

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### ДВУХФАЗНОЕ ВЛИЯНИЕ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ- $\alpha$ НА КЛЕТКИ ЛИНИИ RPMI 2650 *IN VITRO*

Ю.В. Абаленихина\*, Д.И. Бреславец, С.О. Солотнова, С.Г. Буйлина, А.В. Шулькин, Е.Н. Якушева

Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова,  
390026, Рязань, ул. Высоковольная, 9; \*эл. почта: abalenihiina88@mail.ru

Фактор некроза опухоли- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) — ключевой провоспалительный цитокин, повышение уровня которого наблюдается при воспалительных заболеваниях верхних дыхательных путей. В работе исследовано дозо- и времязависимое влияние TNF $\alpha$  (1–100 нг/мл, 6–48 ч) на линию клеток RPMI 2650 — модели назального эпителия. Кратковременное воздействие (6 ч) вызывало активацию NF- $\kappa$ B и повышение уровня белков межклеточных контактов E-кадгерина и ZO-1 без существенного влияния на жизнеспособность. Продолжительная экспозиция (24–48 ч) приводила к увеличению уровня про-IL-1 $\beta$ , активации апоптоза и снижению жизнеспособности клеток. При этом отмечалось снижение уровня белков межклеточных контактов. Таким образом, при кратковременном воздействии TNF $\alpha$  может оказывать защитное действие, повышая плотность межклеточных контактов, а при увеличении длительности экспозиции он запускает процессы апоптоза и снижает плотность межклеточных контактов, что может способствовать повышению проницаемости клеточного слоя.

**Ключевые слова:** фактор некроза опухоли; RPMI 2650; апоптоз; белки межклеточных контактов

**DOI:** 10.18097/PBMCR1633

#### ВВЕДЕНИЕ

Фактор некроза опухоли- $\alpha$  (англ.: Tumor Necrosis Factor, TNF $\alpha$ ) — один из центральных цитокинов, который участвует в регуляции иммунного ответа, воспаления и гибели клеток [1]. TNF $\alpha$  может действовать как медиатор, активируя через NF- $\kappa$ B экспрессию генов вторичных провоспалительных цитокинов, таких как IL-1, а также молекул адгезии, что усиливает воспалительный ответ [2] или запускает апоптоз, активируя эффекторные каспазы и нарушая баланс Bcl-2 белков [3].

Интраназальное введение является перспективным способом доставки лекарственных веществ в ЦНС, минуя гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), а также в системный кровоток [4]. Любой интраназально вводимый препарат первоначально контактирует с назальным эпителием и должен проникнуть через него, чтобы дальше попасть в системный кровоток или транспортироваться по ходу нервов в ЦНС. Состояние эпителиальных клеток и плотные контакты между ними являются одним из основных факторов определяющих биодоступность лекарственных веществ [5]. С другой стороны, слизистая оболочка носовых путей постоянно находится в контакте с окружающей средой и регулярно подвергается воздействию агентов инфекционной и неинфекционной природы, что может приводить к развитию местной воспалительной реакции. Для прогнозирования эффективности интраназального введения лекарственных веществ необходимо знать, как влияет развивающееся воспаление на состояние назального эпителия и межклеточных контактов, образуемых им.

Клетки линии RPMI 2650, происходящие из карциномы носовой перегородки человека, при культивировании способны полярно дифференцироваться; они образуют межклеточные контакты, характерные для назального эпителия, микроворсинки на апикальной поверхности и начинают продуцировать мукоидный материал на поверхности клеток [6]. Благодаря вышеупомянутым свойствам эти клетки широко используются в исследованиях токсичности, проницаемости слизистой оболочки носа, метаболизма и транспорта лекарственных средств [7, 8].

Целью настоящего исследования было проведение комплексной оценки дозо- и времязависимого влияния TNF $\alpha$  на состояние клеток линии RPMI 2650.

#### МЕТОДИКА

##### Культивирование клеток

Клеточная линия RPMI 2650 была закуплена в Институте цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН, Санкт-Петербург, Россия). Клетки RPMI 2650 культивировали в питательной среде MEM (“ПанЭко”, Россия) с добавлением 10% FBS (fetal bovine serum, фетальная бычья сыворотка), 2 mM L-глутамин, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (все компоненты производства “ПанЭко”) при температуре 37°C и 5% содержании CO<sub>2</sub> в инкубаторе WS-189C (“World Science”, Корея). Клетки культивировали в флаконах (25 см<sup>2</sup>) и 6-луночных планшетах (“Corning”, США) в течение 14 дней после формирования монослоя в 6-луночных планшетах



(“Corning”) [9], далее в питательную среду вносили индуктор воспаления TNF $\alpha$  (“Cloud-Clone Corp.”, Китай) в концентрациях 1 нг/мл, 5 нг/мл, 10 нг/мл, 50 нг/мл и 100 нг/мл в течение 6 ч, 24 ч и 48 ч. Для поддержания концентрации тестируемого вещества смену среды выполняли каждые 12 ч.

*Оценка доли популяции живых клеток методом проточной цитометрии*

Оценку доли популяции живых и мёртвых клеток проводили методом проточной цитометрии с использованием ДНК-связывающего красителя DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндола, “Sigma-Aldrich”, США). После инкубации с TNF $\alpha$  в заданных концентрациях и временных точках клетки линии RPMI 2650 трипсинизировали, дважды отмывали фосфатно-солевым буфером (“ПанЭко”). Клеточную суспензию инкубировали с DAPI в конечной концентрации 0,5 мкг/мл в течение 10 мин при комнатной температуре в темноте. Анализ проб выполняли немедленно после окрашивания на проточном цитометре SinoCyteCluster (“SinoCyte”, Китай) с использованием лазера с длиной волны 405 нм для возбуждения флуоресценции DAPI; детекцию сигнала проводили в канале, соответствующем длине волны 450 $\pm$ 50 нм. Для каждого образца регистрировали не менее 10000 событий. Клетки с повышенной интенсивностью флуоресценции DAPI, свидетельствующей о нарушении целостности мембраны и проникновении красителя в ядро, идентифицировали как нежизнеспособные (позитивные по DAPI). Данные анализировали с использованием программного обеспечения, предоставленного производителем цитометра.

*Определение относительного количества pro-IL1 $\beta$ , Cleaved-Caspase-3, Bcl-2, Nf- $\kappa$ B, ZO-1, E-кадгерина методом вестерн-блот*

Количество белков оценивали методом вестерн-блот. По окончании эксперимента клетки линии RPMI 2650 снимали с поверхности лунок 6-луночного планшета раствором трипсин-ЭДТА (0,25% трипсин и 0,2% ЭДТА, “Sigma-Aldrich”, Германия), трижды промывали раствором фосфатного буфера (“ПанЭко”). Для определения pro-IL1 $\beta$ , Cleaved-Caspase-3, Bcl-2, ZO-1, E-кадгерина клетки лизировали в RIPA Cell Lysis Buffer Thermo (“Thermo Fisher Scientific”, США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ (“Sigma-Aldrich”, Германия) в течение 30 мин при 4 $^{\circ}$ C и постоянном перемешивании из расчёта 10<sup>7</sup> клеток на 100 мкл буфера. Полученный лизат центрифугировали при 5000 g (CM-50, “Eppendorf”, Германия). Супернатант использовали для выполнения анализа вестерн-блот.

Для определения уровня NF- $\kappa$ B в ядерной фракции клетки лизировали с использованием набора ReadyPrep Protein extraction kit (“Bio-Rad”, США) с ингибиторами протеаз (“Sigma Aldrich”, США).

30 мкг белков тотального лизата (pro-IL1 $\beta$ , Cleaved-Caspase-3, Bcl-2, ZO-1, E-кадгерина) и ядерной фракции (NF- $\kappa$ B) подвергали электрофорезу с использованием 7,5% TGX Stain-Free FastCast

Acrylamide Kit (“Bio-Rad”) в буферной системе Laemmli (“BioRad”). Образцы смешивали с буфером Laemmli (“Bio-Rad”), содержащем 50 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол (“BioRad”) в соотношении 1:2, инкубировали 10 мин при температуре 70 $^{\circ}$ C. Гели подвергали электрофорезу при 100 В в течение 90 мин.

Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Trans-Blot Turbo Mini-Size nitrocellulose, “Bio-Rad”) с использованием Mini Trans-Blot (“Bio-Rad”). Программное обеспечение выбирали согласно молекулярной массе белка.

Белки на мембране блокировали 1% раствором EveryBlot Blocking Buffer (“Bio-Rad”), содержащим 0,1% Tween в течение 30 мин при комнатной температуре.

Детекцию белков проводили с использованием первичных кроличьих поликлональных антител к pro-IL1 $\beta$ , Cleaved-Caspase-3, Bcl-2, E-cadgerin, ZO-1 (цитоплазматическая фракция лизата) и Nf- $\kappa$ B (Antibody, “Affinity”, Китай) (ядерная фракция лизата) в концентрации 1:500 (разведение в блокирующем растворе) в течение 2 ч при 37 $^{\circ}$ C.

Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных козьих антител (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP, “Invitrogen”, США) в разведении 1:4000 и инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре. Хемилуминесценцию фиксировали с помощью ChemiDocXRS+ (“Bio-Rad”). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab (“Bio-Rad”).

Молекулярная масса была подтверждена путём сравнения с маркерами молекулярной массы (Precision plus protein standards Dual Color, “Bio-Rad”).

Содержание белков в цитоплазме оценивали относительно глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH, англ.: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, первичные антитела GAPDH, “Affinity”), разведение 1:1000, а в ядре — ламинина B1 (“Affinity”) вторичные кроличьи антитела — Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP (“Invitrogen”), разведение 1:4000). Оптимизация и валидация метода вестерн-блот была выполнена для каждого белка.

Каждый эксперимент был выполнен в 3-кратном повторении. Анализ результатов осуществляли с помощью программы GraphPad Prism Version 9.5.0. Для оценки статистической значимости различий использовали дисперсионный анализ ANOVA, попарные сравнения оценивали по критерию Даннетта. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

При воздействии TNF $\alpha$  происходит увеличение уровня NF- $\kappa$ B в ядерной фракции лизата клеток при сроках воздействия 6 ч и концентрациях цитокина 1 нг/мл, 10 нг/мл, 50 нг/мл и 100 нг/мл на 25,0% ( $p = 0,02$ ), 62,3% ( $p < 0,0001$ ),

## ДВУХФАЗНОЕ ВЛИЯНИЕ TNF $\alpha$ НА КЛЕТКИ ЛИНИИ RPMI 2650

45,5% ( $p = 0,0002$ ), 34,2% ( $p = 0,0025$ ) соответственно. Важно отметить, что изменения носили дозозависимый характер между концентрациями 1 нг/мл и 10 нг/мл, 10 нг/мл и 100 нг/мл, а также между 50 нг/мл и 100 нг/мл (рис. 1). При инкубации в течение 24 ч увеличение уровня NF- $\kappa$ B отмечалось при концентрациях TNF 10 нг/мл, 50 нг/мл и 100 нг/мл на 137,8% ( $p = 0,001$ ), 78,5% ( $p = 0,03$ ) и 79,5% ( $p = 0,03$ ) соответственно; дозозависимые различия были зафиксированы только между концентрациями 1 нг/мл и 10 нг/мл на 93,9% ( $p = 0,004$ ) (рис. 1). При инкубации в течение 48 ч уровень NF- $\kappa$ B возрастал при действии TNF $\alpha$  в концентрациях 10 нг/мл, 50 нг/мл и 100 нг/мл на 32,0% ( $p = 0,02$ ), 33,2% ( $p = 0,02$ ) и 29,0% ( $p = 0,03$ ) соответственно, а дозозависимые различия зафиксированы не были.

Таким образом, TNF $\alpha$  запускает активацию транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B, представляющего собой ключевой регуляторный белок, контролирующей экспрессию генов, участвующих в клеточном выживании, пролиферации и воспалительном ответе [10]. В неактивном состоянии NF- $\kappa$ B находится в цитоплазме в комплексе с ингибиторными белками I $\kappa$ B. Активация сигнального каскада, инициируемая в данном исследовании TNF $\alpha$ , приводит к транслокации NF- $\kappa$ B в ядро, что подтверждается результатами вестерн-блот анализа. В настоящее время известно, что фосфорилирование и последующая деградация I $\kappa$ B лежит в основе данного процесса [2]. Высвобожденный NF- $\kappa$ B

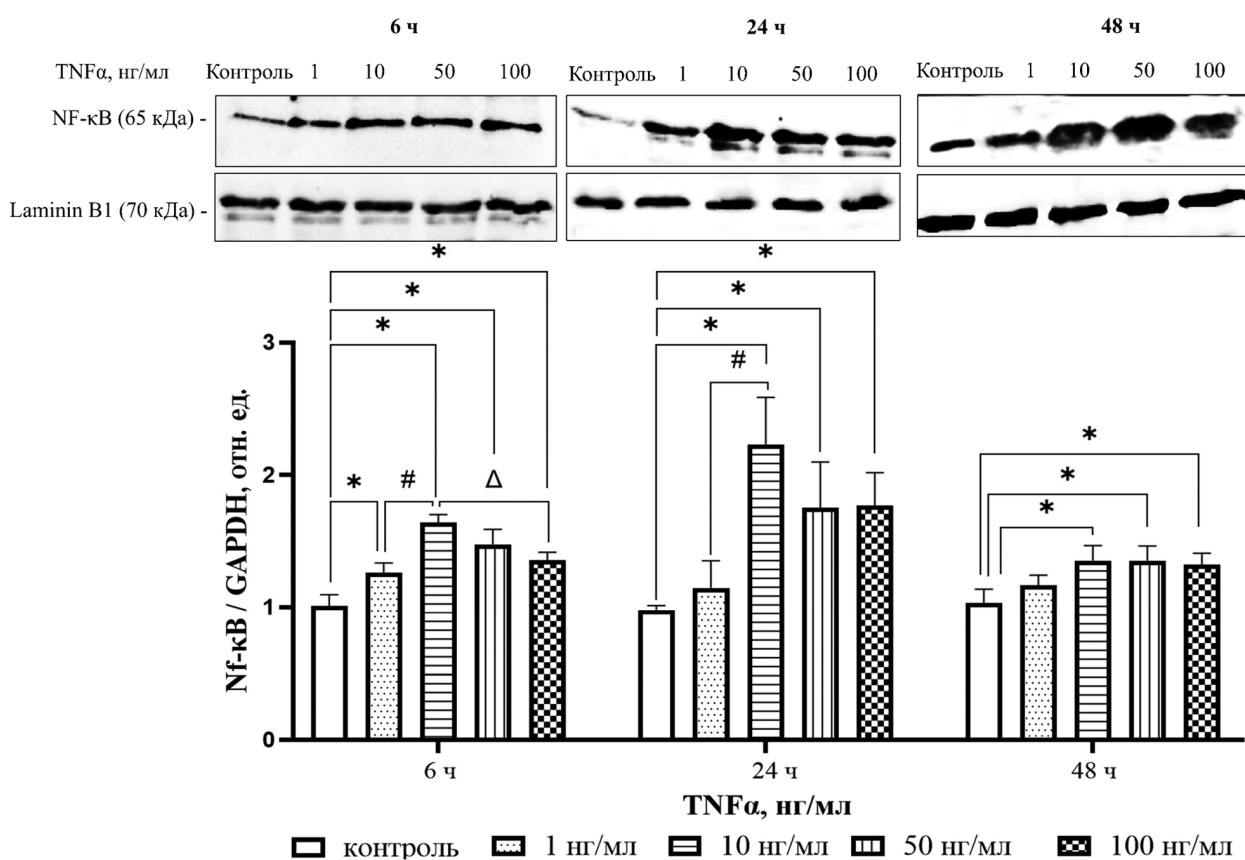
транслоцируется в ядро, где связывается со специфическими последовательностями ДНК и регулирует транскрипцию целевых генов.

