

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «РЯЗАНСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
АКАДЕМИКА И.П. ПАВЛОВА» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Бреславец Дмитрий Игоревич

**Механизмы регуляции проницаемости монослоя клеток назального эпителия
RPM1 2650 при моделировании воспаления фактором некроза опухоли- α**

1.5.4. Биохимия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент

Абаленихина Юлия Владимировна

Рязань – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Структурно-функциональные особенности назального эпителия <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>	14
1.1.1. Структурно-функциональная организация назального эпителия <i>in vivo</i> : клеточный состав и биохимические особенности.....	15
1.1.2. Модели для изучения назального эпителия <i>in vitro</i> : первичные культуры и immortalized клеточные линии	17
1.2. Молекулярные основы барьерной проницаемости эпителия: характеристика белков межклеточных контактов	23
1.2.1. E-кадгерин: структура и функции	24
1.2.2. Клаудин-1: структура и функции	29
1.2.3. Окклюдин: структура и функции	31
1.2.4. ZO-1: структура и функции	35
1.3. Воспаление как модулятор эпителиального барьера.....	37
1.3.1. Существующие экспериментальные модели воспаления <i>in vitro</i>	37
1.3.2. Фактор некроза опухоли- α как ключевой провоспалительный медиатор... ..	38
1.3.3. Молекулярные механизмы регуляции проницаемости эпителиального барьера при воспалении.....	41
1.4. Заключение обзора литературы	43
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	45
2.1. Объект исследования: клеточная линия RPMI 2650. Условия работы с клеточной линией.....	45
2.2. Обоснование экспериментальной модели и схемы воздействия.....	47
2.3. Экспериментальные группы и серии.....	48
2.4. Дизайн исследования: схема воздействия и экспериментальные группы	50
2.5. Оценка доли популяции живых клеток методом проточной цитометрии	52
2.6. Протокол выделения цитоплазматических фракций из культур клеток для биохимического анализа.....	52

2.7. Метод определения продуктов перекисного окисления липидов в клеточных лизатах	54
2.8. Метод спектрофотометрического определения содержания карбонильных групп в белках клеточного лизата	55
2.9. Приготовление биологических образцов для анализа методом вестерн-блот	57
2.10. Определение относительного количества про-ИЛ-1 β , Cleaved-Caspase 3, Bcl2, Nf- κ B, ZO-1, E-кадгерина, клаудина-1, окклюдина, EGF, GAPDH, ламинина B1 методом вестерн-блот	58
2.11. Тест на заживление раны (скарификационный тест, scratch-test).....	63
2.12. Оценка трансэпителиального электрического сопротивление клеточного монослоя	64
2.13. Способ определения концентрации маннитола методом ВЭЖХ МС/МС	65
2.14. Метод иммуноцитохимии	67
2.15. Методы статистической обработки данных.....	68
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	69
3.1. Формирование и характеристика монослоя клеток назального эпителия (клеточная линия RPMI 2650)	69
3.1.1. Валидация метода вестерн-блот при анализе относительного количества белков межклеточных контактов	69
3.1.2. Анализ изменения уровня белков межклеточных контактов при формировании монослоя клеток линии RPMI 2650	75
3.1.3. Локализация белков межклеточных контактов при формировании монослоя клеток RPMI 2650	82
3.1.4. Динамика изменения трансэпителиального сопротивления при формировании монослоя клеток линии RPMI 2650	84
3.2. Оценка провоспалительного, цитотоксического и регенеративного ответа клеток линии RPMI 2650 при моделировании воспалительного повреждения фактором некроза опухоли- α	86

3.2.1. Моделирование провоспалительного состояния на клетках RPMI 2650: активация пути Nf-κB и синтез провоспалительного цитокина ИЛ-1β	86
3.2.2. Цитотоксический эффект фактора некроза опухоли-α: жизнеспособность и апоптотический ответ клеток	90
3.2.3. Развитие окислительного стресса в клетках RPMI 2650 под действием фактора некроза опухоли-α	96
3.2.4. Влияние фактора некроза опухоли-α на регенеративную активность: оценка миграционной активности клеток RPMI 2650	100
3.3. Влияние фактора некроза опухоли-α на барьерную функцию клеток RPMI 2650: динамика трансэпителиального сопротивления и параклеточной проницаемости.....	106
3.3.1. Влияние фактора некроза опухоли-α на значение трансэпителиального сопротивления клеток линии RPMI 2650	106
3.3.2. Влияние фактора некроза опухоли-α на транспорт маннитола через монослой клеток линии RPMI 2650	108
3.4. Молекулярные механизмы влияния фактора некроза опухоли-α на барьерную функцию клеток RPMI 2650: количество и локализация белков межклеточных контактов.....	109
3.4.1. Влияние фактора некроза опухоли-α на уровень белков межклеточных контактов клеток линии RPMI 2650.....	110
3.4.2. Влияние фактора некроза опухоли-α на локализацию ключевых белков межклеточных контактов в клетках RPMI 2650.....	116
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	118
ВЫВОДЫ	123
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	125
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	126
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	128

ВВЕДЕНИЕ

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 [13, 119, 179]. 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 [18, 105, 240]. Воспаление, характеризующееся высвобождением провоспалительных цитокинов и развитием окислительного стресса, может модулировать проницаемость эпителиального барьера. Фактор некроза опухоли- α (ФНО- α) выступает одним из ключевых медиаторов этого процесса, однако детальные механизмы его воздействия на специфические белки межклеточных контактов назального эпителия требуют дальнейшего изучения [24, 33, 131, 191].

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 [190]. 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 [123]. 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- α .

Следовательно, существует значительный пробел в понимании молекулярно-биохимических основ нарушения назального барьера под действием ФНО- α 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- α , и структурно-функциональной организацией назального барьера. Полученные результаты заложат фундамент для создания молекулярной модели дисфункции эпителиального барьера при ринопатологиях, что важно, как для углубления знаний в области биохимии и патофизиологии, так и для разработки таргетных 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- α в дестабилизации плотных контактов через активацию внутриклеточных киназ и ремоделирование цитоскелета [131, 231]. 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 [67]. Клеточная линия RPMI 2650 хорошо охарактеризована как модель для изучения пассивного трансэпителиального транспорта лекарственных средств [254]. Имеются противоречивые данные о способности RPMI 2650 формировать функциональный барьер: некоторые исследования сообщают о низких значениях TEER и слабой экспрессии белков контактов [223], в то время как другие, с

использованием оптимизированных протоколов культивирования на границе раздела воздух-жидкость демонстрируют улучшенные барьерные свойства [68, 97].

Несмотря на это, систематические исследования, посвященные именно провоспалительной модуляции барьера в клеточной линии RPMI 2650 малоизучены по сравнению с кишечным эпителием [131]. Отсутствуют работы, в которых бы одновременно оценивались функциональная проницаемость монослоя, количество и локализация белков межклеточных контактов, миграционная активность клеток в ответ на воздействие ФНО- α .

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- α .

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- α на монослой клеток RPMI 2650, способствующие активации классического провоспалительного сигнального пути Nf- κ B/ИЛ-1 β .

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

3. Установлен двухфазный характер влияния ФНО- α 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- α 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- α . 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- α 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 FBS (англ.: Fetal Bovine Serum), 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- α (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 ($n=3$).

Оценку жизнеспособности проводили методом проточной цитометрии с красителем DAPI. Уровень белков (pro-ИЛ-1 β , Cleaved-Caspase 3, Bcl2, Nf- κ 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- α способствует активации сигнального каскада Nf- κ B/ИЛ-1 β , 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- α 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 молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «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 с международным участием, посвященной 75-летию РязГМУ на Рязанской земле, «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, а также практической 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, статистическая обработка экспериментальных данных. Интерпретация результатов и подготовка научных публикаций осуществлялись совместно с научным руководителем

Сведения о публикациях по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, отражающих полученные результаты и положения диссертационного исследования, 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 цитатно-аналитической 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Структурно-функциональные особенности назального эпителия *in vivo* и *in vitro*

Назальный эпителий представляет собой высокоспециализированную ткань, находящуюся на границе между организмом и внешней средой. Он выполняет комплекс барьерных, сенсорных, иммунологических и секреторных функций, что делает его ключевым элементом в поддержании гомеостаза дыхательного пути. Нарушение целостности и функционирования эпителиального барьера является патогенетической основой широкого спектра заболеваний, таких как аллергический ринит, хронический риносинусит, полипоз и респираторные инфекции [18, 105].

Углубленное изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе биохимической регуляции, физиологического функционирования и патологической дезорганизации назального барьера, является актуальной задачей современной биомедицины. Эти знания необходимы для выявления биохимических механизмов регуляции, разработки новых подходов диагностики, профилактики и терапии отоларингологических заболеваний, а также для создания эффективных и безопасных интраназальных лекарственных форм.

Проведение подобных исследований напрямую зависит от наличия удобных и воспроизводимых экспериментальных моделей. Различия между сложной многоклеточной организацией ткани *in vivo* и клеточными культурами *in vitro* создают методологическую проблему. Понимание структурно-функциональных и биохимических особенностей нативного назального эпителия позволяет сформулировать требования к модели *in vitro*.

Таким образом, только комплексный подход, сочетающий биохимический анализ с оценкой тканевой организации и особенностей *in vitro* моделей, создает основу для внедрения фундаментальных знаний в клиническую практику.

1.1.1. Структурно-функциональная организация назального эпителия *in vivo*: клеточный состав и биохимические особенности

Назальный эпителий формирует многоуровневый защитный барьер, объединяющий механические, химические и иммунные механизмы. В зависимости от отдела носовой полости его строение варьирует: преддверие носа выстлано многослойным плоским эпителием (продолжение кожного покрова), который по мере углубления сменяется типичным для дыхательной зоны и околоносовых пазух многорядным мерцательным (реснитчатым) эпителием [23]. Многорядный эпителий представлен несколькими типами клеток: реснитчатыми, бокаловидными (секреторными), базальными, а также редкими популяциями нейроэндокринных клеток, ионоцитов и ворсинчатых (щеточных) клеток [119]. Благодаря многослойному расположению клеток, при котором все они контактируют с базальной мембраной, обеспечивается регенерация эпителия, реагируя на воспалительные сигналы [152, 225].

Защита дыхательных путей обеспечивается скоординированной работой нескольких слоев назального барьера. На поверхности эпителиоцитов расположен гликокаликс – сеть из муцинов (MUC1, MUC4) и гликолипидов, контролирующая доступ частиц к клеточной мембране [23, 29, 105, 106, 246]: мелкие молекулы (аллергены) проникают легче, крупные вирусы могут задерживаться [187]. Над гликокаликсом находится перилиарный слой – водянистая прослойка с муцинами MUC1, MUC4, MUC16, обеспечивающая свободное движение ресничек [16, 17, 35]. Верхний слой представлен слизью, продуцируемой бокаловидными клетками и железами [187]. Вязкость слизи определяют муцины MUC5AC и MUC5B [187]. Слизь выполняет двойную функцию: служит физико-химическим барьером, захватывающим патогены, и содержит антимикробные пептиды с IgA. Протеомный анализ назальной слизи при аллергическом рините выявляет значительные изменения в белковом составе. Так, например, показано значимое повышение уровней аполипопротеинов и белков острой фазы, одновременно наблюдалось снижение уровня секреторного ингибитора протеиназы лейкоцитов [166]. Авторы

связывают эти изменения с патогенезом заболевания, предполагая, что протеазы пыльцы способны деградировать белки плотных контактов, облегчая проникновение аллергенов, а снижение концентрации антипротеаз может критически усиливать уязвимость эпителиального барьера [166].

Функциональная целостность назального эпителия как барьера определяется скоординированной работой межклеточных контактов, защитных белков слизи и антиоксидантных систем. Белки плотных контактов, такие как окклюдин, клаудины и ZO-1, формируют два функциональных пути: «поровый путь», отвечающий за селективный транспорт ионов и регулируемый преимущественно клаудинами, и «путь транспорта», обеспечивающий ограниченное движение более крупных молекул и зависящий от окклюдина и ZO-1 [90]. На модели аллергического ринита, индуцированного аллергеном клеща домашней пыли, было продемонстрировано снижение экспрессии ключевых белков межклеточных контактов – окклюдина и ZO-1 [124]. Аналогичные изменения описаны и при хроническом риносинусите с полипами – дисфункция назального эпителия, сопровождающаяся снижением уровней клаудина-4 и окклюдина в биоптатах [81]. В функциональных моделях было показано, что провоспалительные цитокины (интерферон- γ и ИЛ-4) снижают трансэпителиальное сопротивление, что указывает на ослабление барьера в условиях моделирования воспаления [81].

Помимо межклеточных контактов, важным компонентом биохимической целостности эпителия является поддержание окислительно-восстановительного равновесия [53]. Слизистая оболочка носа постоянно подвергается воздействию активных форм кислорода и азота, что требует эффективной работы антиоксидантных систем, включая супероксиддисмутазу, каталазу, тиоредоксиновую систему и другие [28, 127, 192]. При хроническом воспалении этот гомеостаз нарушается, что приводит к развитию окислительного/нитрозативного стресса [127]. Так, например, при сезонном аллергическом рините в назальном лаваже было отмечено снижение уровня простагландина E₂ и повышение концентрации медиаторов воспаления – цистеиниловых лейкотриенов и 8-изопростана – маркера липидной пероксидации

[72, 130]. Также была показана положительная корреляция между уровнем белка Клара (CC16) и NO в назальном лаваже при аллергическом рините [74].

Таким образом, назальный эпителий представляет собой динамичную адаптивную систему, которая функционирует как биохимически активный барьер. Состав слизи, липидные медиаторы, окислительно-восстановительный статус и структура межклеточных контактов совместно определяют проницаемость для веществ. Понимание клеточной организации назального эпителия и биохимических особенностей является фундаментальной основой для изучения патогенеза ринологических заболеваний.

1.1.2. Модели для изучения назального эпителия *in vitro*: первичные культуры и immortalized клеточные линии

Исследования биохимических механизмов, физиологии, патогенеза заболеваний и разработка новых интраназальных лекарственных препаратов невозможны без применения соответствующих экспериментальных моделей. В связи с этим, создание и совершенствование моделей *in vitro* является одной из ключевых задач молекулярной биологии [21, 34].

Культуры клеток *in vitro* позволяют контролировать экспериментальные условия, проводить высокоточные манипуляции на клеточном и молекулярном уровнях, а также изучать специфические биохимические механизмы, изолированные от системных влияний целого организма. Использование клеточных линий является важным звеном между фундаментальными исследованиями и клинической практикой [10, 30]. Исследования *in vitro* при изучении функционирования назального эпителия можно проводить на первичных клеточных линиях и immortalized клетках.

Первичные клеточные линии получают непосредственно из биологического материала носовой полости (щёточные соскобы, биопсия). Они имеют определенное количество делений и в оптимальных условиях культивирования

образуют сильно поляризованный, мукоцилиарно-дифференцированный эпителий, близкий к *in vivo*. Первичные культуры клеток назального эпителия впервые были получены из плоскоклеточной карциномы эпителия носа [254], однако они показали низкую жизнеспособность [161].

В исследованиях на первичных клетках назального эпителия человека (Human Nasal Epithelial Cells, HNEC) идентифицирован ряд сигнальных путей, вовлеченных в регуляцию барьерной функции в ответ на стрессовые стимулы. Ключевую роль играют механизмы, связанные с продукцией активных форм кислорода, а именно путь Rac1/NOX, нижестоящими эффекторами выступают сигнальные пути Akt/Nf- κ B, ERK1/2 и p38 MAPK, а также рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) и индукторы эпителиально-мезенхимального перехода (Snail). Активация этих путей коррелирует со снижением трансэпителиального электрического сопротивления (TEER), повышением проницаемости для макромолекул и ремоделированием белков межклеточных контактов, включая ZO-1, окклюдин, клаудины и E-кадгерин [107]. Следует отметить, что цитокины ИЛ-4 и ИЛ-13 играют центральную роль в патогенезе аллергических заболеваний. Воздействуя на эпителий через рецептор интерлейкина 4R α , они стимулируют экспрессию муцинов MUC5AC и MUC5B. Ключевым внутриклеточным медиатором этого эффекта является сигнальный путь STAT6, который, в свою очередь, активирует транскрипционный фактор SPDEF, регулирующий дифференцировку бокаловидных клеток и продукцию муцинов [115, 215].

При хроническом воспалении важную роль играют процессы ремоделирования тканей, ассоциированные с эпителиально-мезенхимальным переходом. Ключевым индуктором этого перехода выступает трансформирующий фактор роста- β (TGF- β), активирующий как Smad-зависимые сигнальные пути. Эти каскады, взаимодействуя с фактором HIF-1, микроРНК (в частности, miR-21, miR-155, miR-761) и деацетилазой SIRT1, модулируют пластичность эпителия и способствуют патологическому ремоделированию [115].

Проведенный анализ литературы подтвердил, что первичные клеточные линии являются важным и незаменимым экспериментальным этапом в биомедицинских исследованиях, поскольку они максимально точно воспроизводят фенотип, метаболизм и специфические функции клеток *in vivo*. Их использование позволяет получить данные, релевантные для понимания физиологических и патологических процессов в контексте изучаемой патологии. Однако при проведении фундаментальных исследований могут возникнуть сложности, в связи с ограниченным количеством пассажей, генетической разнородностью биологического материала и т.д. Именно поэтому возникает необходимость создания и использования иммортализованных клеточных линий, представляющих собой популяции клеток многоклеточного организма, которые в нормальных условиях не способны размножаться бесконечно, но вследствие мутации избежали клеточного старения и вместо этого могут продолжать подвергаться делению.

Клеточная линия NAS 2BL на основе первичной культуры опухоли крысы обеспечивает техническое удобство и долговременную стабильность в экспериментах, однако обладает рядом методологических ограничений [126]. У клеток отсутствует мукоцилиарный барьер и дифференцировка реснитчатых клеток, а также отмечается нестабильность трансэпителиального сопротивления (TEER), что может снижать воспроизводимость и соответствие *in vivo*.

При анализе литературы не удалось найти сведения о функциональных параметрах барьера, экспрессии белков межклеточных контактов или активации классических провоспалительных сигнальных каскадов в клетках NAS 2BL. Таким образом, биохимический профиль линии на сегодняшний день ограничен только подтвержденным биохимическим каскадом «активированный онкоген/ трансформация», что определяет узкую сферу ее применения для изучения онкогенной трансформации назального эпителия и поиска канцерогенов, активирующих специфические онкогены [126].

Среди коммерчески доступных клеточных линий *in vitro* RPMI 2650 является единственной иммортализованной линией назальных клеток человека [83]. Различные исследователи рассматривали данную клеточную линию как

инструмент для изучения биохимических механизмов регуляции проникновения лекарственных средств [254]. Линия клеток RPMI 2650 получена из анапластической плоскоклеточной карциномы носовой перегородки человека. Как показали электронно-микроскопические изображения различных исследований, клетки RPMI 2650 растут в моно- или многослойном виде *in vitro*, отмечается кубическая и поляризованная морфология клеток, микроворсинки и мукоидный материал на апикальной поверхности, формирование межклеточных контактов [254]. Клетки содержат все компоненты: митохондрии, эндоплазматический ретикулум и крупные клеточные ядра с небольшим количеством цитоплазмы [199]. Межклеточные соединения играют важную роль в парацеллюлярной барьерной функции клеточных слоев.

Слияние клеточных слоев и наличие межклеточных соединений являются двумя главными условиями в модели назального эпителия *in vitro*. В литературе имеются противоречивые данные, что клетки RPMI 2650 не демонстрируют дифференцировку в бокаловидные или реснитчатые клетки и не экспрессируют белки межклеточных контактов, образуя кластеры без слияния клеток [123]. Однако, позже в литературных источниках появились данные о сливающихся клеточных слоях и межклеточных соединениях. Разногласия литературных данных были объяснены тем, что начальная плотность клеток является важным фактором в создании модели клеточной культуры носового барьера для оценки транспорта веществ [86]. Начальная плотность клеток 5×10^5 клеток/см² оказалась оптимальной, иначе клетки RPMI 2650 не достигают конфлюэнтности и образуют клеточные кластеры, что типично для клеток карциномы [123].

Позже было доказано, что клетки RPMI 2650 способны образовывать сливающийся клеточный слой и развивать соответствующее трансэпителиальное электрическое сопротивление и барьер проникновения при культивировании на границе раздела воздух-жидкость [97]. В этих условиях культивирования клетки, по-видимому, также экспрессировали белки плотных контактов. Разнонаправленные полученные результаты объясняются особенностями условий культивирования [199, 136]. Доказано, что коллагеновый матрикс улучшает

прикрепление клеток RPMI 2650 и создает надлежащую поверхность для слоев эпителиальных клеток носа, что может объясняться содержанием коллагеновых волокон в респираторной базальной мембране [96].

На Рисунке 1 сравнивается гистологическое строение нативного респираторного эпителия полости носа и его клеточной модели – линии RPMI 2650, что подчеркивает разницу между сложной тканью *in vivo* и более простой, но удобной для исследований моделью *in vitro*.

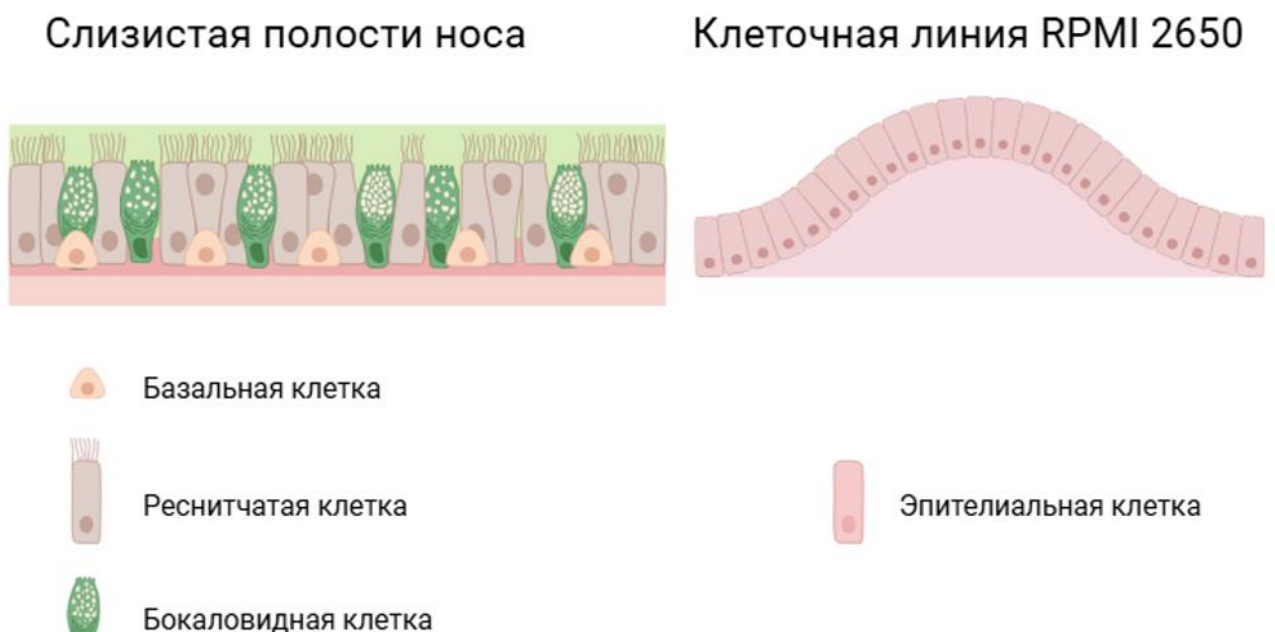


Рисунок 1 – Сравнение гистологического строения слизистой оболочки полости носа и клеточной линии RPMI 2650 (выполнено с помощью BioRender)

Клетки RPMI 2650 экспрессируют ряд белков межклеточных контактов, таких как ZO-1, окклюдин и клаудин-1, а также адгезивные молекулы E-кадгерин, β -катенин. Это позволяет им формировать монослой с трансэпителиальным электрическим сопротивлением (TEER), приближающимся к значениям нативной ткани, что делает клеточную линию пригодной для изучения барьерной функции [158, 185, 208]. Важным свойством RPMI 2650 является наличие ферментативной активности пептидаз, сопоставимой с таковой в нативной ткани человека. В клетках обнаружены лейцинаминопептидаза, аминопептидазы N, A и B, а также лизосомальная аминопептидаза, что делает линию пригодной для оценки

метаболической деградации пептидных и белковых молекул при интраназальной доставке [66, 126, 158]. Кроме того, клетки RPMI 2650 экспрессируют широкий спектр транспортеров, относящихся к семействам ABC и SLC. В частности, описана экспрессия ABCB6 и ABCC1, умеренная экспрессия ABCB1 (P-гликопротеина), а также SLC19A2, SLC25A1, SLC38A2, переносчиков семейств SLC3/SLC7 и SLC15A2 [126]. Функциональная активность P-гликопротеина и белков множественной лекарственной устойчивости (MRP) подтверждена в экспериментах с ингибиторами и субстратами эффлюксных насосов [158].

В научной литературе для RPMI 2650 подробно описаны барьерно-транспортные характеристики, имеются данные о регуляции ретиноевой кислотой и гидрокортизоном [96, 158].

Отдельные исследования демонстрируют, что под воздействием кадмия в клетках повышается экспрессия фермента AKR1C3, что обусловлено генерацией активных форм кислорода и последующей активацией сигнального пути PI3K/Akt совместно с фактором Nrf2. Данный механизм представляет собой адаптивный защитный ответ клеток на токсичность тяжелого металла [58]. Однако исследования в области биохимии классических воспалительных сигнальных каскадов практически отсутствуют и нуждаются в изучении. Биохимический потенциал RPMI 2650 раскрыт фрагментарно, данные ограничены ответами на окислительный стресс (PI3K/Akt/Nrf2) [58]. Практически не изучены провоспалительные каскады (Nf-κB, MAPK), их влияние на барьерную функцию и белки межклеточных контактов. Отсутствуют данные о модуляции цитокинами продукции муцинов, что ограничивает применение линии для скрининга противовоспалительных соединений.

Таким образом, для решения методических задач и углубленного изучения биохимических механизмов, выявленных на первичной модели, используют иммортализованные клеточные линии. Выбор между линиями RPMI 2650 и NAS 2BL не является взаимозаменяемым и напрямую определяется целью исследования. RPMI 2650 – это специализированная модель для изучения

назального барьера и доставки веществ. NAS 2BL – это узконаправленная онкологическая модель для изучения процессов злокачественной трансформации.

1.2. Молекулярные основы барьерной проницаемости эпителия: характеристика белков межклеточных контактов

Транспорт веществ через эпителиальные барьеры является фундаментальным процессом, обеспечивающим гомеостаз, питание и защиту организма. В основе транспорта веществ лежит два разных пути:

- *трансклеточный* – перенос веществ через клетки посредством мембранных каналов, переносчиков и насосов, включает пассивную диффузию, облегчённую диффузию, первично- и вторично-активный транспорт, а также везикулярный транспорт (эндо-/экзоцитоз и транцитоз). Эпителиальная полярность (разделение апикальной и базолатеральной мембран) обеспечивает транспорт потоков веществ [94, 203].

- *параклеточный* – транспорт веществ между клетками через плотные контакты; селективность и проницаемость определяются составом и состоянием межклеточных контактов [95].

Межклеточные контакты отличаются сложным строением и многофункциональностью (Рисунок 2). Основные типы – адгезивные (Adherens Junctions, AJ) и плотные контакты (Tight Junctions, TJ) – отличаются по своей структуре и функциям. Адгезивные контакты служат для механического сцепления соседних клеток [41, 117, 224]. Плотные контакты выполняют главную роль в формировании барьера и контроле парацеллюлярного транспорта веществ [179].

По клеточной локализации белки контактов можно разделить на две группы:

- интегральные мембранные белки: E-кадгерин, клаудины и окклюдин находятся в плазматической мембране и обеспечивают межклеточное взаимодействие [117, 179].

- цитоплазматические каркасные белки, например, ZO-1, представляющий собой мембранно-ассоциированные гуанилат киназо-подобные белки (MAGUK)

располагаются внутри клетки, где формируют каркас контакта и обеспечивают его связь с цитоскелетом [231].

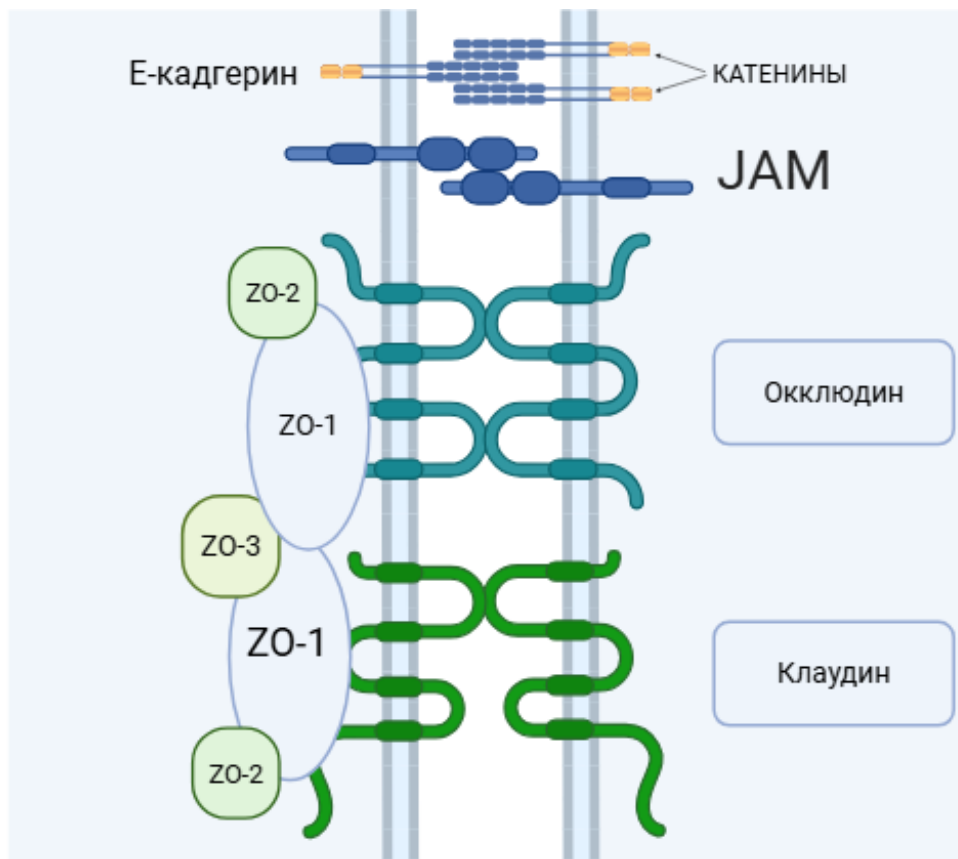


Рисунок 2 – Схема межклеточных контактов (оформлено с помощью BioRender)

1.2.1. E-кадгерин: структура и функции

Кадгерин представляет собой огромное семейство Ca^{2+} -зависимых гликопротеинов клеточной адгезии, которые дифференцированно экспрессируются в тканях и онтогенезе у широких групп организмов, от воротничковых жгутиконосцев до беспозвоночных и всех классов позвоночных. Поэтому эволюция кадгеринов имеет особое значение для понимания происхождения многоклеточных организмов [113, 118, 120, 178].

Синтез белка происходит на рибосомах, далее процессинг включает удаление продомена сериновой протеазой фурином в аппарате Гольджи, что является необходимым этапом для активации его адгезивной функции [5].

Кадгерины входят в состав межклеточных контактов и играют важную роль в морфогенезе многих тканей и органов [156]. Данное семейство включает 5 подсемейств: «классические» кадгерины 1-го типа, кадгерины 2-го типа, кадгерины десмосом (десмоколлины и десмоглеины), протокадгерины и кадгеринсвязанные белки [250]. Эпителиальный кадгерин (epithelial; E-кадгерин, кадгерин-1) относится к «классическим» кадгеринам и получил префикс E (epithelial), поскольку обнаруживается в эпителиальных клетках в отличие от N-кадгерина (определяется в нервных клетках) и P-кадгерина (определяется в плаценте) [5].

E-кадгерин кодируется геном *CDH1* и состоит из 728 аминокислотных остатков, имеет молекулярную массу 97,5 кДа, включает внеклеточный (около 550 аминокислотных остатков) трансмембранный и внутриклеточный домены (около 150 аминокислотных остатков) [145].

Классические кадгерины, такие как E-кадгерин, связываются с β -катенином через цитоплазматический домен (Cytoplasmic Domain, CD) и способствуют клеточной адгезии [206] или быстро деградируют [69, 133, 217]. По мере развития кадгерины устанавливают и поддерживают адгезионные контакты посредством адаптерных белков к цитоскелету [112, 116, 151, 174]. Эти сложные структурные единицы называются кадгесомами [261] и действуют, интегрируя сигналы из внеклеточной и внутриклеточной среды [55, 113, 134, 168]. E-кадгерин в основном экспрессируется в эпидермальной эктодерме [262], но он также был обнаружен в производных нейроэктодермы, мезодермы и энтодермы [87, 134].

Зрелый классический E-кадгерин представляет собой трансмембранный гликопротеин, состоящий из трёх основных сегментов: внеклеточного домена (Extracellular Domain, EC), трансмембранного (Transmembrane Domain, TM) и цитоплазматического домена (CD). Внеклеточная часть белка сформирована пятью повторами EC1–EC5, каждый из которых имеет β -сэндвичподобную структуру, схожую с иммуноглобулиновыми доменами, и содержит консервативные участки для связывания ионов кальция (Ca^{2+}) [64] (Рисунок 3). Четыре междоменных линкера характеризуются специфическими последовательностями, служащими сайтами связывания Ca^{2+} [260]:

1. DXD – Аспарат – Любая аминокислота – Аспарат
2. DRE – Аспарат – Аргинин – Глутамат
3. DXNDNAPXF – Аспарат–Любая аминокислота – Аспарагин – Аспарат – Аспарагин – Аланин – Пролин – Любая аминокислота – Фенилаланин.

Связывание Ca^{2+} играет ключевую структурно-функциональную роль, а именно, придает внеклеточному домену жесткую конформацию, необходимую для адгезии [59, 142, 180], стабилизирует структуру белка в целом [38], защищает его от протеолитической деградации и обеспечивает правильную локализацию на клеточной мембране [38, 88]. Наиболее дистальный от мембраны N-концевой домен EC1 обеспечивает распознавание и адгезивное связывание с E-кадгеринами на соседних клетках посредством кальций-зависимой димеризации [64]. В доменах EC4/EC5 располагаются участки N-гликозилирования, также важные для функционирования белка [5] (Рисунок 3).

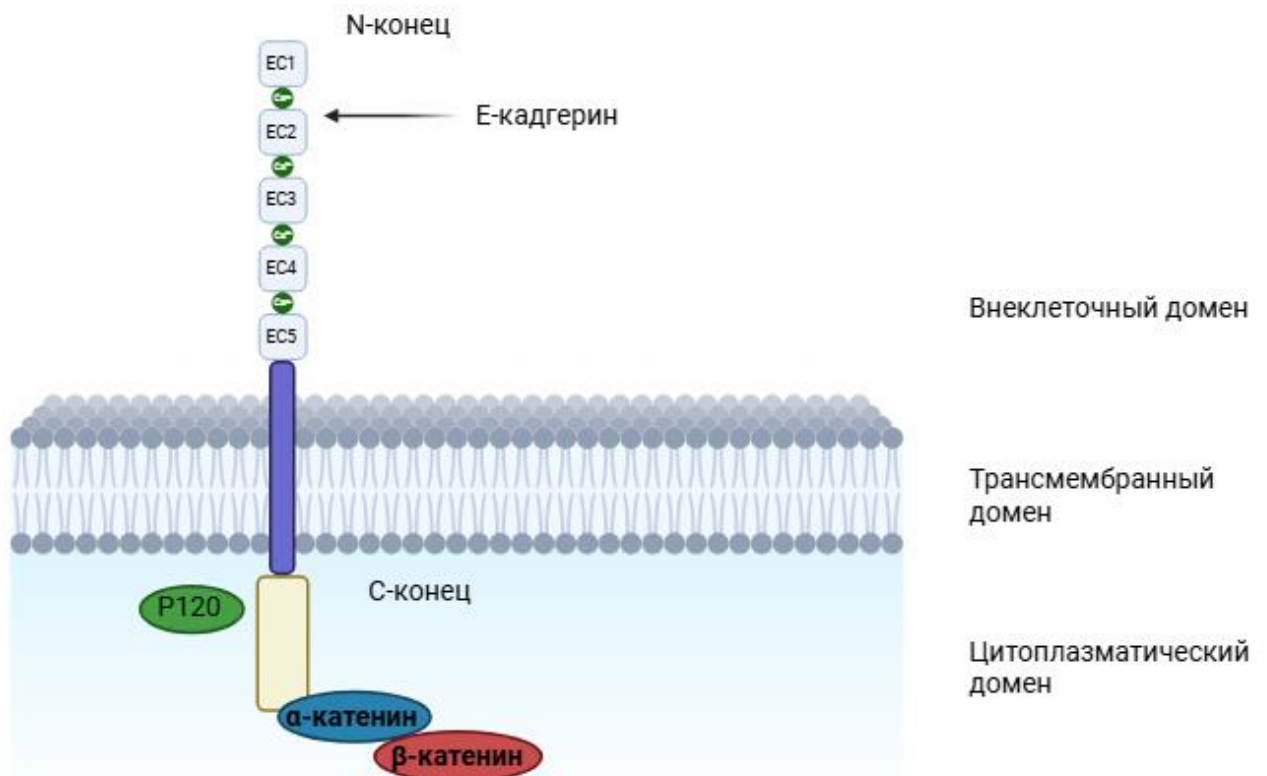


Рисунок 3 – Структура белка E-кадгерина и его связь с катенинами (оформлено с помощью BioRender)

Цитоплазматический домен E-кадгерина демонстрирует наибольшую вариабельность среди представителей семейства [118, 120] и обеспечивает функциональную связь с внутриклеточными сигнальными путями и цитоскелетом [64], что и определяет функциональное разнообразие кадгеринов [118, 178]. Цитоплазматический домен подразделяется на два ключевых региона: юкстамембранный домен (juxtamembrane domain, JMD), связывающий p120-катенин (катенин дельта-1), и катенин-связывающий домен (catenin-binding domain, CBD), взаимодействующий с β -катенином (Рисунок 3). Образовавшийся комплекс с β -катенином, в свою очередь, связывается с α -катенином, что обеспечивает закоривание E-кадгерина на актиновом цитоскелете клетки, создавая прочное межклеточное соединение [5].

Эпителиальные адгезионные контакты (АК) строятся на основе контактов между кластерами (E или P)-кадгеринов на поверхности соседних эпителиальных клеток [113, 143] при участии нектинов [167, 198, 200] (Рисунок 3). Внеклеточный домен, обращенный в межклеточное пространство, взаимодействует с аналогичными молекулами на соседней клетке, образуя межклеточный контакт. Трансмембранный домен пронизывает клеточную мембрану, а цитоплазматический домен находится внутри клетки и связывает белок с элементами цитоскелета [198, 200] (Рисунок 3). Таким образом, E-кадгерин выступает как трансмембранный мостик, соединяющий цитоскелет двух соседних клеток и обеспечивающий механическую связь между ними.

После того как адгезионные контакты сформированы за счет внутриклеточного взаимодействия с цитоскелетом, модулируется структурная организация актиновых филаментов [43, 52, 184] и сеть микротрубочек [46, 157].

Адгезионные соединения – это очень динамичные структуры, которые постоянно подвергаются ремоделированию. Ремоделирование включает замену отдельных молекул или групп молекул внутри адгезивных кластеров без нарушения стационарных межклеточных контактов, но также может сопровождаться разрушением и восстановлением межклеточных контактов [132].

Факторы роста опосредуют взаимодействие между пролиферацией, миграцией и адгезией клеток. Факторы роста связываются со своим специфическим рецептором, вызывая диссоциацию клеток, эндоцитоз E-кадгерина и его возвращение на поверхность клетки [45, 56, 91]. Совместная регуляция кадгеринов и сигналов факторов роста играет важную роль в эпителиально-мезенхимальном переходе (ЭМП) и канцерогенезе [92, 194]. E-кадгерин, в свою очередь, модулирует передачу сигналов, взаимодействуя с рецепторными тирозин-киназами, включая рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) [63, 89], например, тиреоидные гормоны, которые оказывают влияние на рост и развитие [103]. Все больше исследований показывают действие тиреоидных гормонов в различных сигнальных путях через мембранные рецепторы, цитоплазматические партнеры и рецепторы тиреоидных гормонов [137, 195].

Известно, что путь Wnt/ β -катенина включает семейство белков, которые играют важную роль в эмбриональном развитии и гомеостазе тканей взрослого человека. Нарушение регуляции передачи сигналов Wnt/ β -катенина часто приводит к развитию серьезных заболеваний, включая онкологические [175, 256, 257]. Белок Wnt связывается с клеточным рецептором, что способствует транслокации β -катенина из цитоплазмы в ядро. В ядре он активирует фактор Т-клеток/ лимфоидный усиливающий фактор (TCF / LEF), что приводит к транскрипции целевых генов, например, протоонкогена *c-MYC* [9, 257]. Все эти события вызывают миграцию и пролиферацию клеток, а также рост или, наоборот, апоптоз [165]. Фосфорилирование комплекса E-кадгерин/ β -катенин тирозин-киназой разрушает этот комплекс, высвобождая свободный β -катенин в цитоплазму для участия в сигнальном каскаде Wnt [222].

Таким образом, E-кадгерин является ключевым кальций-зависимым белком адгезии, который обеспечивает структурную целостность эпителия, формируя трансмембранный мост между цитоскелетами соседних клеток. E-кадгерин выступает не только как структурный элемент, но и как важный регуляторный компонент.

1.2.2. Клаудин-1: структура и функции

Клаудин-1 (*CLDN1*) является интегральным мембранным белком плотных межклеточных соединений и принадлежит к семейству клаудинов, насчитывающему 24 представителя у млекопитающих животных и 23 у человека [139]. Семейство клаудинов подразделяется на «классические» и «неклассические» (на основе сходства аминокислотных последовательностей). Клаудин-1 относится к «классическим» барьерообразующим клаудинам, способствующим формированию плотных, малопроницаемых парацеллюлярных барьеров [26]. Ген *CLDN1* расположен на хромосоме 3q28-q29, а кодируемый им белок состоит из 211 аминокислотных остатков, имеет молекулярную массу ~22,7–22,8 кДа [140, 216].

