченко, д. 34, корп. 2) и на сайте [www.rzgmu.ru](http://www.rzgmu.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_»\_\_\_\_\_2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор медицинских наук, доцент

Короткова Н.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Назальный эпителий выполняет важную барьерную функцию, защищая дыхательные пути от патогенов, аллергенов и других агентов окружающей среды. Целостность этого барьера обеспечивается сложной организацией межклеточных контактов, включающих плотные (Tight Junctions, TJ) и адгезивные (Adherens Junctions, AJ) соединения, ключевыми белками которых являются окклюдин, клаудин-1, ZO-1 и E-кадгерин соответственно (Марков А.Г. и др., 2022, Hellings P.W., 2020, Otani T., 2020). Нарушение барьерной функции является центральным звеном в патогенезе широкого спектра хронических воспалительных заболеваний носа, таких как аллергический ринит, хронический риносинусит и полипоз, распространенность которых неуклонно растет (Озерская И.В. и др., 2018, Frey A. et al, 2023, Jiang Y. et al, 2023). Воспаление, характеризующееся высвобождением провоспалительных цитокинов и развитием окислительного стресса, может модулировать проницаемость эпителиального барьера. Фактор некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) выступает одним из ключевых медиаторов этого процесса, однако детальные механизмы его воздействия на специфические белки межклеточных контактов назального эпителия требуют дальнейшего изучения (Прозоровская Ю.И. и др., 2024, Тополянская С.В., 2020, Wang F. et al., 2005, Bruewer M. et al., 2005).

Современные исследования биохимических механизмов и патофизиологии заболеваний верхних дыхательных путей и скрининг новых интраназальных лекарственных форм невозможны без использования *in vitro* моделей. Первичные культуры клеток назального эпителия человека, несмотря на свое соответствие *in vivo*, обладают существенными ограничениями: междонорская вариабельность, ограниченный жизненный цикл и сложность масштабирования (Terrance M. et al., 2024). В связи с этим, иммортализованная клеточная линия RPMI 2650, происходящая из карциномы носовой перегородки человека, представляет собой стандартизированную модель для изучения биохимических свойств назального эпителия (De Fraissinette A. et al, 1995). Однако, несмотря на

широкое использование этой клеточной линии для оценки назальной проницаемости, ее способность воспроизводить динамику воспалительного ответа и связанные с ним изменения барьерной функции не изучены. В частности, недостаточно данных о биохимической регуляции изменения проницаемости монослоя под действием ФНО- $\alpha$ . Следовательно, существует значительный пробел в понимании молекулярно-биохимических основ нарушения назального барьера под действием ФНО- $\alpha$  в клеточной модели RPMI 2650. В связи с этим, необходимо провести комплексное исследование, направленное на выявление причинно-следственных связей между активацией внутриклеточных сигнальных путей, индуцированных ФНО- $\alpha$ , и структурно-функциональной организацией назального барьера. Полученные результаты заложат фундамент для создания молекулярной модели дисфункции эпителиального барьера при ринопатологиях, что важно для углубления знаний в области биохимии и патофизиологии, разработки фармакологических стратегий, направленных на восстановление назального эпителия.

### **Степень разработанности темы**

Проблема нарушения эпителиального барьера при воспалении активно изучается на моделях кишечного и бронхиального эпителия, где установлена роль ФНО- $\alpha$  в дестабилизации плотных контактов через активацию внутриклеточных киназ и ремоделирование цитоскелета (Wang F. et al, 2005, Kuo W.T. et al, 2021). В контексте назального эпителия в литературе описаны эксперименты на первичных культурах, подтверждающие снижение трансэпителиального электрического сопротивления (TEER) и повышение параклеточной проницаемости под действием провоспалительных цитокинов (Heijink I.H. et al, 2010). Клеточная линия RPMI 2650 хорошо охарактеризована как модель для изучения пассивного трансэпителиального транспорта лекарственных средств (Wengst A., 2010). Имеются противоречивые данные о способности RPMI 2650 формировать функциональный барьер: некоторые исследования сообщают о низких значениях TEER и слабой экспрессии белков контактов (Agu R.U. et al, 2001), в то время как другие, с использованием

оптимизированных протоколов культивирования на границе раздела воздух-жидкость демонстрируют улучшенные барьерные свойства (Kürti L. et al., 2012, Bai S. et al., 2008). Несмотря на это, систематические исследования, посвященные именно провоспалительной модуляции барьера в клеточной линии RPMI 2650 малоизучены по сравнению с кишечным эпителием (Wang F. et al., 2005). Отсутствуют работы, в которых бы одновременно оценивались функциональная проницаемость монослоя, количество и локализация белков межклеточных контактов и миграционная активность клеток в ответ на воздействие ФНО- $\alpha$ .

### **Цель исследования**

Выявить особенности регуляции проницаемости монослоя клеток назального эпителия RPMI 2650 посредством оценки вклада белков межклеточных контактов и миграционной активности клеток при моделировании воспаления фактором некроза опухоли- $\alpha$ .

### **Задачи исследования**

1. Оценить способность клеточной линии RPMI 2650 к формированию функционального барьера назального эпителия в условиях длительного культивирования (21 сутки) по характеристике трансэпителиального электрического сопротивления, уровня и локализации ключевых белков межклеточных контактов (ZO-1, окклюдин, клаудин-1, E-кадгерин).

2. Разработать модель провоспалительного ответа на клетках линии RPMI 2650, установив рабочие концентрации и временные интервалы воздействия фактора некроза опухоли- $\alpha$  на монослой клеток RPMI 2650, способствующие активации классического провоспалительного сигнального пути Nf- $\kappa$ B/ИЛ-1 $\beta$ .

3. Исследовать клеточный ответ на моделируемое воспаление по показателям окислительного стресса (окисление липидов и белков), жизнеспособности, апоптоза (сигнальный путь Bcl-2/Cleaved caspase 3), миграционной активности клеток и ее связи с уровнем эпидермального фактора роста (EGF).

4. Определить влияние фактора некроза опухоли- $\alpha$  на функциональную целостность барьера назального эпителия по изменению проницаемости

монослоя клеток RPMI 2650, оцененного по динамике трансэпителиального электрического сопротивления и коэффициента кажущейся проницаемости для параклеточного маркера (маннитол).

5. Выявить особенности молекулярных механизмов регуляции проницаемости при моделировании воспаления *in vitro*, установив вклад белков межклеточных контактов в полученные изменения барьерной функции назального эпителия.

### **Научная новизна**

В ходе выполнения работы впервые:

1. Комплексно охарактеризован ответ клеточной линии RPMI 2650 на провоспалительный стимул ФНО- $\alpha$ , включающий одновременную оценку жизнеспособности, барьерной функции, количества белков межклеточных контактов. Показано, что данная клеточная модель способна воспроизводить сложную динамику воспалительного ответа *in vitro*.

2. Впервые изучено влияние ФНО- $\alpha$  на миграционную активность клеток RPMI 2650 как аспект ремоделирования эпителиального барьера. Показано, что стимуляция миграции в ранние сроки воздействия ФНО- $\alpha$  сопровождается повышением уровня эпидермального фактора роста (EGF), указывая на активацию механизмов, направленных на восстановление целостности монослоя.

3. Установлен двухфазный характер влияния ФНО- $\alpha$  на барьерную функцию монослоя RPMI 2650, что вносит новый аспект в понимание регуляции функционирования назального эпителия при воспалении. Выявлена, ранее не описанная для данной модели, компенсаторная фаза (6-24 часа), характеризующаяся уплотнением барьера (рост TEER, снижение проницаемости), также показана классическая фаза декомпенсации (48 часов) с нарушением барьера.