В ядре NF- $\kappa$ B связывается с промоторами генов многочисленных провоспалительных цитокинов, включая IL-1 $\beta$  [11].

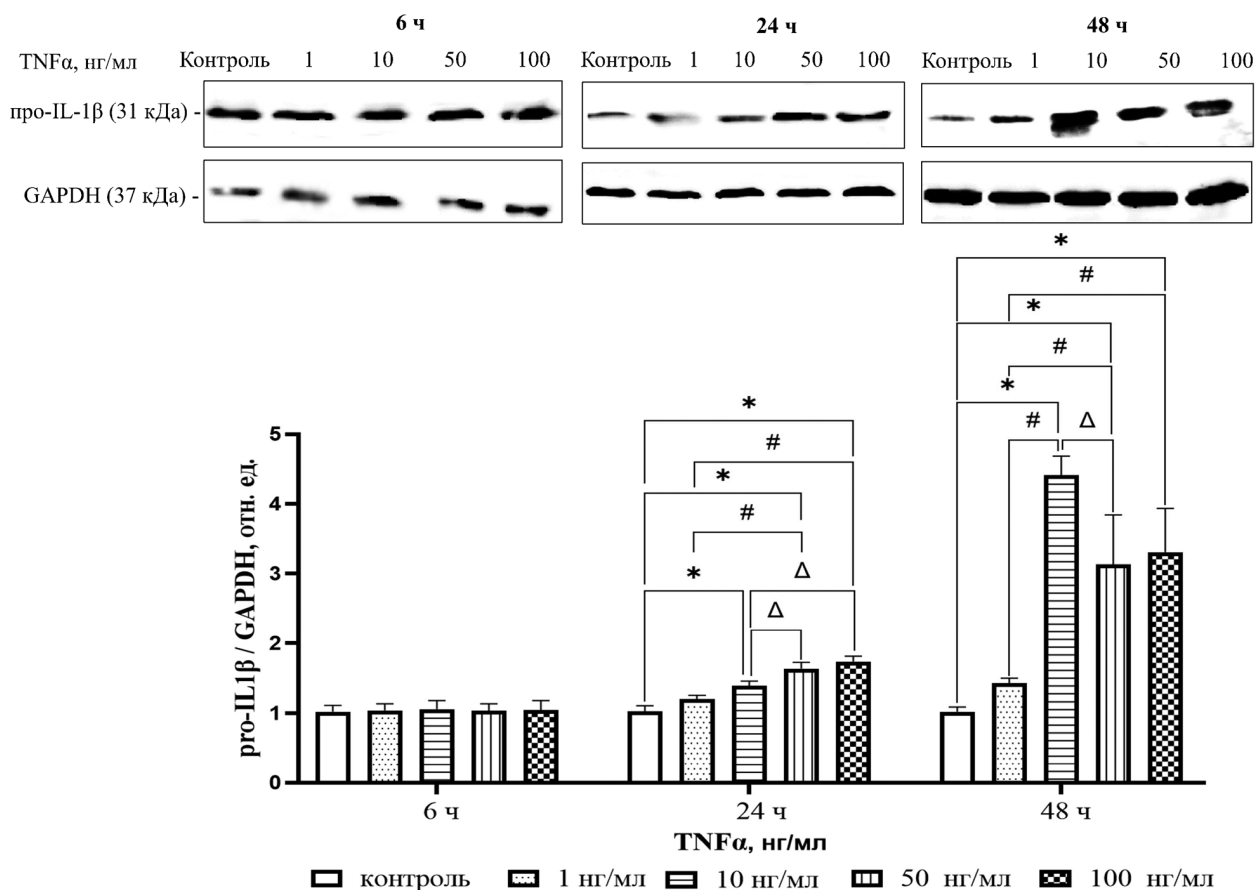
В результате вестерн-блот анализа в цитоплазматической фракции клеточных лизатов была детектирована иммуореактивная полоса с молекулярной массой приблизительно 31 кДа, соответствующая неактивной предшествующей форме интерлейкина-1 $\beta$  — про-IL-1 $\beta$  [12].

Относительное количество про-IL-1 $\beta$  не изменялось при воздействии TNF $\alpha$  в течение 6 ч. При увеличении времени инкубации до 24 ч относительно контроля было получено увеличение уровня про-IL-1 $\beta$  при воздействии TNF $\alpha$  в концентрациях 10 нг/мл, 50 нг/мл, 100 нг/мл на 39,0% ( $p = 0,001$ ), 63,3% ( $p < 0,0001$ ) и 73,7% ( $p < 0,0001$ ) соответственно. Дозозависимые изменения наблюдали относительно концентрации 1 нг/мл при 50 нг/мл и 100 нг/мл на 35,8% ( $p = 0,0002$ ) и на 44,2% ( $p < 0,0001$ ) соответственно и относительно концентрации 10 нг/мл при 50 нг/мл и 100 нг/мл на 17,3% ( $p = 0,02$ ) и 24,4% ( $p = 0,02$ ) соответственно (рис. 2).

При времени инкубации 48 ч также была отмечена дозозависимая тенденция относительно контроля и концентраций 10 нг/мл,



**Рисунок 1.** Относительное количество NF- $\kappa$ B в клетках линии RPMI 2650 при воздействии TNF $\alpha$  в концентрациях 1 нг/мл, 10 нг/мл, 50 нг/мл и 100 нг/мл в течение 6 ч, 24 ч и 48 ч. Статистически значимые отличия: \* – от контроля; # – от группы 1 нг/мл;  $\Delta$  – от группы 10 нг/мл.



**Рисунок 2.** Относительное количество про-IL-1 $\beta$  в клетках линии RPMI 2650 при воздействии TNF $\alpha$  в концентрациях 1 нг/мл, 10 нг/мл, 50 нг/мл и 100 нг/мл в течение 6 ч, 24 ч и 48 ч. Статистически значимые отличия: \* – от контроля; # – от группы 1 нг/мл;  $\Delta$  – от группы 10 нг/мл.

50 нг/мл и 100 нг/мл на 341,0% ( $p < 0,0001$ ), 213,0% ( $p = 0,0012$ ) и 230,0% ( $p = 0,0006$ ) соответственно. Относительно концентрации 1 нг/мл при концентрациях 10 нг/мл, 50 нг/мл и 100 нг/мл были получены статистически значимые различия на 210,6% ( $p < 0,0001$ ), 120,4% ( $p = 0,005$ ) и 132,6% ( $p = 0,003$ ), а между концентрациями 10 нг/мл и 50 нг/мл на 29,0% ( $p = 0,03$ ) (рис. 2).

Известно, что NF- $\kappa$ B регулирует транскрипцию гена *IL-1 $\beta$*  и индуцирует выработку про-IL-1 $\beta$  в клетках [13]. Таким образом, накопление про-IL-1 $\beta$  в клетке служит прямым маркером транскрипционной активности NF- $\kappa$ B, индуцированной TNF $\alpha$ , и является подтверждением активации этого сигнального пути.

Для оценки функциональных последствий активации сигнального пути NF- $\kappa$ B–про-IL-1 $\beta$  была определена выживаемость клеток. Обработка клеток RPMI 2650 TNF $\alpha$  в концентрациях 1 нг/мл, 10 нг/мл, 50 нг/мл и 100 нг/мл в течение 6 ч, 24 ч и 48 ч показала дозозависимое и времязависимое снижение доли живых клеток.