Клаудин-1 представляет собой белок с четырьмя трансмембранными доменами, короткими цитоплазматическими N- и C-концами и двумя внеклеточными петлями. Первая внеклеточная петля (ECL1, ~50 аминокислот) содержит консервативный мотив Триптофан – Глицин – Лейцин – Триптофан – Цистеин – Цистеин (W-GLW-CC); два цистеина в её составе образуют стабилизирующий дисульфидный мостик, а заряженные остатки определяют ионную селективность барьера. Вторая внеклеточная петля (ECL2, ~15–35 аминокислот) опосредует цис- и транс-взаимодействия между молекулами клаудинов. C-концевой домен содержит PDZ-связывающий мотив (типа I), который обеспечивает взаимодействие с цитоплазматическими каркасными белками (scaffold proteins), такими как ZO-1, ZO-2, ZO-3 и MUPP1 (Multi-PDZ domain protein 1), осуществляя заякоривание клаудина на актиновом цитоскелете [140, 213].

Синтез клаудина-1 происходит на рибосомах, а далее на мембранах эндоплазматического ретикула происходит ко-трансляционная укладка трансмембранных доменов и формирование дисульфидной связи в ECL1. Белок далее транспортируется через аппарат Гольджи к апикальной латеральной мембране. Его включение в плотные соединения зависит от PDZ-опосредованных взаимодействий с белками ZO и последующих посттрансляционных модификаций:

фосфорилирования, пальмитоилирования С-концевых цистеинов и убиквитинирования (Рисунок 4). Эти модификации регулируют стабильность, локализацию и кластеризацию белка, а также его рециклинг или лизосомальную деградацию [44].

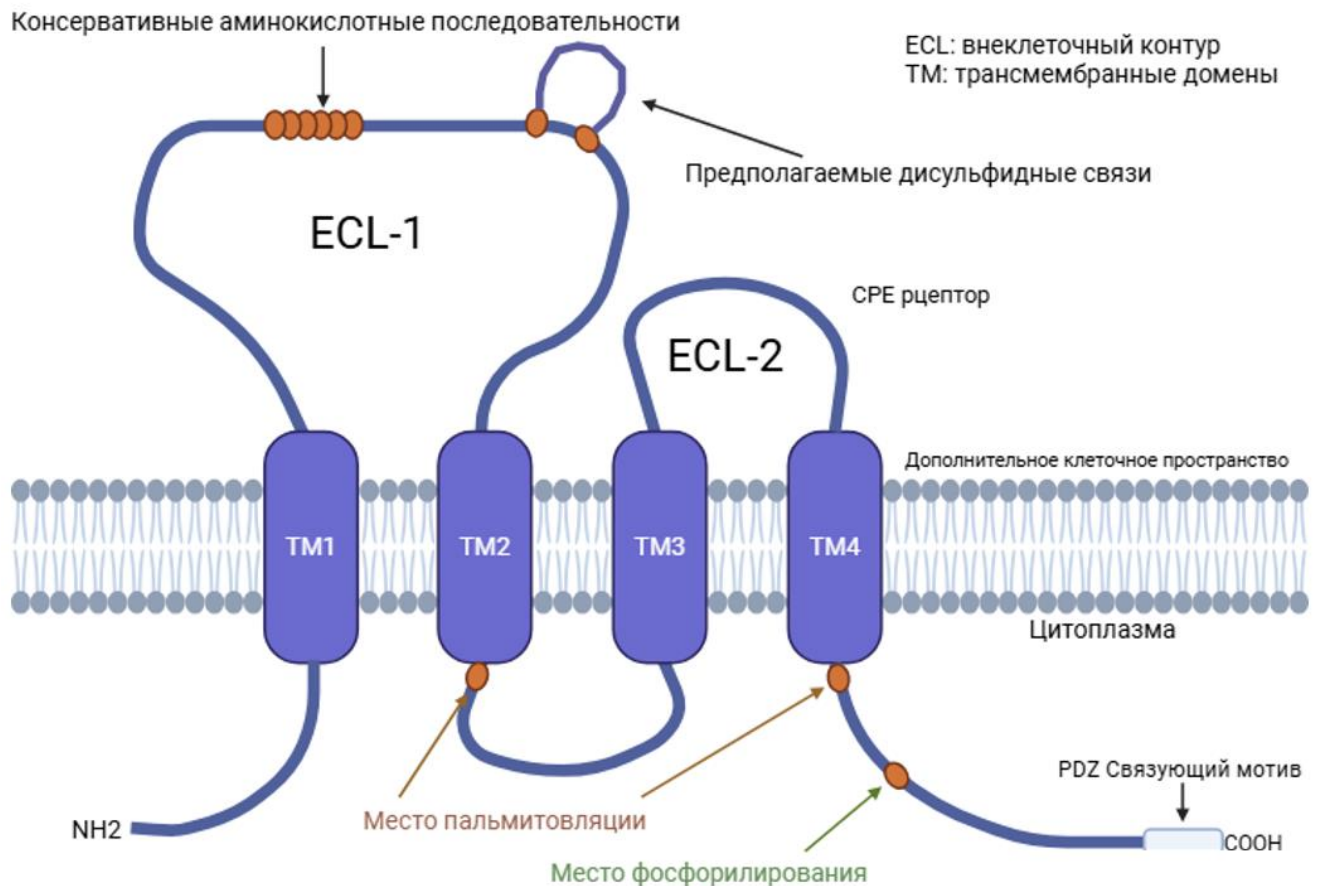


Рисунок 4 – Структурная организация белка клаудина-1 (оформлено с помощью BioRender)

Основная функция клаудина-1 – формирование и регулирование парацеллюлярного барьера. Он опосредует гомо- и гетеротипические цис- и транс-взаимодействия (например, с клаудином-3), образуя полимерные нити плотных контактов, которые контролируют избирательную проницаемость для ионов и малых молекул. Повышение уровня CLDN1 увеличивает трансэпителиальное электрическое сопротивление, снижая парацеллюлярную проницаемость, тогда как его недостаток или мутации приводят к нарушению барьерной функции [76, 93]. Клаудин-1 образует сеть взаимодействий с ключевыми белками плотных

контактов, включая TJP1/ZO-1, TJP2/ZO-2, TJP3/ZO-3, окклюдин и другие клаудины-3, 7 [213]

Клаудин-1 широко экспрессируется в эпителиальных и эндотелиальных тканях, наибольшее содержание отмечается в коже. Белок важен для поддержания эпидермального барьера: нокаут *Cldn1* у мышей приводит к летальной потере воды через кожу [75], а также аномальной барьерной функции рогового слоя у мышей [233]. У человека мутации в *CLDN1* вызывают синдром «неонатальный ихтиоз со склерозирующим холангитом» [169, 170]. Помимо барьерной функции, ECL1 клаудина-1 выступает ко-рецептором для вируса гепатита С (HCV), облегчая его проникновение в гепатоциты [114, 140, 216].

Экспрессия *CLDN1* регулируется на транскрипционном и посттрансляционном уровнях. Его промотор содержит сайты связывания для факторов транскрипции Cdx1/2, GATA4, Tcf/Lef1 (опосредуя ответ на Wnt/ β -катенин) и Sp1 [62]. Репрессоры эпителиально-мезенхимального перехода, такие как Snail/Slug, подавляют экспрессию *CLDN1* через E-box элементы. На уровень и локализацию белка также влияют внеклеточные сигналы: цАМФ/ПКА снижает экспрессию *CLDN1*, в то время как TGF- β , гипоксия и микроРНК (например, miR-212/132) уменьшают его количество [44].

Таким образом, клаудин-1 является ключевым структурным и функциональным компонентом плотных контактов, определяющим барьерные свойства эпителия и эндотелия, а его дисрегуляция ассоциирована с рядом патологических состояний.

1.2.3. Окклюдин: структура и функции

Окклюдин представляет собой интегральный мембранный белок, относящийся к семейству TJMP (Tight Junction-Associated MARVEL Proteins) [163, 216]. Он является ключевым компонентом плотных контактов эпителиальных и эндотелиальных барьеров, а его основной функцией служит регуляция

архитектуры и проницаемости сети тяжелой плотных контактов посредством взаимодействия с другими белками [163, 216].

Основной изоформой белка считается окклюдин-1 [79]. Однако также описаны альтернативные варианты, которые отличаются своей субклеточной локализацией и способностью участвовать во взаимодействиях в составе плотных контактов [79]. Генетически белок кодируется геном *OCLN*, расположенным у человека на хромосоме 5 [163, 216].

В структуре окклюдина находится четыре трансмембранных модуля (Transmembrane Modules, TM1–TM4), двумя внеклеточными петлями (ExtraCellular Loops, ECL1, ECL2), цитозольными N- и C-концами, а также одной короткой внутриклеточной петлей [216] (Рисунок 5). Структурные домены включают следующие компоненты:

1. MARVEL-домен, образованный трансмембранными сегментами TM1–TM4 и ассоциированный с холестерин-обогащёнными мембранными микродоменами; он участвует в латеральных аппозициях мембран и процессе олигомеризации белка [79, 163, 216].

2. N-концевой домен, содержащий цитозольный N-конец с мотивами для специфических взаимодействий, например, PY-мотивы для связывания с E3-убиквитинлигазами [216].

3. C-концевой домен, представляющий собой длинный цитозольный C-конец с участком спиральная катушка (coiled coil) для связывания с ZO-1; этот домен разделён на мембранно-проксимальную и дистальную части [216].

4. Внеклеточная петля ECL2 содержит консервативную внутримолекулярную дисульфидную связь между двумя остатками цистеина, что критически важно для стабильности белка и его олигомеризации [163, 216]. Полноразмерный человеческий окклюдин состоит примерно из 522 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу около 59 кДа [163, 216].

Данные структурные особенности позволяют оптимально функционировать белку, обеспечивая межклеточные контакты различных эпителиальных барьеров.

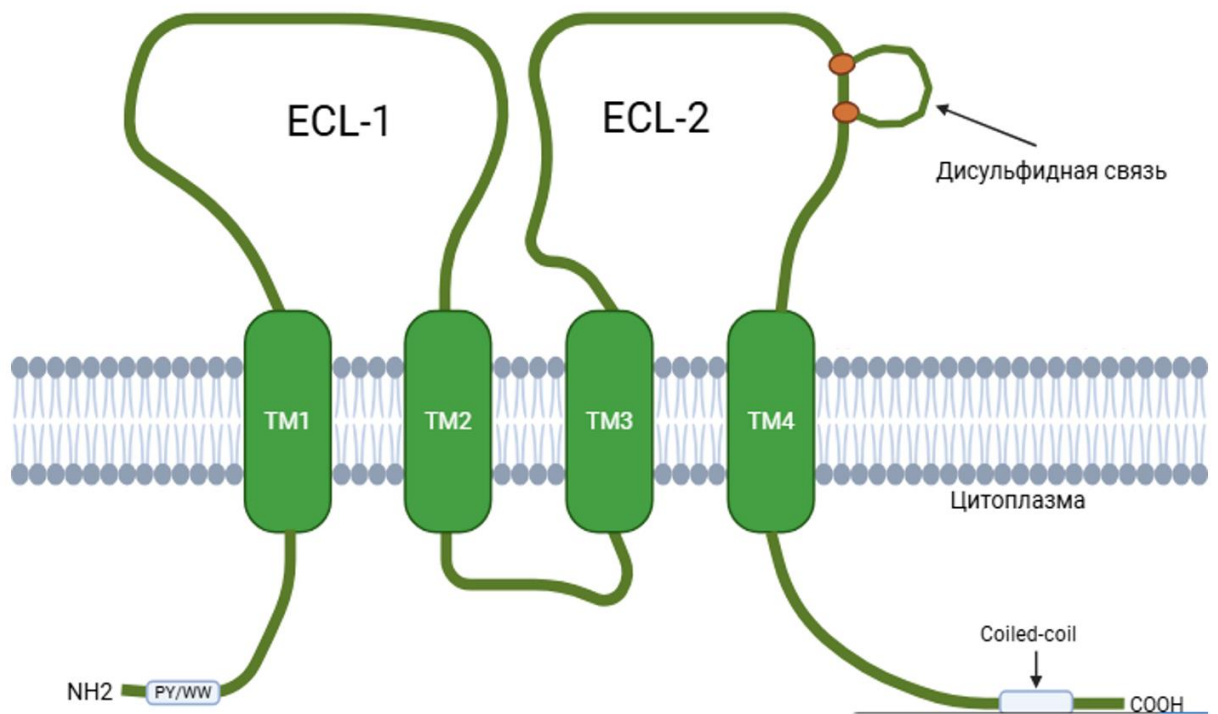


Рисунок 5 – Структурная организация белка окклюдина (оформлено с помощью BioRender)

Синтез белка окклюдина происходит на рибосомах, далее дозревание на мембранах шероховатого эндоплазматического ретикулула. Для правильной локализации и интеграции в плотные контакты необходимы посттрансляционные модификации, в первую очередь фосфорилирование, а также взаимодействие с адаптерными белками. Важно отметить, что сплайс-варианты, лишенные определенных доменов (например, TM4), не способны корректно локализоваться в мембране [177].

Окклюдин локализован в апикальной области на латеральной мембране клеток. Его локализация и стабилизация в контактах происходят через прямое взаимодействие С-конца с адаптерным белком ZO-1, который, в свою очередь, связан с актиновым цитоскелетом.

Биохимическая функция окклюдина заключается в формировании структуры и проницаемости плотных контактов. Взаимодействуя с ZO-белками и клаудинами, он координирует состав контактов. Гиперэкспрессия окклюдина уплотняет барьер, тогда как нокаут *CLDN* повышает проницаемость [84, 216, 234]. Белок также

участвует в контроле парацеллюлярной проницаемости для макромолекул [84, 234]. Помимо канонических функций, участие окклюдина зафиксировано при проникновении в клетку вируса гепатита С и некоторых энтеровирусов, что обусловлено структурой его внеклеточных петель и локализацией в мембранных микродоменах [79, 234].

Регуляция функции окклюдина осуществляется преимущественно через посттрансляционные модификации, сосредоточенные в С-концевом участке [79, 84, 248].

Ключевые механизмы регуляции включают фосфорилирование по сайту S490, который является ключевой мишенью для протеинкиназы С β . Фосфорилирование белка приводит к убиквитинированию, эндоцитозу окклюдина и повышению проницаемости барьера [84, 234, 248]. Фосфорилирование тирозинов Y398/Y402 тирозинкиназой Src ослабляет связь с ZO-1 и дестабилизирует контакты [186]. Дефосфорилирование сайта S408, являющегося мишенью киназы 2 (CK2), усиливает связывание с ZO-1 [176]. Мутации T403/404A приводят к утрате способности окклюдина локализоваться в плотных контактах, тогда как мутации T403/404D ослабляют опосредованное ингибитором протеинкиназы С перераспределение окклюдина из межклеточных соединений [188]. Эти результаты раскрывают важный механизм регуляции эпителиальных плотных контактов с помощью протеинкиназы С. Доказано влияние аутофагии, а именно повышение аутофагической активности способствует стабилизации окклюдина в мембране, уменьшая его деградацию и снижая проницаемость барьера [79, 84, 248].

Окклюдин является ключевым интегральным белком плотных контактов, чья структура и функции регулируются через посттрансляционные модификации, в первую очередь фосфорилирование.

Посттрансляционные модификации, управляемые различными киназами, напрямую влияют на взаимодействие окклюдина с адаптерными белками (такими как ZO-1), его стабильность в мембране и, как следствие, на целостность и проницаемость эпителиального барьера.

1.2.4. ZO-1: структура и функции

ZO-1 (Zonula Occludens) представляет собой многофункциональный MAGUK-белок (membrane-associated guanylate kinase), выступающий центральной молекулой для сборки и регуляции белкового комплекса плотных межклеточных контактов. Его доменно-модульная организация включает N-концевые PDZ-домены (PDZ1, PDZ2, PDZ3), SH3-домен, уникальные U5/HOOK-модуль и GUK-подобный (гуанилат киназы) домен, а также С-концевой кислый мотив U6 и обширные неупорядоченные участки, содержащие актин-связывающий регион (ABR) [100, 219].

Каждый домен выполняет специфичные функции по рекрутированию партнеров: PDZ1 распознает С-концевые мотивы клаудинов и способствует их полимеризации в нити TJ, PDZ3 связывает белок адгезии JAM-A, а модуль SH3-U5-GUK формирует единый интерфейс для взаимодействия с окклюдинам и α -катенином, обеспечивая взаимосвязь между плотными и адгезивными контактами [100, 264]. С-концевой ABR обеспечивает прямую связь ZO-1 с F-актином и актин-ассоциированными белками, что важно для морфогенеза и поляризации эпителия [264] (Рисунок 6).

Дополнительные регуляторные механизмы включают:

1. способность PDZ1 конкурировать за связывание с «хвостами» клаудинов [210];
2. автоингибирующую роль мотива U6, который модулирует связывание с окклюдинам и переключение между TJ- и AJ-ассоциированными функциями [230];
3. механочувствительность, при которой механическое растяжение может активировать ZO-1 и контролировать его локализацию и активность [100].

Белки семейства ZO выполняют роль каркаса посредством своих многочисленных доменов (PDZ, SH3, GUK), связывая трансмембранные белки контактов с цитоскелетом и сигнальными комплексами.

К трансмембранным компонентам, напрямую ассоциированным с ZO-белками через PDZ-домены, относятся – окклюдинам и представители семейства клаудинов, а

также адгезивные молекулы JAM (*Junctional Adhesion Molecules*). Периферические белки TJ, такие как афадин (AF-6), цингулин (cingulin) и трицеллюлин (tricellulin), стабилизируют надмолекулярную структуру контактов, причем последний специфически уплотняет зоны соединения клеток [232] (Рисунок 6).

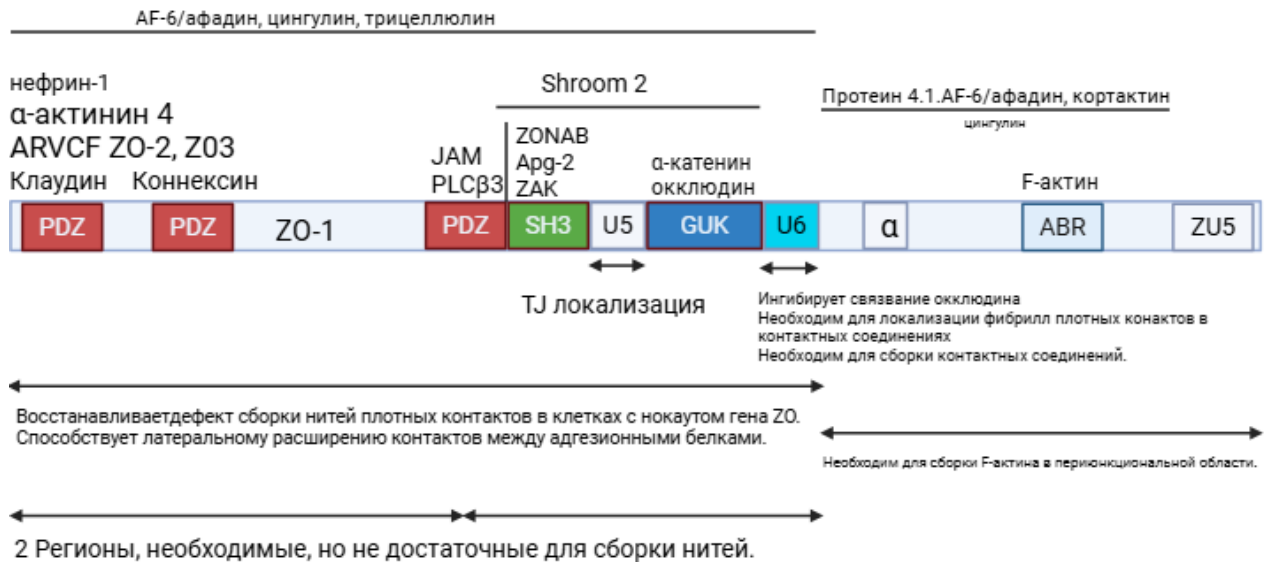


Рисунок 6 – Молекулярная организация плотных контактов и их взаимодействие с цитоскелетом и сигнальными системами клетки

ZO-1 является ключевым каркасным белком плотных контактов, связывающим трансмембранные компоненты с F-актином через свой актин-связывающий регион [100, 219, 264]. В клетках RPMI 2650 экспрессия ZO-1 подтверждена, однако данные о его регуляции при воспалении и окислительном стрессе остаются фрагментарными. Изучение домен-специфичных взаимодействий ZO-1 с сигнальными молекулами в данной модели позволило бы уточнить механизмы нарушения барьерной функции при патологии.

Таким образом, полученные данные подчеркивают, что плотные контакты представляют собой высокодинамичную и полифункциональную белковую сеть. Их целостность и функциональность определяются строго координированными взаимодействиями между трансмембранными, каркасными, цитоскелетными и сигнальными компонентами, что является фундаментальной основой для поддержания барьерного гомеостаза и клеточного ответа в норме и при патологии.

1.3. Воспаление как модулятор эпителиального барьера

Целостность и селективная проницаемость эпителиального барьера являются ключевыми факторами, определяющими гомеостаз тканей и их защиту от патогенов и вредных агентов. Воспалительный ответ, будучи фундаментальной защитной реакцией организма [4], при хроническом или чрезмерном течении становится мощным дестабилизирующим фактором для этого барьера. Дисфункция эпителия, индуцированная воспалением, лежит в основе патогенеза широкого спектра заболеваний, от воспалительных патологий кишечника [27, 183, 251] и респираторных расстройств [49, 109, 221] до нейродегенеративных процессов, связанных с нарушением гематоэнцефалического барьера [54, 129, 214].

1.3.1. Существующие экспериментальные модели воспаления *in vitro*

Существует несколько подходов к моделированию воспаления, каждый из которых имеет свои преимущества и ограничения.

Так, например, липополисахарид (LPS) – бактериальный эндотоксин активирует TLR4 и запускает Nf-κB, а также MAPK, что приводит к выбросу цитокинов ФНО-α, ИЛ-6, ИЛ-8. Данный способ имитирует бактериальную инфекцию и вызывает сильный провоспалительный ответ. Однако, данный способ может вызывать неспецифическую токсичность, а также активирует одновременно несколько биохимических путей. Таким образом, LPS менее избирателен, чем цитокины [51].

Моделирование с помощью вирусных компонентов, например, поли(I:C) – аналог вирусной РНК. Способ основан на связывании с TLR3, что вызывает активацию интерферонов и провоспалительных цитокинов. Данный способ моделирует вирус-индуцированное воспаление и стимулирует воспаление и экспрессию генов, чувствительных к IFN и TGFβ [189], однако слабо активирует Nf-κB по сравнению с интерлейкинами.

Воспаление также можно моделировать механическим повреждением клеток [154] – в этом случае не регулируется биохимический механизм. Химическим повреждением клеток, например, H_2O_2 , гипоксия вызывают окислительный стресс, который активирует HIF-1 α и Nf- κ B. Основными недостатками является неспецифичность – может быть вызван апоптоз/некроз, а также сложно контролировать степень воспаления.

В связи с ограничением использования вышеперечисленных моделей возникает необходимость поиска новых моделей *in vitro*.

1.3.2. Фактор некроза опухоли- α как ключевой провоспалительный медиатор

Фактор некроза опухоли- α (ФНО- α , Tumor Necrosis Factor, TNF) – ключевой провоспалительный цитокин с плеiotропными эффектами, определяемыми формой лиганда, типом рецептора и тканью-мишенью. ФНО существует как мембранный предшественник (mTNF, 26–34 кДа) и растворимый тример (sTNF, ~17 кДа), образующийся после деградации фактора некроза опухоли-конвертирующий фермент TACE/ADAM17. mTNF эффективно активирует рецептор фактора некроза опухоли TNFR2 и способен активировать рецептор TNFR1, тогда как sTNF преимущественно сигнализирует через рецептор TNFR1 [57, 211, 238].

ФНО- α связывается с двумя гомологичными рецепторами – TNFR-1 и TNFR-2 [122]. Известно, что TNFR-1 экспрессируется практически всеми органами и тканями организма и содержит домен смерти, TNFR-2 экспрессирован ограниченно (регуляторные Т-клетки, эндотелий, глия, миоциты и др.) и не содержит домена смерти. TNFR-2 активируется главным образом mTNF и формирует более стабильные комплексы, тогда как TNFR-1 реагирует на обе формы, особенно на sTNF [57, 155, 238]. Активация TNFR-1 формирует сигнальный комплекс рецептора ФНО, что приводит к активации ИКК и далее Nf- κ B, индуцируя гены выживания и провоспалительные медиаторы [57, 238]. В отличие от TNFR-1,

сигналинг через TNFR-2 приводит к активации как канонического (активируется при воздействии на рецепторы клетки воспалительных цитокинов), так и неканонического пути Nf-κB (активируется в результате ограниченного протеолиза незрелого предшественника Nf-κB-p100), PI3K/Akt и MAPK, способствуя пролиферации, выживанию клеток и тканевой регенерации [155, 242]. В иммунной и сосудистой системах ФНО-α активирует моноциты и макрофаги, стимулирует секрецию интерлейкинов ИЛ-1β, ИЛ-6 и других цитокинов, регулирует баланс выживания и гибели эффекторных клеток, усиливает выработку нейтрофилов. Он также повышает экспрессию адгезивных молекул (например, VCAM-1, ICAM-1) на эндотелии, увеличивает сосудистую проницаемость и способствует ангиогенезу, в том числе за счет индукции ИЛ-8 и VEGF [238, 242].

Дисрегуляция ФНО-опосредованных путей лежит в основе многих заболеваний. При хронических иммуновоспалительных патологиях, таких как ревматоидный артрит, псориаз и воспалительные заболевания кишечника, ФНО-α выступает центральным драйвером воспаления, что подтверждается высокой клинической эффективностью его ингибиторов [211, 238]. Известно, что экспрессия TNFR-2 на T-регуляторных клетках и миелоидных супрессорных клетках (MDSC, Myeloid Derived Suppressor Cells) в микроокружении опухоли способствует иммуносупрессии и прогрессии заболевания [50, 207]. Однако в других условиях TNFR-2 может оказывать ко-стимулирующее действие на эффекторные CD8⁺ T-лимфоциты, что создает основу для разработки селективных агонистов или антагонистов данного рецептора в терапии рака [155, 207]. Ключевые эксперименты на культурах диссоциированных клеток синовиальной оболочки при ревматоидном артрите показали, что нейтрализация ФНО-α практически полностью подавляет продукцию ИЛ-1 [106]. Обзорные работы также подчеркивают роль ФНО-α в активации синовиоцитов, матриксных металлопротеиназ и молекул адгезии, что непосредственно ведет к деструкции хрящевой и костной ткани [108, 243].

В когортных исследованиях у госпитализированных пациентов с COVID-19 концентрации ФНО-α в плазме крови были значимо выше у лиц с критическим

течением по сравнению с тяжелым, а также у умерших по сравнению с выжившими. Данный факт позволяет рассматривать ФНО- α как независимый предиктор летального исхода среди других провоспалительных цитокинов [201]. Патологическое действие ФНО- α при COVID-19 не ограничивается индукцией воспаления. Цитокин вовлечен в развитие острого респираторного дистресс-синдрома и тромбовоспаления [227]. Исследования тканевого уровня демонстрируют усиление экспрессии ФНО- α в полипозной ткани, активация сигнального пути ФНО- α / ИЛ-1 β / Nf- κ B рассматривается как один из ключевых механизмов формирования полипов и перестройки внеклеточного матрикса [85]. Кроме этого, ФНО- α участвует в патогенезе аллергических ринитов, риносинуситов [71, 147]. ФНО- α рассматривают как вероятный системный фактор риска ринопатологий, он перспективен как маркер стратификации, но не как самостоятельная доказанная терапевтическая мишень в рутинной практике [98].

В клинической практике применяются несколько классов препаратов, блокирующих ФНО- α : моноклональные антитела (инфликсимаб, адалимумаб, голимумаб), пегилированный Fab-фрагмент (цертолизумаб пегол) и растворимый рецептор-«ловушка» (этанерцепт). Они демонстрируют высокую эффективность при ревматоидном артрите, атеросклерозе, псориатическом артрите, ювенильном идиопатическом артрите и псориазе. При воспалительных заболеваниях кишечника (болезнь Крона, язвенный колит) применяются преимущественно инфликсимаб, адалимумаб, голимумаб и цертолизумаб, в то время как этанерцепт не показал значимой эффективности в лечении кишечного воспаления, что, вероятно, связано с различиями в механизмах действия [211, 238]. Однако прямых клинических испытаний в этой области недостаточно.

Таким образом, биологическая активность ФНО- α представляет собой сложную систему, сигнальные рецепторные пути объясняют способность этого цитокина управлять как провоспалительными и цитотоксическими программами, [57, 238]. Дисрегуляция сигнальных каскадов ФНО- α лежит в основе патогенеза хронических воспалительных заболеваний назального эпителия, включая аллергический ринит и полипоз.

1.3.3. Молекулярные механизмы регуляции проницаемости эпителиального барьера при воспалении

Воспалительные процессы приводят к комплексной перестройке эндотелиального и эпителиального барьеров, затрагивающей как параклеточный, так и трансцеллюлярный пути транспорта. Ключевой мишенью является система адгезионных контактов. Такие стимулы, как фактор роста эндотелия сосудов (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) и другие воспалительные медиаторы, активируя рецептор VEGFR2, индуцируют фосфорилирование E-кадгерина через киназы семейства Src и комплекс, обеспечивающий эффекты интегринов, PAK/FAK [181, 252, 255]. Специфичность внутриклеточного сигналинга VEGF определяется фосфорилированием конкретных тирозиновых остатков в VEGFR2 [25]. В этом процессе также участвует эндотелиальная синтаза оксида азота (eNOS) и её продукт NO. Оксид азота способствует VEGF-индуцированному повышению проницаемости, в частности, через S-нитрозилирование β -катенина по остатку Cys619, что приводит к дестабилизации адгезионных комплексов [209].

Плотные контакты также вовлечены в процесс повышения проницаемости. Фосфорилирование и убиквитинирование окклюдина запускает его эндоцитоз и деградацию. Для целостности гематоэнцефалического барьера критическую роль играет клаудин-5, нарушение экспрессии или организации которого напрямую коррелирует с увеличением параклеточного транспорта [181, 252].

Ключевую роль в реорганизации клеточных контактов играет цитоскелет. Воспалительные стимулы индуцируют перестройку актиновых филаментов и образование фибрилл, что создает механическое натяжение, дестабилизирующее межклеточные соединения. Сборка актомиозиновых комплексов находится под контролем малых ГТФаз семейства Rho (RhoA, Rac1, Cdc42), активность которых модулируется провоспалительными медиаторами. Образовавшиеся межклеточные щели дополнительно фиксируются сократительным аппаратом клетки, что приводит к устойчивому повышению проницаемости. Процесс модификации барьера является обратным: при устранении воспалительного сигнала запускаются

механизмы восстановления, включающие кластеризацию кадгеринов и реполимеризацию кортикального актина, что обеспечивает закрытие межклеточных промежутков и возврат барьерной функции к исходному уровню [213].

Воспаление усиливает не только парацеллюлярный, но и трансцеллюлярный транспорт. Происходит активация кавеоларно-везикулярной трансцитозы, опосредованной кавеолином-1 и белком плазмолеммальной везикулы-1 (PV1), который формирует диафрагму кавеол [70]. VEGF, гистамин и серотонин увеличивают экстравазацию макромолекул, такую как перенос альбумина, через систему везикуло-вакуолярных органелл (VVO) [11]. Перекрестная регуляция с eNOS, которая ингибируется при связывании с кавеолином-1, также вносит вклад в модуляцию барьерной функции [15].

Ключевым звеном патогенеза многих воспалительных заболеваний является дисфункция эпителиального барьера, вызванная действием провоспалительных цитокинов. Исследования на различных клеточных линиях эпителия демонстрируют, что провоспалительный цитокин ФНО- α (как самостоятельно, так и в комбинации с интерфероном- γ) является мощным индуктором барьерной дисфункции и воспалительного ответа, действуя через сложную сеть внутриклеточных сигнальных каскадов. Центральную роль в этих процессах играет нарушение целостности плотных межклеточных контактов. В частности, на модели кишечного эпителия Caco-2 показано, что ФНО- α (10 нг/мл, 0-48 ч) вызывает снижение трансэпителиального электрического сопротивления и увеличение парацеллюлярной проницаемости. Ключевым молекулярным механизмом является активация киназы легких цепей миозина (MLCK) через транскрипционный фактор Nf- κ B, что приводит к фосфорилированию MLC [153]. Сочетанное воздействие ФНО- α и интерферон- γ (10 нг/мл, 48 ч) усугубляет повреждение, вызывая не только активацию MLCK, но и качественные изменения в структуре TJ, такие как локализация окклюдина и перераспределение клаудина-1 из мембраны в цитоплазму, что наблюдается как в клетках Caco-2, так и T84 (воздействие интерферона- γ в концентрации 2,5 нг/мл, затем ФНО- α в концентрации 20 нг/мл,

срок экспозиции 24 ч) [40, 193]. При этом сигнальные пути p38 MAPK и Nf-κB являются общими для регуляции как барьерной функции, так и экспрессии генов, кодирующих белки межклеточных контактов.

В бронхиальном эпителии (BEAS-2B) стимуляция ФНО-α (10 нг/мл, 24 ч) приводит к активации Nf-κB и ERK1/2, что необходимо для индукции ИЛ-8 и ICAM-1 [61]. В альвеолярных эпителиоцитах (A549) ФНО-α в концентрации 10 нг/мл в течение 30 мин запускает экспрессию широкого спектра хемокинов и цитокинов, включая ИЛ-6, ИЛ-8 и MCP-1 через сигнальные пути Nf-κB и ERK1/2 [60]. В бронхиальных эпителиальных клетках ФНО-α (0,1-20 нг/мл, 24 ч) специфически индуцирует матриксную металлопротеиназу-9 через Nf-κB-зависимый механизм, чувствительный к изменениям редокс-статуса клетки, что было доказано ингибированием NAC и PDTC [128].

Обобщая данные по разным типам эпителия, можно заключить, что ФНО-α задействует ограниченный набор сигнальных механизмов, однако их функциональная роль может варьировать в зависимости от типа клеток и конечного эффекта.

1.4. Заключение обзора литературы

Назальный эпителий представляет собой сложную многокомпонентную систему, выполняющую барьерную функцию. Его целостность и нормальное функционирование зависят от слаженной работы разнообразных клеточных популяций – реснитчатых, бокаловидных, базальных, секреторных – и плотного комплекса межклеточных контактов. Ключевыми структурными элементами, определяющими барьерные свойства эпителия, являются белки плотных (клаудины, окклюдин, ZO-1) и адгезивных (E-кадгерин) соединений. Нарушение их экспрессии, локализации или взаимодействия лежит в основе патологического повышения проницаемости эпителиального барьера, что характерно для широкого спектра воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей [49, 109, 221].

Для углубленного изучения молекулярных механизмов, лежащих в основе этих нарушений, необходимы воспроизводимые экспериментальные модели. Несмотря на то, что первичные культуры клеток назального эпителия человека максимально приближены к физиологическим условиям, их использование для масштабных и стандартизированных исследований ограничено из-за междонорской вариабельности, технической сложности получения и конечного пролиферативного потенциала. В связи с этим иммортализованные клеточные линии являются незаменимым инструментом для фундаментальных биохимических и фармакологических исследований. Среди них клеточная линия RPMI 2650, полученная из карциномы назального эпителия человека, является наиболее признанной *in vitro* моделью. При культивировании на полупроницаемых мембранах в условиях жидкость-воздух, клетки RPMI 2650 способны формировать поляризованный монослой, экспрессирующий ключевые белки межклеточных контактов и демонстрирующий функциональные барьерные свойства, что делает их релевантной моделью для изучения проницаемости и ее регуляции.

В качестве модулятора воспалительного повреждения активно рассматривается фактор некроза опухоли- α – центральный провоспалительный цитокин, играющий ключевую роль в патогенезе хронических воспалительных процессов. Плейотропное действие ФНО- α , опосредованное сигнализацией через рецепторы TNFR1 и TNFR2, включает модуляцию экспрессии и организации белков межклеточных контактов, что делает его высокоэффективным инструментом для моделирования дисфункции эпителиального барьера *in vitro*.

Таким образом, интеграция модели клеточной линии RPMI 2650 с моделью воспаления, индуцированного ФНО- α , является объективной моделью для изучения биохимических механизмов нарушения назального барьера. Полученные результаты могут послужить основой для разработки новых стратегий коррекции ринопатологий. Данный подход позволяет в контролируемых условиях воспроизвести ключевые биохимические звенья воспалительной деструкции барьера и открывает перспективы для дальнейшего изучения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования: клеточная линия RPMI 2650. Условия работы с клеточной линией

Исследование было проведено на клеточной линии RPMI 2650. Данная линия была получена из плевральной жидкости пациента с карциномой носовой перегородки и описана в 1964-1965 гг. [161]. Для диссертационной работы клеточная линия была закуплена в Институте цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН), Санкт-Петербург. Клеточная линия имеет эпителиальное происхождение, клетки характеризуются эпителиоподобной морфологией и ростом в виде монослоя [254]. При культивировании были использованы 3-5 пассажи.

Культивирование клеток RPMI 2650. Клетки RPMI 2650 культивировали в питательной среде MEM (Minimum Essential Medium, «ПанЭко», Россия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки FBS (Fetal Bovine Serum), 2 мМ L-глутамина, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (все компоненты производства «ПанЭко», Россия). Клетки культивировали во флаконах (25 см²) до достижения монослоя. Далее пересеивали и культивировали в 6-луночных, 24-луночных, 96-луночных планшетах («Corning», США) в течение 14 дней после формирования монослоя («Corning», США) [2]. Кроме этого, при достижении монослоя во флаконах 25 см² («Corning», США) клетки засеивали в трансвелл-системы («Corning», США) и инкубировали 7 дней с добавлением питательной среды в апикальную (0,5 мл) и базолатеральную (1,5 мл) камеры. После 7 дней инкубации для индукции поляризации клеток и образования плотных межклеточных контактов в питательную среду добавляли только в базолатеральную камеру, а апикальную камеру оставляли свободной.

Две различные модели культивирования клеток разработали и использовали для достижения конкретных поставленных целей:

1. *Модель стандартного монослоя:* культивирование клеток на поверхности планшетов до достижения конfluence. Данная модель использовалась для изучения биохимических клеточных ответов на воздействие тестируемого вещества, включая оценку жизнеспособности, апоптоза, содержание ключевых сигнальных белков воспаления, апоптоза и роста, а также миграционной активности *in vitro*.

2. *Модель поляризованного эпителиального барьера:* культивирование на полупроницаемых мембранах трансвелл-систем. Клетки культивировали 7 дней с добавлением питательной среды в апикальную (0,5 мл) и базолатеральную (1,5 мл) камеры. После 7 дней инкубации для индукции поляризации клеток и образования плотных межклеточных контактов в питательную среду добавляли только в базолатеральную камеру, а апикальную камеру оставляли свободной. Условия жидкость-воздух необходимы для полярной дифференциации клеток RPMI 2650 [218]. В таких условиях клетки инкубировали в течение 14 суток после образования монослоя, по окончании данного срока клетки использовали для выполнения экспериментов. Данный способ культивирования обеспечивал формирование высокодифференцированного поляризованного монослоя с развитыми межклеточными контактами. Модель использовалась для функциональной оценки целостности барьера путем измерения трансэпителиального электрического сопротивления (transepithelial electrical resistance, TEER) и исследования параклеточной проницаемости, а также для анализа содержания белков адгезивных контактов.

Процедура пассирования клеток RPMI 2650. Для пассирования использовали раствор трипсин-ЭДТА (0,25% трипсин: 0,2% ЭДТА, «Sigma-Aldrich», Германия). Клетки пересеивали при достижении 80-90% конfluence. Оптимальная плотность посева составляла $2,0-4,0 \times 10^4$ клеток/см².

Криоконсервация и восстановление. Для криоконсервации клетки ресуспендировали в ростовой среде, содержащей 10% диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия), в концентрации $1,0-2,0 \times 10^6$ клеток/мл. Жизнеспособность

клеток после размораживания, оцененная методом окраски трипановым синим, составляла не менее 85%.

Контроль качества культивирования клеток. В целях обеспечения стерильности и валидности проводимых экспериментов культура клеток находилась под постоянным мониторингом на наличие посторонних микроорганизмов. Регулярное тестирование (перед началом новой серии экспериментов и после криоконсервации) включало оценку контаминации бактериями, грибами и микоплазмой. Контроль на бактериальную и грибковую контаминацию проводился путем визуального осмотра культуры ежедневно с использованием инвертированного микроскопа Olympus СКХ-53 (Olympus, Япония) с цифровой цветной камерой (CCD 5 МПикс). Контроль на микоплазменную контаминацию осуществлялся с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием ДНК-связывающего красителя DAPI («Sigma-Aldrich», США, 4',6-диамидино-2-фенилиндол) для визуализации внехромосомной ДНК в цитоплазме клеток.

Проводимые тесты (95%) показали отрицательные результаты, в случае положительного результата серии исключались из эксперимента, что подтверждает использование клеточной линии в данном исследовании только при отсутствии контаминации.

2.2. Обоснование экспериментальной модели и схемы воздействия

Для исследования влияния воспаления на свойства назального эпителия в рамках настоящей работы была применена классическая экспериментальная модель, основанная на использовании провоспалительного цитокина фактора некроза опухоли- α (ФНО- α) [249].

ФНО- α является ключевым плейотропным медиатором системного воспаления и локального иммунного ответа [249]. Он играет центральную роль в патогенезе хронических воспалительных заболеваний и известен своим двойственным действием на клетки: в зависимости от времени воздействия и дозы

ФНО- α , что делает его оптимальным агентом для моделирования воспалительного повреждения тканей *in vitro*.

Для воспроизведения разного спектра возможных патологических состояний от слабого фонового воспаления до острого цитокинового «шторма» был выбран широкий диапазон концентраций ФНО- α 1-100 нг/мл [135], что позволило оценить пороговые и максимальные эффекты цитокина на изучаемые процессы.

В ходе работы были смоделированы различные экспериментальные группы по степени воздействия ФНО- α с целью воспроизведения стадий воспалительного процесса, характерных для микроокружения клеток.

Временные точки воздействия 6, 24, 48 часов были подобраны для анализа как ранних (активация сигнальных путей, изменение проницаемости), так и отсроченных (изменение экспрессии белков, долгосрочные эффекты на жизнеспособность и барьерную функцию) клеточных ответов на провоспалительный стимул.

Таким образом, применение данной модели в сочетании с двумя типами культивирования клеточных культур (стандартный и поляризованный монослой) позволило провести анализ влияния ФНО- α -опосредованного воспаления на барьерные свойства клеток назального эпителия RPMI 2650.