4. Доказана прямая причинно-следственная связь между функциональными изменениями проницаемости монослоя под действием ФНО- $\alpha$  и количественными изменениями ключевых белков межклеточных контактов

(клаудин-1, окклюдин, E-кадгерин, ZO-1) для линии клеток RPMI 2650. Показано, что усиление барьера в компенсаторную фазу сопровождается повышением уровня всех изучаемых белков межклеточных контактов, а его нарушение в фазу декомпенсации – снижением уровня белков плотных контактов.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные результаты углубляют понимание молекулярных механизмов повреждения назального эпителия при хроническом воспалении, где ключевую роль играет длительное воздействие провоспалительным цитокином – фактором некроза опухоли- $\alpha$ . В ходе работы были установлены оптимальные временные сроки (14-21 день) и разработаны методические подходы для использования клеточной линии RPMI 2650 в качестве модели назального барьера *in vitro* в исследованиях токсичности, проницаемости, транспорта экзогенных и лекарственных веществ. Выявленный двухфазный ответ барьера на воздействие ФНО- $\alpha$  демонстрирует, что на ранних стадиях воспалительной реакции существуют компенсаторные механизмы, которые следует учитывать при назначении интраназальных препаратов. Доказанные выводы могут служить основой для разработки новых подходов к терапии хронических воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей, нацеленных не только на подавление воспаления, но и на защиту и восстановление эпителиального барьера.

Таким образом, проведенное исследование вносит существенный вклад в фундаментальные представления о взаимодействии провоспалительных цитокинов с эпителиальными клетками слизистых оболочек и закладывает биохимические основы для дальнейших доклинических исследований в области отоларингологии и разработки лекарственных форм для интраназального применения.

### **Методология и методы исследования**

Работа выполнена на клеточной линии назального эпителия человека RPMI 2650. Клетки культивировали в среде MEM (Minimum Essential Medium, «ПанЭко», Россия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Fetal Bovine Serum, FBS), 2 mM L-глутамин, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл

стрептомицина (все компоненты производства «ПанЭко», Россия). В ходе работы использовали две модели культивирования: клеточный монослой на планшетах и поляризованный эпителиальный барьер на полупроницаемых мембранах в трансвелл-системах (условия жидкость-воздух). Для моделирования воспаления клетки обрабатывали фактором некроза опухоли- $\alpha$  (Cloud-Clone Corp., Китай) в концентрациях 1–100 нг/мл в течение 6, 24 и 48 ч. Для каждой модели были сформированы контрольная и опытные группы ( $n=3$ ). Оценка жизнеспособности проводили методом проточной цитометрии с красителем DAPI. Уровень белков (про-ИЛ-1 $\beta$ , Cleaved Caspase 3, Bcl2, Nf- $\kappa$ B, ZO-1, E-кадгерин, клаудин-1, окклюдин, EGF, GAPDH, ламинин B1) анализировали с помощью вестерн-блот анализа. Оценка миграционной активности клеток проводилась путем измерения скорости закрытия раневого дефекта (скарификационный тест). Для определения барьерной функции измеряли трансэпителиальное электрическое сопротивление (TEER, вольтметр и электрод Millicell® ERS-2, Millipore, США) и параклеточную проницаемость маннитола (метод ВЭЖХ-МС/МС). Визуализация локализации белков межклеточных контактов осуществлялась с использованием иммуноцитохимии. Статистическая обработка данных выполнена с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Результаты представлены как  $M \pm SD$ . Уровень значимости  $p < 0,05$ .

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Оптимизированные условия длительного культивирования клеток RPMI 2650 обеспечивают формирование стабильного монослоя, который по своим биохимическим и функциональным свойствам соответствует нативному назальному эпителию.

2. Кратковременное воздействие ФНО- $\alpha$  способствует активации сигнального каскада Nf- $\kappa$ B/ИЛ-1 $\beta$ , что сопровождается развитием окислительного стресса и стимуляцией миграционной активности в клетках RPMI 2650, тогда как пролонгированная экспозиция приводит к смещению баланса клеточного гомеостаза в сторону апоптоза, демонстрируя стадийность воспалительного процесса.

3. Фактор некроза опухоли- $\alpha$  оказывает двухфазное действие на барьерную функцию эпителиального монослоя RPMI 2650, заключающееся в последовательной смене компенсаторного уплотнения барьера его структурно-функциональным нарушением при пролонгированном воздействии провоспалительного цитокина.

4. Молекулярным механизмом разнонаправленных изменений барьерной функции назального эпителия является модуляция экспрессии белков межклеточных контактов, а именно компенсаторная стабилизация барьера объясняется повышением их уровня как адгезивных (E-кадгерин), так и плотных (клаудин-1, окклюдин, ZO-1) контактов, тогда как последующее нарушение барьерных свойств обусловлено селективным снижением количества белков плотных контактов (клаудин-1 и окклюдин), являющихся ключевыми регуляторами парацеллюлярной проницаемости.

#### **Степень достоверности и апробация результатов**

Высокая степень достоверности полученных результатов обусловлена достаточным объемом экспериментальных данных, полученных с использованием современных методов исследования с последующей статистической обработкой. Работа выполнена при поддержке внутривузовского гранта ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России «Механизмы регуляции проницаемости монослоя клеток назального эпителия RPMI2650 при воспалении», договор № 1 от 2025 г. Основные положения диссертации опубликованы, доложены и обсуждены на: IX Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2023); III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молодые ученые – науке и практике XXI века» (Оренбург, 2024); III Международной научно-практической конференции «Клеточные технологии в экспериментальной медицине – 2024» (Курск, 2024); Международном молодежном форуме «Медицинская наука без границ – 2025» (Ставрополь, 2025); Ежегодной научной конференции Рязанского государственного медицинского

университета имени академика И.П. Павлова, посвященной 75-летию университета на Рязанской земле (Рязань, 2025); Всероссийской научно-практической интернет-конференции студентов и молодых ученых с международным участием «YSRP 2025» (Саратов, 2025); XI Всероссийской с международным участием научной конференции «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2025); XIII Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы науки XXI века» (Смоленск, 2025); Всероссийской научно-практической конференции «Биология XXI века в свете глобальных вызовов» (Рязань, 2025).

### **Внедрение результатов работы в практику**

Основные положения работы используются в учебном процессе при обучении студентов на кафедрах биологической химии и патофизиологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, работе Междисциплинарного научно-образовательного лабораторного центра ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

### **Личный вклад автора**

Автором самостоятельно подготовлен аналитический обзор литературы по изучаемой проблеме, составлен дизайн исследования, проведены эксперименты *in vitro*, хроматографические исследования, вестерн-блот анализ, обработка и интерпретация данных, подготовка публикаций по диссертационной работе.

### **Сведения о публикациях по теме диссертации**

По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для публикации научных результатов диссертационных исследований, из которых 2 публикации в изданиях, индексируемых в международной цитатноаналитической базе данных Scopus. Подана 1 заявка на патент РФ на изобретение.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 158 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов

исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, включающего 266 источников, из которых 36 – отечественных и 230 – зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована 36 рисунками, 8 таблицами.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

Исследование выполнено на клеточной линии RPMI 2650 (карцинома носовой перегородки человека). Клеточная линия приобретена в Институте цитологии РАН (Санкт-Петербург). В работе использовали клетки 3–5 пассажа. Культивирование проводили в среде MEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 mM L-глутамина, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (все компоненты – «ПанЭко», Россия). Пассирование осуществляли раствором трипсин-ЭДТА (0,25%/0,2%, «Sigma-Aldrich», Германия) при достижении 80–90% конфлюэнтности. Контроль качества культивирования включал ежедневный визуальный осмотр (микроскоп Olympus SKX-53, Япония) и тестирование на микоплазменную контаминацию с красителем DAPI.