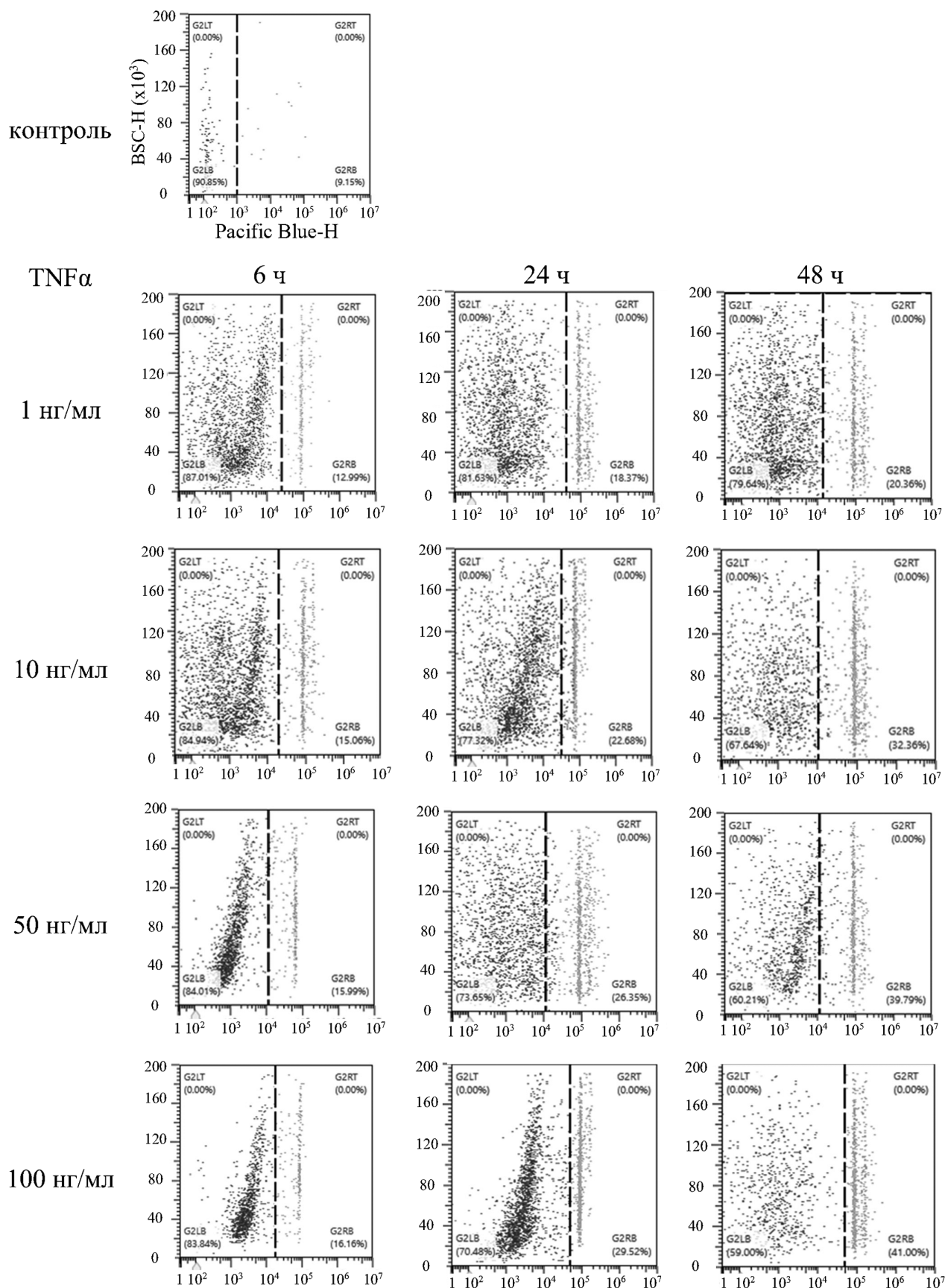
При кратковременной экспозиции (6 ч) значительного снижения жизнеспособности не было отмечено ни в одной из тестируемых концентраций по сравнению с контрольной группой (клетки, не обработанные TNF $\alpha$ ). Доля живых клеток оставалась на уровне  $> 85,13 \pm 11,02\%$  ( $p > 0,05$ )

во всех опытных группах, что указывает на отсутствие немедленного цитотоксического эффекта TNF $\alpha$  в данном временном промежутке. Важно отметить, что в контроле популяция клеток смещена влево (DAPI-отрицательный ответ), при воздействии TNF $\alpha$  популяция клеток смещена вправо, что указывает на тенденцию снижения жизнеспособности клеток (рис. 3).

При воздействии TNF $\alpha$  в течение 24 ч при концентрациях 1 нг/мл, 10 нг/мл и 50 нг/мл доля живых клеток незначительно снизилась до  $81,63 \pm 5,23\%$  ( $p > 0,05$ ),  $77,32 \pm 8,12\%$  ( $p > 0,05$ ) и  $73,65 \pm 10,05\%$  ( $p > 0,05$ ) соответственно. При концентрации 100 нг/мл обнаружено статистически значимое снижение доли живых клеток до  $70,48 \pm 6,05\%$  ( $p = 0,03$ ), а популяция клеток смещена вправо — в сторону повышения сигнала (DAPI-позитивная реакция) (рис. 3).

Наиболее значительный эффект был зафиксирован через 48 ч инкубации с TNF $\alpha$ . Цитотоксическое действие носило более выраженный эффект: 1 нг/мл — доля живых клеток снизилась до  $79,64 \pm 3,23\%$  ( $p = 0,045$ ), 10 нг/мл — снизилась до  $67,64 \pm 7,43\%$  ( $p = 0,03$ ), 50 нг/мл и 100 нг/мл — снизилась до  $60,21 \pm 4,32\%$  ( $p = 0,03$ ) и  $59,0 \pm 5,15\%$  ( $p = 0,01$ ) соответственно. Анализ проточной цитометрии демонстрировал значительный сдвиг популяции в сторону DAPI-позитивных клеток (рис. 3).

ДВУХФАЗНОЕ ВЛИЯНИЕ TNF $\alpha$  НА КЛЕТКИ ЛИНИИ RPMI 2650



**Рисунок 3.** Оценка популяции DAPI-положительных и DAPI-негативных популяций клеток линии RPMI 2650 при воздействии TNF $\alpha$  в течение 6 ч, 24 ч и 48 ч. BSC-H (англ. Backward Scatter-Height, боковое светорассеивание-высота) — физический параметр, характеризующий рассеивание света; Pacific Blue-H — интенсивность флуоресценции в синем диапазоне спектра.

Таким образом, в контроле наблюдается низкий DAPI-сигнал (DAPI-негативные клетки), что свидетельствует о сохранении целостности ядерной мембраны. Под действием TNF $\alpha$  количество DAPI-положительных клеток возрастает, что указывает на повышение проницаемости ядерной оболочки и отмечается при запуске клеточной гибели. В регуляции выживания клеток решающую роль играет Nf- $\kappa$ B, регулируя гены, участвующие в выживании клеток и апоптозе [14].