2.3. Экспериментальные группы и серии

Контрольная группа. Клетки инкубировали в полной питательной среде согласно протоколу п. 2.1. В данной группе выполнялась регулярная замена среды в соответствии с протоколом (каждые 12 часов), что обеспечивало контроль условий культивирования, идентичных опытным группам (Таблица 1).

Опытные группы. Клетки обрабатывали ФНО- α , растворенного в питательной среде, в пяти конечных концентрациях: 1, 5, 10, 50 и 100 нг/мл. Для каждой концентрации воздействие проводили в течение трех временных точек: 6, 24 и 48 часов. Каждое воздействие выполнялось в трех биологических повторностях ($n=3$).

Дизайн исследования включал серию параллельных экспериментов на культурах клеток линии RPMI 2650, разделенных на группы в зависимости от типа культивирования и характера воздействия. Такой дизайн позволил провести сравнительный анализ ответа клеток на воздействие широкого диапазона концентраций провоспалительного цитокина в различные сроки культивирования, что обеспечило возможность выявления как ранних, так и поздних изменений барьерных свойств эпителия.

Таблица 1 – Схема формирования экспериментальных групп и серий

Группы	Серии	Концентрация ФНО- α , нг/мл	Время воздействия, ч	Количество, n
Стандар- тный моно- слой клеток	Контроль	0	6	3
			24	3
			48	3
	Опытная серия 1	1	6	3
			24	3
			48	3
	Опытная серия 2	5	6	3
			24	3
			48	3
	Опытная серия 3	10	6	3
			24	3
			48	3
	Опытная серия 4	50	6	3
			24	3
			48	3
Опытная серия 5	100	6	3	
		24	3	
		48	3	

Продолжение Таблицы 1

Поляри- зованный моно- слой клеток	Контроль	0	6	3
			24	3
			48	3
	Опытная серия 1	1	6	3
			24	3
			48	3
	Опытная серия 2	5	6	3
			24	3
			48	3
	Опытная серия 3	10	6	3
			24	3
			48	3
	Опытная серия 4	50	6	3
			24	3
			48	3
Опытная серия 5	100	6	3	
		24	3	
		48	3	
Примечание – смена питательной среды в опытных группах 24 и 48 ч осуществлялась каждые 12 ч				

2.4. Дизайн исследования: схема воздействия и экспериментальные группы

На Рисунке 7 представлен дизайн эксперимента по изучению воздействия фактора некроза опухоли- α на клеточную линию RPMI 2650. Клетки культивировали в стандартных и поляризованных монослоях для оценки цитотоксичности, воспалительного ответа, вестерн-блоттинга и измерения барьерной функции (TEER). Анализировали белки межклеточных контактов (E-

кадгерин, клаудин-1) и фактор роста (EGF) в различные временные точки (6–48 ч) при концентрациях ФНО- α от 1 до 100 нг/мл.

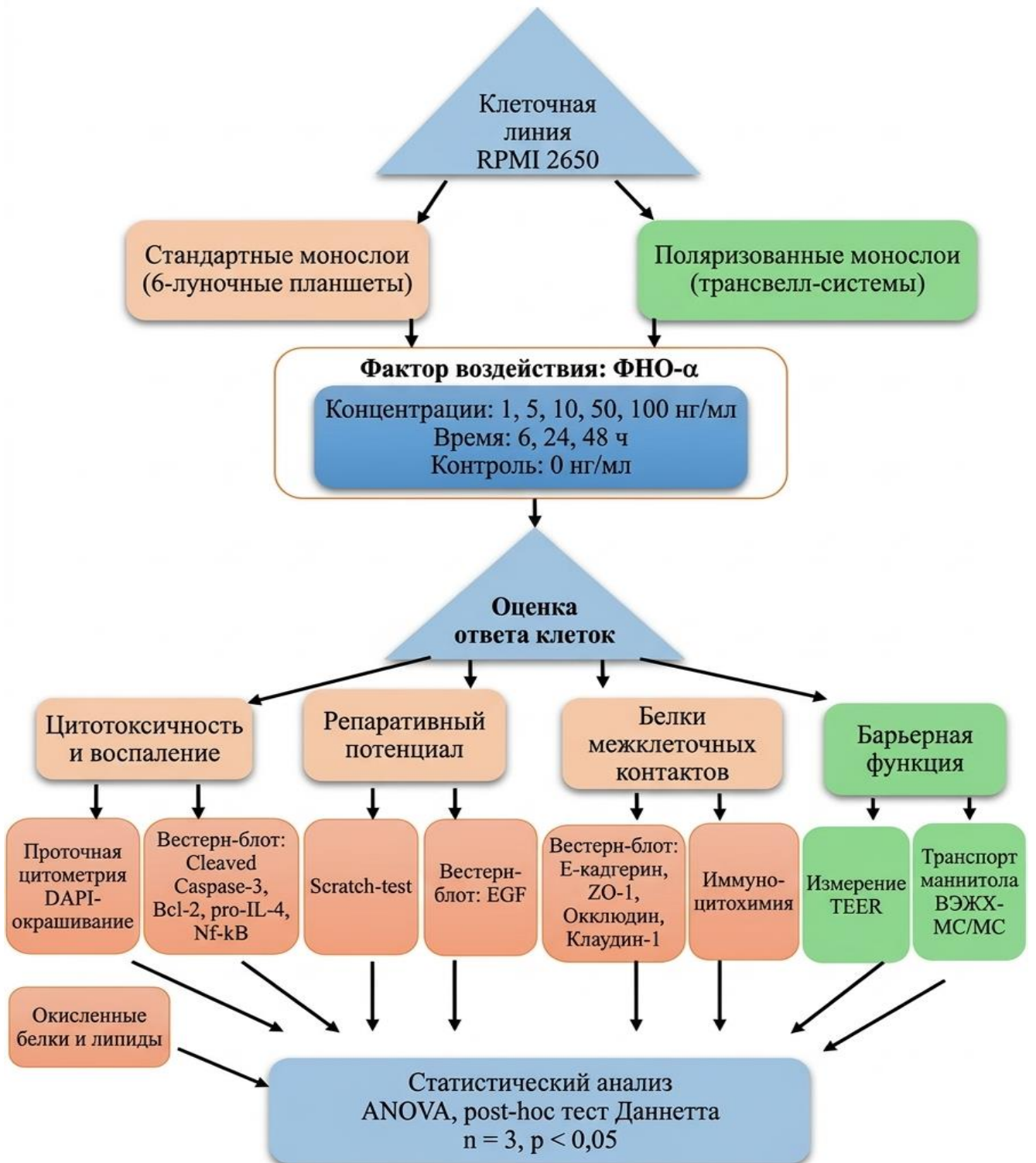


Рисунок 7 – Дизайн исследования

2.5. Оценка доли популяции живых клеток методом проточной цитометрии

Оценку доли популяции живых и мертвых клеток проводили методом проточной цитометрии с использованием ДНК-связывающего красителя DAPI («Sigma-Aldrich», США, 4',6-диамидино-2-фенилиндол). После инкубации с ФНО- α в заданных концентрациях и временных точках клетки линии RPMI 2650 трипсинизировали, дважды отмывали фосфатно-солевым буфером («ПанЭко», Россия). Клеточную суспензию инкубировали с DAPI в конечной концентрации 0,5 мкг/мл в течение 10 минут при комнатной температуре в темноте. Анализ проб выполняли немедленно после окрашивания на проточном цитометре («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 10 000 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 SinoCyteCluster, предоставленного производителем цитометра.

2.6. Протокол выделения цитоплазматических фракций из культур клеток для биохимического анализа

Культивирование клеток осуществляли в стандартных условиях в шестилуночных планшетах. По завершении экспериментальных воздействий питательную среду полностью удаляли. Для разрушения клеточного монослоя использовали раствор трипсина (0,25%) в комбинации с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА, 0,2%) производства «Sigma-Aldrich» (Германия). Инкубацию с трипсин-ЭДТА раствором проводили при 37°C до полного отслоения клеток, визуально контролируя под инвертированным микроскопом. Полученную суспензию клеток переносили в центрифужные

пробирки и ингибировали активность трипсина добавлением питательной среды. Клетки осаждали центрифугированием при 300 g в течение 5 минут при температуре +4°C на микроцентрифуге CM-50 («Eppendorf», Германия). Надосадочную жидкость полностью аспирировали, а клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл охлажденного стерильного изотонического раствора хлорида натрия (0,9%, «Медпро», Россия) для удаления следов среды и трипсина. Процедуру осаждения и промывки повторяли трижды, что исключает влияние компонентов культуральной среды и остаточного трипсина на результаты последующего анализа.

После финального центрифугирования надосадок удаляли, а к клеточному осадку добавляли 450 мкл специально приготовленного охлажденного лизирующего буфера. Состав буфера для лизиса: 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM KCl, 0,5% детергент Тритон X-100. Для предотвращения протеолиза в буфер непосредственно перед использованием вносили коктейль ингибиторов протеаз, включающий: AEBSF (2 mM), апротинин (0,3 мкМ), бестатин (130 мкМ), ЭДТА (1 mM), E-64 (14 мкМ) и лейпептин (1 мкМ) («Sigma-Aldrich», Германия).

Суспензию клеток в лизирующем буфере аккуратно пипетировали для гомогенизации и инкубировали на ледяной бане в течение 10 минут для обеспечения полного лизиса плазматических мембран. Для разделения фракций полученный лизат подвергали центрифугированию при 5000 g и температуре +4°C в течение 10 минут. Эта процедура позволяет осадить неразрушенные клетки, ядра и крупные клеточные дебрисы.

После центрифугирования надосадочную жидкость (супернатант), представляющую собой обогащенную цитоплазматическую (экстраядерную) фракцию, осторожно, не задевая осадок, переносили в пробирки типа Eppendorf. Данную фракцию использовали для последующих биохимических исследований. Все процедуры выполняли при температуре +4°C для минимизации деградации целевых биомолекул. Полученные образцы замораживали и хранили при -80°C («POZIS», Россия) до проведения анализа [236].

2.7. Метод определения продуктов перекисного окисления липидов в клеточных лизатах

Концентрация конечных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – малонового диальдегида (МДА) и 4-гидроксиалкеналя (4-гидрокси-2-ноненаля и 4-гидрокси-2-гексеналя) – в лизатах клеток определялась спектрофотометрическим методом, основанным на реакции исследуемых соединений с 1-метил-2-фенилиндолом в кислой среде. В результате реакции образуется устойчивый цианиновый краситель, интенсивность окраски которого пропорциональна суммарному содержанию указанных ПОЛ в пробе. Измерение оптической плотности полученного хромофора проводили при длине волны, соответствующей его максимуму поглощения (586 нм) [196].

Определение концентрации продуктов ПОЛ проводили с использованием коммерческого набора реагентов «Elabscience» (Китай) в соответствии с инструкцией производителя. Процедура включала следующие этапы:

Приготовление рабочего реагента. Смешивание реагента на основе 1-метил-2-фенилиндола с метанольным раствором соляной кислоты для создания необходимых условий реакции.

Постановка реакции. В пробирки вносили аликвоты исследуемых клеточных лизатов (100 мкл) и добавляли рабочий реагент (300 мкл). В качестве контролей использовали: контрольную пробу (Blank), лизирующий буфер вместо образца; калибровочные пробы, серия стандартных растворов с известной концентрацией МДА, поставляемая в наборе.

Инкубация. Планшет закрывали и инкубировали в термошейкере при температуре 45°C в течение 40 минут для завершения реакции образования хромофора.

Измерение оптической плотности. После инкубации и охлаждения проб до комнатной температуры оптическую плотность (ОП) окрашенного раствора измеряли на планшетном фотометре Stat Fax 2100 («Awareness Technology», США) при длине волны 586 нм.

Строили калибровочный график, откладывая по оси ординат значения оптической плотности калибровочных растворов, а по оси абсцисс – соответствующую им концентрацию МДА. По калибровочному графику определяли концентрацию продуктов ПОЛ в каждой пробе ($C_{\text{пробы}}$).

Содержание продуктов ПОЛ рассчитывали в пересчете на общее количество белка в образце по формуле:

$$\text{Продукты ПОЛ (мкмоль/мг белка)} = (C_{\text{пробы}} * V_{\text{пробы}}) / (m_{\text{белка}}) \quad (1)$$

где: $C_{\text{пробы}}$ – концентрация продуктов ПОЛ, определенная по калибровочному графику (мкМ); $V_{\text{пробы}}$ – общий объем реакционной смеси (л); $m_{\text{белка}}$ – масса белка, внесенная в реакционную смесь (мг), рассчитанная как произведение объема аликвоты лизата на концентрацию белка в нем.

При построении калибровочной кривой для образцов было получено, что нижний предел количественного определения составил $1,38 \pm 0,15$ мкмоль/мг белка.

2.8. Метод спектрофотометрического определения содержания карбонильных групп в белках клеточного лизата

Содержание карбонильных производных белков, являющихся маркером окислительной модификации белков, оценивали спектрофотометрическим методом, основанным на реакции гидразинового производного. Карбонильные группы (альдегидные и кетонные) окисленных белков в кислой среде специфично взаимодействуют с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ). В результате реакции конденсации образуются стабильные окрашенные 2,4-динитрофенилгидразоны, обладающие характерным максимумом поглощения в ультрафиолетовой области спектра. Измерение оптической плотности продуктов реакции проводят при длине волны 375 нм [19, 82, 253].

Аналізу подвергали цитоплазматические фракции клеточных лизатов, полученные по описанному ранее протоколу п. 2.6. Концентрацию общего белка в образцах предварительно определяли по методу Бредфорда [138] для последующей нормализации результатов.

Перед проведением реакции образцы не подвергали повторному замораживанию-оттаиванию.

Процедура выполнялась в следующем порядке:

Дериватизация. Аликвоту клеточного лизата (100 мкл) смешивали с рабочим раствором 2,4-ДНФГ, приготовленным на соляной кислоте. Параллельно для каждого образца готовили контрольную пробу, в которую вместо реактива 2,4-ДНФГ добавляли эквивалентный объем кислоты без гидразинового компонента. Это позволяет учесть неспецифическое поглощение при 375 нм, связанное с исходными компонентами лизата.

Инкубация. Пробирки с реакционными смесями инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 60 минут для завершения реакции образования гидразонов.

Осаждение и отмывка белков. После инкубации для удаления избытка непрореагировавшего реагента и низкомолекулярных компонентов проводили осаждение белков добавлением трихлоруксусной кислоты (ТХУ) до конечной концентрации 10-15%. Образовавшийся белковый осадок отделяли центрифугированием. Осадок трижды отмывали смесью этанол-этилацетат (1:1) для полного удаления следов реагента и липидов.

Растворение осадка и измерение. Очищенный белковый осадок растворяли в денатурирующем буфере, содержащем 6 М гуанидин гидрохлорид. Полученный прозрачный раствор переносили в 96-луночный планшет.

Спектрофотометрия. Оптическую плотность (ОП) окрашенного раствора регистрировали на планшетном фотометре Stat Fax 2100 («Awareness Technology», США) при длине волны 375 нм. В качестве референса (нулевого контроля) использовали раствор соответствующей контрольной пробы, обработанной кислотой без 2,4-ДНФГ.

Расчет концентрации.

Содержание карбонильных групп в образцах рассчитывали по закону Бугера-Ламберта-Бера, используя молярный коэффициент экстинкции (ϵ) для образовавшихся 2,4-динитрофенилгидразонов при 375 нм, равный $22\,000\text{ M}^{-1}\times\text{cm}^{-1}$.

Концентрацию вычисляли по следующим формулам:

Количество карбонила в лунке для образца

$$C \text{ (нмоль/лунка)} = (A375/6,364) \times 100 \quad (2)$$

6,364 – миллимолярный коэффициент экстинкции; 100 – общий объем лунки (мкл)

Окончательный результат выражали в пересчете на общее количество белка в аликвоте, взятой для анализа:

$$CP = \text{нмоль карбонила/мг белка} = (C/P) \times 1000 \times D \quad (3)$$

где: C – количество карбонила в лунке для пробы (нмоль/лунка); P – количество белка из стандартной лунки $\times 20$ (мкг/лунка); D – разведение или концентрация образца; 1000 – коэффициент пересчета (мкг в мг)

При построении калибровочной кривой для образцов было получено, что нижний предел количественного определения составил $0,05 \pm 0,015$ нмоль/мг белка.

2.9. Приготовление биологических образцов для анализа методом вестерн-блот

По окончании эксперимента клетки линии RPMI 2650 снимали с поверхности лунок 6-луночного планшета раствором трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, «Sigma-Aldrich», Германия), трижды промывали раствором фосфатного буфера («ПанЭко», Россия). Для определения *pro-ИЛ-1 β* , *Cleaved-Caspase 3*, *Bcl2*, *ZO-1*, *E-кадгерина*, *клаудина-1*, *окклюдина*, *EGF* клетки лизировали в RIPA Cell Lysis Buffer Thermo («Thermo Fisher Scientific», США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ («Sigma-Aldrich», Германия) в течение 30 минут при +4 °C и постоянном перемешивании из расчета 10^7 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- κ B* в ядерной фракции клетки лизировали с использованием набора ReadyPrep Protein extraction kit («Bio-Rad», США) с ингибиторами протеаз («Sigma Aldrich», США).

Оценка содержания белка в биологических образцах. В полученных гомогенатах оценивали уровень содержания белка по методу Бредфорда [138].

2.10. Определение относительного количества про-ИЛ-1 β , Cleaved-Caspase 3, Bcl2, Nf- κ B, ZO-1, E-кадгерина, клаудина-1, окклюдина, EGF, GAPDH, ламинина В1 методом вестерн-блот

Метод вестерн-блоттинг основан на иммунодетекции белков, основанный на электрофоретическом разделении, переносе на мембрану и визуализации с помощью специфических антител.

Подготовка образцов для электрофореза. 30-50 мкг белков цитоплазматической фракции и ядерной фракции лизата подвергали электрофорезу с использованием 12% TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit («Bio-Rad», США) в буферной системе Laemmli («BioRad», США). Образцы смешивали с буфером Laemmli («Bio-Rad», США), содержащим 50 мМ β -меркаптоэтанола («BioRad», США) в соотношении 1:2, инкубировали 10 мин при температуре 70°C. Денатурация белков при 70°C позволяет обеспечить полное разворачивание полипептидных цепей, не вызывая агрегации образца. Добавление β -меркаптоэтанола необходимо для восстановления дисульфидных связей, что критически важно для корректного разделения белков по молекулярной массе. Выбор 12% полиакриламидного геля для электрофоретического разделения белков обусловлен оптимальным разрешением в диапазоне молекулярных масс 20-100 кДа, что позволяет эффективно разделить большинство исследуемых в работе белков.

Подготовка гелей для электрофореза. Для работы использовали набор для приготовления гелей SDS-PAGE Gel Preparation Kit (ServiceBio, Китай), содержащий 1,5 М Tris-HCl (pH 8,8), 30% акриламид-бисакриламид (29:1), 1,0 М Tris-HCl (pH 6,8), 10% SDS, дополнительно использовали TEMED (Biorad, США) и аммония персульфат (APS, neoFroxx, Германия) (Таблица 2).

Таблица 2 – Протокол приготовления гелей

Кол-во гелей	ddH ₂ O, мл	30% AA, мл	1,5M Tris, мл	10% SDS, мкл	10% APS, мкл	TEMED, мкл	Общий объем, мл
Разделяющий гель (12 %)							
1 гель	1,650	2	1,250	50	50	5	5
Концентрирующий гель							
1 гель	1,290	0,330	0,330	27	12	2,7	~ 2
Примечание – AA – акриламид; Tris – 30% акриламид-бисакриламид; SDS – Gel Preparation Kit, 10% раствор додецилсульфата натрия; APS – аммоний персульфат							

Жидкую смесь быстро заливали между двумя стеклянными пластинами – сначала разделяющий гель, а затем концентрирующий, вставляя гребешок для создания лунок. Смесь оставляли на 15-30 минут для образования стабильной полимерной сетки. После полимеризации гель в кассете помещали в камеру для электрофореза.

Условия выполнения электрофореза. Гели подвергали электрофорезу с использованием источника тока PowerPacTM Basic Power Supply (BioRad, США) и буфера 10x TGS Buffer Solution (BioRad, США) в течение 90 мин при 100 В и комнатной температуре (23-25 °С).

Вестерн-блот анализ. Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану 0,45 мкм (Trans-Blot Turbo Mini-Size nitrocellulose, «Bio-Rad», США) с использованием бумажных фильтров для блоттинга, 7x9 см, Thick (0,6 мм, ServiceBio, Китай) в Transfer Buffer (5x, Guangzhou Daoyi Science and Technology Co., Ltd., Китай) с помощью системы Mini Trans-Blot («Bio-Rad», США) и программного обеспечения, соответствующей молекулярной массе белка. Белки на мембране блокировали 1% раствором EveryBlot Blocking Buffer («Bio-Rad», США), содержащим 0,1% Tween («Bio-Rad», США) в течение 30 мин при комнатной температуре (Рисунок 8).



Рисунок 8 – Этапы вестерн-блот анализа (выполнено с помощью программы Biorender)

Детекцию белков проводили с использованием первичных кроличьих поликлональных антител, инкубация в течение 2 ч при 37°C в разведении 1:200 (Antibody, 100 мкл, Affinity, Китай) в блокирующем растворе в течение 2 ч при 37°C). После инкубации с первичными антителами мембрану трижды отмывали в фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,1% Твин-20, по 10 мин на каждую отмывку для удаления несвязавшихся антител. Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных в разведении 1:4000 и инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре (Таблица 3).

Для проявки мембран использовали набор Clarity™ Western ECL Substrate (BioRad, США). Хемилюминесценцию фиксировали с помощью ChemiDocXRS+ («Bio-Rad», США). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически (количественная оценка относительно содержания целевых белков путем измерения оптической плотности сигнала, полученного после иммунодетекции на мембране) с помощью программного обеспечения ChemiDoc™ XRS+ Imaging System («Bio-Rad», США). Нормирование интенсивности сигнала целевых белков проводили по уровню экспрессии белка

«домашнего хозяйства» GAPDH, что позволило скорректировать возможные различия в загрузке образцов по дорожкам.

Таблица 3 – Характеристика первичных и вторичных антител для вестерн-блоттинга

Фракция	Целевой белок	Антитела	Молекулярная масса
Первичные антитела Affinity Biosciences (Китай)			
Цито-плазма	про-ИЛ-1 β	IL1 beta Ab, AF5103	25-35 kDa; 31kD
	Активная каспаза 3	Cleaved-Caspase 3 AF7022	17kDa; 32kD
	Bcl2	Bcl-2, AF6139	26kDa; 26kD
	ZO-1	ZO1, AF5145	195 kDa; 195kD
	Е-кадгерин	E-cadherin, AF0131	120kDa; 97kD
	Клаудин-1	Claudin 1, AF0127	22kDa; 23kD
	Окклюдин	Occludin Ab, DF7504	23-30kD, 52-65kD; 59kD
	Глицеральдегид-3-фосфат	GAPDH Ab, AF7021	37kDa; 36kD
Ядро	Nf- κ B	Nf- κ B p65 Ab, AF5006	65-80kDa; 60kD
	Ламинин B1	Lamin B1 Ab, AF5161	66 kDa; 66kD
Вторичные антитела			
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP, Invitrogen, США, Cat#PA3-023			

Молекулярная масса была подтверждена путем сравнения с маркерами молекулярной массы Precision plus protein standards Dual Color («Bio-Rad», США).

Валидация метода вестерн-блот для белков межклеточных контактов. Для количественного анализа методом вестерн-блоттинг были сформированы серийные разведения клеточного лизата с известной концентрацией общего белка:

Группа 1 – лизат клеток RPMI 2650, разведение 1 (содержание общего белка 5 мкг/лунка);

Группа 2 – лизат клеток RPMI 2650, разведение 2 (содержание общего белка 10 мкг/лунка);

Группа 3 – лизат клеток RPMI 2650, разведение 3 (содержание общего белка 20 мкг/лунка);

Группа 4 – лизат клеток RPMI 2650, разведение 4 (содержание общего белка 30 мкг/лунка);

Группа 5 – лизат клеток RPMI 2650, разведение 5 (содержание общего белка 50 мкг/лунка).

Далее в пробах серийных разведений проводили анализ методом вестерн-блот по протоколу, описанному выше. Линейный диапазон детекции для каждого целевого белка определяли, построив график зависимости оптической плотности полосы от количества общего белка, внесенного в лунку (5-50 мкг/лунка). Для последующих экспериментов использовали количество белка, попадающее в линейный диапазон калибровочной кривой.

Валидация стабильности количества референсного белка GAPDH в условиях действия ФНО- α . Для подтверждения стабильности экспрессии белка GAPDH (ключевой фермент гликолиза) и возможности его использования для нормализации данных при изучении влияния ФНО- α на количество белков межклеточных контактов проводили валидацию. Данный этап является критически важным, поскольку ФНО- α , будучи провоспалительным цитокином, способен модулировать метаболические пути клетки, потенциально влияя на уровень классических «домашних» генов.

Таким образом, необходимо подтверждение, что GAPDH сохраняет конститутивный уровень экспрессии в условиях действия ФНО- α .

2.11. Тест на заживление раны (скарификационный тест, scratch-test)

Скарификационный тест проводили путем нанесения механического повреждения монослою клеток с последующей оценкой их миграционной активности. После достижения 80-100% конфлюэнтности клеточного монослоя выполняли линейное повреждение стерильным наконечником объемом 1 мл (Рисунок 9). Затем клетки трижды отмывали стерильным фосфатным буфером (DPBS, «ПанЭко», Россия) для удаления клеточного дебриса и добавляли свежую питательную среду, содержащую индуктор воспаления ФНО- α в концентрациях 1, 5, 10, 50 и 100 нг/мл в течение 6, 24 и 48 часов. Для поддержания концентрации тестируемого вещества смену среды выполняли каждые 12 часов. Контрольную группу клеток инкубировали в среде без добавления исследуемого вещества. Миграцию клеток в область «раны» документировали с помощью инвертированного микроскопа Olympus CKX-53 («Olympus», Япония) сразу после нанесения «раны» (точка отсчета - 0 часов) и через 6, 24 и 48 часов инкубации. Для каждого временного пункта анализировали не менее 10 полей зрения в трех повторах.

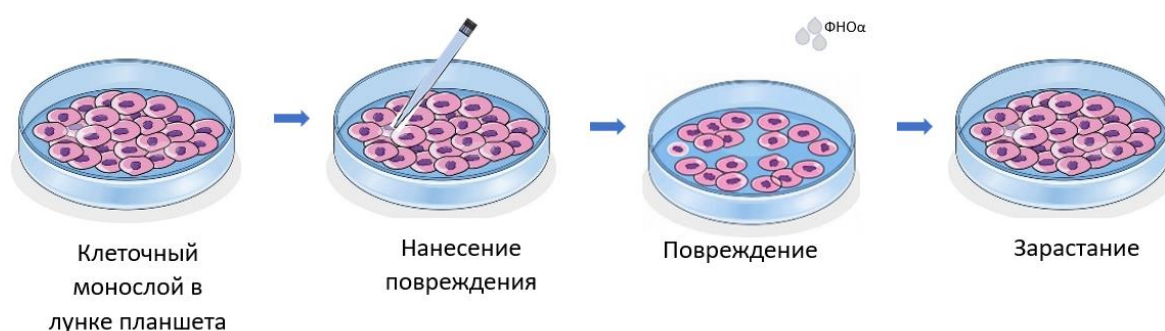


Рисунок 9 – Этапы проведения скарификационного теста (выполнено с помощью программы Biorender)

Количественную оценку скорости миграции клеток проводили с использованием программы ImageJ 1.48v путем измерения ширины закрытия раневого дефекта в различные временные точки и рассчитывали по формуле:

$$\text{Скорость миграции} = (A_0 - A_t) / t, \quad (4)$$

где A_0 – ширина раны в начальный момент времени (0 часов); A_t – ширина раны в момент времени t ; t – время.

Полученные результаты выражали в мкм/час.

2.12. Оценка трансэпителиального электрического сопротивление клеточного монослоя

Для объективной оценки формирования функционально полноценного эпителиального барьера и целостности межклеточных контактов в культуре клеток линии RPMI 2650, выращенных на полупроницаемых мембранах трансвелл-систем, использовали метод измерения трансэпителиального электрического сопротивления. Данный метод является стандартным способом для оценки плотности и функциональной зрелости клеточных монослоев *in vitro* [8]. Метод основан на измерении пассивного сопротивления, которое оказывает клеточный монослой прохождению ионов через параклеточный путь. Сопротивление прямо пропорционально степени сформированности комплексов плотных контактов. Для измерений использовали вольтметр и электрод Millicell® ERS-2 (Millipore, США). Электроды калибровали перед началом каждой серии измерений с помощью встроенного в прибор калибровочного резистора согласно инструкции (Рисунок 10).

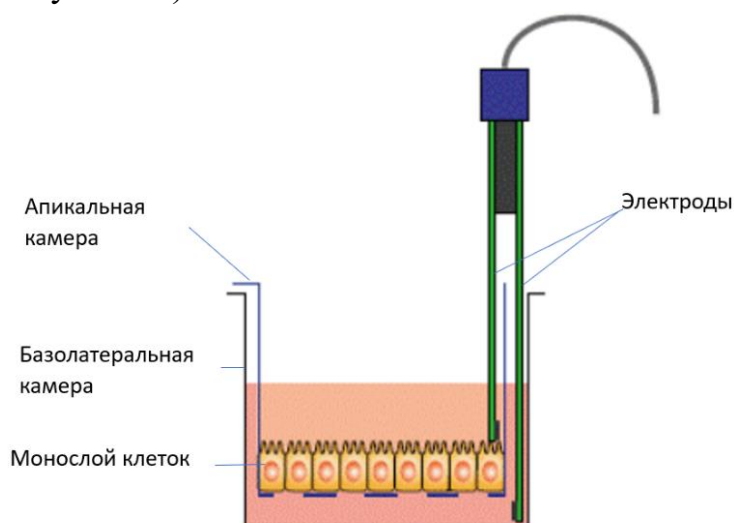


Рисунок 10 – Схема определения трансэпителиального электрического сопротивления монослоя клеток RPMI 2650

Все манипуляции проводили в ламинарном боксе. Электроды и руки обрабатывали 70% этанолом. Планшет с клетками извлекали из инкубатора и выдерживали в ламинарном боксе при комнатной температуре в течение 15 минут для стабилизации условий. Короткий измерительный электрод погружали в среду апикальной камеры, избегая контакта с мембраной. Длинный токовый электрод погружали в среду базальной камеры через специальное отверстие в корпусе вставки или непосредственно в лунку планшета. После стабилизации показаний (5-7 секунд) фиксировали значение сопротивления в O_{\max} (Ω). Фоновое сопротивление измеряли на интактных вставках без клеток, заполненных только культуральной средой.

Для каждой вставки удельное трансэпителиальное сопротивление (TEER) рассчитывали по формуле:

$$\text{TEER} (\Omega \times \text{см}^2) = (R_{\text{кл}} - R_{\text{ф}}) \times S, \quad (5)$$

где $R_{\text{кл}}$ – измеренное сопротивление вставки с клетками (Ω); $R_{\text{ф}}$ – среднее фоновое сопротивление контрольных вставок (Ω); S – площадь поверхности мембраны (см^2).

Измерения TEER проводили один раз в 2 дня для построения кинетической кривой созревания монослоя. Эксперимент начинали после достижения TEER стабильного плато, свидетельствующего о формировании зрелого барьера.

2.13. Способ определения концентрации маннитола методом ВЭЖХ МС/МС

Маннитол является полярным веществом и проникает через клеточный монослой только параклеточным транспортом [90]. Для оценки его проникновения через клеточный монослой питательную среду в камерах заменяли на транспортную среду, состоящую из раствора Хэнкса (ООО «ПанЭко», Россия) с добавлением 25% раствора HEPES («Gipco», Англия) и 1% раствора ДМСО (ООО «ПанЭко», Россия), добавляли маннитол в апикальную камеру (камера донор), в концентрации 10 мкг/мл и через 2 ч забирали 100 мкл среды из

базолатеральной камеры (камера реципиент). Концентрацию маннитола оценивали методом ВЭЖХ-МС/МС на хроматографе Shimadzu LC-40D (Япония) и масс-спектрометре Sciex Triple Quad 3500 (Сингапур).

Условия хроматографического анализа были следующими: колонка Luna Omega 3µm Polar C18 50x2.1, 3µm, предколонка аналогичного типа – C18 3 мкм. Температура разделения – 35°C, скорость потока – 0,3 мл/мин. Применяли градиентный режим элюирования, соотношение 0,1% раствора муравьиной кислоты («Panreac», Испания) и метанола («Merck», Германия) было следующим: 0,0 мин – 60% / 40%; 0,3 мин – 15% / 85%; 4 мин – 1% / 99%; 6 мин – 60% / 40%; 8 мин – 60% / 40%. Ионизацию молекул проводили в режиме негативной ионизации, анализировали следующие MRM переходы m/z 183,1 \rightarrow 129,1, m/z 183,1 \rightarrow 69,1. Аналитический диапазон составил 10-1000 нг/мл.

О проницаемости маннитола судили по коэффициенту кажущейся проницаемости P_{app} :

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} * \frac{1}{A * C_0}; \quad (6)$$

где P_{app} – коэффициент кажущейся проницаемости маннитола; dQ/dt – изменение концентрации субстрата в камере-реципиенте за время инкубации; A – площадь полупроницаемой мембраны в апикальной камере трансвелл-системы; C_0 – начальная концентрация субстрата в камере-доноре.

Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки по площади пиков. Аналитический диапазон методики составил 600 – 20000 нмоль/л. Биоаналитическая методика была валидирована согласно EMA Guideline on bioanalytical method validation (European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2011) по следующим параметрам: селективность, линейность, нижний предел количественного определения, точность (внутрицикловая и межцикловая), прецизионность, перенос пробы, стабильность образцов, матричный эффект.

2.14. Метод иммуноцитохимии

Иммуноцитохимическое исследование проводили с целью визуализации и подтверждения мембранной локализации белков плотных контактов (ZO-1, окклюдина и клаудина-1) и адгезивного контакта (Е-кадгерина) в культуре клеток после воздействия ФНО- α . Объектом исследования служила культура клеток, выращенная в 96-луночных планшетах до образования монослоя.

По окончании воздействия ФНО- α культуральную среду удаляли и приступали к фиксации охлажденным до -20°C метанолом в течение 15 минут. После фиксации проводили дополнительную обработку детергентом. Для этого клетки инкубировали с 0,1% раствором Тритона X-100 в течение 15 минут. Затем, чтобы минимизировать риск неспецифического связывания антител с пластиком планшета или участками клеток, не содержащими целевые антигены, проводили этап блокирования. Клетки инкубировали с блокирующим раствором BSA-DPBST в течение 30 минут при комнатной температуре. Данный раствор готовили *ex tempore*, смешивая 1 г бычьего сывороточного альбумина, 100 мл фосфатно-солевого буфера и 100 мкл детергента Tween-20. После блокирования раствор удаляли и вносили первичные антитела. В работе использовали кроличьи поликлональные антитела, специфичные к каждому из исследуемых белков: ZO-1, Е-кадгерину, окклюдину и клаудину-1 (Таблица 3). Инкубацию с первичными антителами проводили в течение ночи (12–16 часов) при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. На следующий день после инкубации с первичными антителами клетки тщательно отмывали фосфатно-солевым буфером («ПанЭко», Россия) для удаления несвязавшихся молекул. Для визуализации использовали вторичные антитела против кроличьих белков (S0018 Polyclonal Goat Anti-Rabbit IgG 49 (H+L) Fluor488-conjugated, «Affinity Biosciences», КНР), которые добавляли к клеткам на 1 час в темноте при комнатной температуре, инкубация 1 час при комнатной температуре в темноте. По окончании инкубации клетки вновь отмывали для удаления избытка вторичных антител фосфатным буфером. Детекцию результатов осуществляли методом флуоресцентной микроскопии (Olympus СКХ-53, Япония, $\times 400$).

2.15. Методы статистической обработки данных

Для обоснования достоверности полученных результатов и проверки научных гипотез проводили статистическую обработку экспериментальных данных с помощью программного обеспечения «Graph Pad Prism». Выбор конкретных методов определялся типами данных, дизайном эксперимента и необходимостью решения следующих задач: сравнение средних значений нескольких независимых экспериментальных групп или множественное сравнение каждой опытной группы с одной контрольной группой. В связи с малым объемом выборки ($n=3$ в каждой экспериментальной группе) формальная проверка данных на соответствие нормальному распределению не проводилась, так как при таком числе повторов стандартные тесты (например, Шапиро-Уилка) статистически неинформативны.

Для сравнения средних значений в экспериментах, включающих одну контрольную группу и несколько опытных групп, полученных в результате независимых измерений (сравнение уровней количества белка или значения TEER в один момент времени после воздействия разных концентраций вещества), применялся однофакторный дисперсионный анализ (One-Way ANOVA). В случае обнаружения статистически значимых межгрупповых различий по результатам ANOVA ($p < 0,05$) для последующего post-hoc анализа применялся тест Даннетта для сравнения каждой из нескольких опытных групп с одной контрольной группой, а при множественном сравнении использовался post-hoc тест Тьюки для контроля уровня значимости. Данные представлены в виде средних значений со стандартным отклонением ($M \pm SD$). Для попарного сравнения независимых выборок применяли двусторонний t-критерий Стьюдента. Статистически значимыми считали данные при $p < 0,05$. Для анализа цитохимических снимков использовали программный пакет ImageJ. Полученные количественные данные экспортировали для статистической обработки.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Формирование и характеристика монослоя клеток назального эпителия (клеточная линия RPMI 2650)

3.1.1. Валидация метода вестерн-блот при анализе относительного количества белков межклеточных контактов

В рамках исследования была проведена валидация условий полуколичественного иммуноблоттинга для детекции белков межклеточных контактов (Е-кадгерин, клаудин-1, окклюдин, ZO-1) в клеточной линии RPMI 2650. Корректность количественных сравнений методом вестерн-блоттинга зависит от соблюдения двух условий: работы в линейном диапазоне детекции для всех анализируемых белков и использования внутреннего контроля, уровень которого не меняется в сравниваемых группах [37, 159]. В данной работе была проведена экспериментальная проверка условий для анализа белков межклеточных контактов (ZO-1, Е-кадгерин, клаудин-1, окклюдин) и референсного белка GAPDH в клеточной линии RPMI 2650.

Первым этапом валидации стало определение линейного диапазона детекции для целевых белков и референсного белка GAPDH. Анализ серийных разведений клеточного лизата (5–50 мкг общего белка на лунку) показал, что для всех исследуемых белков в интервале 5–50 мкг/лунка зависимость интенсивности хемилюминесцентного сигнала от количества белка адекватно описывалась линейной регрессионной моделью ($R^2 > 0,98$) для каждого белка, что исключает эффект насыщения сигнала в этом диапазоне.

На Рисунке 11 представлен репрезентативный иммуноблот белков плотных контактов и GAPDH. Результаты подтверждают специфичность использованных

антител и корректное определение молекулярных масс целевых белков в лизатах клеток линии RPMI 2650.

В ранее проведенных исследованиях было показано, что при работе с методом возможен артефакт, проявившийся при нагрузке, выходящей за пределы линейной области. При количестве белка до 100 мкг/лунку наблюдалось плато сигнала для целевых белков, свидетельствующее о насыщении системы детекции. В этом состоянии расчет нормализованного показателя (отношение целевой белок / GAPDH) переставал быть информативным, а нормализованное значение статистически не отличалось от значения при нагрузке в 50 мкг/лунка [1]. Этот результат показывал, что проведение количественного анализа в условиях насыщения сигнала может приводить к систематическим ошибкам и ложноотрицательным выводам [37, 159]. Следовательно, для последующих экспериментов был установлен оптимальный рабочий диапазон 20–50 мкг/лунку, указывающий на нахождение в средней части линейной области.

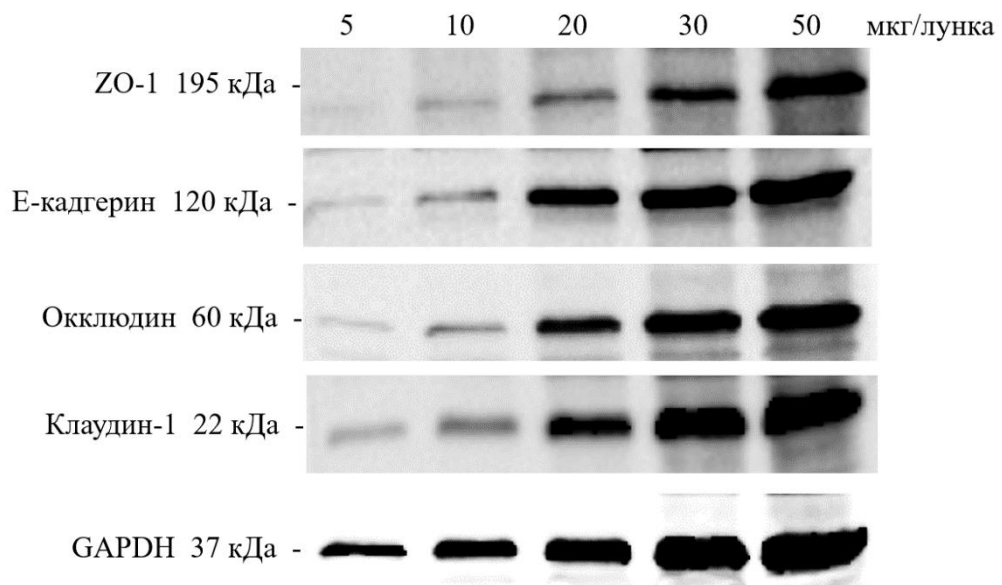


Рисунок 11 – Репрезентативный иммуноблот белков плотных контактов и GAPDH

На Рисунке 12 представлены калибровочные кривые, отражающие зависимость интенсивности сигнала (в относительных единицах) от количества нагруженного общего клеточного белка (мкг/лунку). На блоте визуализированы

четкие полосы, соответствующие молекулярной массе без неспецифического связывания, что подтверждает специфичность проведенного анализа. Данный блот служит иллюстрацией исходных данных, на основе которых были построены калибровочные кривые (Рисунок 12) и рассчитаны нормализованные значения (Рисунок 13).