В работе использовали две модели культивирования:

1. *Стандартный монослой* – культивирование на поверхности планшетов (Corning, США) до достижения конфлюэнтности. Модель применяли для оценки биохимических ответов клеток (жизнеспособность, апоптоз, содержание сигнальных белков, миграционная активность).

2. *Поляризованный эпителиальный барьер* – культивирование на полупроницаемых мембранах трансвелл-систем (Corning, США). Клетки инкубировали 7 дней с добавлением среды в обе камеры, затем для индукции поляризации среду вносили только в базолатеральную камеру (условия жидкость-воздух) в течение 14 суток. Модель использовали для измерения трансэпителиального электрического сопротивления (TEER), оценки параклеточной проницаемости и анализа белков межклеточных контактов.

*Экспериментальная модель воспаления и дизайн исследования.* Для моделирования воспаления использовали фактор некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) в концентрациях 1, 5, 10, 50 и 100 нг/мл. Экспериментальные группы формировали по двум типам культивирования. В каждом типе выделяли контрольную группу (без ФНО- $\alpha$ ) и пять опытных групп, соответствующих указанным концентрациям цитокина. Для каждой концентрации оценивали три временные точки воздействия – 6, 24 и 48 часов. Все эксперименты выполняли в трех биологических повторах (n=3). В опытных группах с экспозицией 24 и 48 часов смену среды проводили каждые 12 часов.

*Оценка жизнеспособности клеток методом проточной цитометрии.* Долю живых и мертвых клеток определяли с использованием красителя DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндола, «Sigma-Aldrich», США). Клетки инкубировали с DAPI (0,5 мкг/мл) в течение 10 мин, анализ проводили на проточном цитометре «SinoCyte» (Китай) с возбуждением 405 нм, не менее 10 000 событий. Нежизнеспособные клетки идентифицировали как DAPI-позитивные.

*Выделение цитоплазматических фракций и вестерн-блот анализ.* Клетки снимали раствором трипсин-ЭДТА, трижды отмывали фосфатным буфером. Для вестерн-блот анализа клетки лизировали в RIPA буфере («Thermo Fisher Scientific», США) с ингибиторами протеаз (30 мин, +4°C). Лизат центрифугировали (5000 g), супернатант использовали для анализа. Для определения Nf- $\kappa$ B в ядерной фракции клетки лизировали с использованием набора ReadyPrep Protein extraction kit («Bio-Rad», США). Концентрацию белка оценивали по методу Брэдфорда. Электрофорез выполняли с использованием 12% полиакриламидного геля. Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Детекцию проводили с первичными антителами к про-ИЛ-1 $\beta$ , Cleaved-Caspase 3, Bcl2, ZO-1, E-кадгерину, клаудину-1, окклюдину, EGF, Nf- $\kappa$ B, GAPDH, ламинину B1 (Affinity Biosciences, Китай) и вторичными антителами, конъюгированными с HRP (Invitrogen, США). Хемилюминесценцию регистрировали с помощью системы ChemiDoc XRS+ («Bio-Rad», США). Идентификацию белков проводили с использованием маркеров молекулярной

массы Precision plus protein standards Dual Color («Bio-Rad», США). Для количественного анализа выполняли валидацию: определяли линейный диапазон детекции для каждого целевого белка с помощью серийных разведений лизата (5–50 мкг белка на лунку). Стабильность экспрессии референсного белка GAPDH в условиях действия ФНО- $\alpha$  подтверждена экспериментально.

*Оценка окислительной модификации липидов и белков.* Клетки, культивированные в шестилуночных планшетах, после экспериментальных воздействий снимали раствором трипсин-ЭДТА, трижды отмывали и лизировали в буфере (50 мМ Tris-HCl pH 7,4, 150 мМ KCl, 0,5% Triton X-100) с ингибиторами протеаз. После центрифугирования (5000 g, 10 мин, +4°C) надосадочную жидкость, содержащую цитоплазматическую фракцию, отбирали и хранили при -80°C до анализа. *Продукты перекисного окисления липидов* (малоновый диальдегид и 4-гидроксиалкеналь) определяли спектрофотометрическим методом с 1-метил-2-фенилиндолом («Elabscience», Китай). Оптическую плотность измеряли при 586 нм, результаты нормализовали на содержание белка. *Содержание карбонильных производных белков* оценивали по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином. Оптическую плотность регистрировали при 375 нм, концентрацию рассчитывали с использованием молярного коэффициента экстинкции 22 000 M<sup>-1</sup>×см<sup>-1</sup>.

*Оценка миграционной активности (скарификационный тест).* При достижении 100% конфлюэнтности монослоя наносили линейное повреждение стерильным наконечником. Клетки инкубировали с ФНО- $\alpha$  (1–100 нг/мл) в течение 6, 24 и 48 ч. Микрофотографии получали с помощью инвертированного микроскопа Olympus СКХ-53 (Япония). Скорость миграции (мкм/ч) рассчитывали по формуле: Скорость=(A<sub>0</sub>-A<sub>t</sub>)/t, где A<sub>0</sub> – ширина раны в начальный момент времени (0 часов); A<sub>t</sub> – ширина раны в момент времени (t). Анализ изображений проводили с использованием программы ImageJ 1.48v.

*Оценка барьерной функции монослоя.* Трансэпителиальное электрическое сопротивление (TEER) измеряли с помощью системы Millicell® ERS-2 (Millipore, США) на клетках, культивированных на полупроницаемых

мембранах трансвелл-систем. Удельное сопротивление ( $\Omega \times \text{см}^2$ ) рассчитывали как произведение разности сопротивлений (лунок без и с клетками) на площадь мембраны. Измерения выполняли каждые 2 дня до выхода на плато.

*Оценка параклеточной проницаемости* проводилась по транспорту маннитола. Маннитол (10 мкг/мл) добавляли в апикальную камеру, через 2 ч отбирали пробы из базолатеральной камеры трансвеллов. Концентрацию определяли методом ВЭЖХ-МС/МС на хроматографе Shimadzu LC-40D с масс-спектрометром Sciex Triple Quad 3500. Коэффициент кажущейся проницаемости рассчитывали по формуле:  $P_{app} = (dQ/dt) \cdot 1 / (A \cdot C_0)$ , где  $dQ/dt$  – изменение концентрации субстрата в камере-реципиенте за время инкубации;  $A$  – площадь полупроницаемой мембраны в апикальной камере трансвелле;  $C_0$  – начальная концентрация субстрата в камере-доноре.

*Иммуоцитохимический анализ.* Локализацию белков ZO-1, окклюдина, клаудина-1 и E-кадгерина оценивали методом иммуоцитохимии. Клетки фиксировали охлажденным метанолом, пермеабилizировали 0,1% Triton X-100 и блокировали 1% BSA. Инкубацию с первичными антителами (Affinity, Китай) проводили в течение ночи при  $+4^\circ\text{C}$ , с вторичными антителами, конъюгированными с Fluor488 – 1 ч при комнатной температуре в темноте. Анализ выполняли с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus CKX-53 ( $\times 400$ ).

*Статистический анализ* проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Данные представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения ( $M \pm SD$ ). Сравнение нескольких независимых групп выполняли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One-Way ANOVA) с последующим post-hoc тестом Тьюки для множественных сравнений или тестом Даннетта для сравнения с контрольной группой. Парное сравнение независимых выборок проводили с использованием двустороннего t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

*Валидация метода вестерн-блот.* Корректность вестерн-блоттинга обеспечивается детекцией в линейном диапазоне. Для ZO-1, E-кадгерина, клаудина-1, окклюдина и GAPDH в клетках RPMI 2650 установлен линейный характер зависимости сигнала от количества белка при 5–50 мкг/лунку ( $R^2 > 0,98$ ). Выход за пределы линейного диапазона (100 мкг/лунку) приводил к насыщению сигнала (Рисунок 1). Оптимальный рабочий диапазон составил 20-50 мкг/лунку.