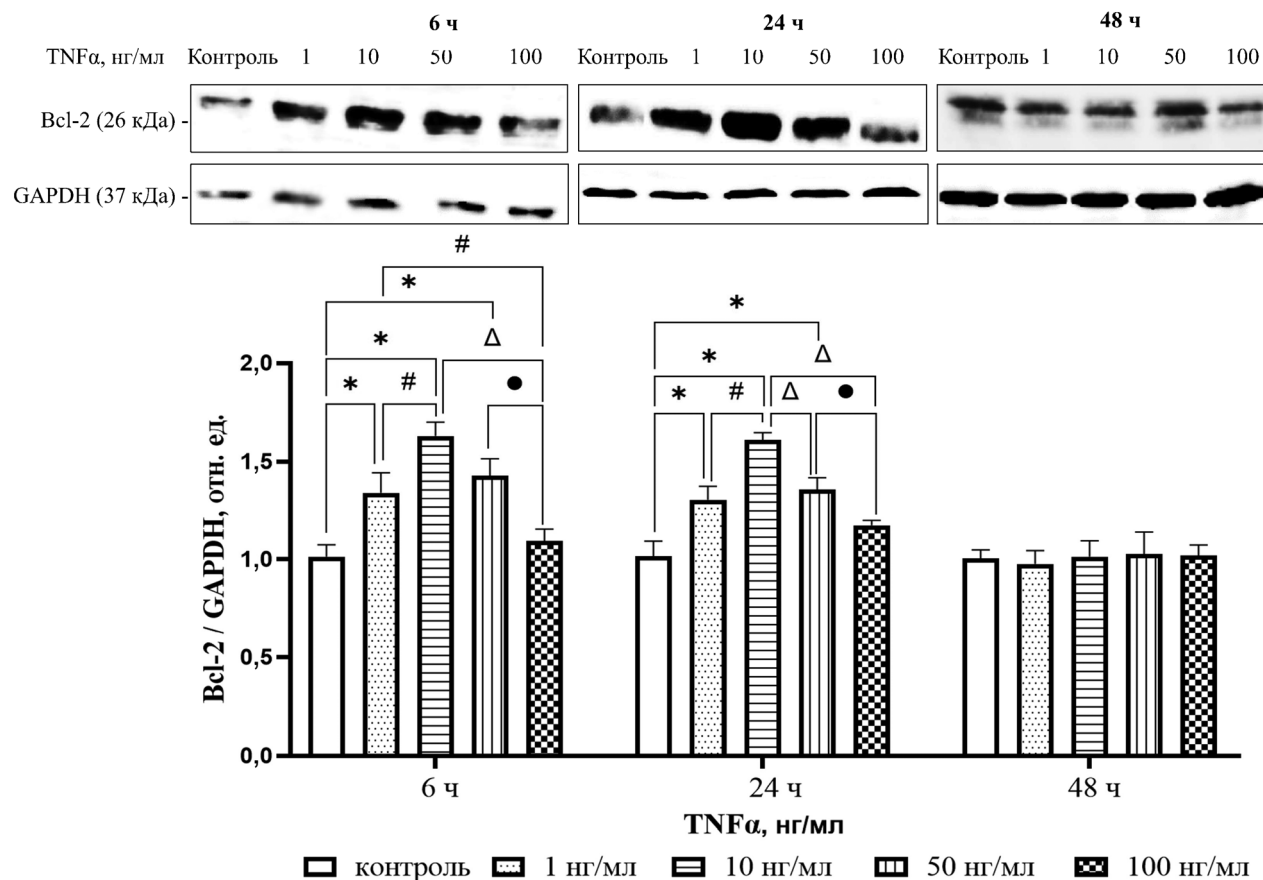
Для уточнения вклада данного механизма была проведена оценка относительного количества антиапоптотического белка Bcl-2 в клетках RPMI 2650.

При воздействии TNF $\alpha$  в течение 6 ч в концентрациях 1 нг/мл, 10 нг/мл и 50 нг/мл уровень Bcl-2 в клетках RPMI 2650 возрастал на 32,7% ( $p = 0,003$ ), 61,4% ( $p < 0,0001$ ) и 40,6% ( $p = 0,0005$ ) соответственно. Изменения носили дозозависимый характер — 1 нг/мл и 10 нг/мл на 21,6% ( $p = 0,007$ ), 1 нг/мл и 100 нг/мл на 18,6% ( $p = 0,02$ ), 10 нг/мл и 100 нг/мл на 33,1% ( $p < 0,0001$ ), 50 нг/мл и 100 нг/мл на 23,2% ( $p = 0,003$ ). При воздействии TNF $\alpha$  в течение 24 ч и концентрациях 1 нг/мл, 10 нг/мл и 50 нг/мл уровень Bcl-2 возрастал в клетках RPMI 2650 на 29,0% ( $p = 0,0008$ ), 33,6% ( $p < 0,0001$ ) и 33,7% ( $p = 0,0002$ ) соответственно. Изменения носили дозозависимый характер между концентрациями 1 нг/мл и 10 нг/мл на 23,8%

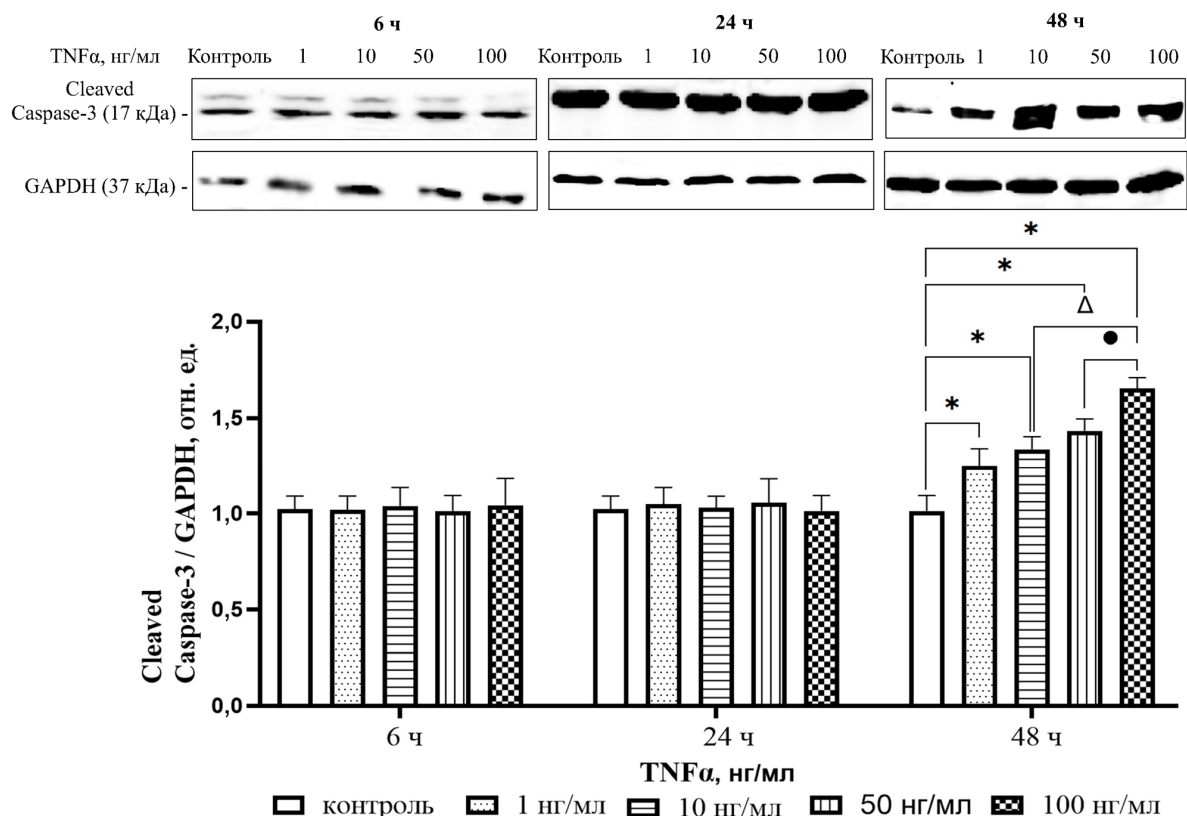
( $p = 0,0005$ ), 10 нг/мл и 50 нг/мл на 16,1% ( $p = 0,002$ ), 10 нг/мл и 100 нг/мл на 27,3% ( $p < 0,0001$ ), 50 нг/мл и 100 нг/мл на 14,0% ( $p = 0,02$ ). При инкубации в течение 48 ч статистически значимых изменений зафиксировано не было (рис. 4).

Каспаза-3 присутствует в клетке как в неактивной (молекулярная масса 32 кДа), так и в активной форме, оценка именно расщепленной формы (cleaved) позволяет однозначно идентифицировать запуск клеточной гибели. Детекция большой субъединицы с молекулярной массой ~17 кДа с помощью вестерн-блоттинга является наиболее специфичным методом подтверждения активации каспазы-3 [15].