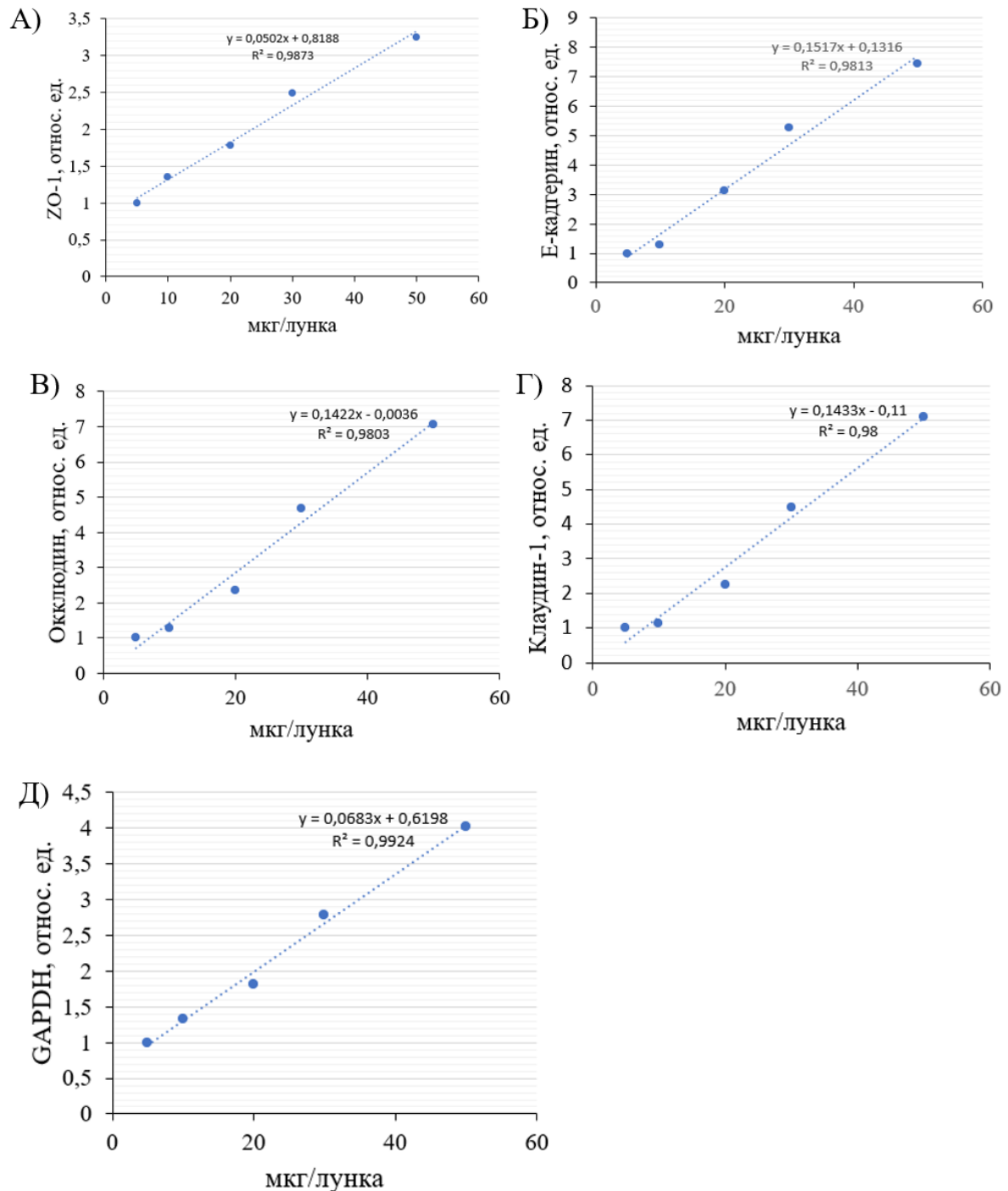


Рисунок 12 – Линейная зависимость сигнала белков ZO-1 (А), E-кадгерина (Б), окклюдина (В), клаудина-1 (Г), GAPDH (Д)

Подход к нормализации данных в нашем исследовании основан на отношении сигналов двух белков [37, 159]. Анализ результатов показал, что в линейном диапазоне сигнала отношение «целевой белок / GAPDH» не изменяется в зависимости от степени загрузки лунок белком (Рисунок 13).

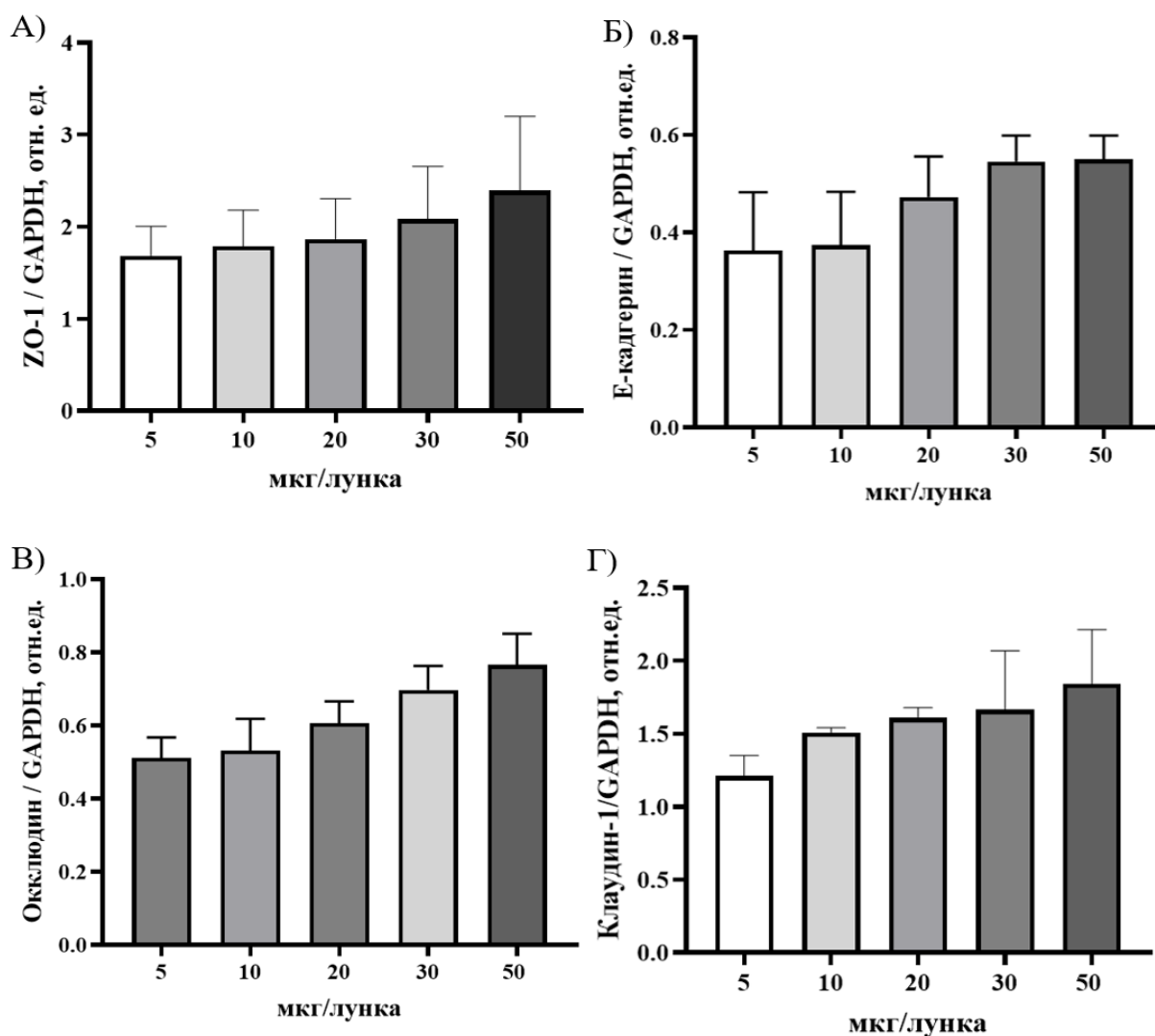


Рисунок 13 – Относительное количество белков ZO-1 (А), E-кадгерина (Б), окклюдина (В), клаудина-1 (Г) в клетках линии RPMI 2650

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в диапазоне загрузки 20-50 мкг/лунку происходит детекция белков при линейной зависимости без признаков насыщения. Разработанный валидированный протокол создает методическую основу для последующего изучения регуляции белков плотных контактов в различных экспериментальных условиях.

Валидация референсного белка GAPDH в модели воспаления, индуцированного ФНО- α . Использование глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) в качестве эндогенного контроля в количественном вестерн-блоттинге основано на предположении о его конститутивной стабильной экспрессии. Однако это допущение может не выполняться в конкретных экспериментальных условиях. Уровень экспрессии белков «домашнего хозяйства», в том числе GAPDH, как ключевого фермента гликолиза, может изменяться в ответ на различные физиологические и патологические состояния, включая пролиферацию, клеточный стресс, гипоксию, воспаление и онкогенную трансформацию [99, 108, 160]. В частности, провоспалительные цитокины, такие как ФНО- α , способны влиять на активность метаболических путей и, как следствие, на экспрессию метаболических ферментов. Следовательно, нормализация данных по белку, уровень которого потенциально изменчив, может привести к систематическим ошибкам: ложному завышению/занижению реальных изменений в содержании целевого белка, поэтому необходимо экспериментально подтвердить стабильность экспрессии GAPDH непосредственно в условиях проводимого исследования, что соответствует современным стандартам методологического подхода в молекулярно-биологических исследованиях.

Для валидации, клетки линии RPMI 2650 обрабатывали ФНО- α в концентрации 5, 10, 50 и 100 нг/мл в течение 6, 24 и 48 часов. Данная доза и время инкубации соответствуют стандартным протоколам индукции воспалительного ответа *in vitro* [135]. Лизаты контрольных и обработанных клеток, содержащие строго равное количество общего белка (30 мкг/лунка), анализировали методом вестерн-блоттинга с детекцией GAPDH. Результаты доказали, что интенсивность полос GAPDH в образцах, обработанных ФНО- α , визуальна и количественно не отличалась от контроля (Рисунок 14). Денситометрический анализ подтвердил отсутствие статистически значимых различий для 6 ч $F=0,05$, $p=0,99$; 24 ч $F=0,06$, $p=0,99$; 48 ч $F=0,37$, $p=0,82$.

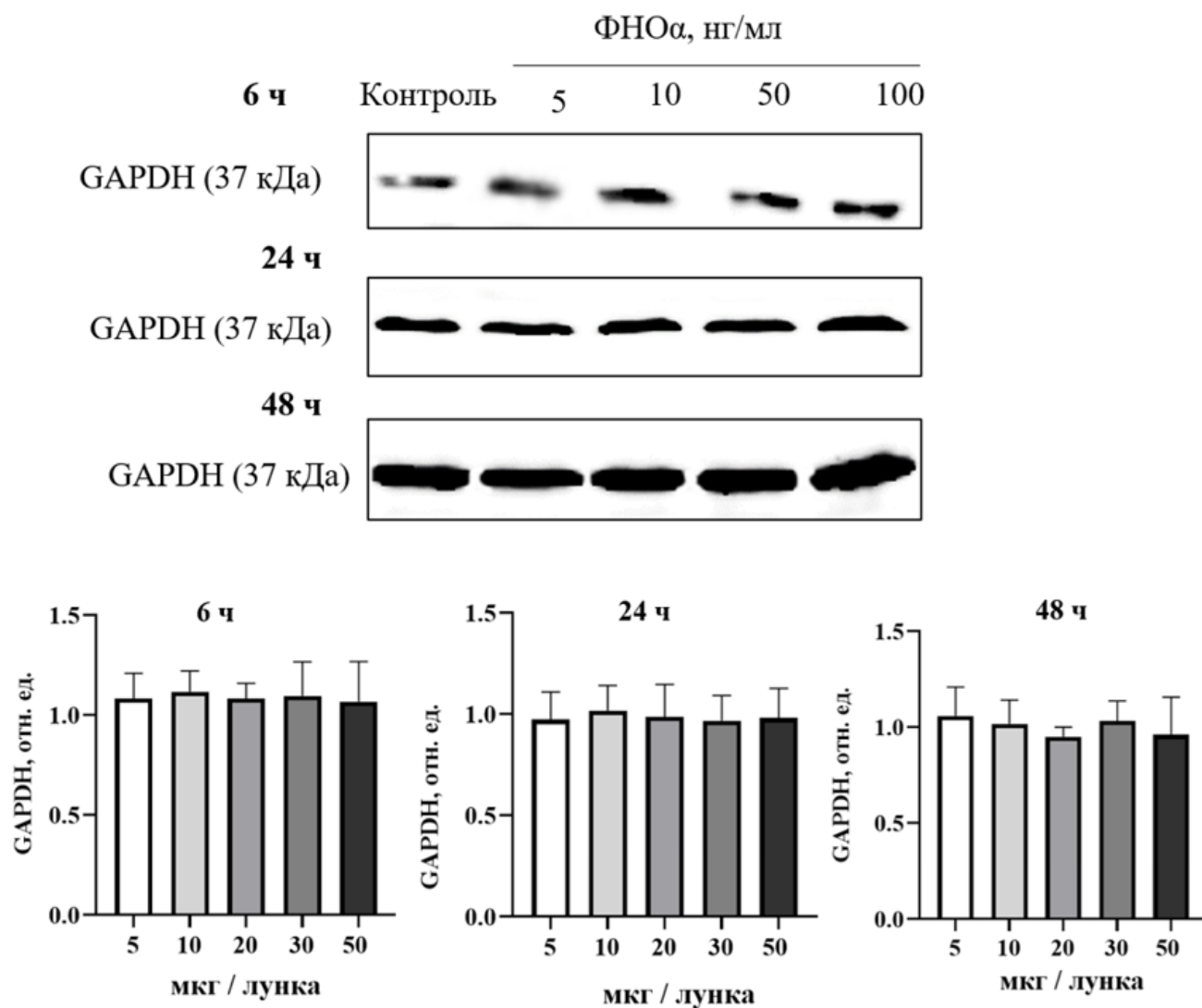


Рисунок 14 – Влияние ФНО- α на уровень GAPDH в концентрации 5, 10, 50 и 100 нг/мл в течение 6, 24 и 48 часов

Отсутствие влияния ФНО- α на уровень GAPDH указывает на то, что в данных конкретных условиях цитокин не вызывает нарушений метаболизма в клетках RPMI 2650. Таким образом, стабильность GAPDH обосновывает его использование в качестве референсного белка для нормализации данных в последующих экспериментах по изучению влияния ФНО- α . Это означает, что любые наблюдаемые изменения в отношениях «целевой белок/GAPDH» будут объективно отражать изменения уровня целевых белков, а не артефакт, вызванный колебаниями контроля.

3.1.2. Анализ изменения уровня белков межклеточных контактов при формировании монослоя клеток линии RPMI 2650

Клетки линии RPMI 2650, происходящие из карциномы носовой перегородки человека, при культивировании способны полярно дифференцироваться и образуют межклеточные контакты, характерные для назального эпителия, микроворсинки на апикальной поверхности и начинают продуцировать мукоидный материал на поверхности клеток [96]. Благодаря вышеупомянутым свойствам они широко используются в исследованиях токсичности, проницаемости слизистой оболочки носа, метаболизма и транспорта лекарственных средств [125, 218].

Существующие системы *in vitro* тестирования в основном состоят из изолированных эпителиальных клеток носовой полости человека или клеточной линии RPMI 2650. Эпителиальные клетки слизистой оболочки носа человека *in vivo* обычно имеют значения трансэпителиального электрического сопротивления (TEER) около $100 \text{ Ом} \times \text{см}^2$ [39, 65], первичные культуры в основном демонстрируют значения, превышающие этот уровень ($>1000 \text{ Ом} \times \text{см}^2$) [42, 204]. Однако органотипические свойства (экспрессия слизи и активных ресничек) могут быть усилены путем культивирования на границе раздела воздух-жидкость [226]. Клеточная линия RPMI 2650, полученная из карциномы носовой перегородки человека и широко используемая в качестве модели назального эпителия *in vitro* [162], характеризуется органотипическими значениями TEER при культивировании на границе раздела воздух-жидкость.

Снимки клеток RPMI 2650 показаны на Рисунке 15. Оценка состояния клеточного монослоя клеток линии RPMI 2650 с помощью световой микроскопии показала, что эти клетки образуют монослой на 5 сутки культивирования, а к 8-10 – наблюдалось формирование перекрывающихся слоев. Клетки были сгруппированы, причем кластеры соединялись клеточными перемычками меньшего или большего размера и состояли из круглых и слегка уплощенных клеток. Поверхности круглых клеток были изогнуты с выступами,

напоминающими микроворсинки. Реснички отсутствовали, а между отдельными клетками и скоплениями наблюдались промежутки разного размера.

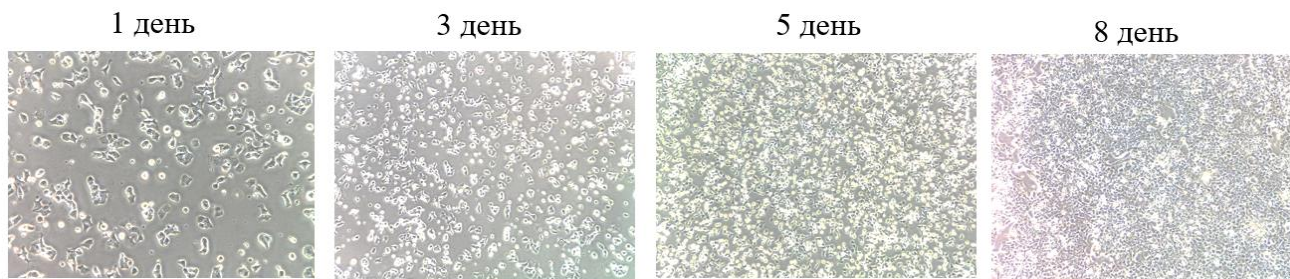


Рисунок 15 – Клеточная линия RPMI 2650 на разных этапах формирования монослоя. Фазово-контрастная микроскопия, ув. x200

Для формирования межклеточных контактов и транспорта через монослой назального эпителия RPMI 2650 наибольшее значение имеет состояние белков межклеточных контактов: E-кадгерин, клаудин-1, окклюдин, ZO-1. Именно поэтому в ходе работы в клетках линии RPMI 2650 была проведена оценка относительного количества белков межклеточных контактов на разных этапах формирования клеточного монослоя.

Кадгерины представляют собой большое семейство трансмембранных или мембраносвязанных гликопротеинов, которые опосредуют специфическую межклеточную адгезию Ca^{2+} -зависимым образом, функционируя в качестве ключевых молекул в морфогенезе различных органов. На Рисунке 16 представлены результаты вестерн-блоттинга и количественного анализа уровня белка E-кадгерина в клеточной культуре RPMI 2650 на 3, 5, 8, 14 и 21 сутки культивирования. Анализ показал статистически значимое увеличение относительного количества E-кадгерина в зависимости от срока культивирования. По сравнению с 3-м днем уровень белка достоверно возрастал к 5-му дню – на 29,7% ($p=0,0038$), к 8-му дню – на 63,3% ($p<0,0001$), к 14-му дню – на 116,0% ($p<0,0001$) и к 21-му дню – на 124,0% ($p<0,0001$). Попарные сравнения также выявили значимые различия между промежуточными сроками. Относительное количество на 8-й день было на 26,5% выше, чем на 5-й день ($p=0,0013$), к 14-му дню уровень E-кадгерина продолжал значительно нарастать, превышая показатели 5-го дня на 66,9% ($p<0,0001$) и 8-го дня на 31,7% ($p<0,0001$), а к 21-му дню белок

достигал значений, превышающих уровень 5-го дня на 73,1% ($p < 0,0001$) и 8-го дня на 36,6% ($p < 0,0001$). Стоит отметить, что разницы между 14-ми и 21-ми сутками культивирования не отмечалось ($p = 0,67$). Максимальное количество Е-кадгерина достигается к 14-му дню и в дальнейшем стабилизируется. Таким образом, динамика экспрессии Е-кадгерина характеризуется повышением в течение первых 14 дней с последующим выходом на плато, что отражает завершение процесса формирования кадгерин-зависимых межклеточных контактов в данной клеточной модели.

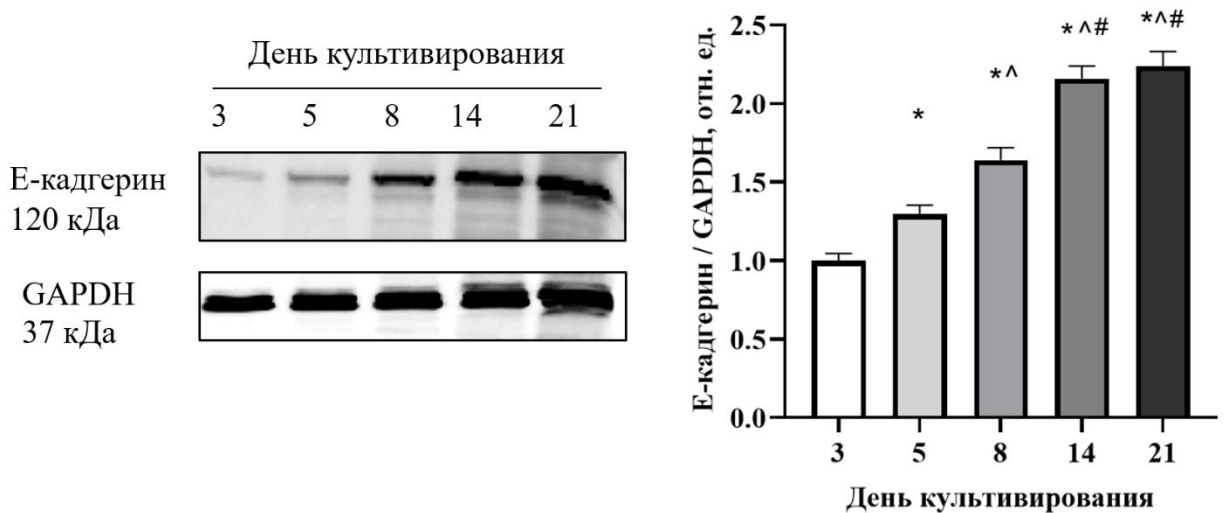


Рисунок 16 – Относительное количество Е-кадгерина в клетках линии RPMI 2650 на 1-8 дни культивирования

Примечание – * – статистически значимые отличия относительно 5 дня культивирования; *^ – статистически значимые отличия относительно 8 дня культивирования; *^# – статистически значимые отличия относительно 14 дня культивирования

Клаудины представляют собой семейство белков, которые являются наиболее важными компонентами плотных (замыкающих) контактов, где они устанавливают параклеточный барьер, который контролирует транспорт молекул в межклеточном пространстве между клетками эпителия [234].

На Рисунке 17 представлены результаты вестерн-блоттинга и количественного анализа уровня белка клаудин-1 в клеточной культуре RPMI 2650 на 3, 5, 8, 14 и 21 сутки культивирования.

Анализ данных демонстрирует выраженную динамику увеличения количества белка межклеточных контактов в течение всего экспериментального периода. По сравнению с исходным уровнем на 3-й день наблюдается достоверное

увеличение количества клаудина-1 на всех последующих сроках: на 5-й день – на 38,3% ($p=0,0003$), на 8-й день – на 81,7% ($p<0,0001$), на 14-й день – на 118,3% ($p<0,0001$) и на 21-й день – на 126,3% ($p<0,0001$).

При сравнении между промежуточными сроками культивирования также выявлены статистически значимые различия. Уровень клаудина-1 на 8-й день был на 31,2% выше, чем на 5-й день ($p=0,0001$). Относительное количество продолжало значительно нарастать к 14-му дню, превышая уровень 5-го дня на 57,9% ($p<0,0001$) и уровень 8-го дня на 20,4% ($p=0,0004$), а к 21-му дню количество белка стало еще выше, чем на 5-й день на 63,7% ($p<0,0001$) и на 8-й день на 24,7% ($p<0,0001$).

Статистический анализ с поправкой Тьюки показал, что разница в уровне клаудина-1 между 14-м и 21-м днями культивирования не является статистически значимой ($p=0,61$) (Рисунок 17).

Таким образом, экспрессия клаудина-1 характеризуется постепенным, но значительным накоплением в течение всего периода эксперимента, достигая плато между 14-ми и 21-ми сутками культивирования, что указывает на стабилизацию формирования плотных контактов в поздние сроки.

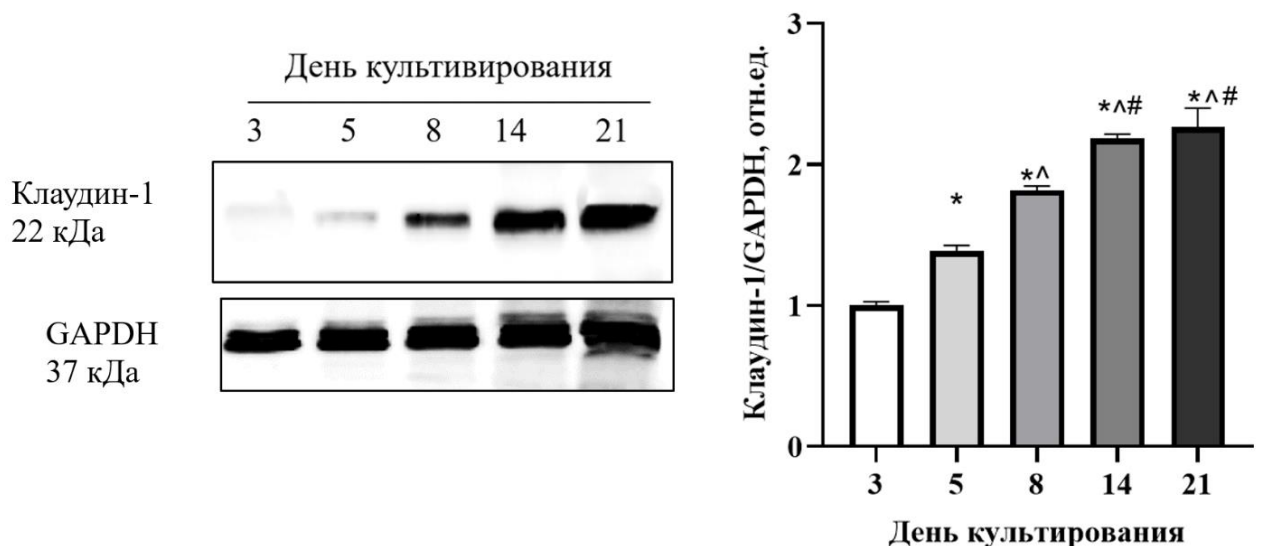


Рисунок 17 – Относительное количество клаудина-1 в клетках линии RPMI 2650 на 3-21 дни культивирования

Примечание – * – статистически значимые отличия относительно 5 дня культивирования; *^ – статистически значимые отличия относительно 8 дня культивирования; *^# – статистически значимые отличия относительно 14 дня культивирования

На Рисунке 18 представлены данные вестерн-блоттинга и количественная оценка уровня белка окклюдина в клеточной культуре в различные дни культивирования (3, 5, 8, 14 и 21 сутки). Анализ результатов выявил статистически значимые различия между группами. По сравнению с 3-м днем количество окклюдина достоверно увеличивалось на всех последующих сроках наблюдения: повышение составило 31,3% к 5-му дню ($p=0,004$), 51,3% к 8-му дню ($p<0,0001$), 85,3% к 14-му дню ($p<0,0001$) и 85,0% к 21-му дню ($p<0,0001$).

Попарные сравнения с поправкой Тьюки показали, что различия между 5-м и 8-м днями составило 14,9% ($p=0,05$). Однако начиная с 14-го дня уровень окклюдина становился существенно выше, чем на 5-й день на 41,2%, ($p<0,0001$) и 8-й день на 24,0% ($p=0,0016$). Аналогичные результаты наблюдались и при сравнении с 21-м днем: его показатели значительно превышали значения 5-го дня на 40,9% ($p<0,0001$) и 8-го дня на 23,8% ($p=0,002$).

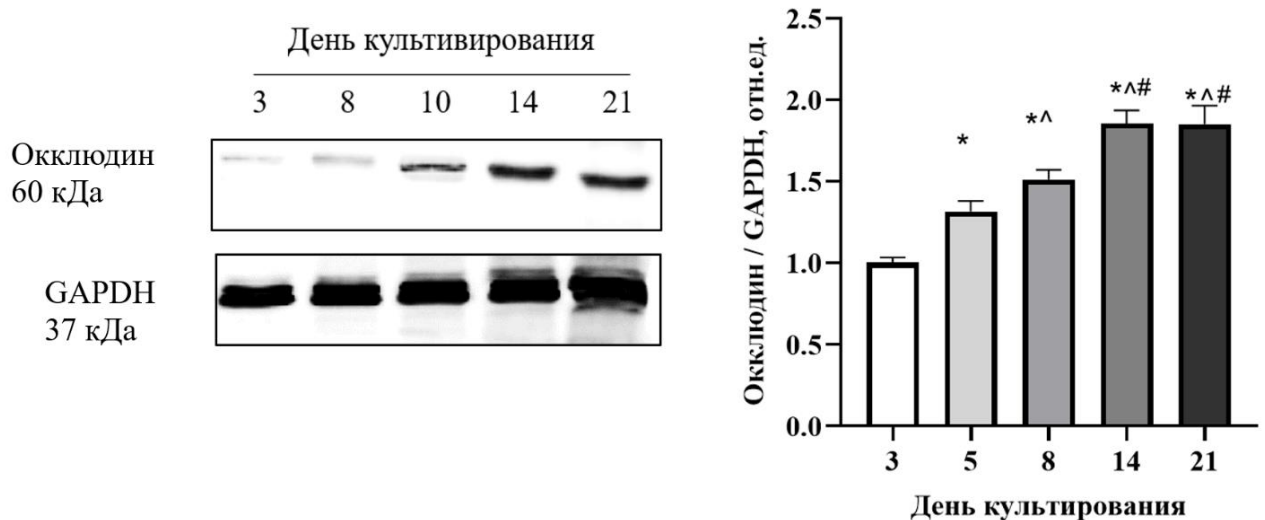


Рисунок 18 – Относительное количество окклюдина в клетках линии RPMI 2650 на 3-21 дни культивирования

Примечание – * – статистически значимые отличия относительно 5 дня культивирования; *^ – статистически значимые отличия относительно 8 дня культивирования; *^# – статистически значимые отличия относительно 14 дня культивирования

Важно отметить, что между 14-ми и 21-ми сутками статистически значимого различия в уровне окклюдина не выявлено ($p>0,99$). Полученные результаты свидетельствуют о стабилизации количества данного белка к 14-му дню

культивирования. Таким образом, динамика количества окклюдина характеризуется выраженным ростом в течение первых двух недель, после чего его количество сохраняется на постоянном уровне.

На Рисунке 19 представлены результаты вестерн-блоттинга и количественного анализа уровня белка ZO-1 в клеточной культуре на 3, 5, 8, 14 и 21 сутки культивирования. Анализ данных выявляет четкую зависимость экспрессии этого белка от времени формирования монослоя. По сравнению с исходным уровнем (3-й день) наблюдается достоверное увеличение количества белка ZO-1 уже на 5-е сутки на 23,0% ($p=0,006$), в последующие сроки прирост становится еще более выраженным на 8-й день – на 40,0% ($p<0,0001$), на 14-й день – на 67,3% ($p<0,0001$) и на 21-й день – на 65,3% ($p<0,0001$) (Рисунок 19).

При сравнении между промежуточными точками также выявлены статистически значимые различия. Уровень ZO-1 на 8-й день был на 13,8% выше, чем на 5-й день ($p=0,036$), к 14-му дню количество продолжало нарастать, превышая уровень 5-го дня на 35,7% ($p<0,0001$), а уровень 8-го дня – на 19,2% ($p=0,0016$), к 21-му дню показатель оставался значительно выше, чем на 5-й день на 34,1% ($p<0,0001$) и на 8-й день на 17,8% ($p=0,0028$) (Рисунок 19).

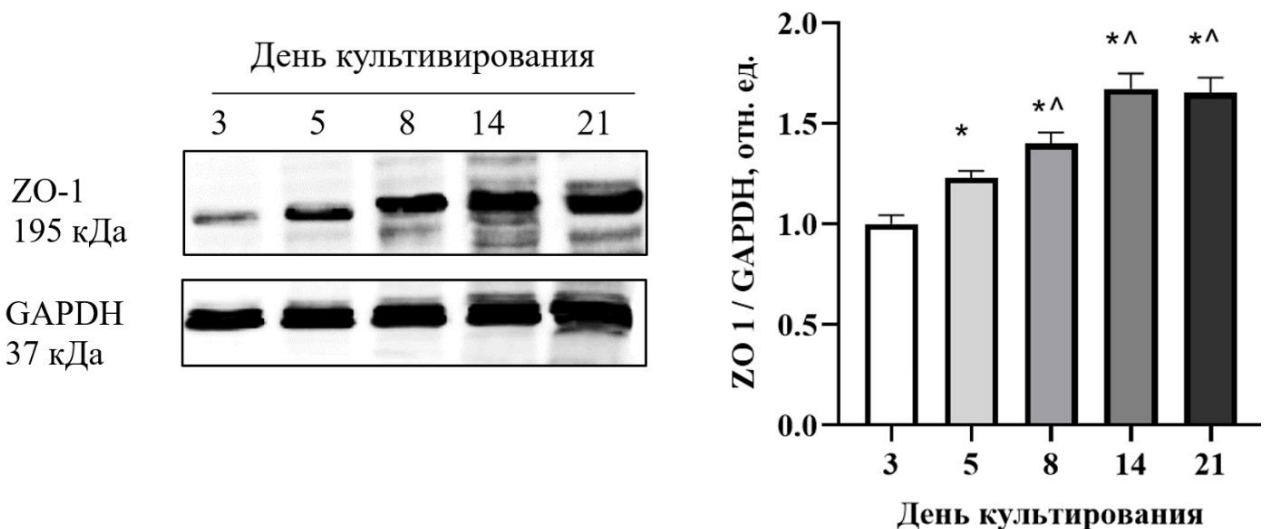


Рисунок 19 – Относительное количество белка межклеточных контактов ZO-1 в клетках линии RPMI 2650 на 3-21 дни культивирования

Примечание – * – статистически значимые отличия относительно 5 дня культивирования; *^ – статистически значимые отличия относительно 8 дня культивирования

Важно отметить, что статистически значимой разницы ($p=0,99$) в уровне белка ZO-1 между 14-ми и 21-ми сутками культивирования не было отмечено. Полученный результат указывает на то, что максимальное количество и, предположительно, полноценное формирование плотных контактов на основе ZO-1 достигаются к 14-му дню и далее стабилизируются, не претерпевая существенных изменений. Следовательно, динамика количества белка ZO-1 характеризуется быстрым значительным ростом в первую и вторую недели культивирования с последующим выходом на плато.

Эпителиальные клетки характеризуются сильной межклеточной адгезией, обеспечиваемой особыми соединениями. Эти соединения представляют собой специализированные участки адгезии, в которых различные трансмембранные гликопротеины взаимодействуют с цитоскелетом.

Межклеточная адгезия в основном осуществляется тремя типами соединительных комплексов: плотные соединения, адгезивные соединения и десмосомы. Каждое соединение имеет свой особый механизм формирования, регулирования и функционирования, обширная коммуникация между различными соединениями взаимно влияет на их динамику и передачу сигнала.

Имеются данные, что ZO-1 является функциональным компонентом межклеточных взаимодействий, так связи с кадгерином базируются на системе клеточной адгезии [80]. Взаимозависимая адгезия белков является необходимым условием для образования других специализированных межклеточных контактов. ZO-1 и E-кадгерин участвуют в образовании межклеточной структуры, что способствует организации белков в плотном соединении.

Таким образом, из полученных данных следует, что ZO-1, E-кадгерин, клаудин-1, окклюдин принимают активное участие в образовании межклеточных контактов при формировании клеточного монослоя линии RPMI 2650. Полученные данные имеют важное значение в контексте обсуждения формирования назального эпителия, соответствующего модели *in vivo*.

3.1.3. Локализация белков межклеточных контактов при формировании монослоя клеток RPMI 2650

Для обоснования использования клеточной линии RPMI 2650 в качестве *in vitro* модели назального эпителия было проведено иммуноцитохимическое исследование, сравнивающее состояние межклеточных контактов на 5-е и 21-е сутки культивирования. В физиологическом состоянии подтверждение модели определяется способностью клеток формировать функциональный барьер, основанный на зрелых межклеточных контактах.

Полученные результаты демонстрируют выраженную динамику созревания клеточного монослоя. При длительном культивировании наблюдается значительное, статистически достоверное увеличение количества ключевых белков, ответственных за формирование межклеточных контактов. Иммунофлуоресцентный анализ подтвердил характерную для белков плотных контактов и адгезивных соединений мембранную и примембранную локализацию (Рисунок 20). Окклюдин и клаудин-1 демонстрировали типичное линейное распределение по периметру клеток в области апикальных латеральных мембран, что соответствует их основной функции в формировании филаментов плотных контактов. Сигнал был сосредоточен в зоне клеточных границ, образуя непрерывную сеть. Е-кадгерин, являясь ключевым трансмембранным белком адгериновых контактов, был также локализован по латеральным клеточным мембранам с акцентом в базально-латеральных отделах. На снимках наблюдалась четкая маркировка границ между соседними клетками. ZO-1 – цитоплазматический адапторный белок, связывающий трансмембранные белки плотных контактов с актиновым цитоскелетом. Его локализация соответствовала примембранной зоне непосредственно под плазматической мембраной в области плотных контактов, что визуализировалось как интенсивная линейная полоса, непосредственно прилегающая к клеточной границе.

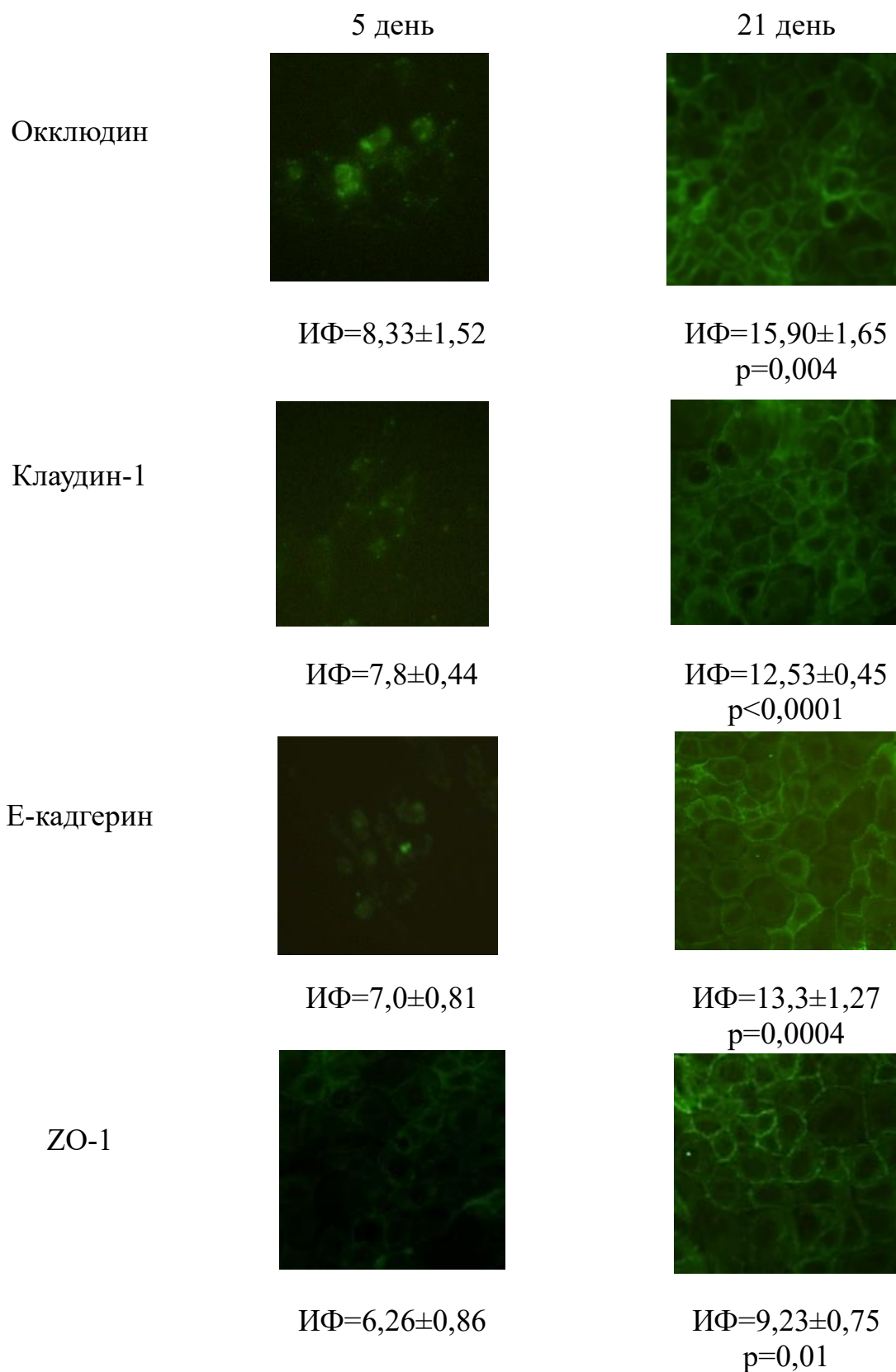


Рисунок 20 – Локализация белков межклеточных контактов в клетках RPMI2650 на 5-е и 21-е сутки культивирования

Примечание – ИФ – интенсивность флуоресценции

Выявленная локализация окклюдина, клаудина-1, E-кадгерина и ZO-1 с типичным распределением в области межклеточных границ свидетельствует о способности данной линии формировать структуры, аналогичные назальному эпителию *in vivo*. Полученные данные обосновывают использование длительного культивирования (21 сутки) для достижения максимально приближенного к нативному состоянию барьерного фенотипа.

Следовательно, клеточная линия RPMI 2650 при культивировании в условиях воздушной среды может служить адекватной *in vitro* моделью для изучения барьерной функции респираторного эпителия и ее нарушений.

Визуальная оценка изображений на 21-е сутки по сравнению с 5-ми сутками показала не только увеличение интенсивности флуоресценции, но и более четкую, организованную и непрерывную картину распределения всех белков по клеточным границам, что морфологически подтверждает данные количественного анализа об усилении формирования межклеточных контактов.

Таким образом, полученные данные подтверждают, что в процессе культивирования клетки RPMI 2650 не просто пролиферируют, но и подвергаются функциональному созреванию – формирование межклеточных контактов. Наличие плотных и адгезивных контактов является фундаментальным критерием, позволяющим рассматривать клеточную линию RPMI 2650 в качестве модели назального эпителия для оценки проницаемости монослоя.

3.1.4. Динамика изменения трансэпителиального сопротивления при формировании монослоя клеток линии RPMI 2650

Метод с применением TEER позволяет также регистрировать ранние изменения состояния монослоя при действии различных веществ [12].

При изучении трансэпителиального сопротивления были получены следующие результаты. С увеличением срока инкубации, величина TEER постепенно увеличивалась и примерно к 8-21 дню выходила на плато (Таблица 4).