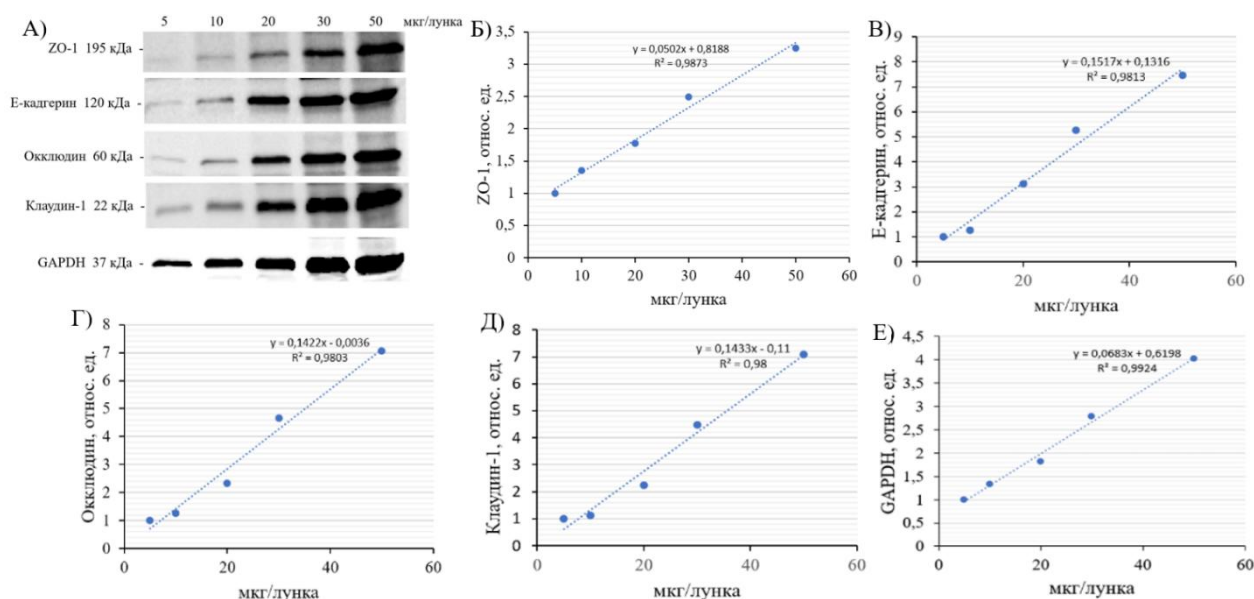


Рисунок 1 – Репрезентативный иммуноблот (А) и линейная зависимость сигналов белков межклеточных контактов (Б, В, Г, Д) и GAPDH (Е)

Стабильность GAPDH подтверждена в условиях воспаления, индуцированного ФНО- $\alpha$  (5–100 нг/мл, 6–48 ч): статистически значимых различий в уровне GAPDH между контрольными и опытными группами не было (6 ч:  $F=0,05$ ,  $p=0,99$ ; 24 ч:  $F=0,06$ ,  $p=0,99$ ; 48 ч:  $F=0,37$ ,  $p=0,82$ ).

*Анализ формирования монослоя клеток линии RPMI 2650.* Оценка состояния клеточного монослоя клеток линии RPMI 2650 с помощью световой микроскопии показало, что эти клетки образуют монослой на 5 сутки культивирования, а к 8-10 – наблюдалось формирование перекрывающихся слоев (Рисунок 2А). Проведена оценка относительного количества белков межклеточных контактов (E-кадгерин, клаудин-1, окклюдин, ZO-1) на разных этапах культивирования клеток линии RPMI 2650 (3-21 сутки) (Рисунок 2Б, В).

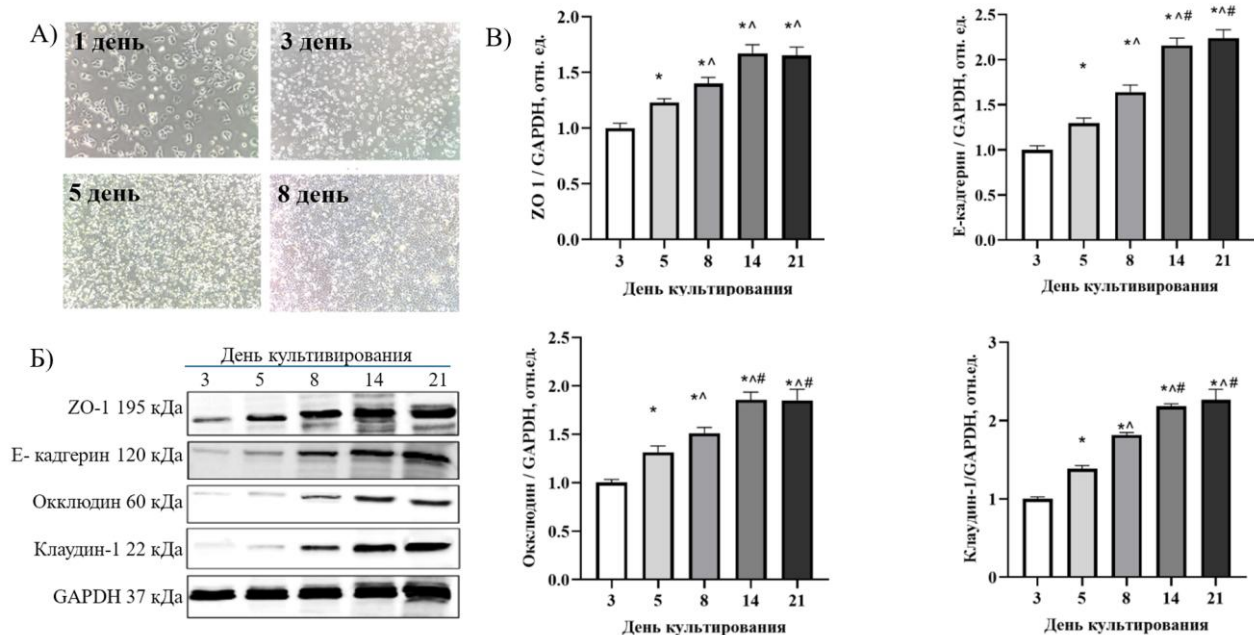


Рисунок 2 – Клеточная линия RPMI 2650 на разных этапах формирования монослоя (А), относительное количество белков межклеточных контактов в клетках линии RPMI 2650 на 3-21 дни культивирования (Б, В)

Примечание – статистика  $p < 0,05$  от \* – 5 дня культивирования; ^ – 8 дня культивирования

Динамика TEER характеризовалась статистически значимым ростом в течение первых 8 дней культивирования с последующей стабилизацией, что отражает формирование зрелого функционального монослоя (Таблица 1).

Таблица 1 – Динамика трансэпителиального электрического сопротивления в процессе культивирования клеточного монослоя в течение 21 суток (M±SD)

сутки	3	5	8	14	21
TEER, $\Omega \times \text{см}^2$	$35,0 \pm 1,8$	$40,0 \pm 2,0$	$48,0 \pm 2,4^{*^{\wedge}}$	$54,0 \pm 2,7^{*^{\wedge}}$	$56,0 \pm 2,8^{*^{\wedge}\#}$

Примечание – статистика ( $p < 0,05$ ) относительно дня культивирования \* – 3; ^ – 5; # – 8

Иммунофлуоресцентный анализ подтвердил мембранную локализацию окклюдина, клаудина-1 и E-кадгерина в области межклеточных границ, а также примембранную локализацию ZO-1, что свидетельствует о способности клеток RPMI 2650 формировать структуры, аналогичные назальному эпителию *in vivo*. К 21-м суткам культивирования наблюдали увеличение интенсивности флуоресценции и более четкое распределение всех белков по клеточным границам по сравнению с 5-ми сутками (Рисунок 3).