При инкубации в течение 6 ч и 24 ч достоверных изменений относительного количества cleaved каспазы-3 не наблюдали. Полученные результаты показывают, что воздействие TNF $\alpha$  приводит к увеличению относительного количества расщепленной формы каспазы-3 в клетках линии RPMI 2650 только при сроке инкубации в течение 48 ч и концентрациях 1 нг/мл, 10 нг/мл, 50 нг/мл и 100 нг/мл на 25,0% ( $p = 0,02$ ), 33,7% ( $p = 0,002$ ), 43,3% ( $p = 0,0002$ ) и 65,3% ( $p < 0,0001$ ) соответственно. Изменения носили дозозависимый характер относительно концентрации 100 нг/мл и 1 нг/мл, 10 нг/мл и 50 нг/мл — увеличение на 24,2% ( $p = 0,0003$ ), 19,3% ( $p = 0,002$ ), 13,3% ( $p = 0,02$ ) (рис. 5).



**Рисунок 4.** Относительное количество Bcl-2 в клетках линии RPMI 2650 при воздействии TNF $\alpha$  в концентрациях 1 нг/мл, 10 нг/мл, 50 нг/мл и 100 нг/мл в течение 6 ч, 24 ч и 48 ч. Статистически значимые отличия: \* – от контроля; # – от группы 1 нг/мл;  $\Delta$  – от группы 10 нг/мл;  $\bullet$  – от группы 50 нг/мл.



**Рисунок 5.** Относительное количество расщеплённой формы каспазы-3 в клетках линии RPMI 2650 при воздействии TNF $\alpha$  в концентрациях 1 нг/мл, 10 нг/мл, 50 нг/мл и 100 нг/мл в течение 6 ч, 24 ч и 48 ч. Статистически значимые отличия: \* – от контроля; # – от группы 1 нг/мл;  $\Delta$  – от группы 10 нг/мл;  $\bullet$  – от группы 50 нг/мл.

Таким образом, потеря жизнеспособности клеток сопровождается увеличением уровня расщеплённой формы каспазы-3, что может свидетельствовать о запуске процессов клеточной гибели в условиях пролонгированного действия TNF $\alpha$ .

Относительное количество E-кадгерина при инкубации клеток с TNF $\alpha$  6 ч в концентрации 10 нг/мл возрастало на 43,7% ( $p = 0,0012$ ) относительно контрольных значений (рис. 6). Изменения носили дозозависимый характер: между концентрациями 1 нг/мл и 10 нг/мл увеличение уровня на 33,3% ( $p = 0,0084$ ), между 10 нг/мл и 50 нг/мл снижение на 55,0% ( $p = 0,0002$ ), между 10 нг/мл и 100 нг/мл на 50,0% ( $p = 0,0004$ ) (рис. 6). При увеличении срока экспозиции до 24 ч наблюдали повышение относительного количества E-кадгерина на 83,6% ( $p = 0,0001$ ), 72,7% ( $p = 0,0004$ ) под воздействием TNF $\alpha$  в концентрациях 10 нг/мл и 50 нг/мл соответственно относительно контроля (рис. 6). Изменения зависели от концентрации TNF $\alpha$ : между 1 нг/мл и 10 нг/мл на 82,7% ( $p = 0,0001$ ), 1 нг/мл и 50 нг/мл на 71,7% ( $p = 0,0004$ ); между 10 нг/мл и 50 нг/мл на 101,0% ( $p = 0,0001$ ), 10 нг/мл и 100 нг/мл на 90,0% ( $p < 0,0001$ ) (рис. 6). При инкубации с TNF $\alpha$  48 ч отмечено изменение на 41,3% ( $p = 0,048$ ) в группе 100 нг/мл относительно контроля.

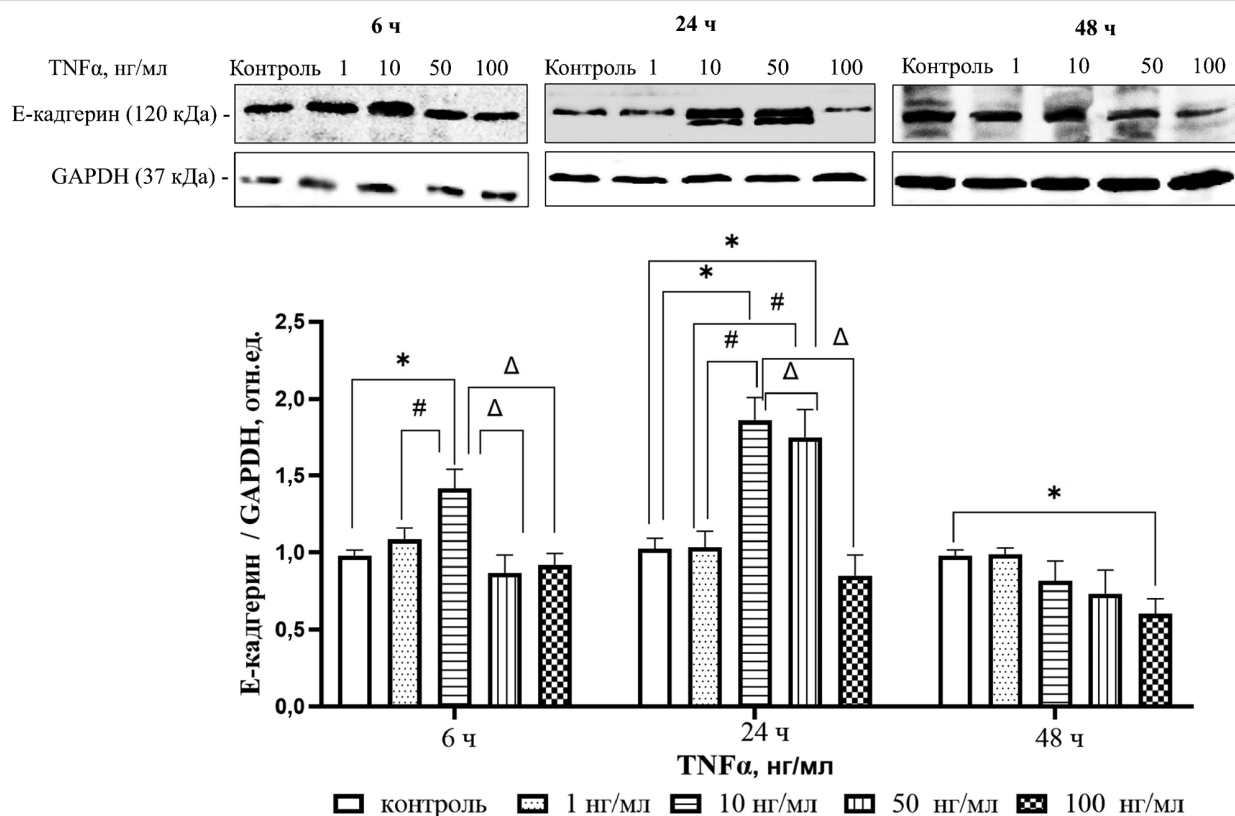
Относительное количество ZO-1 при воздействии TNF $\alpha$  в течение 6 ч и концентрациях 10 нг/мл, 50 нг/мл и 100 нг/мл увеличивалось на 39,2% ( $p = 0,0043$ ), 49,7% ( $p = 0,0008$ ) и 69,1% ( $p < 0,0001$ ) соответственно относительно контрольных значений (рис. 7).

Изменения носили дозозависимый характер: между 1 нг/мл и 10 нг/мл на 30,0% ( $p = 0,02$ ), 10 нг/мл и 50 нг/мл на 40,3% ( $p = 0,036$ ) и 1 нг/мл и 100 нг/мл на 60,7% ( $p = 0,0001$ ); между 10 нг/мл и 100 нг/мл на 30,8% ( $p = 0,023$ ).