Таким образом, нарастание TEER совпадало с формированием плотных межклеточных контактов.

В Таблице 4 представлены результаты статистического анализа динамики трансэпителиального электрического сопротивления (TEER) в процессе культивирования клеток RPMI 2650 в течение 21 дня. Данные были проанализированы с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующими попарными множественными сравнениями по методу Тьюки.

Таблица 4 – Динамика трансэпителиального электрического сопротивления (TEER) в процессе культивирования клеточного монослоя в течение 21 дня

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

Примечание – * – статистически значимые отличия относительно 3 дня культивирования; \wedge – статистически значимые отличия относительно 5 дня культивирования; # – статистически значимые отличия относительно 8 дня культивирования

Анализ выявил статистически значимое увеличение показателя TEER в зависимости от срока культивирования. По сравнению с 3-ми сутками среднее значение TEER достоверно не изменялось по сравнению с 5-ми сутками (разница $5 \Omega \times \text{см}^2$, $p=0,11$), и возрастало к 8-му дню (разница $13 \Omega \times \text{см}^2$, $p=0,0004$), к 14-му дню (разница $19,0 \Omega \times \text{см}^2$, $p<0,0001$) и к 21-му дню (разница $21,3 \Omega \times \text{см}^2$, $p<0,0001$). Сравнение между промежуточными точками также показало значимые различия. Значение TEER на 8-й день было достоверно выше, чем на 5-й день (разница $7,66 \Omega \times \text{см}^2$, $p=0,02$). Показатели на 14-й и 21-й день значимо превышали значение на 5-й день (разницы $13,67 \Omega \times \text{см}^2$, $p=0,0003$ и $6,0 \Omega \times \text{см}^2$, $p<0,0001$, соответственно). Кроме того, значение на 21-й день было значимо выше, чем на 8-й день (разница

8,3 $\Omega \times \text{см}^2$, $p=0,01$). При этом различия между 8-м и 14-м днями (разница 6,0 $\Omega \times \text{см}^2$, $p=0,07$) и между 14-м и 21-м днями (разница 2,3 $\Omega \times \text{см}^2$, $p=0,7$) не были статистически значимыми.

Таким образом, показатель TEER демонстрирует выраженный рост в течение первой недели культивирования (с 3 по 8 сутки), после чего показатель не изменялся. Стабильно высокие и статистически неразличимые значения между 14-ми и 21-ми сутками указывают на формирование зрелого и функционально полноценного клеточного монослоя к концу второй недели культивирования.

3.2. Оценка провоспалительного, цитотоксического и регенеративного ответа клеток линии RPMI 2650 при моделировании воспалительного повреждения фактором некроза опухоли- α

Для комплексной оценки ответа клеток назального эпителия на воспалительный стимул была разработана *in vitro* модель с использованием фактора некроза опухоли- α (заявка патент на изобретение РФ №2025133841 от 02.12.2025). В ходе данного эксперимента последовательно исследовались ключевые аспекты клеточного ответа: активация биохимического сигналинга – каскада транскрипционного фактора Nf- κ B/ИЛ-1 β , развитие окислительного стресса, динамика клеточной жизнеспособности и маркеров апоптоза, а также способность клеток к восстановлению барьера, оцениваемая по миграционной активности [6].

3.2.1. Моделирование провоспалительного состояния на клетках RPMI 2650: активация пути Nf- κ B и синтез провоспалительного цитокина ИЛ-1 β

Впервые ФНО- α был выделен в 1984 году, с тех пор его считают плейотропным агентом, продуцируемым в основном активированными макрофагами и моноцитами, а также многими другими типами клеток, включая В-

лимфоциты, Т-лимфоциты и фибробласты. В настоящее время активно ведутся исследования его сигнального действия в клетках назального эпителия [73, 240]. Известно, что ФНО- α экспрессируется в виде трансмембранного белка массой 26 кДа, который может расщепляться металлопротеазой ФНО- α -превращающим ферментом (TACE) с выделением растворимой формы ФНО массой 17 кДа [237].

Рецепторы ФНО- α относятся к суперсемейству рецепторов ФНО (TNFRSF), которое насчитывает несколько десятков членов (у человека около 29). Для многих членов этого семейства, включая рецепторы ФНО- α 1-го (TNFR1, p55) и 2-го типа (TNFR2, p75), характерно наличие внеклеточного домена с повторяющимися мотивами, богатыми цистеином (CRD) [146]. Связывание ФНО- α с рецептором представляет собой высокоспецифичное лиганд-рецепторное взаимодействие, инициирующее каскад внутриклеточных сигнальных путей, например, Nf- κ B [78].

В ходе настоящего исследования было показано, что при воздействии ФНО- α происходит увеличение уровня Nf- κ B в ядерной фракции лизата клеток при сроках воздействия 6 ч и концентрациях цитокина 1, 10, 50 и 100 нг/мл на 25,0% ($p=0,02$), 62,3% ($p<0,0001$), 45,5% ($p=0,0002$), 34,2% ($p=0,0025$). Важно отметить, что изменения носили дозозависимый характер между концентрациями 1 и 10 нг/мл на 37,7 ($p=0,0013$), 10 и 100 нг/мл на 17,0% ($p=0,01$), также между 50 и 100 нг/мл на 13,2% ($p=0,03$) (Рисунок 21). При сроке инкубации 24 ч увеличение уровня Nf- κ B отмечалось при концентрациях ФНО- α 10, 50 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 и 10 нг/мл на 93,9% ($p=0,004$) (Рисунок 21). При сроке инкубации 48 ч уровень Nf- κ B возрастал при действии ФНО- α в концентрациях 10, 50 и 100 нг/мл на 32,0% ($p=0,02$), 33,2% ($p=0,02$) и 29,0% ($p=0,03$), а дозозависимые изменения зафиксированы не были.

Таким образом, ФНО- α запускает активацию транскрипционного фактора Nf- κ B, представляющего собой ключевой регуляторный белок, контролирующий экспрессию генов, участвующих в клеточном выживании, пролиферации и воспалительном ответе [77]. В неактивном состоянии Nf- κ B находится в цитоплазме в комплексе с ингибиторными белками I κ B. Активация сигнального

каскада, инициируемая в данном исследовании, фактором некроза опухоли- α , приводит к транслокации Nf- κ B в ядро, что подтверждается результатами вестерн-блот анализа. В настоящее время, известно, что фосфорилирование и последующая деградации I κ B лежит в основе данного процесса. Высвобожденный Nf- κ B транслоцируется в ядро, где связывается со специфическими последовательностями ДНК и регулирует транскрипцию целевых генов.

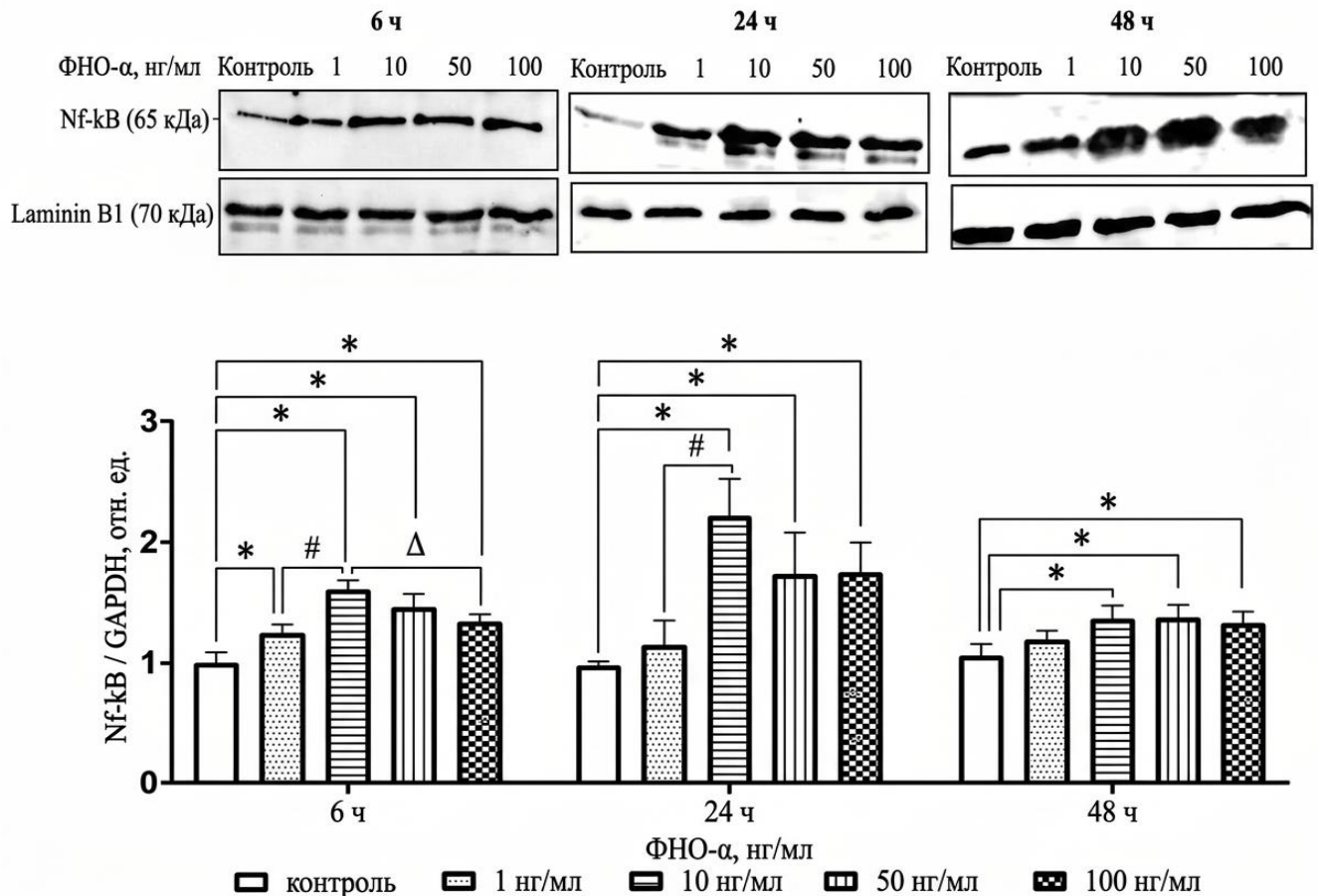


Рисунок 21 – Относительное количество Nf- κ B в клетках линии RPMI-2650 при воздействии фактора некроза опухоли- α в концентрациях 1, 10, 50 и 100 нг/мл в течение 6, 24 и 48 ч

Примечание – статистически значимые отличия: * – от контроля; # – от группы 1 нг/мл; Δ – от группы 10 нг/мл

Относительное количество про-ИЛ-1 β не изменялось при воздействии ФНО- α в течение 6 часов. При увеличении срока инкубации до 24 ч относительно контроля было получено увеличение уровня про-ИЛ-1 β при воздействии ФНО- α 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 наблюдались

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 (Рисунок 22).

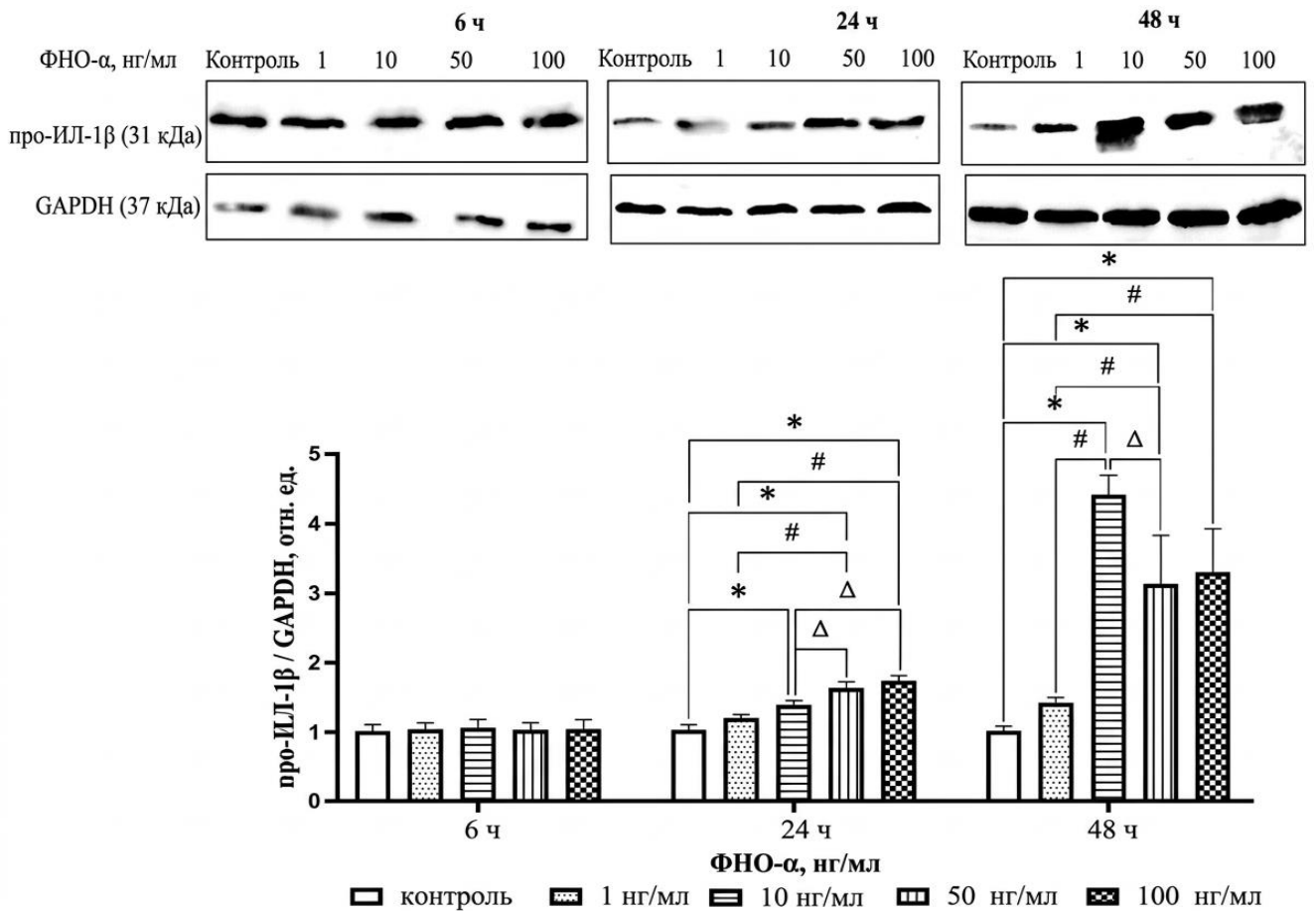


Рисунок 22 – Относительное количество про-ИЛ-1 β в клетках линии RPMI-2650 при воздействии фактора некроза опухоли- α в концентрациях 1, 10, 50 и 100 нг/мл в течение 6, 24 и 48 ч

Примечание – статистически значимые отличия * – от контроля; # – от группы 1 нг/мл; Δ – от группы 10 нг/мл

При сроке инкубации 48 ч также отмечалась дозозависимая тенденция относительно контроля и концентраций 10, 50 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, 50 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 и 50 нг/мл на 29,0% ($p=0,03$)

(Рисунок 22). Известно, что Nf-κB регулирует транскрипцию гена, кодирующего белок ИЛ-1β, и индуцирует выработку про-ИЛ-1β в клетках [160].

Таким образом, накопление про-ИЛ-1β в клетке служит прямым маркером транскрипционной активности Nf-κB, индуцированной ФНО-α, и является подтверждением активации этого сигнального пути.

3.2.2. Цитотоксический эффект фактора некроза опухоли-α: жизнеспособность и апоптотический ответ клеток

Для оценки функциональных последствий активации сигнального пути Nf-κB/про-ИЛ-1β была определена выживаемость клеток. Обработка клеток RPMI 2650 ФНО-α в концентрациях 1, 10, 50 и 100 нг/мл в течение 6, 24 и 48 часов показала дозозависимое и времязависимое снижение доли живых клеток. Жизнеспособность клеток линии RPMI 2650 после обработки ФНО-α оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием красителя DAPI. DAPI проникает через поврежденные мембраны нежизнеспособных клеток и связывается с ДНК, что позволяет дифференцировать живые (DAPI-негативные) и мертвые (DAPI-позитивные) популяции клеток.

Применение проточной цитометрии с красителем DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол) позволяет проводить высокоточную количественную оценку жизнеспособных клеток. Данный метод обеспечивает быстрый и статистически достоверный анализ тысяч клеток за единицу времени, что делает его предпочтительным при оценке цитотоксичности, пролиферации и эффективности экспериментальных воздействий в культурах клеток, включая линии назального эпителия (RPMI 2650), используемые в представленных исследованиях.

При кратковременной экспозиции (6 ч) значительного снижения жизнеспособности не наблюдалось ни в одной из тестируемых концентраций по сравнению с контрольной группой (клетки, не обработанные ФНО-α). 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 ФНО-α в данном

временном промежутке. Важно отметить, что в контроле популяция клеток смещена влево (DAPI-отрицательный ответ), при воздействии ФНО- α – смещена вправо, что указывает на тенденцию снижения жизнеспособности клеток (Рисунок 23).

По истечении 24 ч воздействия ФНО- α было получено, что при концентрациях 1, 10 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, а при концентрации 100 нг/мл доля живых клеток снизилась до $70,48 \pm 6,05\%$ ($p = 0,03$), популяция клеток смещена вправо – сторону повышения сигнала (DAPI-позитивная реакция) (Рисунок 23).

Наиболее значительный эффект был зафиксирован через 48 ч инкубации с ФНО- α . 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 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 (Рисунок 23).

Таким образом, в контроле наблюдается низкий DAPI-сигнал (DAPI-негативные клетки), что свидетельствует о сохранении целостности ядерной мембраны. Под действием ФНО- α количество DAPI-положительных клеток возрастает, что указывает на повышение проницаемости ядерной оболочки и отмечается при запуске клеточной гибели. Полученные данные свидетельствуют о том, что ФНО- α индуцирует цитотоксический эффект в клетках линии RPMI 2650 в дозо- и времязависимой динамике, причем наиболее выраженное снижение жизнеспособности наблюдается при концентрациях 50 и 100 нг/мл после 48 ч экспозиции. Выявленная динамика позволяет сделать вывод о том, что активация сигнального пути Nf- κ B/про-ИЛ-1 β под действием ФНО- α сопровождается запуском процессов клеточной гибели, которые становятся статистически значимыми при длительном (24–48 ч) воздействии цитокина в высоких концентрациях.

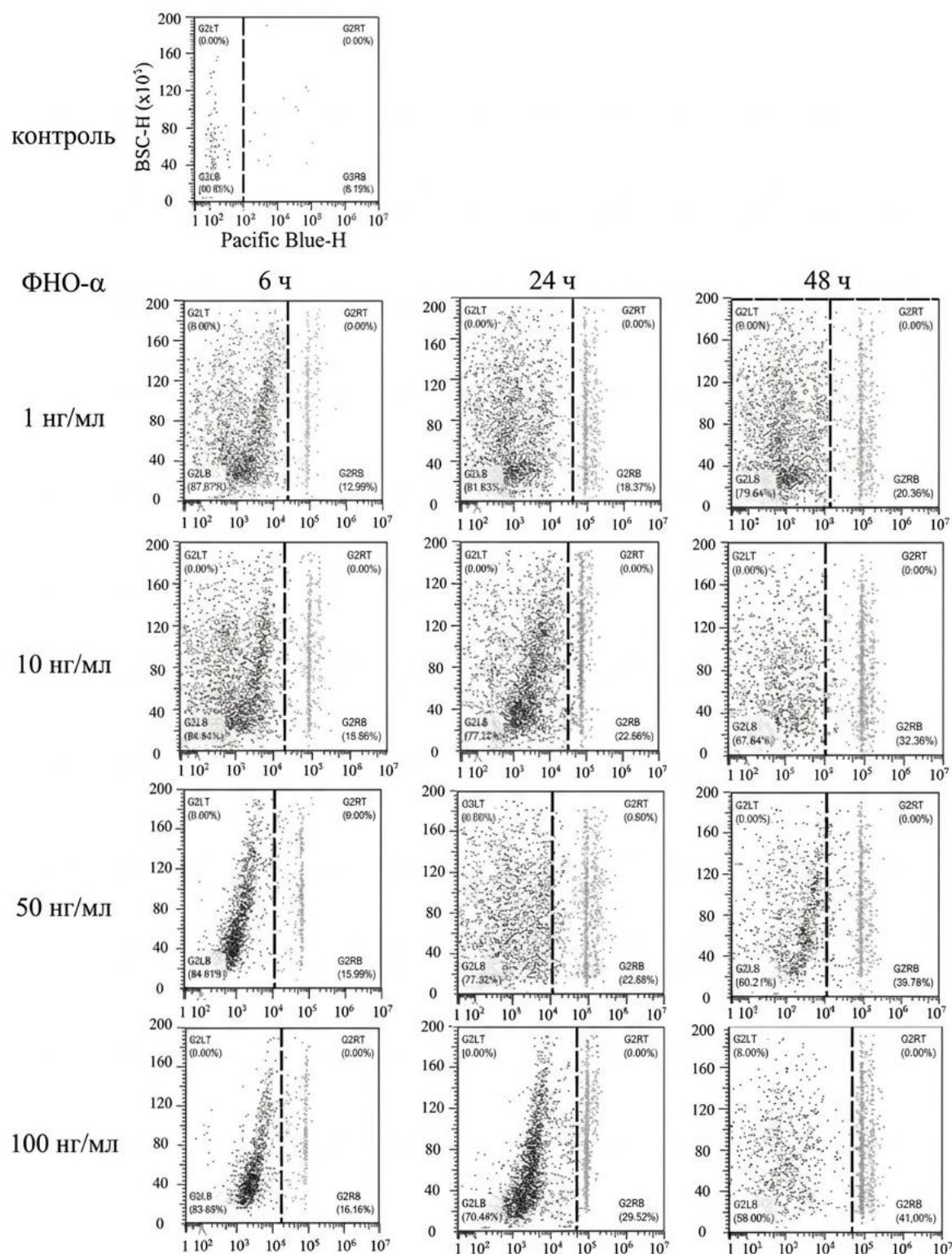


Рисунок 23 – Оценка популяции DAPI-положительных и DAPI-отрицательных популяций клеток линии RPMI 2650 при воздействии фактора некроза опухоли- α в течение 6 ч, 24 ч и 48 ч

Примечание – BSC-H (Backward Scatter-Height, боковое светорассеивание-высота) – физический параметр, характеризующий рассеивание света; Pacific Blue-H – интенсивность флуоресценции в синем диапазоне спектра

В регуляции выживания клеток решающую роль играет Nf-κB, определяя экспрессию генов, участвующих в выживании клеток и апоптозе [159].

Для уточнения вклада данного механизма была проведена оценка относительного количества антиапоптотического белка Bcl-2 в клетках RPMI 2650. При воздействии ФНО-α в течении 6ч в концентрациях 1, 10 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 и 10 нг/мл на 21,6% (p=0,007), 1 и 100 нг/мл на 18,6% (p=0,02), 10 и 100 нг/мл на 33,1% (p<0,0001), 50 и 100 нг/мл на 23,2% (p=0,003). При сроке воздействия ФНО-α 24 ч и концентрациях 1, 10 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). Изменения носили дозозависимый характер между концентрациями 1 и 10 нг/мл на 23,8% (p=0,0005), 10 и 50 нг/мл на 16,1% (p=0,002), 10 и 100 нг/мл на 27,3% (p<0,0001), 50 и 100 нг/мл на 14,0% (p=0,02). При сроке воздействия 48 ч статистически значимых изменений зафиксировано не было (Рисунок 24).

Первоначальное повышение уровня антиапоптотического белка Bcl-2, наблюдаемое через 6 и 24 часа инкубации, может рассматриваться как защитный механизм, направленный на ингибирование митохондриального пути апоптоза. Увеличение экспрессии Bcl-2, вероятно, опосредовано активацией транскрипционного фактора Nf-κB, что согласуется с его известной ролью в регуляции генов выживания. Этот компенсаторный ответ, по-видимому, позволяет клеткам временно противостоять проапоптотическим сигналам, что объясняет невысокий уровень гибели клеток при 24-часовой экспозиции, несмотря на уже запущенные механизмы.

Однако, при длительном действии ФНО-α до 48 часов, защитные ресурсы клетки истощаются, о чем свидетельствует нивелирование различий в уровне Bcl-2 по сравнению с контролем. При снижении уровня Bcl-2 создаются условия для запуска апоптоза – активации эффекторных каспаз. Именно в этот временной точке (48 ч) и фиксируется статистически значимое и дозозависимое повышение уровня

расщепленной (активной) формы каспазы-3, что подтверждает переход клетки к необратимой стадии программируемой гибели (Рисунок 25).

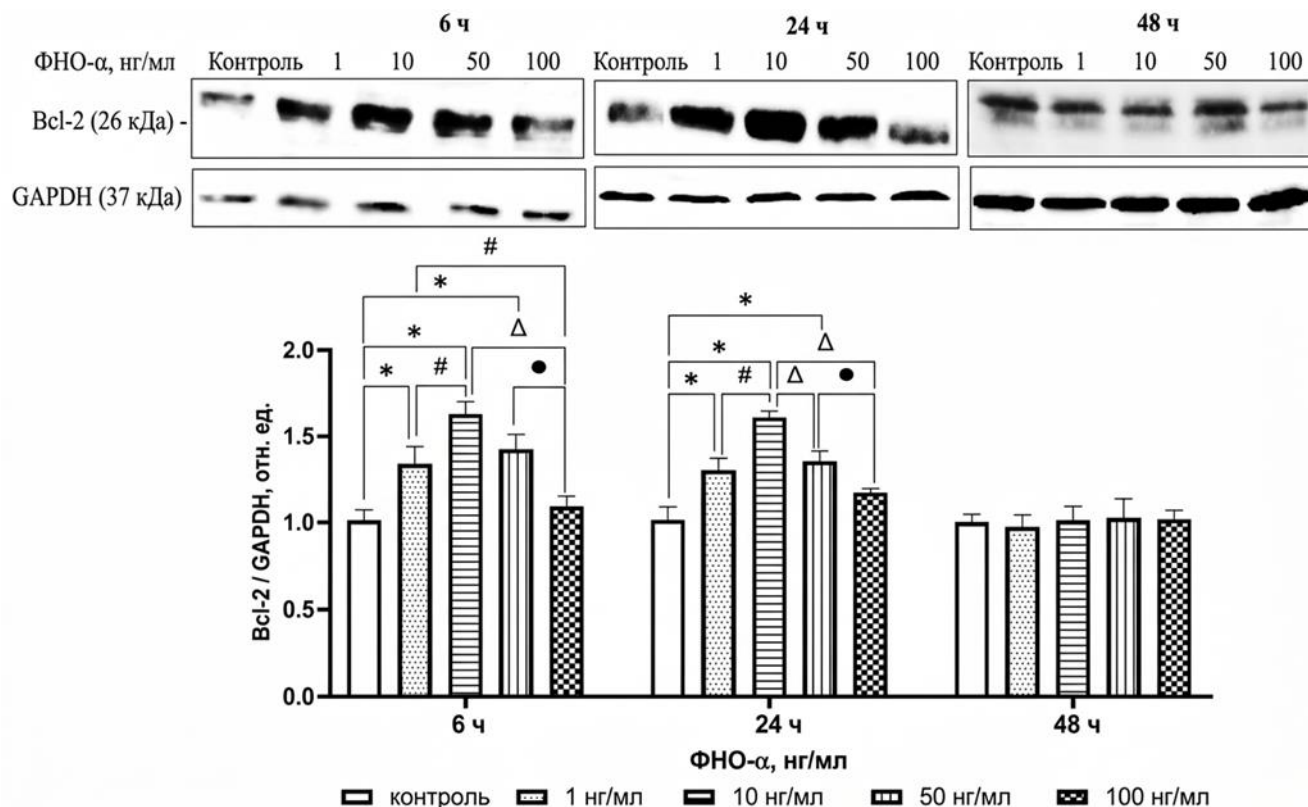


Рисунок 24 – Относительное количество Bcl-2 в клетках линии RPMI-2650 при воздействии фактора некроза опухоли-α в концентрациях 1, 10, 50 и 100 нг/мл в течение 6, 24 и 48 ч

Примечание – статистически значимые отличия * – от контроля; # – от группы 1 нг/мл; Δ – от группы 10 нг/мл; • – от группы 50 нг/мл

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 [170].

При сроке инкубации 6 и 24 часа достоверных изменений относительного количества cleaved каспазы-3 не наблюдали. Полученные результаты показывают, что воздействие FNO-α приводит к увеличению относительного количества cleaved каспазы-3 в клетках линии RPMI-2650 только при сроке инкубации 48 часов

и концентрациях 1, 10, 50 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, 10 и 50 нг/мл – увеличение на 24,2% ($p=0,0003$), 19,3% ($p=0,002$), 13,3% ($p=0,02$) (Рисунок 25).

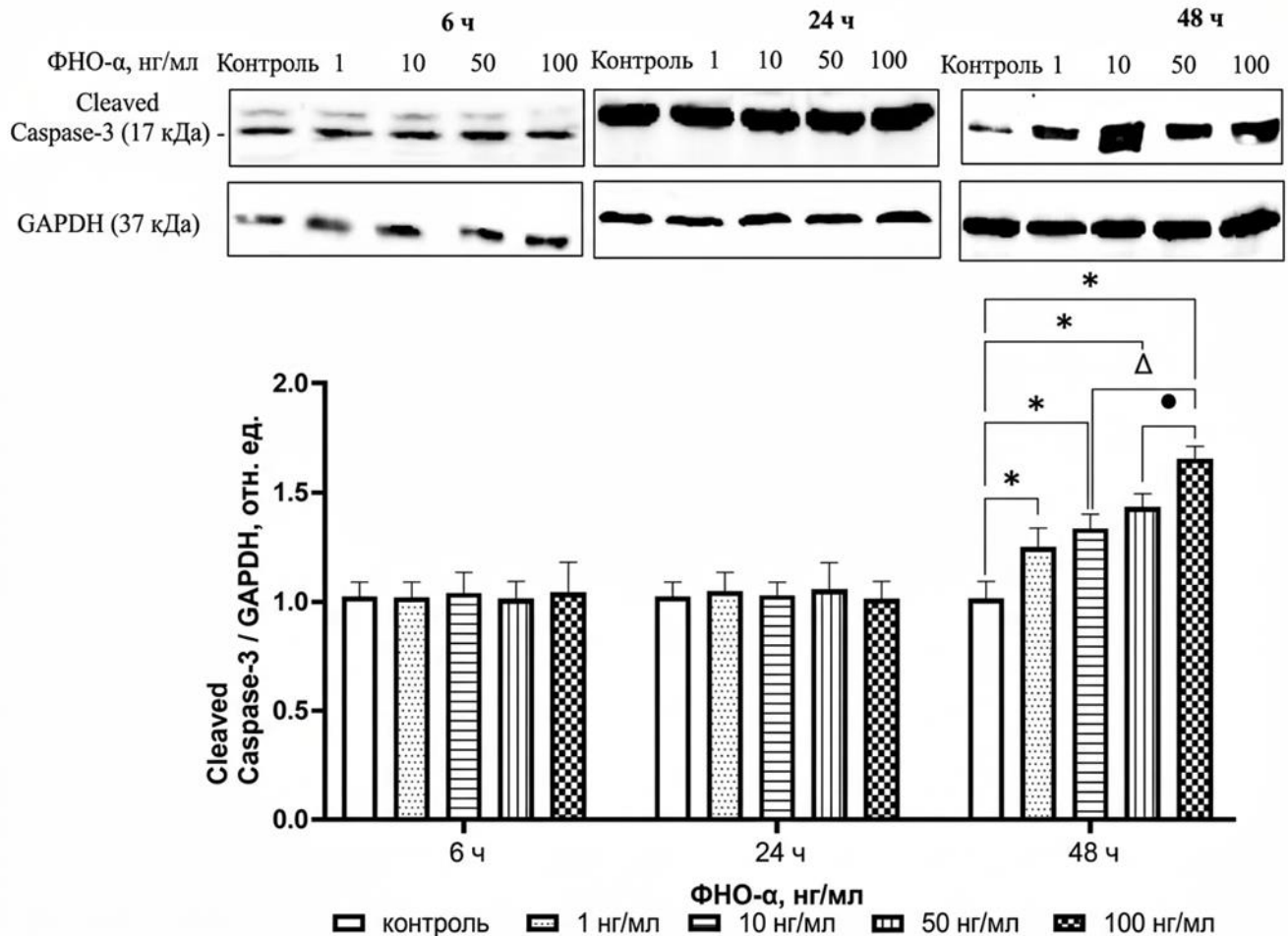


Рисунок 25 – Относительное количество Cleaved Caspase-3 в клетках линии RPMI-2650 при воздействии фактора некроза опухоли- α в концентрациях 1, 10, 50 и 100 нг/мл в течение 6, 24 и 48 ч

Примечание – статистически значимые отличия * – от контроля; # – от группы 1 нг/мл; Δ – от группы 10 нг/мл; • – от группы 50 нг/мл

Таким образом, потеря жизнеспособности клеток сопровождается увеличением уровня cleaved каспазы-3, что может свидетельствовать о запуске процессов клеточной гибели в условиях длительного действия ФНО- α .

3.2.3. Развитие окислительного стресса в клетках RPMI 2650 под действием фактора некроза опухоли- α

По литературным данным, воспалительный процесс сопровождается развитием окислительного стресса (ОС), по степени развития которого можно судить о запуске патологического каскада [263]. Кроме этого, ОС является индуктором клеточной гибели [220]. В проведенном исследовании было получено, что даже кратковременное воздействие высоких концентраций ФНО- α (50-100 нг/мл) статистически значимо увеличивает уровень продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), возможно, через нарушение работы митохондриальной электрон-транспортной цепи, индуцирует генерацию активных форм кислорода (АФК) [241]. Рост уровня АФК усиливает провоспалительный сигнал и вызывает окислительную модификацию липидов, белков и ДНК, приводя к повреждению клеточных структур [77].

При воздействии ФНО- α в течение 6 ч в концентрациях 50 и 100 нг/мл уровень ПОЛ статистически значимо увеличивается на 98,1% ($p=0,0011$) и 140,6% ($p<0,0001$) относительно значений контрольной группы. По сравнению с 1 нг/мл отмечалось повышение содержания ПОЛ на 67,6% ($p=0,0048$) и 104,0% ($p=0,0002$) и по сравнению с группой 10 нг/мл – на 38,6% ($p=0,047$) и 68,3% ($p=0,0011$) относительно групп 50 и 100 нг/мл соответственно (Рисунок 26). Полученные данные демонстрируют, что повышение концентрации ФНО- α приводит к развитию окислительного стресса при переходе от низких (1-10 нг/мл) к высоким (50-100 нг/мл) концентрациям.

При увеличении срока экспозиции до 24 ч с ФНО- α была получена дозозависимая динамика – воздействие с 1 до 100 нг/мл приводит к более чем двукратному росту уровня ПОЛ. Так содержание ПОЛ в группах 1, 10, 50 и 100 нг/мл выше на 111,8% ($p=0,03$), 229,8% ($p=0,0002$), 443,9% ($p<0,0001$) и 588,6% ($p<0,0001$) соответственно, чем в контроле. В группах 10, 50 и 100 нг/мл уровень ПОЛ возрастал на 55,6% ($p=0,025$), 156,7% ($p<0,0001$) и 227,1% ($p<0,0001$) относительно значений группы 1 нг/мл. Дозозависимость отмечалась при

сравнении концентраций 10 и 50 нг/мл на 64,8% ($p=0,0004$) и между 10 и 100 нг/мл на 108,8% ($p<0,0001$), между 50 и 100 нг/мл на 26,6% ($p=0,006$) (Рисунок 26).

Ярко выраженный дозозависимый эффект наблюдался при воздействии ФНО- α в течение 48 часов на всем диапазоне концентраций относительно контроля: при 1 нг/мл на 148,0% ($p=0,025$), 10 нг/мл – 304,0% ($p=0,0001$), 50 нг/мл – 632,0% ($p<0,0001$), 100 нг/мл – 805,2% ($p<0,0001$). Дозозависимость также отмечалась по сравнению с концентрацией 1 нг/мл: при 10 нг/мл на 62,9% ($p=0,018$), 50 нг/мл – 195,2% ($p<0,0001$), 100 нг/мл – 265,0% ($p<0,0001$), а также 10 нг/мл: при 50 нг/мл на 81,2% ($p<0,0001$) и 100 нг/мл на 124,1% ($p<0,0001$), между 50 и 100 нг/мл на 23,5% ($p=0,0095$) (Рисунок 26).

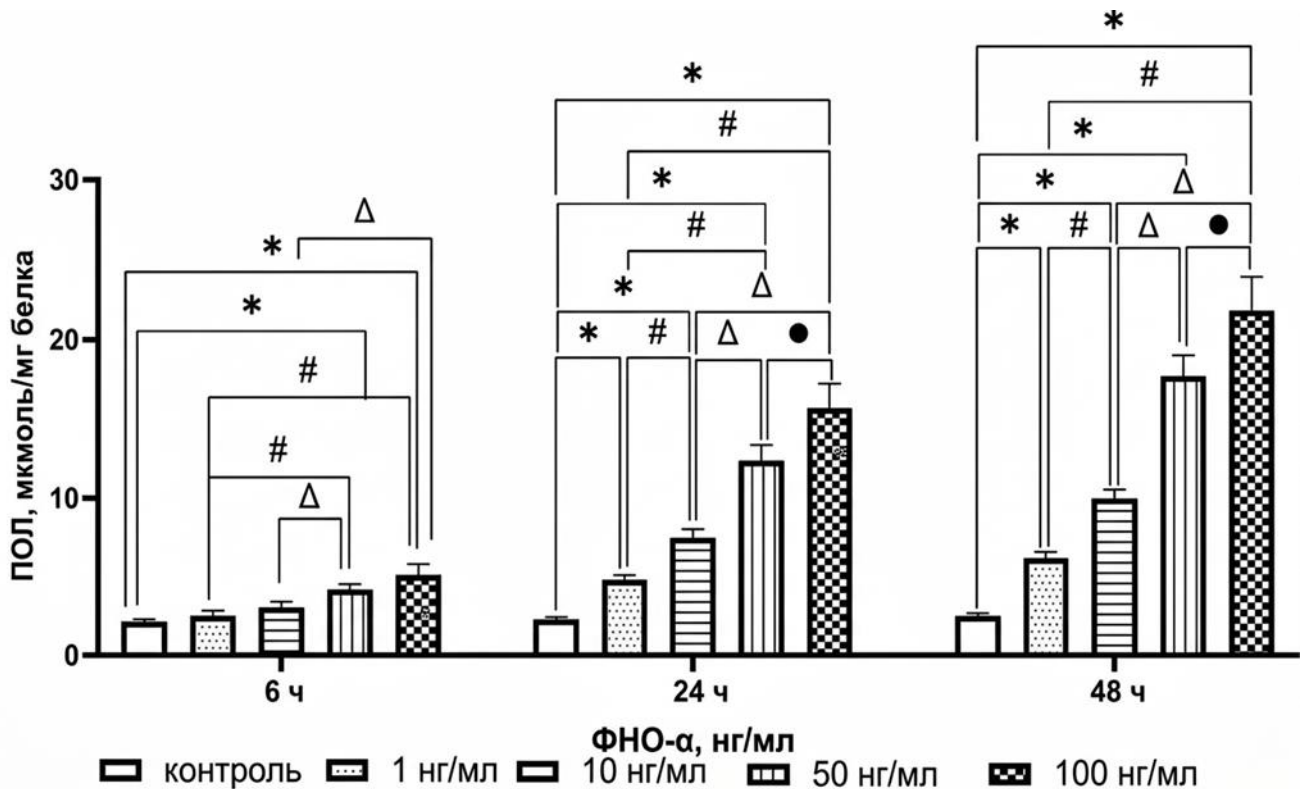


Рисунок 26 – Концентрация продуктов перекисного окисления липидов в клетках RPMI 2650 при воздействии фактора некроза опухоли- α в концентрациях 1, 10, 50 и 100 нг/мл в течение 6, 24 и 48 часов

Примечание – статистически значимые отличия: * – от контроля; # – от группы 1 нг/мл; Δ – от группы 10 нг/мл; • – от группы 50 нг/мл

Также для оценки степени развития окислительного стресса определяли содержание карбонильных производных белков. При сроке воздействия ФНО- α 6 часов уровень окисленных белков не изменялся. 24-часовое воздействие ФНО- α на

клетки RPMI 2650 вызвало выраженное и дозозависимое увеличение уровня карбонильных производных белков, свидетельствующее об интенсивном развитии окислительного стресса (Рисунок 27).

Статистический анализ показал, что все исследуемые концентрации ФНО- α (1, 10, 50 и 100 нг/мл) приводят к статистически значимому ($p < 0,0001$) увеличению уровня карбонильных производных белков по сравнению с контрольной группой. Эффект проявлялся уже при минимальной концентрации 1 нг/мл, вызывая увеличение показателя более чем в 3 раза ($p < 0,0001$). С повышением концентрации цитокина эффект усиливался: при 10 нг/мл уровень окисленных белков повысился в 7,4 раза ($p < 0,0001$), при 50 нг/мл – в 13,7 раза ($p < 0,0001$), а при максимальной концентрации 100 нг/мл наблюдалось почти 19-кратное увеличение ($p < 0,0001$) относительно контроля. Парные сравнения между всеми экспериментальными группами также выявили различия ($p < 0,0001$), подтверждая дозозависимость ответа. Уровень карбонильных производных белков значимо нарастал при переходе от 1 к 10 нг/мл (в 1,3 раза), от 10 к 50 нг/мл (в 1,8 раза) и от 50 к 100 нг/мл (в 1,4 раза) ($p < 0,0001$ во всех группах). 48-часовое воздействие ФНО- α на клетки RPMI 2650 вызвало развитие выраженного окислительного стресса ($p < 0,0001$) дозозависимый рост уровня карбонильных производных белков, что демонстрирует развитие не только глубокого, но и пролонгированного окислительного стресса (Рисунок 27).

На всем диапазоне концентраций (1–100 нг/мл) наблюдалось статистически значимое увеличение карбонильных производных белков по сравнению с контролем. Эффект был максимальным в следующих условиях: концентрация 1 нг/мл повысила уровень окисленных белков в 5,1 раза, 10 нг/мл – в 11,7 раза, 50 нг/мл – в 19,6 раза, а 100 нг/мл – в 23,7 раза ($p < 0,0001$ при всех концентрациях).