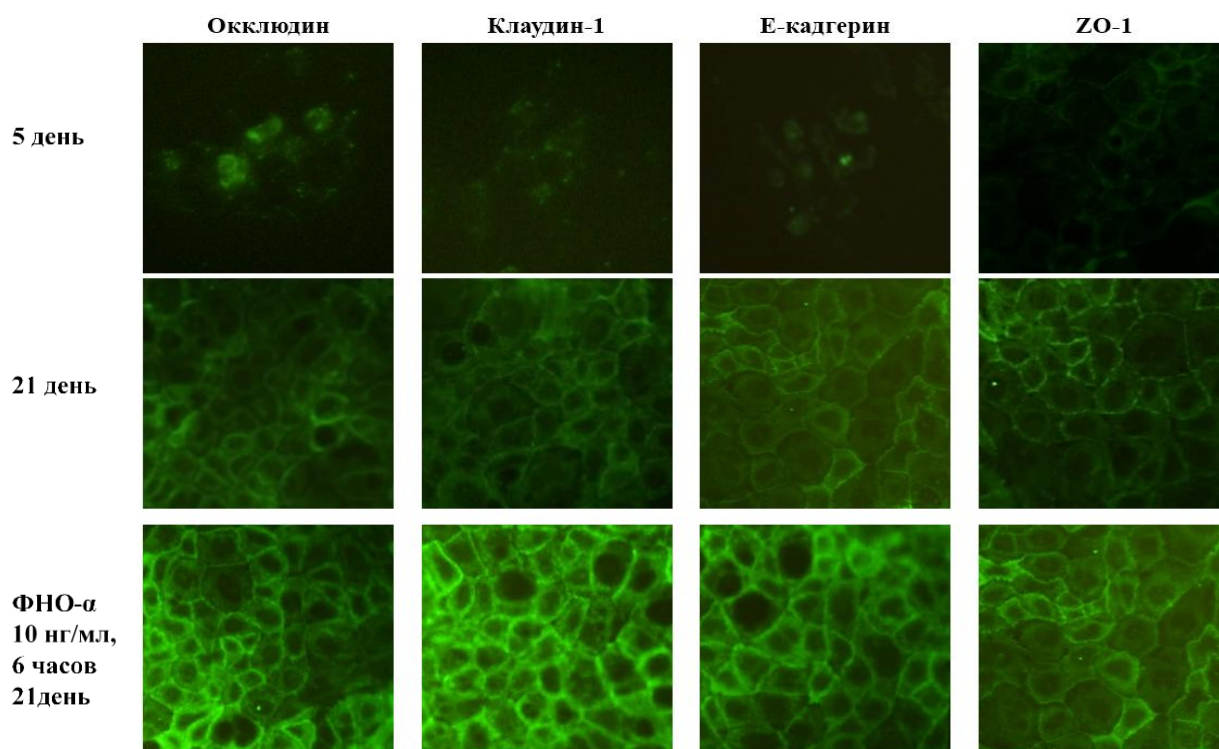


Рисунок 3 – Локализация белков межклеточных контактов в клетках RPMI 2650 на 5-е и 21-е сутки культивирования до и после воздействия ФНО-α

*Провоспалительный ответ клеток RPMI 2650 на воздействие ФНО-α.* В ходе исследования установлено, что под действием ФНО-α уровень Nf-κB в ядерной фракции повышается через 6 ч при всех изученных концентрациях, а через 24 ч – 10-100 нг/мл, к 48 ч динамика сохранялась без дозозависимого эффекта (Рисунок 4Б). Уровень про-ИЛ-1β не изменялся через 6 ч, дозозависимо возрастал через 24 и 48 ч при концентрациях 10-100 нг/мл (Рисунок 4Б).

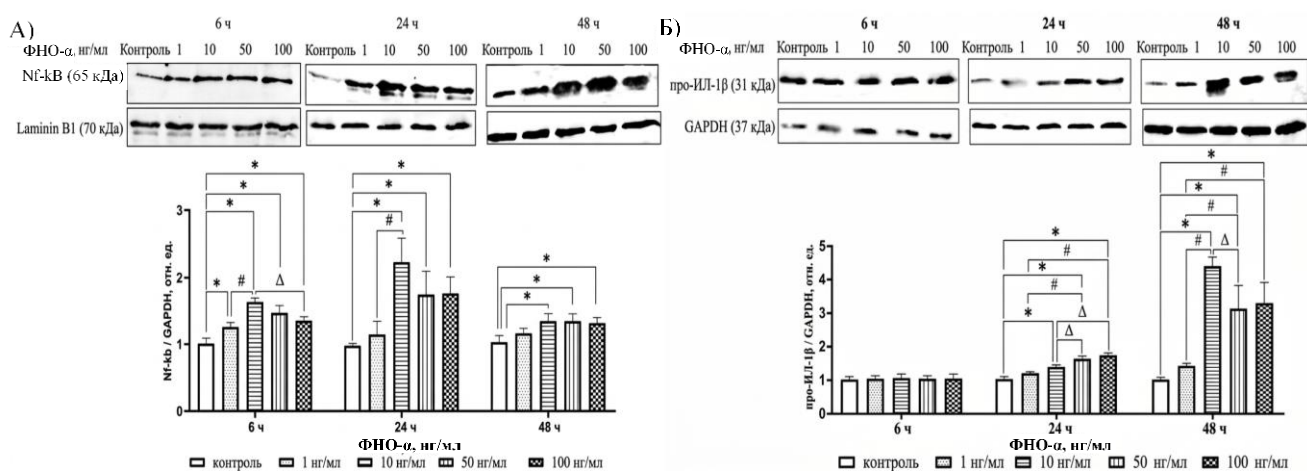


Рисунок 4 – Относительное количество Nf-κB (А), про-ИЛ-1β (Б) в клетках линии RPMI 2650 при воздействии ФНО-α (1-100 нг/мл) в течение 6, 24 и 48 ч. Примечание – статистика  $p < 0,05$  относительно \* – контроля; # – 1 нг/мл; Δ – 10 нг/мл

Жизнеспособность клеток RPMI 2650 при воздействии ФНО- $\alpha$ . В течение первых 6 ч доля живых клеток оставалась стабильно высокой  $>85,13 \pm 11,02\%$  ( $p > 0,05$ ) во всех группах. Доля живых клеток через 24 ч не изменялась: при 1, 10 и 50 нг/мл до  $81,63 \pm 5,23\%$ ,  $77,32 \pm 8,12\%$ ,  $73,65 \pm 10,05\%$  ( $p > 0,05$ ) и снизилась при 100 нг/мл – до  $70,48 \pm 6,05\%$  ( $p = 0,03$ ); через 48 ч: 1 нг/мл –  $79,64 \pm 3,23\%$  ( $p = 0,045$ ); 10 нг/мл –  $67,64 \pm 7,43\%$  ( $p = 0,03$ ); 50 и 100 нг/мл –  $60,21 \pm 4,32\%$  ( $p = 0,03$ ) и  $59,0 \pm 5,15\%$  ( $p = 0,01$ ). Проточная цитометрия показала сдвиг популяции в сторону DAPI-позитивных клеток (Рисунок 5).