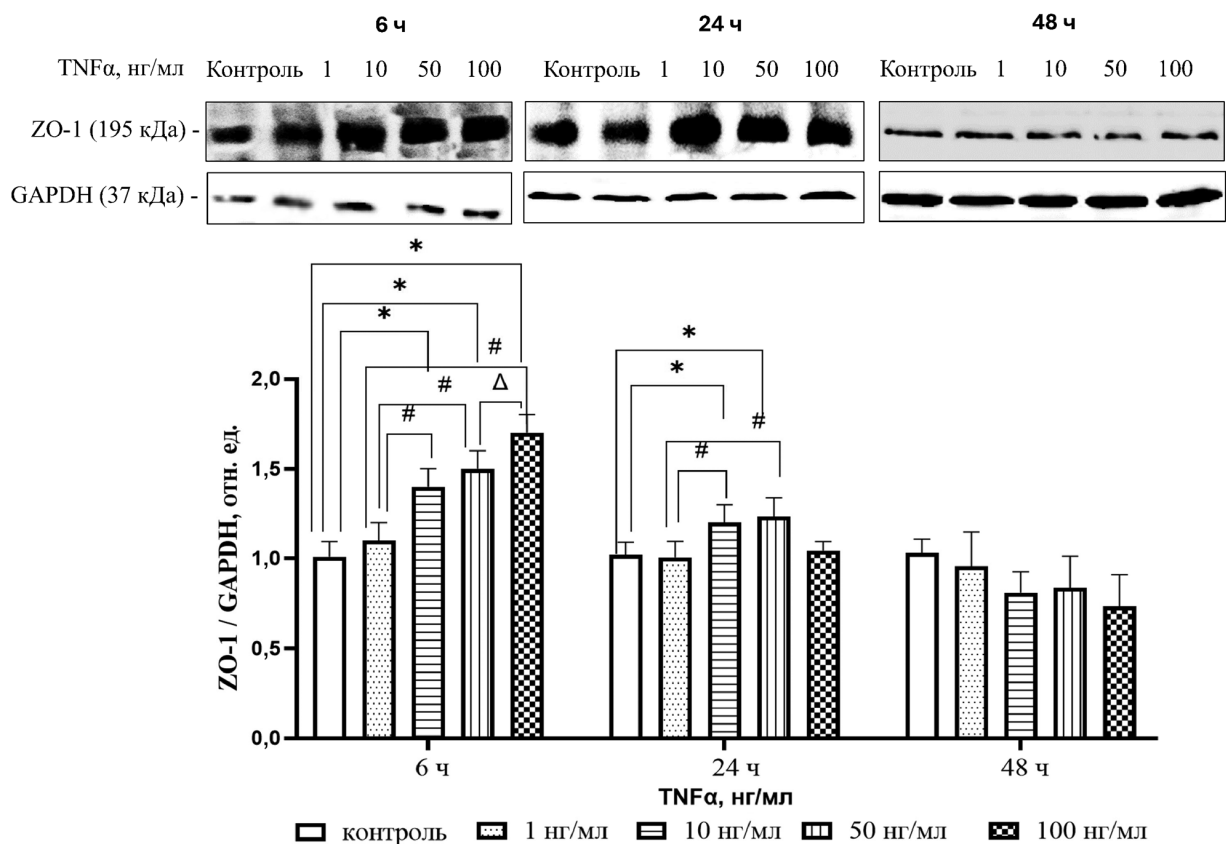
При воздействии TNF $\alpha$  в течение 24 ч и концентрациях 50 нг/мл и 100 нг/мл уровень ZO-1 увеличивался соответственно на 23,3% ( $p = 0,046$ ) и 23,8% ( $p = 0,04$ ) относительно контрольных значений. Дозозависимые различия были между концентрациями 1 нг/мл и 50 нг/мл на 24,7% ( $p = 0,034$ ) и между 1 нг/мл и 100 нг/мл на 20,5% ( $p = 0,035$ ) (рис. 7).

При воздействии TNF $\alpha$  в течение 48 ч изменений в уровне белка межклеточных контактов ZO-1 получено не было (рис. 7).

Наиболее значимым результатом нашего исследования стала наблюдаемая двухфазная динамика изменения ключевых маркеров барьерной функции и клеточной судьбы. Вопреки исходному предположению о прямом нарушающем действии воспаления на эпителиальный барьер, мы зафиксировали значительное увеличение уровня белков межклеточных контактов — E-кадгерина и ZO-1 — в течение первых 24 ч воздействия TNF $\alpha$ . Этот эффект может рассматриваться как компенсаторная реакция эпителия, направленная на укрепление барьера в ответ на воспалительный стимул для предотвращения дальнейшей инвазии патогенов. Подобные защитные механизмы описаны для кишечного эпителия, где некоторые цитокины на ранних стадиях могут временно усиливать барьерную функцию [16, 17].



**Рисунок 6.** Относительное количество E-кадгерина в клетках линии RPMI 2650 при воздействии TNFα в концентрациях 1 нг/мл, 10 нг/мл, 50 нг/мл и 100 нг/мл в течение 6 ч, 24 ч и 48 ч. Статистически значимые отличия: \* – от контроля; # – от группы 1 нг/мл; Δ – от группы 10 нг/мл.



**Рисунок 7.** Относительное количество ZO-1 в клетках линии RPMI 2650 при воздействии TNFα в концентрациях 1 нг/мл, 10 нг/мл, 50 нг/мл и 100 нг/мл в течение 6 ч, 24 ч и 48 ч. Статистически значимые отличия: \* – от контроля; # – от группы 1 нг/мл; Δ – от группы 10 нг/мл.

Параллельно на этой фазе клетки демонстрировали признаки активации антиапоптотических механизмов, о чём свидетельствовало повышение уровня белка Bcl-2. Это согласуется с известной ролью пути NF- $\kappa$ B в индукции генов выживания [14] и объясняет отсутствие значительной потери жизнеспособности клеток в первые 24 ч, несмотря на активное воспаление.

Однако при пролонгированном воздействии (48 ч) картина кардинально менялась. Компенсаторные возможности клеток, по-видимому, были исчерпаны, что проявилось в резком снижении жизнеспособности. Это снижение коррелировало со значительной активацией эффекторной каспазы-3 (Cleaved-Caspase-3), однозначно указывающей на запуск апоптотической гибели клеток [15]. При этом уровень ключевых белков межклеточных контактов возвращался к исходным значениям, что, в совокупности с массовой гибелью клеток, неизбежно должно приводить к нарушению целостности эпителиального пласта. Эта поздняя фаза соответствует классическим представлениям о повреждающей роли хронического воспаления, приводящего к деградации тканевого барьера [18].

С практической точки зрения, выявленная двухфазность имеет прямое отношение к интраназальной доставке лекарственных средств. Временное усиление барьерной функции на ранних стадиях ринита теоретически может снижать биодоступность интраназальных препаратов. Напротив, при затяжном воспалительном процессе массовая гибель клеток и разрушение контактов могут привести к неконтролируемому увеличению проницаемости, что, с одной стороны, повысит системную абсорбцию препарата, а с другой — может способствовать развитию нежелательных побочных эффектов.

**Ограничения исследования.** Основным ограничением нашей работы является то, что выводы о функциональном состоянии барьера сделаны на основе косвенных данных (уровень белков межклеточных контактов и жизнеспособность клеток). Для прямого подтверждения изменений проницаемости в отдельных экспериментах было оценено трансэпителиальное сопротивление (TEER) и проведена оценка проницаемости маннитола. Полученные результаты будут опубликованы в отдельной статье.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе настоящего исследования установлено двухфазное влияние TNF $\alpha$  на клетки назального эпителия — RPMI 2650. При кратковременном воздействии (6–24 ч) TNF $\alpha$  приводит к активации сигнального пути NF- $\kappa$ B и повышает уровень белков межклеточных контактов без существенного влияния на жизнеспособность. Данную фазу можно рассматривать как компенсаторную реакцию, нацеленную на ограничение проникновения агентов, вызвавших воспаление через клеточный монослой.