Парные сравнения между всеми экспериментальными группами также показали различия, указывая на дозозависимость. Наблюдался прирост уровня окисленных белков при сравнениях между концентрациями 1 и 10 нг/мл составил 2,3 раза, 10 и 50 нг/мл – 1,7 раза, 50 и 100 нг/мл – 1,2 раза, что может указывать на

тенденцию к насыщению системы при максимальных дозах и длительной экспозиции (Рисунок 27).

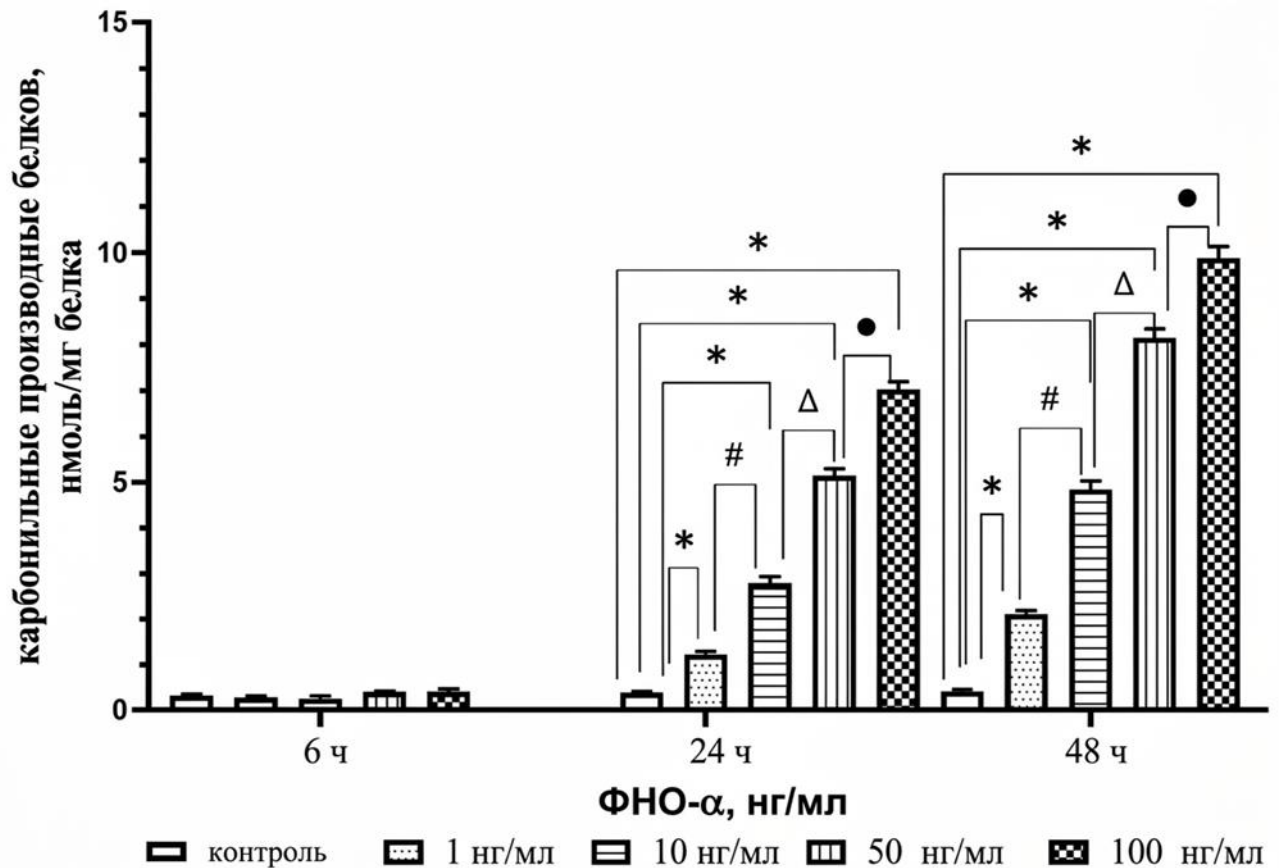


Рисунок 27 – Концентрация карбонильных производных белков в клетках RPMI 2650 при воздействии фактора некроза опухоли-α в концентрациях 1, 10, 50 и 100 нг/мл в течение 6, 24 и 48 часов

Примечание – статистически значимые отличия: * – от контроля; # – от группы 1 нг/мл; Δ – от группы 10 нг/мл; • – от группы 50 нг/мл

Таким образом, 24- и 48-часовая инкубация с ФНО-α индуцирует развитие дозозависимого окислительного стресса, что выражалось в накоплении продуктов перекисного окисления липидов и окисленных белков. Эффект наблюдается во всем диапазоне исследованных концентраций, при этом между каждой парой доз отмечались достоверные различия. Выявленная динамика между нарастанием маркеров окислительного стресса, активацией воспалительного ответа и снижением жизнеспособности клеток подтверждает ключевую роль окислительного повреждения в механизмах цитотоксического действия ФНО-α на клетки назального эпителия.

3.2.4. Влияние фактора некроза опухоли- α на регенеративную активность: оценка миграционной активности клеток RPMI 2650

Воспалительный процесс является фундаментальным патологическим состоянием, лежащим в основе многих заболеваний [4]. Ключевым аспектом воспаления является миграция клеток, направленная в очаг поражения для устранения повреждающего агента и инициации репарации [149]. Эпителиальные и эндотелиальные клетки, выступая барьером, активно участвуют в этом процессе, а их миграционная активность регулируется сложным каскадом цитокинов и факторов роста. Клеточная линия RPMI 2650, происходящая из карциномы носовой перегородки человека, служит моделью для исследования функционирования назального эпителия при изучении барьерных функций, транспорта лекарств и воспалительных реакций [158]. Изучение регуляции этого процесса особенно важно для понимания механизма восстановления слизистых оболочек после повреждений на фоне развития воспаления.

Фактор некроза опухоли- α является одним из центральных провоспалительных цитокинов, который модулирует клеточную адгезию, пролиферацию и миграцию [14, 259].

Роль ФНО- α в модуляции миграции различных типов клеток активно изучается в современных исследованиях. Имеются данные, что у пациентов с немелкоклеточным раком легких интерлейкин-6 и ФНО- α могут индуцировать переход эпителия в мезенхиму и впоследствии способствовать метастазированию рака легких [259]. Индуцированная ФНО- α активация сигнального пути MAPK/ERK может способствовать миграции клеток MDA-MB-231 и MCF7 (модель рака молочной железы) посредством усиления регуляции металлопротеиназы-9, белка активации фибробластов FAP- α [259]. Однако имеются данные, что цитокин ингибирует *in vitro* миграцию вневорсинчатых трофобластов [243]. Описана активация миграции тимоцитов при участии ФНО- α [239].

Двойственность эффектов ФНО- α описана для миграции мезенхимальных стволовых клеток: активация миграции, обусловленная лигандом семейства фактора некроза опухоли, индуцирующим апоптоз, TRAIL, а также ингибирование за счет индукции остеопротегерина, участвующего в ремоделировании [239]. На основании проведенного литературного анализа можно отметить, что специфика воздействия ФНО- α на эпителиальные назальные клетки, в частности на линию RPMI 2650, остается недостаточно изученной. Определение характера влияния ФНО- α на миграционную активность этих клеток важно для понимания механизмов регенерации слизистой оболочки дыхательных путей.

Изучение миграционной активности этих клеток в ответ на действие ФНО- α позволяет смоделировать процессы, происходящие, например, при хроническом риносинусите. Целью данного эксперимента была оценка миграционной активности клеток RPMI 2650 в ответ на стимуляцию различными концентрациями ФНО- α в различные временные интервалы и анализ экспрессии ключевого фактора роста, ассоциированного с данной клеточной линией.

Динамика миграционной активности клеток RPMI 2650 представлена в Таблице 5. Результаты скарификационного теста демонстрируют зависимость миграции клеток от концентрации ФНО- α и времени наблюдения (Таблица 6). В течение первых 6 часов ФНО- α 1-100 нг/мл не вызывало изменений миграционной активности клеток. Однако максимальное значение индекса миграционной активности наблюдалось при концентрации 10 нг/мл ($3,05 \pm 1,14$), что может указывать на наличие оптимальной концентрации цитокина для инициации раннего миграционного ответа (Таблица 5, 6).

Наиболее значимые изменения наблюдались в интервале 6-24 часа. Наблюдается наибольшая и статистически значимая стимуляция миграции – $6,13 \pm 1,13$ ($p=0,043$) при ФНО- α 10 нг/мл. Изменения имели статистически значимые отличия в зависимости от времени, при 24 часах повышение на 101,0% ($p=0,0036$) по сравнению с 6 часами (Таблицы 5, 6).
















Таблица 5 – Индекс миграции клеток RPMI 2650 при воздействии фактора некроза опухоли- α (мкм/час)

Группа	0-6 ч	6-24 ч	24-48 ч
Контроль	2,06 ± 3,04	3,16 ± 0,49	2,06 ± 0,32
ФНО- α 1 нг/мл	1,65 ± 1,92	3,19 ± 2,99	2,99 ± 0,48
ФНО- α 10 нг/мл	3,05 ± 1,14	6,13 ± 1,13*# *p = 0,043 #p = 0,0036	1,16 ± 0,74#^ #p = 0,03 ^ p = 0,001
ФНО- α 50 нг/мл	2,12 ± 1,85	3,64 ± 0,30	1,68 ± 0,48
ФНО- α 100 нг/мл	2,34 ± 2,63	1,52 ± 1,28	1,31 ± 0,73
Примечание – * p<0,05 – статистически значимые отличия от контроля; # p<0,05 – статистически значимые отличия от группы 0-6 ч, ^ p<0,05 – статистически значимые отличия от группы 6-24 ч			

В поздней фазе (24-48 часов) миграционная активность во всех группах снижалась, что, вероятно, связано с конфлюентностью монослоя и завершением основной фазы заживления «раны». Важно отметить, что в группах ФНО- α 10, 50 и 100 нг/мл наблюдалась тенденция снижения значения индекса миграции были ниже контрольных, что может говорить о цитотоксическом эффекте или индукции апоптоза при длительной стимуляции высокими концентрациями ФНО- α (Таблица 5, 6).

Снимки наглядно подтверждают данные, полученные при количественном анализе. Обработка ФНО- α в концентрации 10 нг/мл приводит к значительной активации подвижности клеток RPMI 2650, к 24 часам отмечается частичное закрытие дефекта (Рисунок 28А). Край монослоя становится менее четким, формируются цитоплазматические выросты (Рисунок 28Б).

Таблица 6 – Динамика миграции клеток линии RPMI 2650 в тесте на заживление «раны» в ответ на воздействие фактором некроза опухоли- α в концентрации 1-100 нг/мл в течение 6, 24 и 48 часов (световая микроскопия ув. $\times 4$)

Группы		Время воздействия, часы		
		0-6	6-24	24-48
Контроль				
ФНО- α , нг/мл	1			
	10			
	50			
	100			

Для понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе наблюдаемой миграции, был проведен анализ экспрессии ключевого фактора роста, характерного для клеток RPMI 2650. В качестве такого фактора в данном исследовании рассматривался эпидермальный фактор роста EGF (Epidermal Growth Factor), известный своей ролью в клеточном росте [202].

Результаты вестерн-блоттинга показали достоверное увеличение относительного количества EGF в клетках, обработанных ФНО- α 10 нг/мл, по сравнению с контролем при сроке инкубации 24 часа на 23,0% ($p=0,0048$) (Рисунок

29), что коррелирует с пиком миграционной активности в интервале 6-24 часа. Это позволяет предположить, что ФНО- α -индуцированная миграция клеток RPMI 2650 частично опосредована активацией синтеза и секреции EGF, который может усиливать подвижность клеток и ремоделирование цитоскелета.

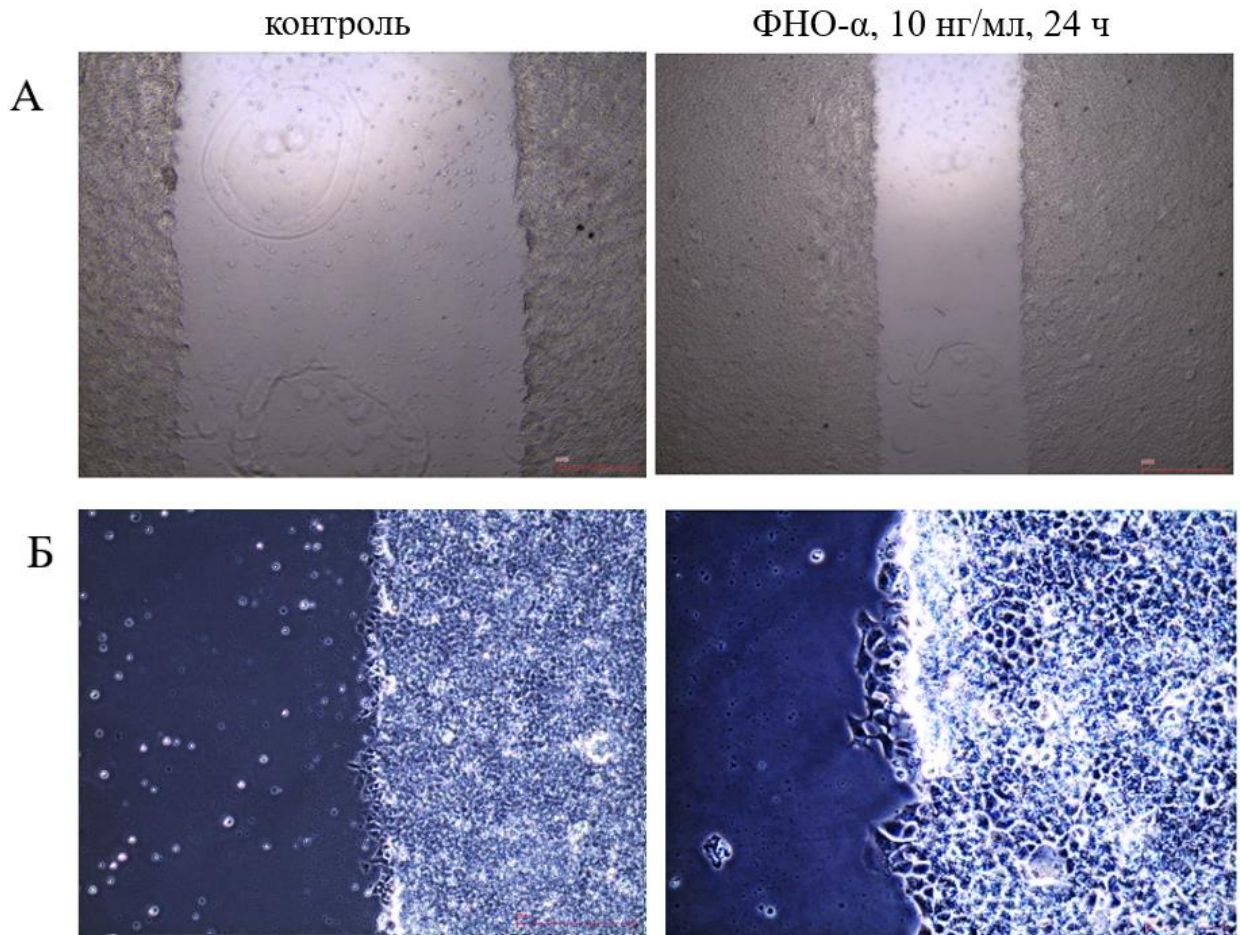


Рисунок 28 – Динамика миграции клеток линии RPMI 2650 в тесте на заживление «раны» в ответ на воздействие фактором некроза опухоли- α в концентрации 10 нг/мл в течение 24 часов, световая микроскопия ув. $\times 4$ (А), ув. $\times 20$ (Б)

Следовательно, фактор некроза опухоли- α модулирует миграционную активность клеток RPMI 2650, его эффект зависит от концентрации и времени воздействия. Наибольший стимулирующий эффект на миграцию наблюдается в интервале 6-24 часа при использовании концентрации ФНО- α 10 нг/мл. Механизм ФНО- α -индуцированной миграции, вероятно, связан с усилением экспрессии фактора роста EGF, что подтверждается результатами вестерн-блоттинга.

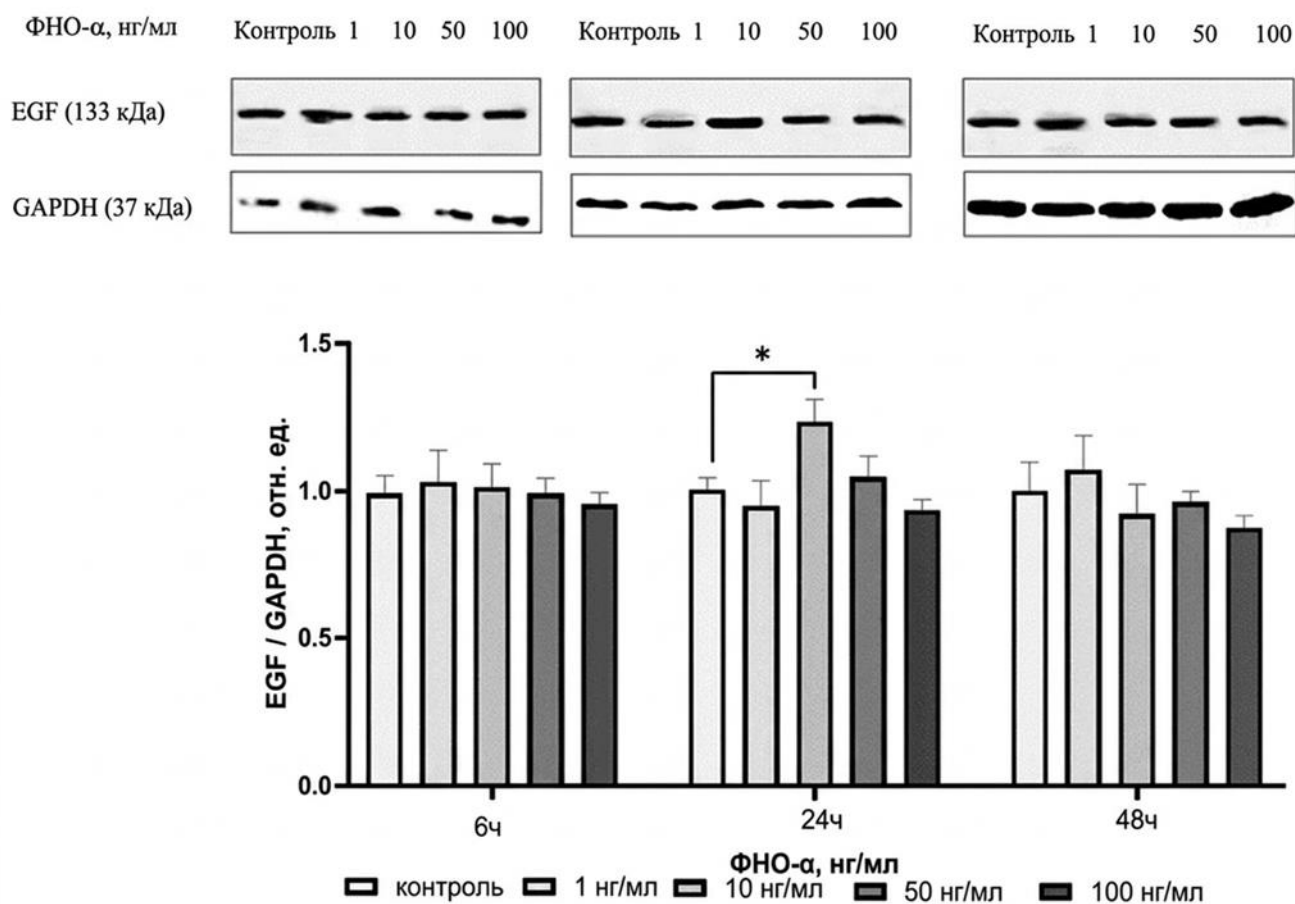


Рисунок 29 – Относительное количество белка EGF в клетках линии RPMI2650 в ответ на воздействие фактором некроза опухоли- α в концентрациях 1-100 нг/мл в течение 6, 24 и 48 часов

Примечание – * $p < 0,05$ относительно контроля

Проведенное исследование продемонстрировало, что ФНО- α индуцирует в клетках назального эпителия линии RPMI 2650 комплексный каскад патологических реакций, моделирующий воспалительное повреждение. Установлена дозо- и времязависимая активация ключевого провоспалительного пути Nf- κ B/ИЛ-1 β , сопровождающаяся развитием выраженного окислительного стресса и, при длительном воздействии, – снижением жизнеспособности клеток за счет индукции апоптоза. В определенных условиях (концентрация 10 нг/мл, 6-24 ч) ФНО- α проявляет регенеративный эффект, стимулируя миграционную активность клеток, что, вероятно, связано с активацией синтеза эпидермального фактора роста (EGF). Таким образом, ответ клеток на ФНО- α является двухфазным, объединяя как деструктивные, так и потенциально регенеративные механизмы.

3.3. Влияние фактора некроза опухоли- α на барьерную функцию клеток RPMI 2650: динамика трансэпителиального сопротивления и параклеточной проницаемости

Целостность эпителиального барьера является ключевым фактором защиты слизистой оболочки носа. Для ее функциональной оценки используются два взаимодополняющих метода: измерение трансэпителиального электрического сопротивления [12], отражающего общую плотность монослоя клеток, и исследование параклеточной проницаемости с помощью низкомолекулярного инертного маркера – маннитола [111]. В данном разделе представлены результаты оценки влияния ФНО- α на барьерную функцию монослоя клеток RPMI2650 в течение 6, 24 и 48 часов.

Анализ сопряженной динамики TEER и коэффициента кажущейся проницаемости (Papp) маннитола позволяет определять особенности клеточного ответа, включая возможную начальную компенсаторную реакцию и последующую декомпенсацию барьера при длительном воздействии провоспалительного цитокина.

3.3.1. Влияние фактора некроза опухоли- α на значение трансэпителиального сопротивления клеток линии RPMI 2650

Для оценки вклада ФНО- α в нарушение барьерной функции назального эпителия важное значение имеет оценка функционирования клеточного монослоя. В данном разделе представлены результаты изучения влияния ФНО- α на трансэпителиальное сопротивление и экспрессию белков межклеточных контактов в культуре клеток линии RPMI 2650, обобщенны. Проведенные исследования выявили разнонаправленную динамику изменения барьерной функции и количества белков межклеточных контактов в монослое клеток RPMI 2650 в ответ на воздействие провоспалительного цитокина ФНО- α [3] (Таблица 7).

Таблица 7 – Влияние ФНО- α на величину трансэпителиального сопротивления монослоя клеток RPMI 2650, $\Omega \times \text{см}^2$

Время экспозиции	Контроль	Концентрации ФНО- α , 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

Полученные данные демонстрируют, что эффект ФНО- α на барьерную проницаемость носит выраженную временную и дозозависимую динамику. Кратковременное воздействие (6 часов) цитокина приводило к значительному увеличению TEER при концентрациях провоспалительного цитокина 10, 50 и 100 нг/мл на 33,3% (p=0,05), 35,5% (p=0,03) и 57,0% (p=0,002) по сравнению с контролем соответственно. Этот начальный рост сопротивления может быть связан с активацией клеточных компенсаторных механизмов в ответ на стрессовое воздействие, направленных на быстрое укрепление межклеточных контактов. Подобный механизм усиления барьерной функции описан в литературе как реакция некоторых типов эпителия на умеренные воспалительные стимулы [141].

При увеличении воздействия до 24 ч TEER монослоя повышалось только при концентрации ФНО- α 10 нг/мл – на 48,3% (p=0,04), а в остальных концентрациях достоверно от контроля не отличалось. Полученный результат может указывать на истощение компенсаторных возможностей клеток или начало реализации альтернативных сигнальных путей, индуцируемых высокими дозами цитокина. При продолжительности эксперимента 48 ч сопротивление монослоя существенно снижалось с 46,0 \pm 3,61 $\Omega \times \text{см}^2$ до 28,00 \pm 3,00 $\Omega \times \text{см}^2$ (p=0,002), 25,00 \pm 5,00 $\Omega \times \text{см}^2$ (p=0,0007) и 21,33 \pm 6,51 $\Omega \times \text{см}^2$ (p=0,0002) в концентрациях ФНО- α 10, 50 и 100 нг/мл (Таблица 7).

3.3.2. Влияние фактора некроза опухоли- α на транспорт маннитола через монослой клеток линии RPMI 2650

Для получения комплексной характеристики проницаемости был выполнен анализ коэффициента кажущейся проницаемости для маркера параклеточного транспорта – маннитола (Таблица 8).

Таблица 8 – Влияние ФНО- α на транспорт маннитола через монослой клеток линии RPMI 2650, $\times 10^{-6}$, см/сек

Время экспозиции	Норма	Концентрации ФНО- α , 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

Сопоставление динамики TEER и транспорта маннитола позволило выявить временные и дозозависимые особенности нарушения целостности эпителиального барьера под действием провоспалительного цитокина. Данные изменения сопротивления монослоя клеток RPMI 2650 сопровождались следующей динамикой проницаемости маннитола через клеточный монослой. Коэффициент кажущейся проницаемости маннитола Papp a-b уменьшался при воздействии ФНО- α в течение 6 ч в концентрациях 50 нг/мл и 100 нг/мл на 48,8% (p=0,05) и на 58,8% (p=0,02) по сравнению с контролем, что свидетельствует о снижении проницаемости клеточного монослоя. При увеличении длительности экспозиции до 24 ч ФНО- α в концентрации 10 нг/мл снижал Papp a-b маннитола на 46,3% (p=0,03), а в концентрации 100 нг/мл, наоборот, увеличивал Papp a-b 46,2% (p=0,03), что является проявлением повышения проницаемости (Таблица 8). При

увеличении длительности воздействия ФНО- α до 48 ч, Papp a-b маннитола существенно повышался при концентрациях провоспалительного цитокина 10 нг/мл в 3,61 раза, при концентрации 50 нг/мл – в 4,5 раза и при концентрации 100 нг/мл – в 4,46 раза по сравнению с контролем. Полученные результаты свидетельствуют о существенном повышении проницаемости монослоя клеток (Таблица 8).

На основании проведенных исследований можно сделать вывод о сложной двухфазной динамике влияния фактора некроза опухоли- α на барьерную функцию клеток RPMI2650. Кратковременное воздействие (6 часов) приводит к компенсаторному усилению барьера, что проявляется в статистически значимом повышении TEER и снижении параклеточной проницаемости для маннитола. Однако при длительном воздействии (48 часов) развивается выраженная барьерная дисфункция: TEER достоверно снижается, а транспорт маннитола через монослой увеличивается в несколько раз, что свидетельствует о нарушении целостности монослоя клеток. Таким образом, ФНО- α индуцирует временное укрепление эпителиального барьера с последующей его дестабилизацией, что соответствует переходу от адаптивного клеточного ответа к патологическому нарушению проницаемости в условиях моделирования воспаления *in vitro*.

3.4. Молекулярные механизмы влияния фактора некроза опухоли- α на барьерную функцию клеток RPMI 2650: количество и локализация белков межклеточных контактов

Повреждение эпителиального назального монослоя в условиях моделирования воспаления ФНО- α является сложным процессом. Нарушение барьерной целостности, выявленное по динамике трансэпителиального сопротивления и параклеточной проницаемости, предполагает структурные изменения, а именно состояние межклеточных контактов. Для понимания механизмов, лежащих в основе двухфазного ответа барьера на воспалительный

стимул, необходимо было изучить влияние ФНО- α на белки межклеточных контактов (Е-кадгерин, клаудин, окклюдин, ZO-1). Именно поэтому на следующем этапе работы был проведен анализ количества и локализации изучаемых белков в клетках RPMI2650, что позволяет установить связь между структурными и функциональными изменениями состояния назального эпителия при воздействии фактора некроза опухоли- α .

3.4.1. Влияние фактора некроза опухоли- α на уровень белков межклеточных контактов клеток линии RPMI 2650

Способность ФНО- α модулировать экспрессию множества генов лежит в основе патогенеза различных заболеваний, включая аутоиммунные расстройства, онкологические и другие процессы [31]. Особый интерес представляет влияние ФНО- α на целостность тканевых барьеров, которая обеспечивается комплексом белков межклеточных. Нарушение этой целостности, приводящее к увеличению проницаемости и дезорганизации ткани, является важным этапом в прогрессировании воспаления.

Клеточная линия RPMI 2650 является удобной моделью для изучения механизмов, связывающих воспаление и транспорт веществ, однако систематический анализ воздействия ФНО- α на уровень и функциональное состояние ключевых белков межклеточных контактов (Е-кадгерин, клаудин-1, окклюдин, ZO-1) в клетках данной линии в литературе освещен недостаточно. Изучение данного аспекта позволит углубить понимание молекулярных основ транспорта веществ в условиях воспаления. Именно поэтому следующим этапом была проведена комплексная оценка влияния ФНО- α на уровень белков межклеточных контактов в клетках линии RPMI для установления роли данного цитокина в нарушении адгезивных свойств и дестабилизации структуры монослоя.

Относительное количество Е-кадгерина при сроке воздействия ФНО- α 6 часов в концентрации 10 нг/мл возрастало на 43,7% ($p=0,0012$) относительно

контрольных значений (Рисунок 30). Изменения носили дозозависимый характер: между концентрациями 1 и 10 нг/мл увеличение уровня на 33,3% ($p=0,0084$), между 10 и 50 нг/мл снижение на 55,0% ($p=0,0002$), между 10 и 100 нг/мл на 50,0% ($p=0,0004$) (Рисунок 30). При увеличении срока экспозиции до 24 часов наблюдалось повышение относительного количества Е-кадгерина на 83,6% ($p=0,0001$), 72,7% ($p=0,0004$) под воздействием ФНО- α в концентрациях 10 и 50 нг/мл соответственно относительно контроля (Рисунок 30). Изменения зависели от концентрации ФНО- α : между 1 и 10 нг/мл на 82,7% ($p=0,0001$), 1 и 50 нг/мл на 71,7% ($p=0,0004$); между 10 и 50 нг/мл на 101,0 ($p=0,0001$), 10 и 100 нг/мл на 90,0% ($p<0,0001$) (Рисунок 30). При воздействии ФНО- α 48 часов на 41,3% ($p=0,048$) в группе 100 нг/мл относительно контроля.

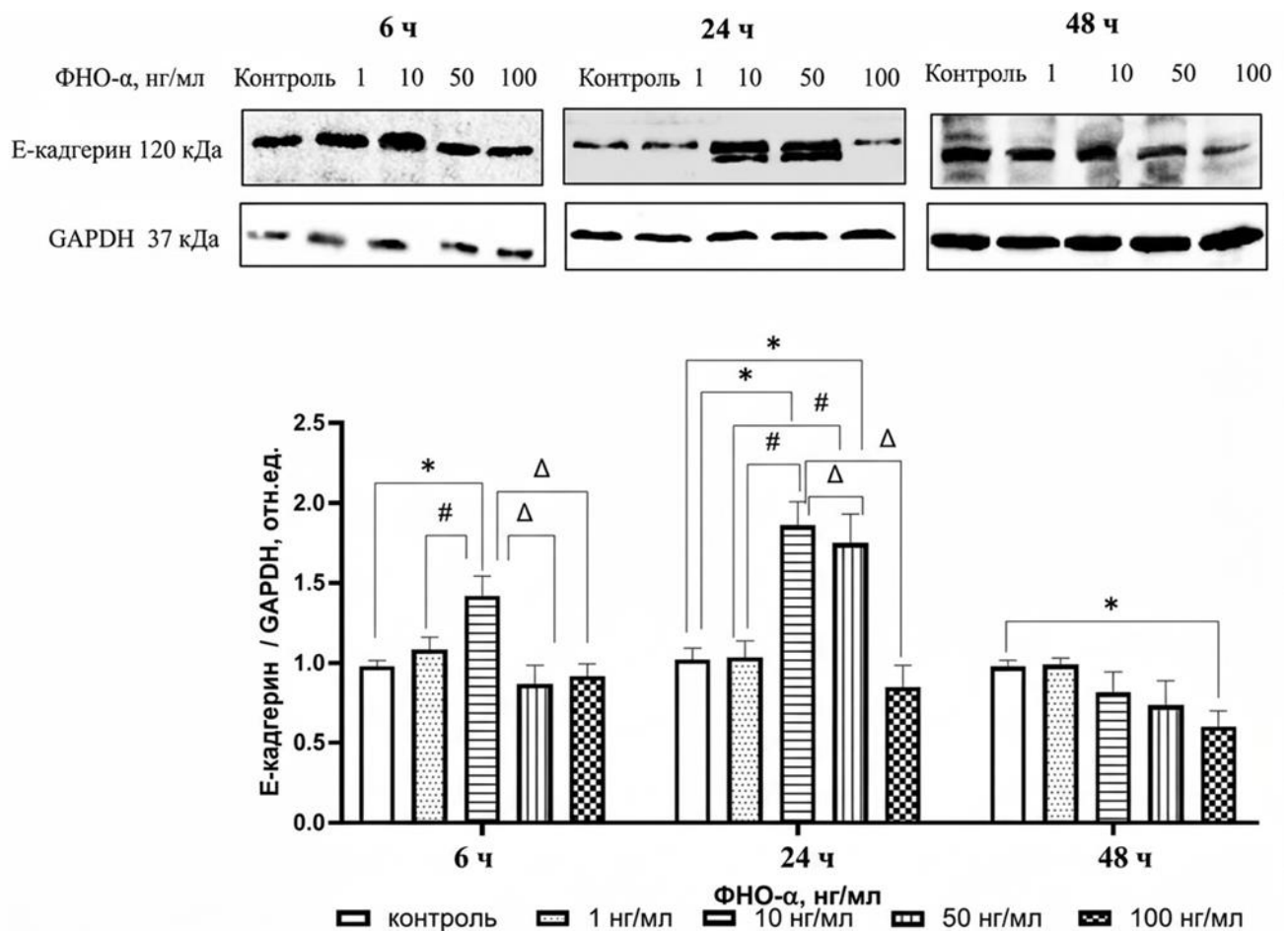


Рисунок 30 – Относительное количество Е-кадгерина в клетках линии RPMI-2650 при воздействии фактора некроза опухоли- α в концентрациях 1, 10, 50 и 100 нг/мл в течение 6, 24 и 48 ч

Примечание – * – статистически значимые отличия от контроля; # – статистически значимые отличия от группы 1 нг/мл; Δ – статистически значимые отличия от группы 10 нг/мл

ФНО- α в концентрациях 1, 10, 50 и 100 нг/мл при длительности воздействия 6 ч вызывал повышение уровня клаудина-1 на 35,3% ($p=0,05$), на 53,0% ($p=0,04$), на 64,0% ($p=0,002$) и на 159,67% ($p=0,003$) соответственно по сравнению с контролем.

Полученные результаты указывают на быстрый эффект цитокина на количество окклюдина, который проявляется уже через 6 часов и достигает максимума при концентрации 50 нг/мл (Рисунок 31). Наибольшее увеличение зафиксировано при максимальной концентрации 100 нг/мл, свидетельствует о прямом дозозависимом стимулирующем действии цитокина на экспрессию данного белка плотных контактов.

При длительности воздействия 24 ч ФНО- α не влиял на уровень клаудина-1, а при длительности экспозиции 48 ч вызывал снижение клаудина-1 на 27,0% ($p=0,09$) при концентрации ФНО- α 50 нг/мл и 37,33% ($p=0,02$) – при концентрации 100 нг/мл (Рисунок 31).

Между группами, обработанными различными концентрациями ФНО- α , статистически значимых различий в уровне клаудина-1 через 48 часов обнаружено не было ($p>0,05$ для всех попарных сравнений). После 48 часов воздействия ФНО- α была отмечена обратная, ингибирующая динамика по сравнению с 6-часовой инкубацией. По сравнению с контролем, наблюдалось статистически значимое снижение уровня клаудина-1 при высоких концентрациях цитокина: на 27,0% ($p=0,09$) при концентрации ФНО- α 50 нг/мл и 37,33% ($p=0,02$) – при концентрации 100 нг/мл. Также снижение было отмечено относительно концентрации 1 нг/мл по сравнению с 50 нг/мл и 100 нг/мл на 38,1% ($p=0,01$), 100 нг/мл – 47,4% ($p=0,03$) (Рисунок 31).

Полученные данные о разнонаправленных эффектах ФНО- α в зависимости от времени инкубации подчеркивают сложность регуляции барьерной функции эпителия в условиях воспаления. Можно предположить, что кратковременный подъем клаудина-1 представляет собой протективный механизм, в то время как длительное воздействие цитокина способствует формированию дисфункции плотных контактов.

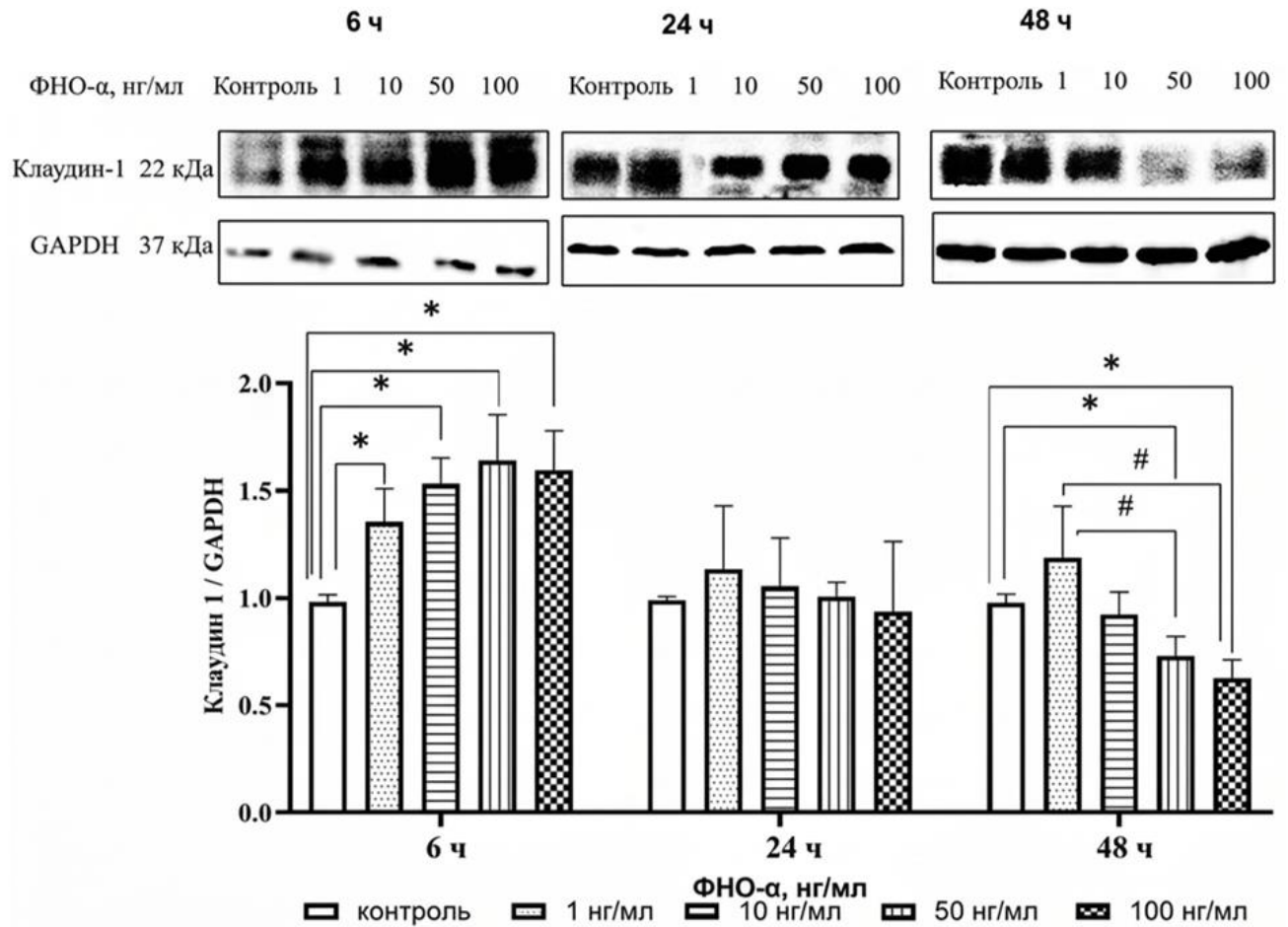


Рисунок 31 – Относительное количество клаудина-1 в клетках линии RPMI 2650 при воздействии фактора некроза опухоли- α в концентрациях 1, 10, 50 и 100 нг/мл в течение 6, 24 и 48 ч

Примечание –* – статистически значимые отличия от контроля; # – статистически значимые отличия от группы 1 нг/мл

Через 6 часов после воздействия ФНО- α наблюдалось дозозависимое повышение уровня окклюдина (Рисунок 32). По сравнению с контролем, все использованные концентрации ФНО- α вызывали статистически значимое повышение относительного количества белка относительно контроля на 40,33% при концентрации 10 нг/мл ($p=0,057$), на 40,67% при 50 нг/мл ($p=0,047$) и на 54,0% по сравнению с контролем при 100 нг/мл ($p=0,02$). Увеличение длительности воздействия до 24 часов усиливало этот эффект ФНО- α в концентрации 10 нг/мл до 80,0% ($p=0,01$), между концентрациями 10 и 100 нг/мл зафиксировано снижение на 43,9% ($p=0,003$). При 48 часах воздействия наблюдалось снижение уровня

окклюдина на 25,67% ($p=0,04$) при концентрации ФНО- α 100 нг/мл. При этом дозозависимых различий не было (Рисунок 32).