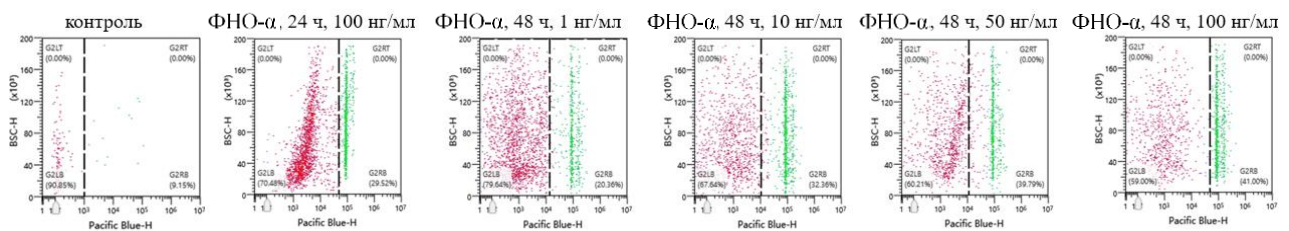


Рисунок 5 – Оценка популяции жизнеспособных клеток линии RPMI 2650 в контроле и при действии ФНО- $\alpha$  в течение 24 ч (100 нг/мл) и 48 ч (1-100 нг/мл)

Клетки отвечали на воздействие ФНО- $\alpha$  повышением уровня антиапоптотического белка Bcl-2 через 6 и 24 ч, что демонстрирует защитный ответ клеток (Рисунок 6А). Уровень расщепленной каспазы-3 дозозависимо возрастал через 48 ч, максимальные значения при 100 нг/мл, без изменений количества Bcl-2 пропорционально концентрации ФНО- $\alpha$  (Рисунок 6Б).

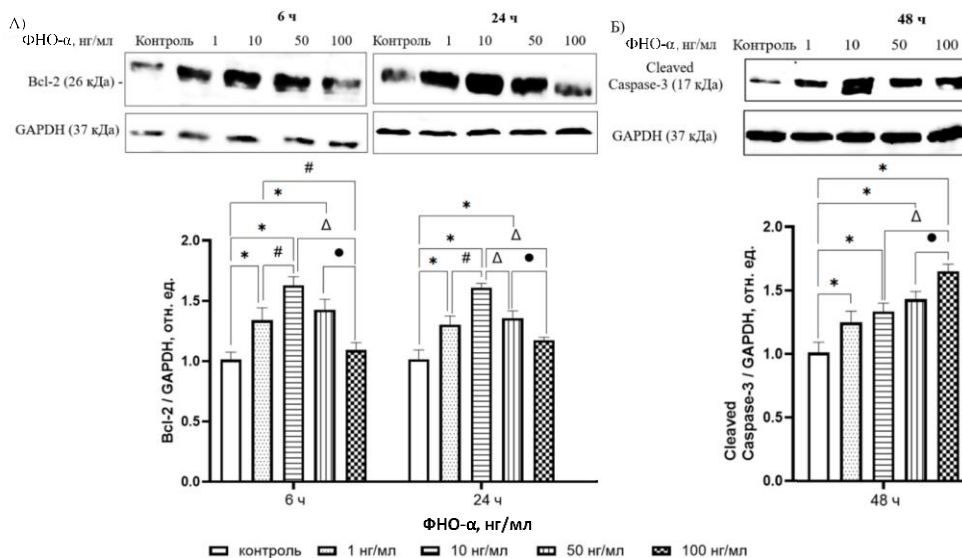


Рисунок 6 – Относительное количество Bcl-2 (А), Cleaved Caspase-3 (Б) в клетках линии RPMI 2650 при воздействии ФНО- $\alpha$  (1-100 нг/мл) 6, 24 и 48 ч  
Примечание – статистика  $p < 0,05$  от \* – контроля; # – 1 нг/мл;  $\Delta$  – 10 нг/мл; • – 50 нг/мл

*Окислительный стресс в клетках RPMI2650 под действием ФНО-α.*

Продукты ПОЛ начинали накапливаться через 6 ч в ответ на высокие концентрации ФНО-α, эффект усиливался к 48 ч и носил дозозависимый характер (Рисунок 7А). Концентрация карбонильных производных белков возрастала через 24 ч воздействия, пик также приходился на 48 ч, эффект дозозависимый (Рисунок 7Б).

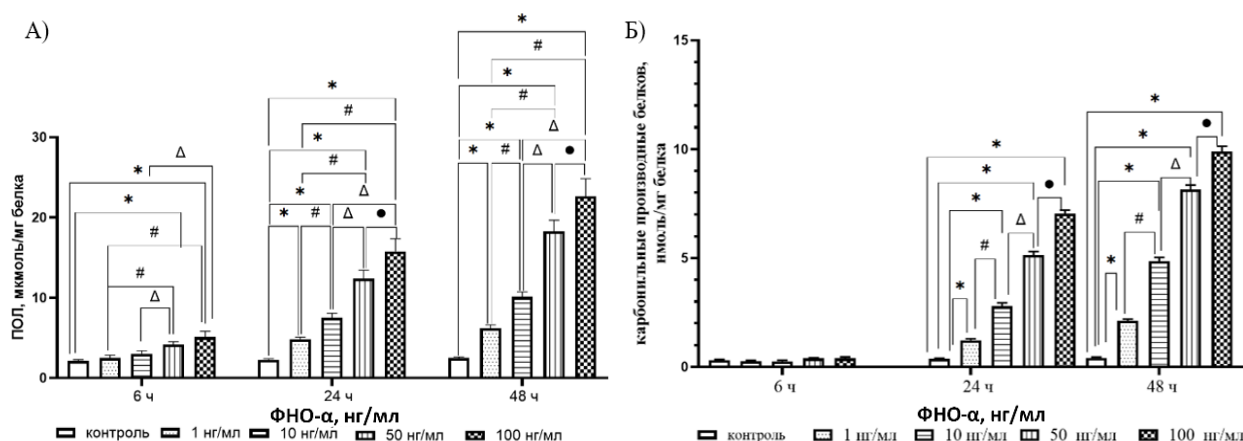


Рисунок 7 – Концентрация продуктов перекисного окисления липидов (А) и карбонильных производных белков (Б) в клетках линии RPMI 2650 при воздействии ФНО-α (1-100 нг/мл) в течение 6, 24 и 48 часов.

Примечание – статистика  $p < 0,05$  от \* – контроля; # – 1 нг/мл; Δ – 10 нг/мл; • – 50 нг/мл

*Оценка миграционной активности клеток RPMI 2650 под действием ФНО-α.*

Наибольшая статистически значимая стимуляция миграции (индекс миграции контроля  $3,16 \pm 0,49$  против  $6,13 \pm 1,13$  при 24 ч;  $p = 0,043$ ) наблюдалась через 6–24 часа, с повышением на 101,0% к 24-му ч ( $p = 0,0036$ ) по сравнению с 6 ч, что сопровождалось увеличением уровня EGF (Рисунок 8).

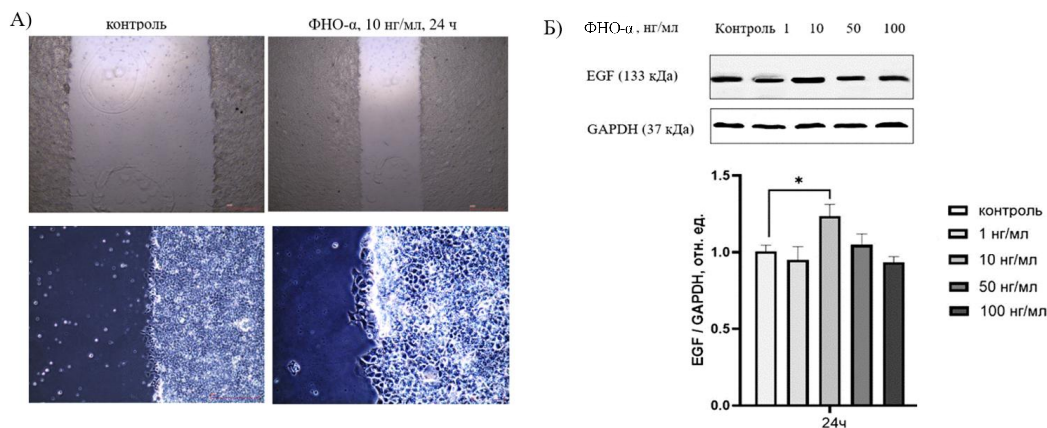


Рисунок 8 – Динамика миграции клеток линии RPMI 2650 (А) и относительное количество белка EGF (Б) при воздействии ФНО-α (1-100 нг/мл) в течение 24 ч. Примечание – \*  $p < 0,05$  относительно контроля.