При пролонгированном воздействии (48 ч) наблюдается активация апоптоза, снижение жизнеспособности клеток и уменьшение количества белков межклеточных контактов, что должно сопровождаться повышением проницаемости слоя назального эпителия. Полученные результаты необходимо иметь в виду при интраназальном применении лекарственных веществ, поскольку повышенная проницаемость монослоя может повысить системную биодоступность применяемых лекарственных препаратов и вызвать развитие нежелательных лекарственных реакций.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке внутривузовского гранта молодых учёных 2025 Рязанского государственного медицинского университета (договор № 2/25 от 10.01.2025).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *van Loo G, Bertrand M.J.M.* (2023) Death by TNF: a road to inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, **23**(5), 289–303. DOI: 10.1038/s41577-022-00792-3
2. *Schütze S, Wiegmann K, Machleidt T, Krönke M.* (1995) TNF-induced activation of NF- $\kappa$ B. *Immunobiology*, **193**(2–4), 193–203. DOI: 10.1016/s0171-2985(11)80543-7
3. *Wang L, Du F, Wang X.* (2008) TNF- $\alpha$  induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell*, **133**(4), 693–703. DOI: 10.1016/j.cell.2008.03.036
4. *Keller L.A., Merkel O., Popp A.* (2022) Intranasal drug delivery: opportunities and toxicologic challenges during drug development. *Drug Deliv. Transl. Res.*, **12**(4), 735–757. DOI: 10.1007/s13346-020-00891-5
5. *Аляутдин Р.Н., Иежица И.Н., Агарвал Р.* (2014) Транспорт лекарственных средств через роговицу глаза: перспективы применения липосомальных лекарственных форм. *Вестник офтальмологии*, **130**(4), 117–122. [*Aliautdin R.N., Iezhitsa I.N., Agarval R.* (2014) Transcorneal drug delivery: prospects for the use of liposomes. *Russian Annals of Ophthalmology*, **130**(4), 117–122.]
6. *Bai S., Yang T., Abbruscato T.J., Ahsan F.* (2008) Evaluation of human nasal RPMI 2650 cells grown at an air-liquid interface as a model for nasal drug transport studies. *J. Pharm. Sci.*, **97**(3), 1165–1178. DOI: 10.1002/jps.21031
7. *Kreft M.E., Jerman U.D., Lasič E., Lanišnik Rižner T., Hevir-Kene N., Peternel L., Kristan K.* (2015) The characterization of the human nasal epithelial cell line RPMI 2650 under different culture conditions and their optimization for an appropriate *in vitro* nasal model. *Pharm. Res.*, **32**(2), 665–679. DOI: 10.1007/s11095-014-1494-0

8. Merkle H.P., Ditzinger G., Lang S.R., Peter H., Schmidt M.C. (1998) *In vitro* cell models to study nasal mucosal permeability and metabolism. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **29**(1–2), 51–79. DOI: 10.1016/s0169-409x(97)00061-6
9. Бреславец Д.И., Абаленихина Ю.В., Шулькин А.В., Буйлина С.Г., Золотова А.В., Якушева Е.Н. (2025) Относительное количество белков межклеточных контактов в динамике формирования монослоя клеток линии RPMI2650. *Технологии живых систем*, **22**(2), 58–65. [Breslavets D.I., Abalenikhina Yu.V., Shchulkin A.V., Bujlina S.G., Zolotova A.V., Yakusheva E.N. (2025) The relative number of intercellular contact proteins in the dynamics of the formation of a monolayer of cells of the RPMI2650 line. *Technologies of Living Systems*, **22**(2), 58–65.]
10. Демина О.М., Румянцев А.Г., Карпова Е.И. (2023) Сигнальные пути транскрипционных факторов и роль генов в их регуляции при акне тяжелой степени. *Иммунология*, **44**(6), 764–775. [Demina O.M., Rumyantsev A.G., Karpova E.I. (2023) Signaling pathways of transcription factors and the role of genes in their regulation in severe acne. *Immunologiya*, **44**(6), 764–775.] DOI: 10.33029/1816-2134-2023-44-6-764-775
11. Iacobazzi D., Convertini P., Todisco S., Santarsiero A., Iacobazzi V., Infantino V. (2023) New insights into NF- $\kappa$ B signaling in innate immunity: focus on immunometabolic crosstalks. *Biology (Basel)*, **12**(6), 776. DOI: 10.3390/biology12060776
12. Lopez-Castejon G., Brough D. (2011) Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **22**(4), 189–195. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2011.10.001
13. Fujisawa T., Chang M.M.-J., Velichko S., Thai P., Hung L.-Y., Huang F., Phuong N., Chen Y., Wu R. (2011) NF- $\kappa$ B mediates IL-1 $\beta$ - and IL-17A-induced MUC5B expression in airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **45**(2), 246–252. DOI: 10.1165/ajrmb.2009-0313OC
14. Sadati S., Khalaji A., Bonyad A., Khoshdooz S., Hosseini Kolbadi K.S., Bahrami A., Moeinfar M.S., Morshedi M., Ghamsaraian A., Eterafi M., Eshraghi R., Khaksary Mahabady M., Mirzaei H. (2025) NF- $\kappa$ B and apoptosis: colorectal cancer progression and novel strategies for treatment. *Eur. J. Med. Res.*, **30**, 616. DOI: 10.1186/s40001-025-02734-w
15. Peng T., Tao X., Xia Z., Hu S., Xue J., Zhu Q., Pan X., Zhang Q., Li S. (2022) Pathogen hijacks programmed cell death signaling by arginine ADPR-deacylation of caspases. *Mol. Cell*, **82**(10), 1806–1820.e8. DOI: 10.1016/j.molcel.2022.03.010
16. Heo J.W., Kim M.J., Yang Y.J., Choi H.N., Kim K.Y., Oh T.W., Yang J.-H., Kim Y.H., Park K.I. (2025) The role of tight junctions in the pathogenesis of inflammatory bowel disease: immune modulation and barrier dysfunction. *Mol. Cell. Toxicol.*, **21**(3), 495–506. DOI: 10.1007/s13273-025-00545-y
17. Zihni C., Mills C., Matter K., Balda M.S. (2016) Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **17**(9), 564–580. DOI: 10.1038/nrm.2016.80
18. McKay D.M., Baird A.W. (1999) Cytokine regulation of epithelial permeability and ion transport. *Gut*, **44**(2), 283–289. DOI: 10.1136/gut.44.2.283

Поступила в редакцию: 02.11.2025.  
 После доработки: 25.11.2025.  
 Принята к печати: 26.11.2025.

## A BIPHASIC EFFECT OF TUMOR NECROSIS FACTOR- $\alpha$ ON RPMI 2650 CELL LINE IN VITRO

Yu.V. Abalenikhina\*, D.I. Breslavets, S.O. Solotnova, S.G. Bujlina, A.V. Shchulkin, E.N. Yakusheva

Ryazan State Medical University,  
 9 Vysokovoltynaya str., Ryazan, 390026 Russia; \*e-mail: abalenikhina88@mail.ru

Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) is a key proinflammatory cytokine; its level increased in inflammatory diseases of the upper respiratory tract. In this study, the dose- and time-dependent effects of TNF $\alpha$  (1–100 ng/ml, 6–48 h) on the RPMI 2650 cell line, a model of nasal epithelium, have been investigated. Short-term exposure (6 h) caused activation of NF- $\kappa$ B and an increase in the levels of the intercellular contact proteins E-cadherin and ZO-1, without a significant effect on cell viability. Long-term exposure (24–48 h) led to an increase in the level of pro-IL-1 $\beta$ , activation of apoptosis, and a decrease in cell viability. At the same time, a decrease in the level of intercellular contact proteins was noted. Thus, short-term exposure to TNF $\alpha$  can exert a protective effect by increasing the density of intercellular contacts, while during prolonged exposure it triggers apoptosis and reduces the density of intercellular contacts, which can contribute to increased permeability of the cell layer.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

**Keywords:** tumor necrosis factor; RPMI 2650; apoptosis; intercellular contact proteins

**Funding.** The work was carried out with the support of the 2025 intra-university grant for young scientists of the Ryazan State Medical University (agreement no. 2/25 dated 10.01.2025).

Received: 02.11.2025; revised: 25.11.2025; accepted: 26.11.2025.