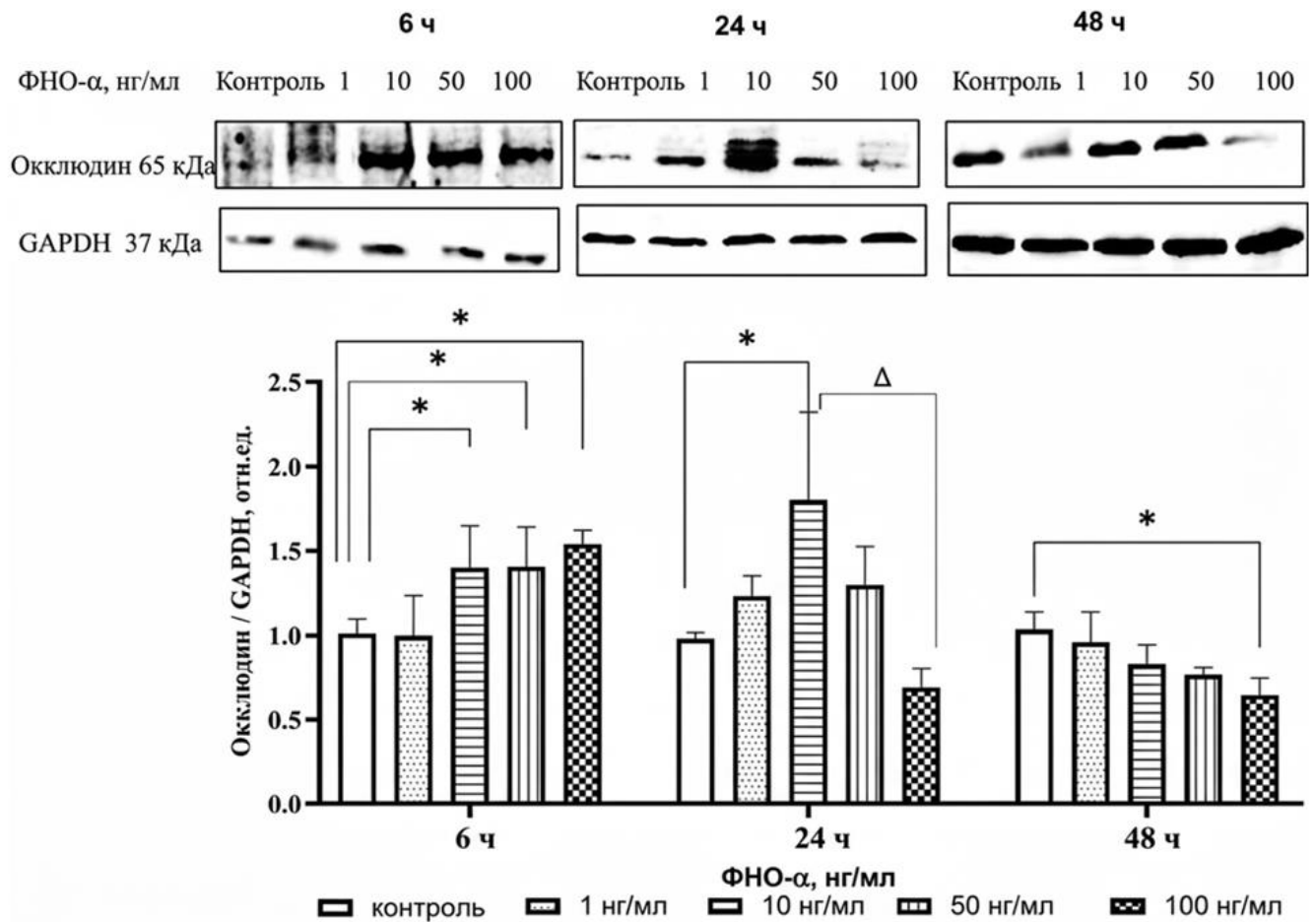


Рисунок 32 – Относительное количество окклюдина в клетках линии RPMI 2650 при воздействии фактора некроза опухоли- α в концентрациях 1, 10, 50 и 100 нг/мл в течение 6, 24 и 48 ч

Примечание – * $p \leq 0,05$ – статистически значимые отличия по сравнению с контролем; Δ – статистически значимые отличия от группы 10 нг/мл

Относительное количество ZO-1 при воздействии ФНО- α в течение 6 часов и концентрациях 10, 50 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 (Рисунок 33). Изменения носили дозозависимый характер: между 1 и 10 нг/мл на 30,0% ($p=0,02$), 10 и 50 нг/мл на 40,3% ($p=0,036$) и 1 и 100 нг/мл на 60,7% ($p=0,0001$); между 10 и 100 нг/мл на 30,8% ($p=0,023$). При сроке воздействия ФНО- α 24 часа и концентрациях 50 нг/мл и 100 нг/мл уровень ZO-1 увеличивался на 23,3% ($p=0,046$) и 23,8% ($p=0,04$) относительно контрольных значений.

Дозозависимые различия были между концентрациями 1 и 50 нг/мл на 24,7% ($p=0,034$) и между 1 и 100 нг/мл на 20,5% ($p=0,035$) (Рисунок 33).

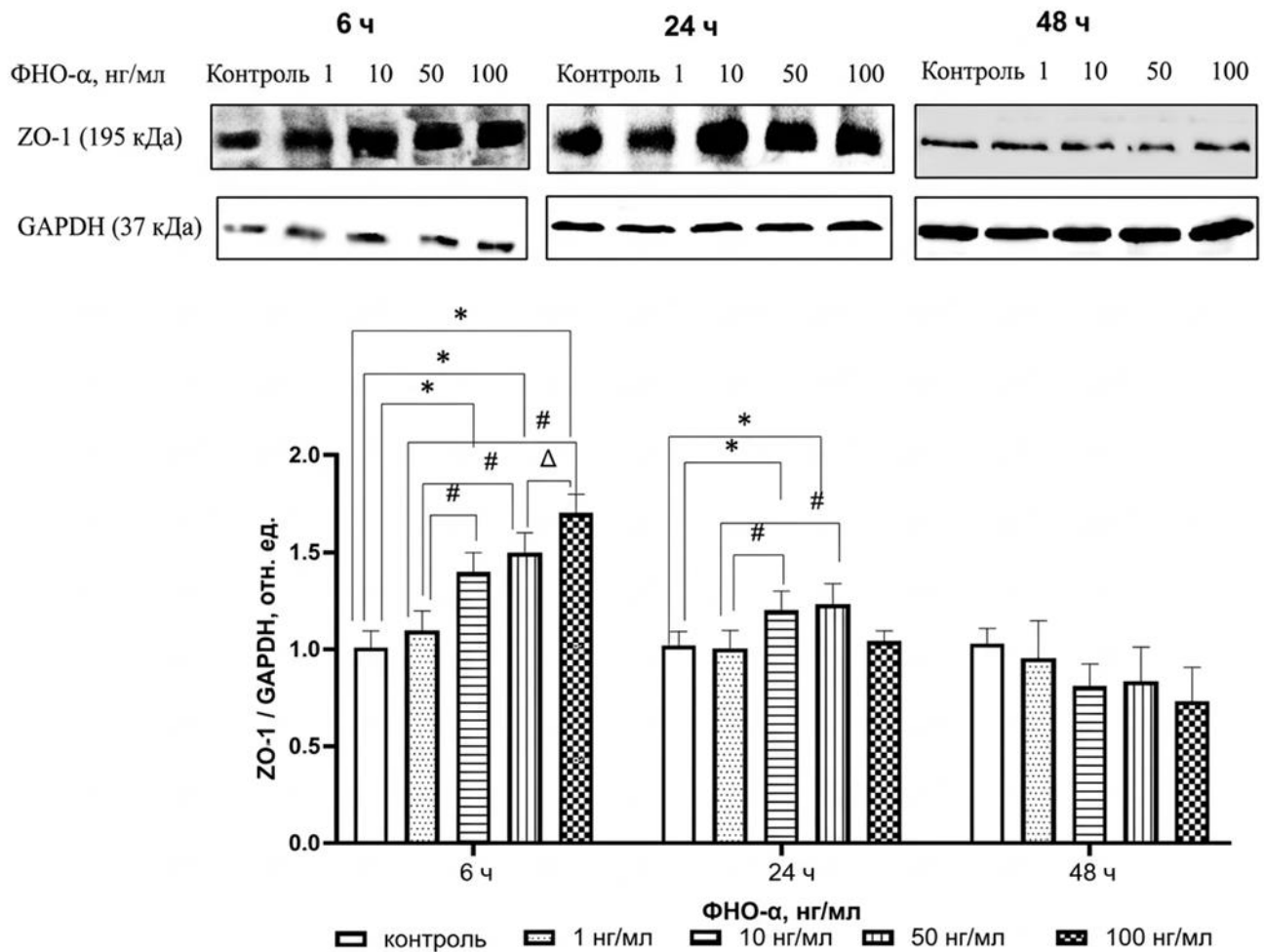


Рисунок 33 – Относительное количество ZO-1 в клетках линии RPMI-2650 при воздействии фактора некроза опухоли- α в концентрациях 1, 10, 50 и 100 нг/мл в течение 6, 24 и 48 ч

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

Известно, что плотные контакты подвергаются быстрому ремоделированию в ответ на внешние стимулы [110]. Наиболее значимым результатом стала двухфазная динамика маркеров барьерной функции. Дозозависимое повышение окклюдина, клаудина-1, ZO-1, E-кадгерина под действием ФНО- α в первые часы может рассматриваться как компенсаторная реакция [218, 224]. Однако после 48 часов воздействия наблюдается увеличение проницаемости, что согласуется с провоспалительной ролью цитокина [48] и аналогичными механизмами, выявленными в исследованиях на моделях кишечного эпителия [218, 224].

3.4.2. Влияние фактора некроза опухоли- α на локализацию ключевых белков межклеточных контактов в клетках RPMI 2650

Количественные изменения белков межклеточных контактов подвержены сложной регуляции под действием ФНО- α . Иммунофлуоресцентный анализ распределения исследуемых молекул выявил ожидаемую для каждого белка специфичную локализацию, соответствующую их функциональной роли в организации клеточного каркаса. Окклюдин и клаудин-1 визуализировались в виде непрерывного или точечного сигнала, строго очерчивающего апикальные границы соседних клеток, что отражает их интеграцию в специализированные домены плазматической мембраны, ответственные за формирование эпителиального барьера. E-кадгерин обнаруживался по всей поверхности латеральных мембран, формируя яркий контур вокруг клеток. Распределение сигнала было равномерным, что характерно для белков, обеспечивающих механическую связь между клетками. ZO-1 локализовался в виде интенсивной полосы, непосредственно прилегающей к клеточной мембране в области межклеточных соединений, что соответствует его функции (Рисунок 34).

При сравнении контрольной группы и образцов, обработанных ФНО- α , визуально отмечалось не только увеличение интенсивности свечения, но и усиление четкости, непрерывности и организации сигнала по клеточному периметру для всех белков. Это наблюдение согласуется с количественными данными и может указывать на индуцированную цитокином активацию процессов формирования межклеточных контактов. Полученные данные позволяют предположить, что наблюдаемое ранее количественное увеличение количество белков сопровождается их функциональной компартиментализацией в мембранах клеток. Сохранение правильной локализации окклюдина, клаудина-1, E-кадгерина и ZO-1 на фоне действия ФНО- α указывает на то, что цитокин может модулировать барьерные свойства эпителия через количество и функционирование белков межклеточных контактов.

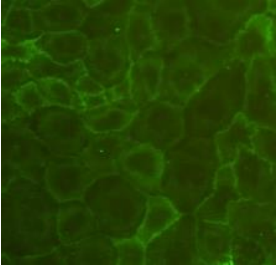
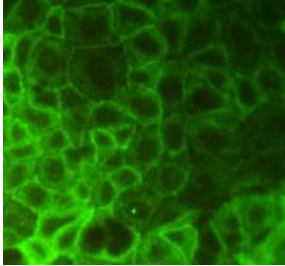
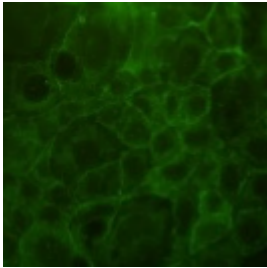
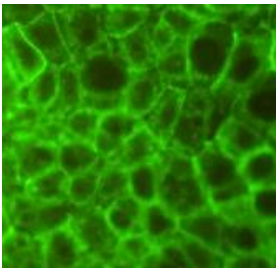
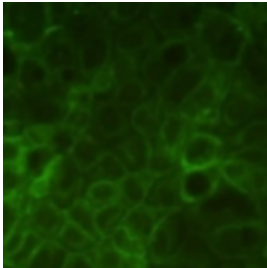
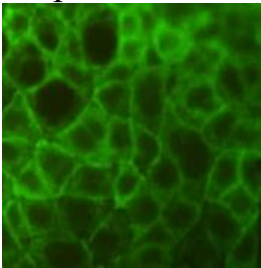
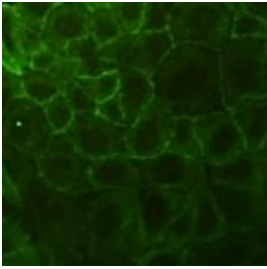
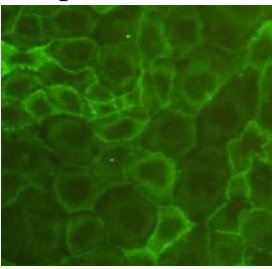
	Контроль, 21 сутки культивирования	Фактор некроза опухоли- α , 10 нг/мл, 6 часов
Е-кадгерин	 ИФ=16,3±1,27	 ИФ=24,96±5,31 p=0,045
Клаудин-1	 ИФ=16,53±0,45	 ИФ=28,3±2,11 p=0,0006
Окклюдин	 ИФ=15,90±1,65	 ИФ=22,60±2,51 p=0,018
ZO-1	 ИФ=9,23±0,75	 ИФ=23,05±2,47 p=0,0008

Рисунок 34 – Локализация белков межклеточных контактов в клетках RPMI 2650 при воздействии фактора некроза опухоли- α

Примечание – ИФ – интенсивность флуоресценции

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование было посвящено изучению ответа назального эпителия на ключевой медиатор воспаления – фактор некроза опухоли- α (ФНО- α). Выбор в качестве модели иммортализованной клеточной линии RPMI 2650, происходящей из карциномы носовой перегородки человека обоснован литературными данными [150, 254] и собственными исследованиями [2, 6]. Как показал анализ литературы, несмотря на опухолевое происхождение, эта линия при оптимизированных условиях культивирования (в частности, на границе раздела воздух-жидкость) демонстрирует способность к поляризации, формированию межклеточных контактов и развитию функционального барьера, что делает её оптимальной и удобной моделью *in vitro* для изучения транспорта и проницаемости [96, 97, 218].

В ходе работы было получено, что в процессе культивирования клетки RPMI 2650 не просто пролиферируют, но и подвергаются функциональному созреванию: на протяжении 14 суток происходило прогрессивное накопление белков плотных (ZO-1, окклюдин, клаудин-1) и адгезивных (E-кадгерин) контактов, что сопровождалось соответствующим увеличением трансэпителиального электрического сопротивления (TEER). Иммунофлуоресцентный анализ визуализировал корректную локализацию этих белков по клеточным границам, формирующим непрерывную сеть. Таким образом, в ходе работы удалось адаптировать к имеющимся условиям стабильную и воспроизводимую *in vitro* модель, имитирующую ключевой аспект назального эпителия – его барьерную функцию.

Центральным этапом работы стало изучение провоспалительного ответа клеток с помощью ФНО- α . Исходя из общепринятых представлений о ФНО- α как о центральном пусковом факторе воспаления, разрушающем тканевые барьеры [211, 239], ожидалось получить однонаправленное ослабление барьерных свойств.

Однако полученные данные представили более сложный и динамичный биохимический механизм (Рисунок 35).

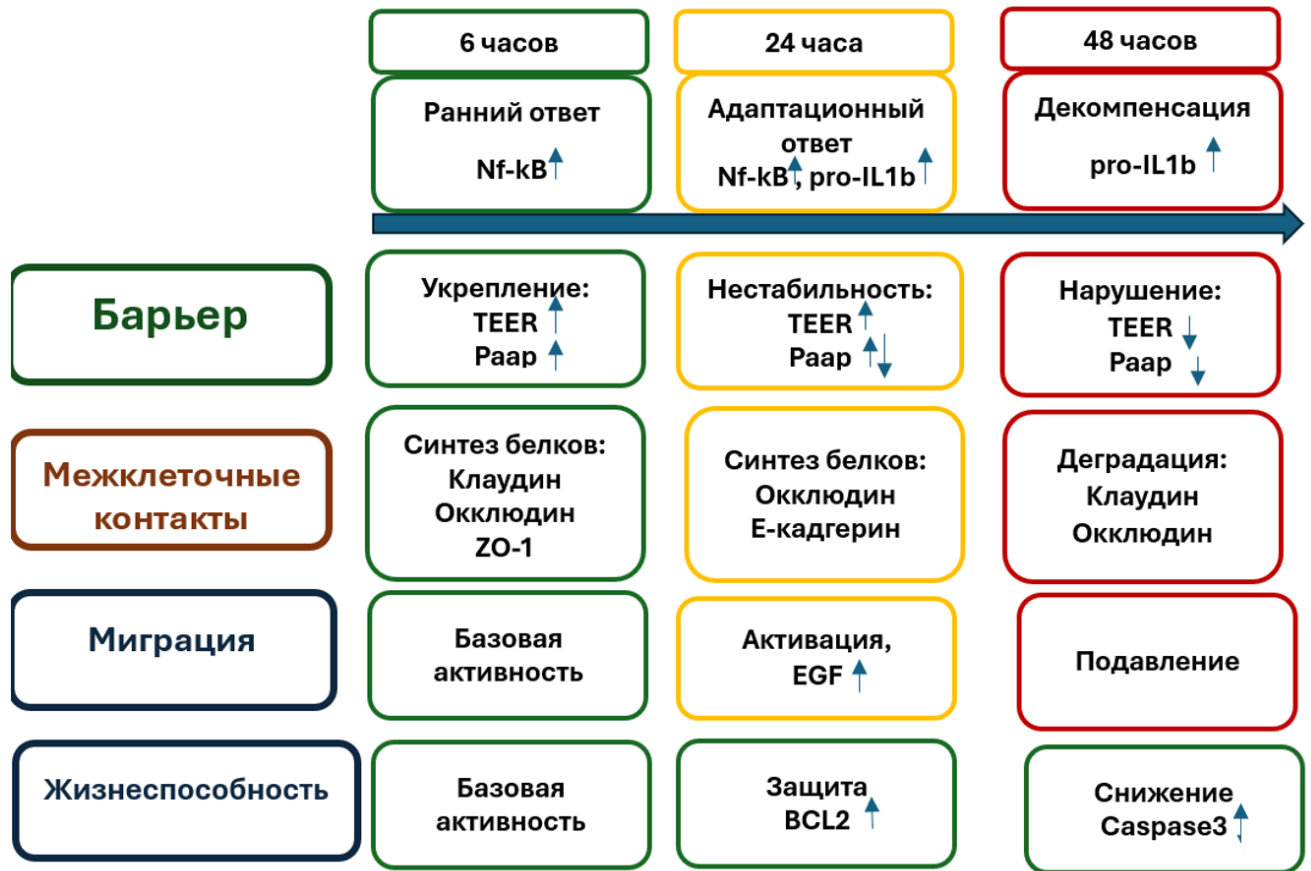


Рисунок 35 – Результаты комплексного анализа воздействия фактора некроза опухоли- α на клетки линии RPMI 2650

Результаты показали, что воздействие ФНО- α запускает в клетках RPMI 2650 каскад взаимосвязанных событий, характерных для воспалительного ответа. В исследовании была получена ожидаемая активация канонического пути Nf-kB и накопление его мишени – про-ИЛ-1 β , что подтвердило эффективность модели в индукции провоспалительного ответа [57, 171]. Параллельно развивался окислительный стресс, проявлявшийся в накоплении продуктов перекисного окисления липидов и карбонильных производных белков (Рисунок 35). Окислительный стресс, как известно, не только является следствием воспаления, но и способен усугублять повреждение клеток и нарушать межклеточные связи [77, 263]. При длительной (48-часовой) экспозиции эти процессы закономерно привели

к снижению жизнеспособности клеток и активации апоптоза, о чём свидетельствовало повышение уровня расщепленной каспазы-3.

Одним из наиболее значимых результатов оказалась выявленная двухфазная динамика изменения барьерной функции. Вопреки исходной гипотезе, кратковременное (6-24 часа) воздействие ФНО- α не ослабляло, а, напротив, укрепляло барьер. Важно отметить, статистически значимое повышение TEER и снижение параклеточной проницаемости для маннитола, что сопровождалось увеличением количества всех исследуемых белков межклеточных контактов – E-кадгерина, клаудина-1, окклюдина и ZO-1 с их функциональной локализацией.

Возможно, что наблюдаемая начальная фаза отражает активную компенсаторно-адаптационную реакцию эпителия в ответ на воздействие ФНО- α (клетки мобилизуют ресурсы для усиления своей защиты). Увеличение синтеза и интеграции белков плотных и адгезивных контактов является биохимическим механизмом для ограничения проникновения потенциальных патогенов или дальнейшей диффузии провоспалительных медиаторов. Подобные защитные механизмы описаны в литературе для кишечного эпителия, где некоторые цитокины на ранних стадиях могут временно усиливать барьерную функцию через сложные регуляторные механизмы [228, 235]. Данные диссертационного исследования впервые демонстрируют, что аналогичная способность к «уплотнению» в ответ на воспаление существует и у клеток назального эпителия.

Однако эта компенсаторная реакция оказалась ограниченной во времени. При длительности воздействия ФНО- α 48 часов результаты изменялись – развивалась фаза декомпенсации. Барьерная функция резко нарушалась, значения TEER снижались, а проницаемость для маннитола возрастала в несколько раз. На молекулярном уровне это сопровождалось снижением уровня ключевых белков плотных контактов (клаудина-1 и окклюдина), в то время как уровни E-кадгерина и ZO-1 переставали расти. Этот переход совпал по времени с пиком окислительного стресса и активацией апоптоза. По-видимому, длительная и интенсивная воспалительная стимуляция приводит к истощению адаптационного резерва клеток. Накопление метаболитов окислительного стресса (продукты

перекисного окисления липидов, карбонильные производные белков) и активация проапоптотических путей (снижение количества Bcl2, повышение уровня cleaved caspase 3) начинают преобладать над репаративными и защитными механизмами (Рисунок 36).

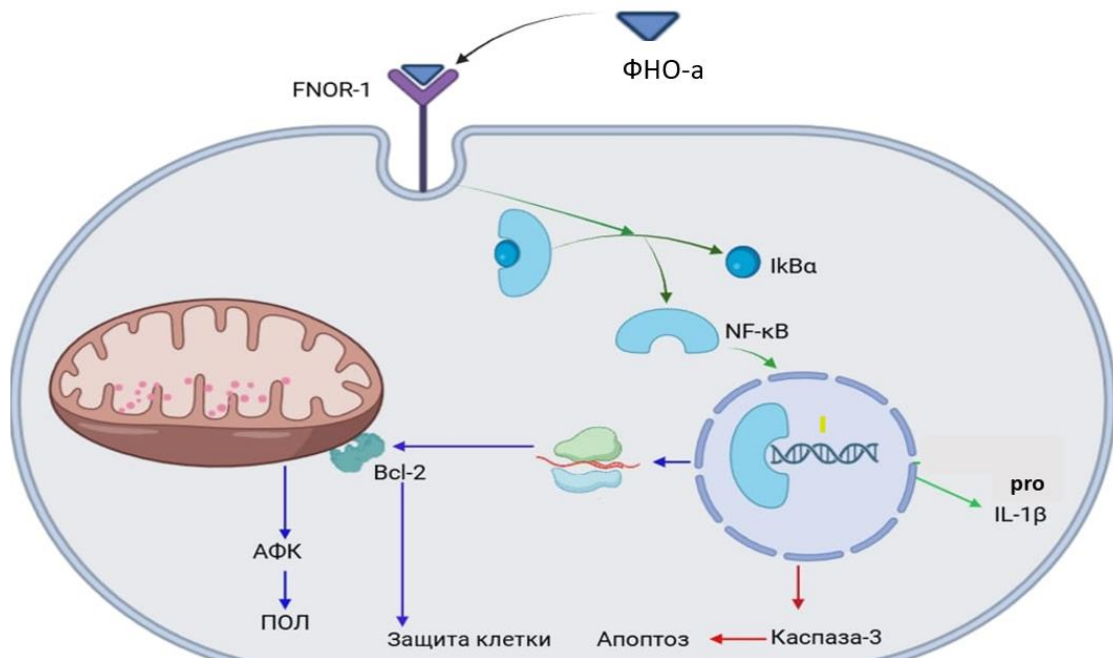


Рисунок 36 – Биохимический механизм провоспалительного ответа клеток RPMI 2650 на воздействие фактора некроза опухоли-α

Примечание – Nf-κB – транскрипционный фактор; Bcl-2 – антиапоптотический фактор; IL-1β – интерлейкин 1 бета; ФНО-α – фактор некроза опухоли-α; АФК – активные формы кислорода; ПОЛ – перекисное окисление липидов

Опираясь на литературные данные, можно предположить, что нарушение целостности цитоскелета, эндоцитоз и деградация белков контактов, опосредованные каскадами киназ и протеаз, в конечном итоге приводят к дезорганизации барьерной функции, что хорошо согласуется с классическими представлениями о патогенетической роли хронического воспаления [48, 181].

Отдельного внимания заслуживает представленный в работе регенеративный аспект ответа на воздействие ФНО-α. Было показано, что цитокин в оптимальной концентрации (10 нг/мл) способен стимулировать миграционную активность клеток RPMI 2650, при этом пик миграции сопровождался повышением уровня эпидермального фактора роста (EGF). Это указывает на то, что в умеренной концентрации ФНО-α может выступать как триггер регенеративных процессов,

возможно, являясь одним из механизмов для восстановления/поддержания целостности монослоя после повреждения. Данный результат согласуется с известной плеiotропностью ФНО- α и его способностью, в зависимости от контекста, участвовать в процессах пролиферации и заживления ран [202, 259].

Полученные данные объясняют механизмы повреждения эпителия при хронических воспалительных заболеваниях верхних дыхательных путей. Длительная гиперэкспрессия ФНО- α поддерживает провоспалительный статус и вызывает постепенную потерю клеток, способствуя ремоделированию слизистой и нарушению барьерной функции. Полученные результаты могут быть полезны при анализе интраназального применения лекарственных веществ, поскольку повышенная проницаемость монослоя способна повысить системную биодоступность применяемых лекарственных препаратов и вызвать развитие нежелательных лекарственных реакций.

С практической точки зрения, разработанная и охарактеризованная модель провоспалительного ответа на клетках RPMI 2650 представляет инструмент для доклинических исследований. Она позволяет не только изучать механизмы нарушения назального барьера, но и проводить скрининг веществ, способных поддержать первую (компенсаторную) фазу или предотвратить переход ко второй (декомпенсации). Понимание двухфазности процесса открывает новые перспективы для разработки обоснованных терапевтических стратегий, направленных на усиление собственных защитных свойств назального эпителия при ринитах и синуситах.

Таким образом, результаты диссертационного исследования показывают, что фактор некроза опухоли- α индуцирует не просто количественные изменения содержания белков межклеточных контактов, но и запускает биохимический механизм структурно-функционального барьера назального эпителия.

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- α 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- κ B и его транскрипционной мишени – предшественника интерлейкина-1 β (про-ИЛ-1 β).

3. Моделирование воспаления под действием фактора некроза опухоли- α 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. Фактор некроза опухоли- α 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- α 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией

2,4-ДНФГ – 2,4-динитрофенилгидразин.

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

МДА – малоновый диальдегид (malondialdehyde)

ФНО- α – Фактор некроза опухоли- α (Tumor Necrosis Factor alpha).

AJ – Adherens Junctions (адгезивные контакты/соединения).

BSA – Бычий сывороточный альбумин (Bovine Serum Albumin).

GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase).

DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол

DMSO – диметилсульфоксид (dimethyl Sulfoxide).

DPBS – Дульбекко фосфатно-солевой буфер (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline).

ECL – внеклеточная петля (ExtraCellular Loop)

EGF – Эпидермальный фактор роста (Epidermal Growth Factor).

EGFR – рецептор эпидермального фактора роста (Epidermal Growth Factor Receptor).

EMA – Европейское агентство по лекарственным средствам (European Medicines Agency).

ZO-1 – Zonula Occludens-1

IgA – Иммуноглобулин А

IgG – Иммуноглобулин G

ИЛ – интерлейкин

CLDN1 – клаудин-1 (claudin-1)

LPS – липополисахарид

MEM – минимальная эссенциальная среда (Minimum Essential Medium)

MRM – мониторинг множественных реакций (Multiple Reaction Monitoring)

MUC – муцины

Nf-κB – ядерный фактор каппа-B (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

Papp – коэффициент кажущейся проницаемости (Apparent Permeability Coefficient)

PBS – Фосфатно-солевой буфер (Phosphate-Buffered Saline)

PDZ-домен – структурный домен, названный по первым буквам трёх белков: PSD-95, Discs-large, ZO-1

PMSF (AEBSF) – Фенилметилсульфонилфторид

RIPA – лизирующий буфер

RPMI 2650 – иммортализованная клеточная линия карциномы носовой перегородки человека (модель назального эпителия)

SDS – Додecilсульфат натрия (Sodium Dodecyl Sulfate)

SDS-PAGE – Электрофорез в полиакриламидном геле с додecilсульфатом натрия

TEER – Трансэпителиальное электрическое сопротивление (Trans epithelial Electrical Resistance)

TEMED – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин

TGF-β – трансформирующий фактор роста-бета (Transforming Growth Factor beta)

TJ – плотные контакты/соединения (Tight Junctions)

TNFR1 (TNFR-1) – Рецептор фактора некроза опухоли 1 типа (TNF Receptor 1)

TNFR2 (TNFR-2) – Рецептор фактора некроза опухоли 2 типа (TNF Receptor 2)

Tris-HCl – Трис(гидроксиметил)аминометан с соляной кислотой (буфер)

Tween-20 – Полисорбат 20 (неионогенный детергент)

FBS – Фетальная бычья сыворотка (Fetal Bovine Serum)

HCV – Вирус гепатита C (Hepatitis C Virus)

HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (буфер)

HRP – Хреновая пероксидаза (Horseradish Peroxidase)

4-ОНН – 4-гидрокси-2-ноненаль (продукт перекисного окисления липидов)

VEGF – Фактор роста эндотелия сосудов (Vascular Endothelial Growth Factor)

VEGFR2 – Рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2 типа

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абаленихина, Ю.В. Вестерн-блот анализ как метод контроля эффективности контроля клеток НЕК293-SLCO1B3 / Ю.В. Абаленихина, П.Д. Ананьева, П.Ю. Мыльников. – Текст: непосредственный // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2025. – Т. 28, № 3. – С. 77-83.
2. Бреславец, Д.И. Относительное количество белков межклеточных контактов в динамике формирования монослоя клеток линии RPMI2650 / Д.И. Бреславец, Ю.В. Абаленихина, С.Г. Буйлина. – Текст: непосредственный // Технологии живых систем. – 2025. – Т. 22, № 2. – С. 58-65.
3. Влияние фактора некроза опухоли-альфа на проницаемость монослоя клеток назального эпителия / Ю.В. Абаленихина, Д.И. Бреславец, П.Ю. Мыльников [и др.]. – Текст: непосредственный // Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П.Павлова Минздрава России. – 2025. – Т. 180, № 12. – С. 774-779.
4. Воспаление – фундаментальный патологический процесс: лекция 1 (альтерация, сосудистые реакции) / С.Н. Серебренникова, И.Ж. Семинский, Е.В. Гузовская [и др.]. – Текст: непосредственный // Байкальский медицинский журнал. – 2023. – Т. 2, № 2. – С. 53-64.
5. Данилова, Н.В. Е-кадгерин: строение и функции, роль в канцерогенезе рака желудка / Н.В. Данилова, Н.А. Олейникова. – Текст (визуальный): непосредственный // Архив патологии. – 2023. – Т. 85, № 4. – С. 70-77.
6. Двухфазное влияние фактора некроза опухоли- α 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, Вып. 6. – С. 414-423.
7. Демина, О.М. Сигнальные пути транскрипционных факторов и роль генов в их регуляции при акне тяжелой степени / О.М. Демина, А.Г. Румянцев, Е.И. Карпова. – Текст (визуальный): непосредственный // Иммунология. – 2023. – Т. 44, № 6. – С. 764-775. DOI: 10.33029/1816-2134-2023-44-6-764-775.

8. Исследование проницаемости эпителиального слоя клеток TEER методом / И.А. Горбачев, О.А. Жукова, В.П. Баклаушев [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // RENSIT. – 2024. – Т. 16. – С. 885-896. DOI: 10.17725/rensit.2024.16.885.
9. Канонический сигнальный путь Wnt/ β -катенин: от истории открытия до клинического применения / Т.А. Гребенникова, Ж.Е. Белая, Л.Я. Рожинская [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Терапевтический архив. – 2016. – Т. 88, № 10. – С. 74-81.
10. Китаева, К.В. Современные методы доклинического скрининга противоопухолевых препаратов с применением тест-систем на основе культур клеток / К.В. Китаева, А.А. Ризванов, В.В. Соловьев. – Текст: непосредственный // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. – 2021. – Т. 163, кн. 2. – С. 155-176.
11. Лобов, Г.И. Иммунная функция лимфатической системы / Г.И. Лобов. – Текст: непосредственный // Успехи физиологических наук. – 2023. – Т. 54, № 3. – С. 3-24.
12. Малозатратное устройство для измерения TEER при культивировании эпителиальных/эндотелиальных клеток на вставках / И.В. Воронкина, Л.В. Смагина, А.А. Иванова [и др.]. – Текст : непосредственный // Медицинский академический журнал. – 2024. – Т. 24, № 2. – С. 35-44.
13. Метил-бета-циклодекстрин изменяет уровень белков плотных контактов в эндотелии сосудов головного мозга / А.Г. Марков, А.Е. Бикмурзина, А.А. Федорова [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Российский физиологический журнал. – 2022. – № 5. – С. 677-685.
14. 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.
15. Модуляция активности различных синтаз оксида азота в качестве подхода к терапии эндотелиальной дисфункции / Д.В. Куркин, Е.Е. Абросимова,

Д.А. Бакулин [и др.]. – Текст: непосредственный // Фармация и фармакология. – 2022. – Т. 10, Вып. 2. – С. 130-153.

16. Молостова, Т.Н. Эпителий дыхательных путей и образование секрета / Т.Н. Молостова. – Текст (визуальный): непосредственный // Респираторная медицина. – 2024. – Т. 1. – С. 203-220. DOI: 10.18093/987-5-6048754-9-0-2024-1-203-220

17. Озерская, И.В. Мукоцилиарная система респираторного тракта при бронхиальной астме и аллергическом рините / И.В. Озерская, Н.А. Геппе, У.С. Малявина. – Текст : непосредственный // Лечащий врач. – М. : Открытые системы. – 2011. – № 9. – С. 17-20.

18. Озерская, И.В. Особенности респираторного эпителия у детей с бронхиальной астмой и аллергическим ринитом / И.В. Озерская, Н.А. Геппе, У.С. Малявина. – Текст (визуальный): непосредственный // Доктор.Ру. – 2018. – № 11 (155). – С. 50-56. DOI: 10.31550/1727-2378-2018-155-11-50-56.

19. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения / Е.Е. Дубинина, С.О. Бурмистров, Д.А. Ходов [и др.]. – Текст: непосредственный // Вопросы медицинской химии. – 1995. – Т. 41, № 1. – С. 24-26.

20. Переход от 2D к 3D *in vitro* модели плоскоклеточного рака носовой перегородки: изменение профиля экспрессии опухоль-ассоциированных генов в норме и после облучения нейтронами / А.Г. Соболева, И.В. Арутюнян, Д.В. Бальчир [и др.]. – Текст: непосредственный // Российский онкологический журнал. – 2025. – Т. 30, № 3. – С. 194-205.

21. Перспективные биотехнологии: коллекции культур клеток высших растений как основа разработки и производства лекарственных препаратов / Е.В. Попова, А.В. Носов, М.В. Титова [и др.]. – Текст: непосредственный // Физиология растений. – 2021. – Т. 68, № 3. – С. 227-244.

22. Рахматуллин, И.М. Респираторный эпителий и гиперреактивность дыхательных путей / И.М. Рахматуллин, Р.М. Галлямов, Р.С. Фассахов. – Текст (визуальный): непосредственный // Казанский медицинский журнал. – 1993. – Т. 74, № 4. – С. 300-303. DOI: 10.17816/kazmj71478.

23. Респираторная медицина : руководство. В 5 томах. Т. 1. Респираторная медицина / под ред. А. Г. Чучалина. – Москва : ПульмоМедиа, 2024. – 668 с.
24. Роль полиморфизма генов про- и противовоспалительных цитокинов в развитии коморбидной формы артериальной гипертензии на фоне хронической обструктивной болезни лёгких / Ю.И. Прозоровская, И.И. Павлюченко, Я.В. Клименко [и др.]. – Текст: непосредственный // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2024. – Т. 19, № 1. – С. 25-30.
25. Роль рецепторов VEGFR в неопластическом ангиогенезе и перспективы терапии опухолей мозга / А.А. Корчагина, С.А. Шеин, О.И. Гурина [и др.]. – Текст: непосредственный // Вестник РАМН. – 2013. – № 11. – С. 104-114.
26. Синдром повышенной эпителиальной проницаемости в клинической практике. Мультидисциплинарный национальный консенсус / В.И. Симаненков, И.В. Маев, О.Н. Ткачева [и др.]. – Текст: непосредственный // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2021. – Т. 20, № 1. – С. 121-278.
27. Синдром системного воспалительного ответа при панкреонекрозе: триггерные агенты, органые повреждения / А.П. Власов, С.Г. Анашкин, Т.И. Власова [и др.]. – Текст: непосредственный // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2021. – № 4. – С. 21-28.
28. Смирнова, О.В. Характеристика процессов липопероксидации и факторов системы антиоксидантной защиты при хроническом рините / О.В. Смирнова, Н.С. Гончарова. – Текст: непосредственный // Вестник оториноларингологии. – 2024. – Т. 89, № 1. – С. 16-20.
29. Сокологорский, С.В. Гликокаликс – рождение новой клинической парадигмы / С.В. Сокологорский. – Текст (визуальный): непосредственный // Анестезиология и реаниматология. – 2018. – № 4. – С. 22-29. DOI: 10.17116/anaesthesiology201804122.
30. Сравнение требований фармакопей мира к качеству клеточных линий / М.А. Водякова, А.Р. Сайфутдинова, Е.В. Мельникова [и др.]. – Текст: непосредственный // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2020. – Т. 20, № 3. – С. 159-173.

31. Терещенко, И.В. Фактор некроза опухоли α и его роль в патологии / И.В. Терещенко, П.Е. Каюшев. – Текст (визуальный): непосредственный // РМЖ. Медицинское обозрение. – 2022. – Т. 6, № 9. – С. 523-527. DOI: 10.32364/2587-6821-2022-6-9-523-527.
32. Тихонова, Г.А. Биомаркеры как инструмент медико-биологического мониторинга и контроля (Обзор литературы. Часть 1) / Г.А. Тихонова, О.В. Котов, А.А. Маркин. – Текст (визуальный): непосредственный // Технологии живых систем. – 2023. – Т. 20, № 2. – С. 18–26.
33. Тополянская С.В. Фактор некроза опухоли-альфа и возрастассоциированная патология/ С.В. Тополянская. – Текст (визуальный): непосредственный // Архивъ внутренней медицины. – 2020. – Т. 10, № 6. – С. 414-421.
34. Федотова, Е.В. Перспективы применения интраназальных наноразмерных полимерных систем доставки лекарственных препаратов и антидотов в медицине экстремальных ситуаций / Е.В. Федотова, Д.В. Криворотов, А.С. Радиллов. – Текст: непосредственный // Медицина экстремальных ситуаций. – 2024. – Т. 26, № 4. – С. 27-37.
35. Цилиарный эпителий при респираторных вирусных инфекциях у детей. Влияние лекарственных препаратов / Н.А. Геппе, И.В. Озерская, У.С. Малявина [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Доктор.Ру. – 2012. – № 9 (77). – С. 9-14.
36. Ченцов, Ю.С. Введение в клеточную биологию / Ю.С. Ченцов. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2004. – 495 с. – Текст (визуальный): непосредственный.
37. A defined methodology for reliable quantification of Western blot data / S.C. Taylor, T. Berkelman, G. Yadav [et al.]. – Text: visual // Molecular Biotechnology. – 2013. – Vol. 55, No. 3. – P. 217-226.
38. A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation / O. Pertz, D. Bozic, A.W. Koch [et al.]. – Text: visual // The EMBO Journal. – 1999. – Vol. 18, № 7. – P. 1738-1747.

39. Abnormal apical cell membrane in cystic fibrosis respiratory epithelium. An *in vitro* electrophysiologic analysis / C.U. Cotton, M.J. Stutts, M.R. Knowles [et al.]. – Text: visual // The Journal of Clinical Investigation. – 1987. – Vol. 79, No. 1. – P. 80-85.
40. Adalimumab prevents barrier dysfunction and antagonizes distinct effects of TNF- α on tight junction proteins and signaling pathways in intestinal epithelial cells / A. Fischer, M. Gluth, U.F. Pape [et al.]. – Text: visual // American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology. – 2013. – Vol. 304, № 11. – P. G970-G979.
41. Adil, M.S. Cell-cell junctions: structure and regulation in physiology and pathology / M.S. Adil, S.P. Narayanan, P.R. Somanath. – Text: visual // Tissue Barriers. – 2021. – Vol. 9, № 1. – P. 1848212. DOI: 10.1080/21688370.2020.1848212.
42. Air-Liquid Interface Culture of Serially Passaged Human Nasal Epithelial Cell Monolayer for *In Vitro* Drug Transport Studies / M.-K. Lee, J.-W. Yoo, H. Lin [et al.]. – Text: visual // Drug Delivery. – 2005. – Vol. 12, No. 5. – P. 305-311.
43. Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly / F. Drees, S. Pokutta, S. Yamada [et al.]. – Text: visual // Cell. – 2005. – Vol. 123, № 5. – P. 903-915.
44. Amoozadeh, Y. Mechanism of Claudin Regulation in Kidney Tubular Epithelial Cells / Y. Amoozadeh. – Text: visual // Journal of Proteome Research. – 2016. – Vol. 15, № 8. – P. 3393–3404. – DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00769.
45. An essential role for ARF6-regulated membrane traffic in adherens junction turnover and epithelial cell migration / F. Palacios, L. Price, J. Schweitzer [et al.]. – Text: visual // The EMBO Journal. – 2001. – Vol. 20, № 17. – P. 4973-4986.
46. Anchorage of microtubule minus ends to adherens junctions regulates epithelial cell-cell contacts / W. Meng, Y. Mushika, T. Ichii [et al.]. – Text: visual // Cell. – 2008. – Vol. 135, № 5. – P. 948-959.
47. Application of RPMI 2650 nasal cell model to a 3D printed apparatus for the testing of drug deposition and permeation of nasal products / M. Pozzoli, H. X. Ong, L. Morgan [et al.]. – Text: visual // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2016. – Vol. 107. – P. 223-233.