*Влияние ФНО- $\alpha$  на TEER клеток RPMI 2650.* Компенсаторная фаза (6 ч, 10-100 нг/мл и 24 ч, 10 нг/мл) характеризуется – повышением TEER, фаза декомпенсации (48 ч, 10-100 нг/мл) – снижением TEER (Таблица 2).

Таблица 2 – Влияние ФНО- $\alpha$  на величину трансэпителиального электрического сопротивления монослоя клеток RPMI 2650,  $\Omega \times \text{см}^2$

Время экспозиции	Контроль	Концентрации ФНО- $\alpha$ , нг/мл			
		1	10	50	100
6 ч	45,00 $\pm$ 5,00	52,33 $\pm$ 5,51	60,00 $\pm$ 5,00 p=0,05	61,00 $\pm$ 6,56 p=0,03	70,67 $\pm$ 9,02 p=0,002
24 ч	39,33 $\pm$ 9,45	47,67 $\pm$ 7,51	58,33 $\pm$ 7,64 p=0,04	50,67 $\pm$ 6,66	38,33 $\pm$ 7,64
48 ч	46,00 $\pm$ 3,61	38,33 $\pm$ 3,51	28,00 $\pm$ 3,00 p=0,002	25,00 $\pm$ 5,00 p=0,0007	21,33 $\pm$ 6,51 p=0,0002

*Влияние ФНО- $\alpha$  на транспорт маннитола через монослой клеток RPMI 2650.* Компенсаторная фаза (6 ч, 50-100 нг/мл и 24 ч, 10 нг/мл) характеризуется снижением коэффициента проницаемости маннитола (Papp), а в фазу декомпенсации (48 ч, 10-100 нг/мл) – повышение (Таблица 3).

Таблица 3 – Влияние ФНО- $\alpha$  на транспорт маннитола через монослой клеток линии RPMI 2650,  $\times 10^{-6}$ , см/сек

Время экспозиции	Норма	Концентрации ФНО- $\alpha$ , нг/мл			
		1	10	50	100
6 ч	6,00 $\pm$ 0,72	6,15 $\pm$ 1,00	3,58 $\pm$ 1,8	3,07 $\pm$ 1,68 p=0,0509	2,47 $\pm$ 0,97 p=0,01
24 ч		5,58 $\pm$ 1,16	3,22 $\pm$ 0,57 p=0,03	5,99 $\pm$ 1,34	8,77 $\pm$ 1,19 p=0,03
48 ч		8,91 $\pm$ 0,37	21,67 $\pm$ 10,3 p=0,09	27,07 $\pm$ 9,13 p=0,02	26,77 $\pm$ 9,93 p=0,02

*Влияние ФНО- $\alpha$  на уровень и локализацию белков межклеточных контактов.* Относительное количество E-кадгерина в клетках RPMI 2650 повышалось через 6 ч (10 нг/мл) и 24 ч (10, 50 нг/мл), к 48 ч снижалось при 100 нг/мл. Уровень ZO-1 дозозависимо возрастал через 6 и 24 ч (10–100 нг/мл), без изменений к 48 ч; клаудин-1 повышался через 6 ч (10–100 нг/мл), без изменений к 24 ч, снижался к 48 ч при 100 нг/мл; окклюдин повышался через 6 ч (10–100 нг/мл) и 24 ч (10 нг/мл), снижался к 48 ч при 100 нг/мл (Рисунок 9, 10). После воздействия ФНО- $\alpha$  усиливалась интенсивность сигнала иммуноцитохимии в области клеточных мембран, что свидетельствует об уплотнении монослоя назального эпителия посредством их регуляции (Рисунок 3).

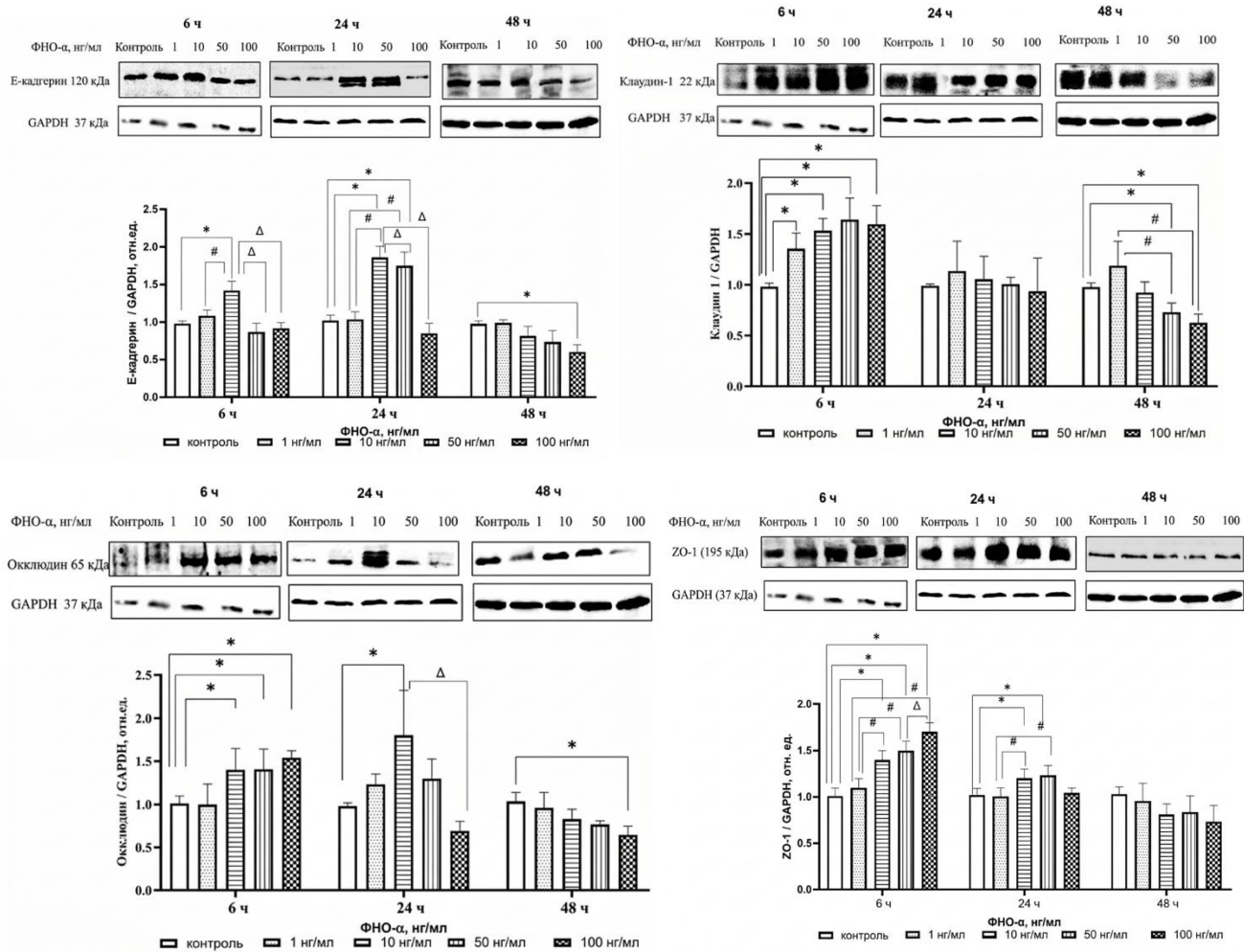


Рисунок 9 – Относительное количество белков E-кадгерина (А), клаудина-1 (Б), окклюдина (В), ZO-1 (Г) в клетках линии RPMI 2650 при воздействии ФНО-α в концентрациях 1-100 нг/мл в течение 6, 24 и 48 ч.

Примечание – \* $p < 0,05$  – статистически значимые отличия от контроля; #  $p < 0,05$  – статистически значимые отличия от группы 1 нг/мл; Δ – статистически значимые отличия от группы 10 нг/мл



Рисунок 10 – Результаты комплексного анализа воздействия фактора некроза опухоли-α на клетки линии RPMI 2650

## ВЫВОДЫ

1. Клеточная линия RPMI 2650 при длительном культивировании (21 сутки) демонстрирует способность к формированию функционального барьера, соответствующего назальному эпителию, что подтверждается увеличением количества белков межклеточных контактов (Е-кадгерин, клаудин-1, окклюдин, ZO-1) и их специфичной локализацией, а также повышением трансэпителиального электрического сопротивления, достигающего стабильного плато к 14-м суткам.

2. Доказано, что фактор некроза опухоли- $\alpha$  в диапазоне концентраций 1-100 нг/мл при экспозиции 6-48 часов активирует классический провоспалительный сигнальный путь, что проявляется в дозо- и времязависимом увеличении уровня ядерного транскрипционного фактора Nf- $\kappa$ B и его транскрипционной мишени – предшественника интерлейкина-1 $\beta$  (про-ИЛ-1 $\beta$ ).

3. Моделирование воспаления под действием фактора некроза опухоли- $\alpha$  индуцирует развитие выраженного окислительного стресса, проявляющегося в накоплении продуктов перекисного окисления липидов и карбонильных производных белков в зависимости от времени воздействия и концентрации цитокина. Длительная экспозиция (48 часов, 1-100 нг/мл) приводит к нарушению баланса в пользу апоптоза, что подтверждается снижением уровня антиапоптотического белка Bcl-2 и повышением уровня активированной каспазы-3 (Cleaved Caspase-3) на фоне снижения жизнеспособности клеток. Фактор некроза опухоли- $\alpha$  в концентрации 10 нг/мл стимулирует миграционную активность клеток в интервале 6-24 часа, что сопровождается повышением уровня эпидермального фактора роста (EGF), указывая на активацию механизмов, потенциально направленных на восстановление целостности монослоя.

4. Выявлен двухфазный характер влияния фактора некроза опухоли- $\alpha$  на барьерную функцию монослоя клеток RPMI 2650. Компенсаторная фаза (6 часов, 10-100 нг/мл и 24 часа, 10 нг/мл) характеризуется усилением барьера –

значительным повышением трансэпителиального электрического сопротивления и снижением коэффициента кажущейся проницаемости (Papp) для параклеточного маркера маннитола; фаза декомпенсации (48 часов, 10-100 нг/мл) сопровождается нарушением барьера – достоверным снижением трансэпителиального электрического сопротивления и увеличением проницаемости для маннитола.

5. Установлено, что белки межклеточных контактов принимают участие в регуляции барьерной функции назального эпителия на модели клеток RPMI 2650. В компенсаторную фазу наблюдается значительное увеличение относительного количества всех исследуемых белков межклеточных контактов (Е-кадгерин, клаудин-1, окклюдин, ZO-1), что составляет основу для функционального укрепления барьера. В фазу декомпенсации зафиксировано снижение уровня ключевых белков плотных контактов клаудина-1 и окклюдина, что объясняет нарушение параклеточной проницаемости и уменьшение значений трансэпителиального электрического сопротивления.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Клеточная линия RPMI 2650, культивируемая в течение 21 суток может использоваться в качестве стандартизированной и воспроизводимой *in vitro* модели назального эпителия для скрининга интраназальных препаратов, а также изучения механизмов действия лекарственных средств, направленных на укрепление эпителиального барьера при хроническом риносинусите и аллергическом рините.

2. Выявленные изменения количества белков плотных контактов (клаудин-1, окклюдин) в фазу декомпенсации могут рассматриваться в качестве потенциальных молекулярных мишеней с целью предотвращения необратимого повреждения назального барьера.

3. Полученные данные об активации миграции и пути EGF в ответ на воспаление создают основу для изучения стимулов и регуляторов регенерации назального эпителия.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Двухфазное влияние фактора некроза опухоли- $\alpha$  на клетки линии RPMI 2650 *in vitro* / Ю. В. Абаленихина, **Д.И. Бреславец**, С.О. Солотнова [и др.] – Текст: непосредственный // **Биомедицинская химия**. – 2025. – Т.71, № 6. – С. 414-423.
2. Влияние фактора некроза опухоли альфа на проницаемость монослоя клеток назального эпителия / Ю.В. Абаленихина, **Д.И. Бреславец**, П.Ю. Мыльников [и др.] – Текст: непосредственный // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2025. – Т.180, № 12. – С. 774-779.
3. Миграционная активность клеток линии RPMI 2650 в условиях индуцированного воспаления / **Д.И. Бреславец**, Ю.В. Абаленихина, Е.А. Стрельникова [и др.] – Текст: непосредственный // **Прикладные информационные аспекты медицины**. – 2025. – Т.28, № 4. – С. 94-100.
4. Относительное количество белков межклеточных контактов в динамике формирования монослоя клеток линии RPMI2650 / **Д.И. Бреславец**, Ю.В. Абаленихина, А.В. Щулькин [и др.] – Текст: непосредственный // **Технологии живых систем**. – 2025. – Т.22, № 2. – С. 58-65.
5. Исследование влияния фактора некроза опухоли- $\alpha$  на трансэпителиальное электрическое сопротивление монослоя клеток RPMI2650 / Ю.В. Абаленихина, **Д.И. Бреславец**, С.Г. Буйлина — Текст: непосредственный // **Медицинская наука без границ – 2025: материалы международного молодежного форума**. – Ставрополь, 2025. – С. 200-201.
6. Способ культивирования клеток RPMI 2650 / **Д.И. Бреславец**, П.Д. Ананьева – Текст: непосредственный // **Альманах молодой науки**. – 2024. – № 1. – С. 79-81.
7. Изменение относительного количества E-кадгерина при культивировании клеток RPMI2650 / **Д.И. Бреславец**, А.В. Буйлина, Ю.В. Абаленихина [и др.] – Текст: непосредственный // **Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста: Сборник докладов X Всеросс. науч. конф. с международным участием молодых специалистов, аспирантов, ординаторов, посвященной 175-летию со дня рождения академика И.П. Павлова и 120-летию со дня получения им Нобелевской премии**. – Рязань, 2024. – С. 15-16.
8. Динамика изменения содержания окклюдина при культивировании клеток RPMI 2650 / **Д.И. Бреславец**, Ю.В. Абаленихина, А.В. Щулькин [и др.] – Текст: непосредственный // **Клеточные технологии в экспериментальной медицине: сборник научных трудов по материалам III Международной научно-практической конференции**. – Курск, 2024. – С. 23-24.
9. Клеточная линия RPMI 2650 как модель назального эпителия *in vitro* для исследований транспорта веществ / **Д.И. Бреславец**, Ф.Т. Гаджиева, Ю.В. Абаленихина – Текст: непосредственный // **Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста: сборник докладов IX Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов**. – Рязань, 2023. – С. 138-139.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией  
ФНО- $\alpha$  – фактор некроза опухоли-альфа  
DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндола  
EGF – эпидермальный фактор роста  
GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

TEER – трансэпителиальное электрическое сопротивление  
Nf- $\kappa$ B – ядерный фактор каппа-B  
FBS – фетальная бычья сыворотка  
ZO-1 – Zonula Occludens-1