48. Arumugam, P. Intestinal Epithelial Tight Junction Barrier Regulation by Novel Pathways / P. Arumugam, K. Saha, P. Nighot. – Text: electronic // *Inflammatory Bowel Diseases*. – 2025. – Vol. 31, № 1. – P. 259-271.
49. Associations Between Inflammatory Endotypes and Clinical Presentations in Chronic Rhinosinusitis / W.W. Stevens, A.T. Peters, B.K. Tan [et al.]. – Text: visual // *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. – 2019. – Vol. 7, № 8. – P. 2812-2820.e3.
50. B Cell Requirement for Robust Regulatory T Cell Responses to Friend Retrovirus Infection / T.C. Moore, L.M. Gonzaga, J.M. Mather [et al.]. – Text: visual // *mBio*. – 2017. – Vol. 8, No. 4. – P. e01122-17. DOI: 10.1128/mBio.01122-17.
51. Bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial activation and dysfunction: a new predictive and therapeutic paradigm for sepsis / M. Wang, J. Feng, D. Zhou [et al.]. – Text: visual // *European Journal of Medical Research*. – 2023. – Vol. 28, № 1. – Art. № 339. DOI: 10.1186/s40001-023-01301-5.
52. Baum, B. Spatial control of the actin cytoskeleton in *Drosophila* epithelial cells / B. Baum, N. Perrimon. – Text: visual // *Nature Cell Biology*. – 2001. – Vol. 3, № 10. – P. 883-890.
53. Benzo[a]pyrene aggravated ovalbumin induced epithelial tight junction disruption via ROS driven NLRP3/Caspase 1 signaling pathway in asthmatic mice / Y. Xu, Y. Feng, L. Wang [et al.]. – Text: electronic // *International Journal of Molecular Medicine*. – 2025. – Vol. 56, № 3. – P. 132.
54. Biological therapy in chronic rhinosinusitis with nasal polyps / Z. Jin, B. Yan, L. Zhang [et al.]. – Text: visual // *Expert Review of Clinical Immunology*. – 2025. – Vol. 21, № 4. – P. 473-492.
55. Brembeck, F.H. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin / F.H. Brembeck, M. Rosario, W. Birchmeier. – Text: visual // *Current Opinion in Genetics & Development*. – 2006. – Vol. 16, № 1. – P. 51-59.
56. Bryant, D.M. Regulation of endocytosis, nuclear translocation, and signaling of fibroblast growth factor receptor 1 by E-cadherin / D.M. Bryant, F.G. Wylie, J.L. Stow. – Text: visual // *Molecular Biology of the Cell*. – 2005. – Vol. 16, № 1. – P. 14-23.

57. Cabal-Hierro, L. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors / L. Cabal-Hierro, P.S. Lazo. – Text: visual // Cellular Signalling. – 2012. – Vol. 24, № 6. – P. 1297-1305. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.02.006.
58. Cadmium-induced up-regulation of aldo-keto reductase 1C3 expression in human nasal septum carcinoma RPMI-2650 cells: Involvement of reactive oxygen species and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt / Y.J. Lee, G.J. Lee, B.J. Baek [et al.]. – Text: visual // Environmental Toxicology and Pharmacology. – 2011. – Vol. 31, № 3. – P. 469-478.
59. Cailliez, F. Cadherin mechanics and complexation: the importance of calcium binding / F. Cailliez, R. Lavery. – Text: visual // Biophysical Journal. – 2005. – Vol. 89, № 6. – P. 3895-3903.
60. Carbocysteine attenuates TNF- α -induced inflammation in human alveolar epithelial cells *in vitro* through suppressing NF- κ B and ERK1/2 MAPK signaling pathways / W. Wang, W.J. Guan, R.Q. Huang [et al.]. – Text: electronic // Acta Pharmacologica Sinica. – 2016. – Vol. 37, № 5. – P. 629-636.
61. Carta, S. Modulation of airway epithelial cell functions by Pidotimod: NF- κ B cytoplasmatic expression and its nuclear translocation are associated with an increased TLR-2 expression / S. Carta, M. Silvestri, G.A. Rossi. – Text: electronic // Italian Journal of Pediatrics. – 2013. – Vol. 39. – P. 29.
62. Caudal homeobox protein Cdx-2 cooperates with Wnt pathway to regulate claudin-1 expression in colon cancer cells / A.A. Bhat, A. Sharma, J. Pope [et al.]. – Text: electronic // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, № 6. – P. e37174.
63. Cavallaro, U. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer / U. Cavallaro, G. Christofori. – Text: visual // Nature Reviews Cancer. – 2004. – Vol. 4, № 2. – P. 118-132.
64. C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms / T.J. Boggon, J. Murray, S. Chappuis-Flament [et al.]. – Text: visual // Science. – 2002. – Vol. 296, № 5571. – P. 1308-1313.

65. Cell culture approaches to the investigation of human airway ion transport / R.C. Boucher, J.R. Yankaskas, C.U. Cotton [et al.]. – Text: visual // *European Journal of Respiratory Diseases. Supplement.* – 1987. – Vol. 153. – P. 59-67.
66. Cell-based *in vitro* models for predicting drug permeability / B. Sarmento, F. Andrade, S.B. da Silva [et al.]. – Text: visual // *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology.* – 2012. – Vol. 8, № 5. – P. 607-621.
67. Characterisation of cell adhesion in airway epithelial cell types using electric cell-substrate impedance sensing / I.H. Heijink, S.M. Brandenburg, J.A. Noordhoek [et al.]. – Text: visual // *European Respiratory Journal.* – 2010. – Vol. 35, № 4. – P. 894-903. DOI: 10.1183/09031936.00065809.
68. Characterization of RPMI 2650 cell line for nasal drug delivery / L. Kürti, S. Veszelka, A. Bocsik [et al.]. – Text: visual // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* – 2012. – Vol. 81, № 2. – P. 281-288.
69. Chen, Y.H. Coupling assembly of the E-cadherin/b-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells / Y.H. Chen, D.B. Stewart, W.J. Nelson. – Text: visual // *The Journal of Cell Biology.* – 1999. – Vol. 144, № 4. – P. 687-699.
70. Chidlow, J.H. Jr. Caveolae, caveolins, and cavins: complex control of cellular signalling and inflammation / J.H. Jr. Chidlow, W.C. Sessa. – Text: visual // *Cardiovascular Research.* – 2010. – Vol. 86, № 2. – P. 219-225.
71. Chronic rhinosinusitis with nasal polyps and without nasal polyps is associated with increased expression of lysophosphatidic acid-related molecules / S.J. Park, Y.J. Jun, K.J. Lee [et al.]. – Text: visual // *American Journal of Rhinology & Allergy.* – 2014. – Vol. 28, № 3. – P. 199-207.
72. Ciebiada, M. Evaluation of eicosanoids in nasal lavage as biomarkers of inflammation in patients with allergic rhinitis / M. Ciebiada, P. Górski, A. Antczak. – Text: electronic // *Archives of Medical Science.* – 2014. – Vol. 10, № 6. – P. 1123-1128.
73. Cigarette Smoke Mediates Nasal Epithelial Barrier Dysfunction via TNF- α / J. Guo, X. Meng, Y.M. Zheng [et al.]. – Text: visual // *American Journal of Rhinology & Allergy.* – 2023. – Vol. 37, № 6. – P. 646-655. DOI: 10.1177/19458924231184741.

74. Clara cell protein in nasal lavage fluid and nasal nitric oxide - biomarkers with anti-inflammatory properties in allergic rhinitis / K. Irander, J.P. Palm, M.P. Borres [et al.]. – Text: electronic // *Clinical and Molecular Allergy*. – 2012. – Vol. 10. – P. 4.
75. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice / M. Furuse, M. Hata, K. Furuse [et al.]. – Text: visual // *Journal of Cell Biology*. – 2002. – Vol. 156, № 6. – P. 1099-1111.
76. CLDN1 knock out keratinocytes as a model to investigate multiple skin disorders / K.A. Arnold, M.C. Moran, H. Shi [et al.]. – Text: visual // *Experimental Dermatology*. – 2024. – Vol. 33, № 5. – P. e15084.
77. Corin protects H₂O₂-induced apoptosis through PI3K/AKT and NF- κ B pathway in cardiomyocytes / Y. Li, J. Xia, N. Jiang [et al.]. – Text: visual // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2018. – Vol. 97. – P. 594-599. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.10.090.
78. Crocin Inhibits Angiogenesis and Metastasis in Colon Cancer via TNF- α /NF- κ B/VEGF Pathways / H.A. Bakshi, G.A. Quinn, M.M. Nasef [et al.]. – Text: electronic // *Cells*. – 2022. – Vol. 11, № 9. – P. 1502. DOI: 10.3390/cells11091502.
79. Cummins, P.M. Occludin: One Protein, Many Forms / P.M. Cummins. – Text: visual // *Molecular and Cellular Biology*. – 2012. – Vol. 32, No. 2. – P. 242-250. DOI: 10.1128/MCB.06029-11.
80. Deafness in occludin-deficient mice with dislocation of tricellulin and progressive apoptosis of the hair cells / S. Kitajiri, T. Katsuno, H. Sasaki [et al.]. – Text: visual // *Biology Open*. – 2014. – Vol. 3, No. 9. – P. 759-766.
81. Defective epithelial barrier in chronic rhinosinusitis: the regulation of tight junctions by IFN- γ and IL-4 / M.B. Soyka, P. Wawrzyniak, T. Eiwegger [et al.]. – Text: visual // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2012. – Vol. 130, № 5. – P. 1087-1096.e10.
82. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins / R.L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver [et al.]. – Text: visual // *Methods in Enzymology*. – 1990. – Vol. 186. – P. 464-478.
83. Development of a Novel ex vivo Nasal Epithelial Cell Model Supporting Colonization With Human Nasal Microbiota / D.D. Charles, J.R. Fisher, S.M. Hoskinson

[et al.]. – Text: electronic // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2019. – Vol. 9. – P. 165.

84. Díaz-Coránguez, M. Tight Junctions in Cell Proliferation / M. Díaz-Coránguez, X. Liu, D. A. Antonetti. – Text: visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20, No. 23. – P. 5972. DOI: 10.3390/ijms20235972.

85. Differential expression of tumor necrosis factor α , interleukin 1β , nuclear factor κB in nasal mucosa among chronic rhinosinusitis patients with and without polyps / D. Plewka, A. Grzanka, E. Drzewiecka [et al.]. – Text: electronic // *Advances in Dermatology and Allergology*. – 2017. – Vol. 34, № 3. – P. 199-206.

86. Drug penetration model of vinblastine-treated Caco-2 cultures / E. Hellinger, M.L. Bakk, P. Pócza [et al.]. – Text: visual // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2010. – Vol. 41, № 1. – P. 96-106.

87. E-cadherin expression in postnatal Schwann cells is regulated by the cAMP-dependent protein kinase A pathway / A.T. Crawford, D. Desai, P. Gokina [et al.]. – Text: visual // *Glia*. – 2008. – Vol. 56, № 15. – P. 1637–1647.

88. E-cadherin expression in sporadic gastric cancer from Mexico: exon 8 and 9 deletions are infrequent events associated with poor survival / A. Gamboa-Dominguez, C. Dominguez-Fonseca, Y. Chavarri-Guerra [et al.]. – Text: visual // *Human Pathology*. – 2005. – Vol. 36, № 1. – P. 29-35.

89. E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases / X. Qian, T. Karpova, A.M. Sheppard [et al.]. – Text: visual // *The EMBO Journal*. – 2004. – Vol. 23, № 8. – P. 1739-1748.

90. Effect of the biologically active fragment of zonula occludens toxin, delta G, on the intestinal paracellular transport and oral absorption of mannitol / N.N. Salama, A. Fasano, R. Lu [et al.]. – Text: visual // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2003. – Vol. 251, № 1-2. – P. 113-121. DOI: 10.1016/s0378-5173(02)00589-6.

91. EGF induces macropinocytosis and SNX1-modulated recycling of E-cadherin / D.M. Bryant, M.C. Kerr, L.A. Hammond [et al.]. – Text: visual // *Journal of Cell Science*. – 2007. – Vol. 120, № Pt 10. – P. 1818–1828.

92. Enhanced activation of epidermal growth factor receptor caused by tumor-derived E-cadherin mutations / A. Bremm, A. Walch, M. Fuchs [et al.]. – Text: visual // *Cancer Research*. – 2008. – Vol. 68, № 3. – P. 707-714.
93. *Entamoeba histolytica* EhCP112 Dislocates and Degrades Claudin-1 and Claudin-2 at Tight Junctions of the Intestinal Epithelium / P. Cuellar, E. Hernández-Nava, G. García-Rivera [et al.]. – Text: electronic // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2017. – Vol. 7. – P. 372.
94. Epithelial Organization: The Gut and Beyond / N. Shashikanth, S. Yeruva, M.L.D.M. Ong [et al.]. – Text: visual // *Comprehensive Physiology*. – 2017. – Vol. 7, № 4. – P. 1497-1518. DOI: 10.1002/cphy.c170003.
95. Epithelial Transport in Disease: An Overview of Pathophysiology and Treatment / V.J. Clemente-Suárez, A. Martín-Rodríguez, L. Redondo-Flórez [et al.]. – Text: visual // *Cells*. – 2023. – Vol. 12, № 20. – P. 2455. DOI: 10.3390/cells12202455.
96. Evaluation of human nasal RPMI 2650 cells grown at an air-liquid interface as a model for nasal drug transport studies / S. Bai, T. Yang, T.J. Abbruscato [et al.]. – Text: visual // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2008. – Vol. 97, No. 3. – P. 1165-1178. DOI: 10.1002/jps.21031.
97. Evaluation of RPMI 2650 cells as an *in vitro* model for human nasal epithelial cells / S. Bai, T. Yang, T.J. Abbruscato [et al.]. – Text: visual // *Pharmaceutical Research*. – 2008. – Vol. 25, № 10. – P. 2331-2338.
98. Exploring causal relationships between inflammatory cytokines and allergic rhinitis, chronic rhinosinusitis, and nasal polyps: a Mendelian randomization study / L. Li, Y. Zhang, H. Liu [et al.]. – Text: electronic // *Frontiers in Immunology*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1288517.
99. Expression stability of common housekeeping genes is differently affected by bowel inflammation and cancer: implications for finding suitable normalizers for inflammatory bowel disease studies / M. Krzystek-Korpacka, D. Diakowska, J. Bania [et al.]. – Text: visual // *Inflammatory Bowel Diseases*. – 2014. – Vol. 20, No. 7. – P. 1147-1156. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000067.

100. Fanning, A.S. Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions / A.S. Fanning, J.M. Anderson. – Text: visual // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2009. – Vol. 1165. – P. 113-120. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.04440.x.
101. Fasano, A. Physiological, Pathological, and Therapeutic Implications of Zonulin-Mediated Intestinal Barrier Modulation: Living Life on the Edge of the Wall / A. Fasano. – Text: visual // *The American Journal of Pathology*. – 2008. – Vol. 173, No. 5. – P. 1243-1252. – DOI: 10.2353/ajpath.2008.080192.
102. Feldmann, M. Discovery of TNF-alpha as a therapeutic target in rheumatoid arthritis: preclinical and clinical studies / M. Feldmann, R.N. Maini. – Text: visual // *Joint Bone Spine*. – 2002. – Vol. 69, № 1. – P. 12-18.
103. Fisher, D.A. The thyroid hormone effects on growth and development may be mediated by growth factors / D.A. Fisher, S. Hoath, J. Lakshmanan. – Text: visual // *Endocrinologia Experimentalis*. – 1982. – Vol. 16, № 4. – P. 259-271.
104. Fox, D.A. Cytokine blockade as a new strategy to treat rheumatoid arthritis: inhibition of tumor necrosis factor / D.A. Fox. – Text: visual // *Archives of Internal Medicine*. – 2000. – Vol. 160, № 4. – P. 437-444.
105. Frey, A. The Dual Role of the Airway Epithelium in Asthma: Active Barrier and Regulator of Inflammation / A. Frey, L.P. Lunding, M. Wegmann. – Text: visual // *Cells*. – 2023. – Vol. 12, № 18. – P. 2208. DOI: 10.3390/cells12182208.
106. Ganesan, S. Barrier function of airway tract epithelium / S. Ganesan, A.T. Comstock, U.S. Sajjan. – Text: visual // *Tissue Barriers*. – 2013. – Vol. 1, № 4. – P. e24997. DOI: 10.4161/tisb.24997.
107. Gao, N. Airway Epithelial Cell Junctions as Targets for Pathogens and Antimicrobial Therapy / N. Gao, F. Rezaee. – Text: electronic // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14, № 12. – P. 2619.
108. GAPDH: A common housekeeping gene with an oncogenic role in pancreatic cancer / J. Wang, X. Yu, X. Cao [et al.]. – Text: visual // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. – 2023. – Vol. 21. – P. 4056-4069. DOI: 10.1016/j.csbj.2023.07.034.

109. Grimm, D. The link between allergic rhinitis and chronic rhinosinusitis / D. Grimm, P.H. Hwang, Y.T. Lin. – Text: visual // *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*. – 2023. – Vol. 31, № 1. – P. 3-10.
110. Guérineau, N.C. Developmental and stress-induced remodeling of cell–cell communication in the adrenal medullary tissue / N.C. Guérineau, M.G. Desarménien [et al.]. – Text: visual // *Cellular and Molecular Neurobiology*. – 2010. – Vol. 30, No. 8. – P. 1425-1431. DOI: 10.1007/s10571-010-9583-z.
111. Gum Arabic enhances paracellular transport of water in amphibian everted small intestinal segments / M.K. Pai, S. Chetan, J.P. Rao [et al.]. – Text: visual // *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*. – 2013. – Vol. 57, № 2. – P. 195-198.
112. Gumbiner, B. M. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis / B.M. Gumbiner. – Text: visual // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2005. – Vol. 6. – P. 622-634.
113. Gumbiner, B.M. Regulation of cadherin adhesive activity / B.M. Gumbiner. – Text : visual // *The Journal of Cell Biology*. – 2000. – Vol. 148, № 3. – P. 399–404.
114. Günzel, D. Claudins and the modulation of tight junction permeability / Günzel, D., Yu A.S. – Text: visual // *Physiological Reviews*. – 2013. – Vol. 93, № 2. – P. 525-95.
115. Ha, J.G. Unraveling the Role of Epithelial Cells in the Development of Chronic Rhinosinusitis / J.G. Ha, H.J. Cho. – Text: electronic // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, № 18. – P. 14229.
116. Harris, T.J. Adherens junctions: from molecules to morphogenesis / T.J. Harris, U. Tepass. – Text: visual // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2010. – Vol. 11. – P. 502-514.
117. Hartsock, A. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton / A. Hartsock, W.J. Nelson. – Text: visual // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. – 2008. – Vol. 1778, № 3. – P. 660-669. DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.07.012.

118. Hasenahuer, M.A. New footprints into metazoan C-1 family cadherin evolution / M.A. Hasenahuer, V.H. Casco, M.F. Izaguirre. – Text : visual // Online Journal of Bioinformatics. – 2013. – Vol. 14. – P. 76–95.

119. Hellings, P.W. Epithelial barriers in allergy and asthma / P.W. Hellings, B. Steelant. – Text: visual // Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2020. – Vol. 145, № 6. – P. 1499-1509. DOI: 10.1016/j.jaci.2020.04.010.

120. Hulpiau, P. Molecular evolution of the cadherin superfamily / P. Hulpiau, F. van Roy. – Text : visual // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. – 2009. – Vol. 41, № 2. – P. 349–369.

121. Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehaaptoglobin-2 / A. Tripathi, K.M. Lammers, S. Goldblum [et al.]. – Text: visual // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2009. – Vol. 106, No. 39. – P. 16799-16804. – DOI: 10.1073/pnas.0906773106

122. Idriss, H.T. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s) / H.T. Idriss, J.H. Naismith. – Text: visual // Microscopy Research and Technique. – 2000. – Vol. 50, № 3. – P. 184-195. DOI: 10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H.

123. Immortalization of human nasal epithelial cells using a hybrid adenovirus-12SV40 virus / A. De Fraissinette, M. Brun-Pascaud, M. Ponelle [et al.]. – Text: visual // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*. – 1995. – Vol. 31, № 1. – P. 38-45.

124. Impaired barrier function in patients with house dust mite-induced allergic rhinitis is accompanied by decreased occludin and zonula occludens-1 expression / B. Steelant, R. Farré, P. Wawrzyniak [et al.]. – Text: visual // Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2016. – Vol. 137, № 4. – P. 1043-1053.e5.

125. *In vitro* cell models to study nasal mucosal permeability and metabolism / H. P. Merkle, G. Ditzinger, S.R. Lang [et al.]. – Text: visual // Advanced Drug Delivery Reviews. – 1998. – Vol. 29, No. 1-2. – P. 51-79. DOI: 10.1016/S0169-409X(97)00061-6.

126. *In Vitro* Studies on Nasal Formulations of Nanostructured Lipid Carriers (NLC) and Solid Lipid Nanoparticles (SLN) / C.P. Costa, S. Barreiro, J.N. Moreira [et al.]. – Text: electronic // Pharmaceuticals. – 2021. – Vol. 14, № 8. – P. 711.

127. Increased Expression of TXNIP Facilitates Oxidative Stress in Nasal Epithelial Cells of Patients With Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyps / H. Lin, G. Ba, R. Tang [et al.]. – Text: visual // American Journal of Rhinology & Allergy. – 2021. – Vol. 35, № 5. – P. 607-614.

128. Induction of MMP-9 in normal human bronchial epithelial cells by TNF-alpha via NF-kappa B-mediated pathway / A. Hozumi, Y. Nishimura, T. Nishiuma [et al.]. – Text: visual // American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology. – 2001. – Vol. 281, № 6. – P. L1444-L1452.

129. Inflammation and immune dysfunction in Parkinson disease / M.G. Tansey, R.L. Wallings, M.C. Houser [et al.]. – Text: visual // Nature Reviews Immunology. – 2022. – Vol. 22, № 11. – P. 657-673.

130. Inflammatory and oxidative stress biomarkers in allergic rhinitis: the effect of smoking / K. Tanou, A. Koutsokera, T.S. Kiropoulos [et al.]. – Text: visual // Clinical and Experimental Allergy. – 2009. – Vol. 39, № 3. – P. 345-353.

131. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression / F. Wang, W.V. Graham, Y. Wang [et al.]. – Text: visual // The American Journal of Pathology. – 2005. – Vol. 166, № 2. – P. 409-419.

132. Ivanov, A.I. Endocytosis of the apical junctional complex: mechanisms and possible roles in regulation of epithelial barriers / A.I. Ivanov, A. Nusrat, C.A. Parkos. – Text: visual // BioEssays. – 2005. – Vol. 27, № 4. – P. 356-365.

133. Izaguirre, M.F. E-cadherin role in epithelial architecture maintenance / M.F. Izaguirre, D. Larrea, J.F. Adur [et al.]. – Text: visual // Cell Communication and Adhesion. – 2010. – Vol. 17, № 1. – P. 1-12.

134. Izaguirre, M.F. T3 regulates E-cadherin, and β - and α -catenin expression in the stomach during the metamorphosis of the toad *Rhinella arenarum* / M.F. Izaguirre, V.H. Casco. – Text: visual // Biotechnic & Histochemistry. – 2010. – Vol. 85, № 5. – P. 305-323.

135. Jeoung, D. Effects of Tumor Necrosis Factor- α on Antimitogenicity and Cell Cycle-related Proteins in MCF-7 Cells / D. Jeoung, B. Iangt, M. Sonenberg. – Text: visual // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1995. – Vol. 270, № 31. – P. 18367-18373.
136. Jones, C.J. Epithelia: Advances in Cell Physiology and Cell Culture / C.J. Jones. – Text: visual // 1st edition. – 1990.
137. Kress, E. Thyroid hormones and the control of cell proliferation or cell differentiation: paradox or duality? / E. Kress, J. Samarut, M. Plateroti. – Text: visual // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2009. – Vol. 313, № 1-2. – P. 36-49.
138. Kruger, N.J. The Bradford Method for Protein Quantitation / N.J. Kruger. – Text: visual // *Methods in Molecular Biology*. – 1994. – Vol. 32. – P. 9-15. DOI: 10.1385/0-89603-268-X:9.
139. Kwon, M.J. Emerging Roles of Claudins in Human Cancer / M.J. Kwon. – Text: visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2013. – Vol. 14, No. 9. – P. 18148-18180. DOI: 10.3390/ijms140918148.
140. Lal-Nag, M. The claudins / M. Lal-Nag, P.J. Morin. – Text: visual // *Genome Biology*. – 2009. – Vol. 10. – P. 235. DOI: 10.1186/gb-2009-10-8-235.
141. Leaky Gut As a Danger Signal for Autoimmune Diseases / Q. Mu, J. Kirby, C.M. Reilly [et al.]. – Text: electronic // *Frontiers in Immunology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 598.
142. Leckband, D. Mechanism and dynamics of cadherin adhesion / D. Leckband, A. Prakasam. – Text: visual // *Annual Review of Biomedical Engineering*. – 2006. – Vol. 8. – P. 259-287.
143. Lien, W.H. Dissecting the role of cadherin–catenin proteins in mammalian epidermis / W. H. Lien, E. Stepniak, V. Vasioukhin. – Text: visual // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – Vol. 105, № 39. – P. 15225-15226.
144. Liu, J. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities / J. Liu, Q. Xiao, J. Xiao [et al.]. – Text: visual // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2022. – Vol. 7, № 1. – P. 3. DOI: 10.1038/s41392-021-00762-6.

145. Liu, X. E-cadherin and gastric cancer: cause, consequence, and applications / X. Liu, K.M. Chu. – Text: visual // *BioMed Research International*. – 2014. – Vol. 2014. – P. 637308. DOI: 10.1155/2014/637308.
146. Lo, C.H. TNF receptors: Structure-function relationships and therapeutic targeting strategies / C.H. Lo. – Text: electronic // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. – 2025. – Vol. 1867, № 1. – P. 184394.
147. Local levels of soluble tumor necrosis factor receptors in patients with allergic rhinitis are regulated by amount of antigen / M. Kato, Y. Kato, K. Takeuchi [et al.]. – Text: visual // *Archives of Otolaryngology – Head & Neck Surgery*. – 2000. – Vol. 126, № 8. – P. 997-1000.
148. Lopez-Castejon, G. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion / G. Lopez-Castejon, D. Brough. – Text: visual // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. – 2011. – Vol. 22, № 4. – P. 189-195. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2011.10.001.
149. Luster, A.D. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets / A.D. Luster, R. Alon, U.H. von Andrian [et al.]. – Text: visual // *Nature Immunology*. – 2005. – Vol. 6, No. 12. – P. 1182-1190. DOI: 10.1038/ni1275.
150. Maaz, A. A Cell-Based Nasal Model for Screening the Deposition, Biocompatibility, and Transport of Aerosolized PLGA Nanoparticles / A. Maaz, I.S. Blagbrough, P.A. De Bank. – Text: visual // *Molecular Pharmaceutics*. – 2024. – Vol. 21, № 3. – P. 1108-1124.
151. McCrea, P.D. The catenin family at a glance / P.D. McCrea, D. Gu. – Text: visual // *Journal of Cell Science*. – 2010. – Vol. 123, № Pt 4. – P. 637-642.
152. Mechanical constraints to cell-cycle progression in a pseudostratified epithelium / S. Hecht, G. Perez-Mockus, D. Schienstock [et al.]. – Text: visual // *Current Biology*. – 2022. – Vol. 32, № 9. – P. 2076-2083.e2. DOI: 10.1016/j.cub.2022.03.004.
153. Mechanism of TNF- α modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression / T.Y. Ma, M.A. Boivin, D. Ye [et al.]. – Text: visual // *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2005. – Vol. 288, № 3. – P. G422-G430.

154. Mechanistic simulations of inflammation: current state and future prospects / Y. Vodovotz, G. Constantine, J. Rubin [et al.]. – Text: visual // *Mathematical Biosciences*. – 2009. – Vol. 217, № 1. – P. 1-10. DOI: 10.1016/j.mbs.2008.07.013.
155. Medler, J. Tumor Necrosis Factor Receptor 2 (TNFR2): An Emerging Target in Cancer Therapy / J. Medler, K. Kucka, H. Wajant. – Text: visual // *Cancers*. – 2022. – Vol. 14, № 11. – P. 2603. DOI: 10.3390/cancers14112603.
156. Mendonsa, A.M. E-cadherin in contact inhibition and cancer / A.M. Mendonsa, T.Y. Na, B.M. Gumbiner. – Text: visual // *Oncogene*. – 2018. – Vol. 37, № 35. – P. 4769-4780. DOI: 10.1038/s41388-018-0304-2.
157. Meng, W. Adherens junction: Molecular architecture and regulation / W. Meng, M. Takeichi. – Text: visual // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2009. – Vol. 1, № 6. – P. a002899.
158. Mercier, C. Is RPMI 2650 a Suitable *In Vitro* Nasal Model for Drug Transport Studies? / C. Mercier, N. Perek, X. Delavenne. – Text: visual // *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. – 2018. – Vol. 43, № 1. – P. 13-24.
159. Misleading Westerns: Common Quantification Mistakes in Western Blot Densitometry and Proposed Corrective Measures / T.A.J. Butler, J.W. Paul, E.C. Chan [et al.]. – Text: visual // *BioMed Research International*. – 2019. – Vol. 2019. – P. 5214821.
160. Montero-Melendez, T. Gapdh gene expression is modulated by inflammatory arthritis and is not suitable for qPCR normalization / T. Montero-Melendez, M. Perretti. – Text: visual // *Inflammation*. – 2014. – Vol. 37, No. 4. – P. 1059-1069. DOI: 10.1007/s10753-014-9829-x.
161. Moore, G.E. Studies of a human tumor cell line with a diploid karyotype / G.E. Moore, A.A. Sandberg. – Text: visual // *Cancer*. – 1964. – Vol. 17. – P. 170-175.
162. Moorhead, P. S. Human tumor cell line with a quasi-diploid karyotype (RPMI 2650) / P.S. Moorhead. – Text: visual // *Experimental Cell Research*. – 1965. – Vol. 39. – P. 190-196.
163. Morgan, S.V. Tight junction protein expression in human astrocytes / S.V. Morgan. – Sheffield: University of Sheffield, 2016. – Text: visual.

164. Morphologic changes in the cytoskeleton and adhesion apparatus during the conversion from pseudostratified single columnar to stratified squamous epithelium in the developing mouse esophagus / D. Getachew, R. Kaneda, Y. Saeki [et al.]. – Text: visual // *Congenital Anomalies*. – 2021. – Vol. 61, № 1. – P. 14-24. DOI: 10.1111/cga.12389.

165. Multiple Targets of the Canonical WNT/ β -Catenin Signaling in Cancers / Y. Lecarpentier, O. Schussler, J.L. Hébert [et al.]. – Text: visual // *Frontiers in Oncology*. – 2019. – Vol. 9. – P. 1248. DOI: 10.3389/fonc.2019.01248.

166. Nasal mucus proteomic changes reflect altered immune responses and epithelial permeability in patients with allergic rhinitis / P.V. Tomazic, R. Birner-Gruenberger, A. Leitner [et al.]. – Text: visual // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2014. – Vol. 133, № 3. – P. 741-750.

167. Nectin/PRR: an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein / K. Takahashi, H. Nakanishi, M. Miyahara [et al.]. – Text: visual // *Journal of Cell Biology*. – 1999. – Vol. 145, № 3. – P. 539-549.

168. Nelson, W.J. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways / W.J. Nelson, R. Nusse. – Text: visual // *Science*. – 2004. – Vol. 303, № 5663. – P. 1483-1487.

169. Neonatal ichthyosis-sclerosing cholangitis syndrome caused by a novel CLDN1 mutation: a case report and literature review / U. Ghosh, A. Agrawal, V.M. Srinivasan [et al.]. – Text: visual // *Clinical and Experimental Pediatrics*. – 2025. – Vol. 68, № 11. – P. 858-867.

170. Neonatal ichthyosis-sclerosing cholangitis syndrome: report of a novel mutation and a review of the literature / E. Demir, C. Tuna Kırşacıoğlu, İ.N. Saltık-Temizel [et al.]. – Text: visual // *Clinical Dysmorphology*. – 2023. – Vol. 32, № 2. – P. 88-91.

171. New Insights into NF- κ B Signaling in Innate Immunity: Focus on Immunometabolic Crosstalks / D. Iacobazzi, P. Convertini, S. Todisco [et al.]. – Text: visual // *Biology*. – 2023. – Vol. 12, № 6. – P. 776. DOI: 10.3390/biology12060776.

172. NF- κ B and apoptosis: colorectal cancer progression and novel strategies for treatment / S. Sadati, A. Khalaji, A. Bonyad [et al.]. – Text: visual // *European Journal of Medical Research*. – 2025. – Vol. 30, № 1. – P. 616. DOI: 10.1186/s40001-025-02734-w.
173. NF- κ B mediates IL-1 β - and IL-17A-induced MUC5B expression in airway epithelial cells / T. Fujisawa, M.M. Chang, S. Velichko [et al.]. – Text: visual // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 2011. – Vol. 45, № 2. – P. 246-252. DOI: 10.1165/rcmb.2009-0313OC.
174. Niessen, C.M. Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation / C.M. Niessen, D. Leckband, A.S. Yap. – Text: visual // *Physiological Reviews*. – 2011. – Vol. 91, № 2. – P. 691-731.
175. Nusse, R. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities / R. Nusse, H. Clevers. – Text: visual // *Cell*. – 2017. – Vol. 169, № 6. – P. 985-999. DOI: 10.1016/j.cell.2017.05.016.
176. Occludin S408 phosphorylation regulates tight junction protein interactions and barrier function / D.R. Raleigh, D.M. Boe, D. Yu [et al.]. – Text: visual // *Journal of Cell Biology*. – 2011. – Vol. 193, № 3. – P. 565-582.
177. Occludin TM4(-): an isoform of the tight junction protein present in primates lacking the fourth transmembrane domain / M.R. Ghassemifar, B. Sheth, T. Papenbrock [et al.]. – Text: visual // *Journal of Cell Science*. – 2002. – Vol. 115, Pt 15. – P. 3171-3180.
178. Origin of metazoan cadherin diversity and the antiquity of the classical cadherin/ β -catenin complex / S.A. Nichols, B.W. Roberts, D.J. Richter [et al.]. – Text: visual // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2012. – Vol. 109, № 32. – P. 13046–13051.
179. Otani, T. Tight Junction Structure and Function Revisited / T. Otani, M. Furuse. – Text: visual // *Trends in Cell Biology*. – 2020. – Vol. 30, № 10. – P. 805-817. DOI: 10.1016/j.tcb.2020.08.004.
180. Ozawa, M. Single amino acid substitutions in one Ca²⁺ binding site of uvomorulin abolish the adhesive function / M. Ozawa, J. Engel, R. Kemler. – Text: visual // *Cell*. – 1990. – Vol. 63, № 5. – P. 1033-1038.

181. Park-Windhol, C. Disorders of Vascular Permeability / C. Park-Windhol, P.A. D'Amore. – Text: visual // Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. – 2016. – Vol. 11. – P. 251-281. DOI: 10.1146/annurev-pathol-012615-044506.
182. Pathogen hijacks programmed cell death signaling by arginine ADPR-deacylation of caspases / T. Peng, X. Tao, Z. Xia [et al.]. – Text: visual // Molecular Cell. – 2022. – Vol. 82, № 10. – P. 1806-1820.e8. DOI: 10.1016/j.molcel.2022.03.010.
183. Pathophysiology of Crohn's disease inflammation and recurrence / L. Petagna, A. Antonelli, C. Ganini [et al.]. – Text: electronic // Biology Direct. – 2020. – Vol. 15, № 1. – P. 23.
184. Perez-Moreno, M. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions / M. Perez-Moreno, C. Jamora, E. Fuchs. – Text: visual // Cell. – 2003. – Vol. 112, № 4. – P. 535-548.
185. Pharmacological Characterization of the RPMI 2650 Model as a Relevant Tool for Assessing the Permeability of Intranasal Drugs / C. Mercier, S. Hodin, Z. He [et al.]. – Text: visual // Molecular Pharmaceutics. – 2018. – Vol. 15, № 6. – P. 2246-2256.
186. Phosphorylation of Tyr-398 and Tyr-402 in occludin prevents its interaction with ZO-1 and destabilizes its assembly at the tight junctions / B.C. Elias, T. Suzuki, A. Seth [et al.]. – Text: visual // Journal of Biological Chemistry. – 2009. – Vol. 284, № 3. – P. 1559-1569.
187. Physiological and immunological barriers in the lung / T. Kageyama, T. Ito, S. Tanaka [et al.]. – Text: visual // Seminars in Immunopathology. – 2024. – Vol. 45, № 5-6. – P. 533-547.
188. PKC ϵ regulates occludin phosphorylation and epithelial tight junction integrity / T. Suzuki, B.C. Elias, A. Seth [et al.]. – Text: visual // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2009. – Vol. 106, № 1. – P. 61-66.
189. Poly(I:C) drives type I IFN- and TGF β -mediated inflammation and dermal fibrosis simulating altered gene expression in systemic sclerosis / G.A. Farina, M.R. York, M. Di Marzio [et al.]. – Text: visual // Journal of Investigative Dermatology. – 2010. – Vol. 130, № 11. – P. 2583-2593. DOI: 10.1038/jid.2010.200.

190. Primary Human Nasal Epithelial Cell Culture / M. Terrance, T. Gunawardena, H. Ouyang [et al.]. – Text: visual // *Methods in Molecular Biology*. – 2024. – Vol. 2725. – P. 213-223. DOI: 10.1007/978-1-0716-3507-0_13.
191. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms / M. Bruewer, A. Luegering, T. Kucharzik [et al.]. – Text: visual // *The Journal of Immunology*. – 2003. – Vol. 171, № 11. – P. 6164-6172.
192. Protection from oxidative stress by thioredoxin and superoxide dismutase of mouse embryos fertilized *in vitro* / T. Nonogaki, Y. Noda, K. Narimoto [et al.]. – Text: visual // *Human Reproduction*. – 1991. – Vol. 6, № 9. – P. 1305-1310.
193. Protective effect of hydrogen sulfide on TNF- α and IFN- γ -induced injury of intestinal epithelial barrier function in Caco-2 monolayers / S.W. Chen, J. Zhu, S. Zuo [et al.]. – Text: visual // *Inflammation Research*. – 2015. – Vol. 64, № 10. – P. 789-797.
194. Raf plus TGFbeta-dependent EMT is initiated by endocytosis and lysosomal degradation of E-cadherin / E. Janda, M. Nevolo, K. Lehmann [et al.]. – Text: visual // *Oncogene*. – 2006. – Vol. 25, № 54. – P. 7117-7130.
195. Rapid nongenomic actions of thyroid hormone / Y. Hiroi, H.H. Kim, H. Ying [et al.]. – Text: visual // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – Vol. 103, № 38. – P. 14104-14109.
196. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation / D. Gérard-Monnier, I. Erdelmeier, K. Régnard [et al.]. – Text: visual // *Chemical Research in Toxicology*. – 1998. – Vol. 11, № 10. – P. 1176-1183. DOI: 10.1021/tx9701790.
197. Reconstituted Human Upper Airway Epithelium as 3-D *In Vitro* Model for Nasal Polyposis / F. De Borja Callejas, A. Martínez-Antón, I. Alobid [et al.]. – Text: visual // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9, No. 6. – P. e100537.
198. Regulation of E-cadherin endocytosis by nectin through afadin, Rap1, and p120ctn / T. Hoshino, T. Sakisaka, T. Baba [et al.]. – Text: visual // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280, № 25. – P. 24095-24103.

199. Retinoic acid and hydrocortisone strengthen the barrier function of human RPMI 2650 cells, a model for nasal epithelial permeability / L. Kürti, S. Veszelka, A. Bocsik [et al.]. – Text: visual // *Cytotechnology*. – 2013. – Vol. 65, № 3. – P. 395-406.
200. Rikitake, Y. Interactions of the cell adhesion molecule nectin with transmembrane and peripheral membrane proteins for pleiotropic functions / Y. Rikitake, Y. Takai. – Text: visual // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2008. – Vol. 65, № 2. – P. 253-263.
201. Role of tumor necrosis factor- α in the mortality of hospitalized patients with severe and critical COVID-19 pneumonia / F. Jia, G. Wang, J. Xu [et al.]. – Text: electronic // *Aging (Albany NY)*. – 2021. – Vol. 13, № 21. – P. 23895-23912.
202. Roles of epidermal growth factor receptor signaling pathway on cultured human nasal epithelial cells RPMI-2650 / G.Q. Ding, C.Q. Zheng, Y. Liu [et al.]. – Text: visual // *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. – 2009. – Vol. 44, No. 3. – P. 203-208.
203. Saint-Criq, V. Role of CFTR in epithelial physiology / V. Saint-Criq, M.A. Gray. – Text: visual // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2017. – Vol. 74, № 1. – P. 93-115. DOI: 10.1007/s00018-016-2391-y.
204. Serially Passaged Human Nasal Epithelial Cell Monolayer for *in Vitro* Drug Transport Studies / J.-W. Yoo, Y.-S. Kim, S.-H. Lee [et al.]. – Text: visual // *Pharmaceutical Research*. – 2003. – Vol. 20, No. 11. – P. 1690-1696.
205. Serum zonulin as a marker of intestinal mucosal barrier function: May not be what it seems / M. Ajamian, D. Steer, G. Rosella [et al.]. – Text: visual // *PLOS ONE*. – 2019. – Vol. 14, No. 1. – P. e0210728. DOI: 10.1371/journal.pone.0210728.
206. Shapiro, L. Structure and biochemistry of cadherins and catenins / L. Shapiro, W.I. Weis. – Text: visual // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2009. – Vol. 1, № 3. – P. a003053. DOI: 10.1101/cshperspect.a003053.
207. Sheng, Y. TNF Receptor 2 Makes Tumor Necrosis Factor a Friend of Tumors / Y. Sheng, F. Li, Z. Qin. – Text: visual // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 1170. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01170.

208. Sibinovska, N. Suitability of RPMI 2650 cell models for nasal drug permeability prediction / N. Sibinovska, S. Žakelj, K. Kristan. – Text: visual // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2019. – Vol. 145. – P. 85-95.
209. S-Nitrosation of β -catenin and p120 catenin: a novel regulatory mechanism in endothelial hyperpermeability / N. Marín, P. Zamorano, R. Carrasco [et al.]. – Text: visual // *Circulation Research*. – 2012. – Vol. 111, № 5. – P. 553-563.
210. Spatial Overlap of Claudin- and Phosphatidylinositol Phosphate-Binding Sites on the First PDZ Domain of Zonula Occludens 1 Studied by NMR / H. Hiroaki, K. Satomura, N. Goda [et al.]. – Text: visual // *Molecules*. – 2018. – Vol. 23, № 10. – P. 2465. DOI: 10.3390/molecules23102465.
211. Study of tumor necrosis factor receptor in the inflammatory bowel disease / R.F. Souza, M.A.F. Caetano, H.I.R. Magalhães [et al.]. – Text: visual // *World Journal of Gastroenterology*. – 2023. – Vol. 29, № 18. – P. 2733–2746. DOI: 10.3748/wjg.v29.i18.2733.
212. Sturgeon, C. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases / C. Sturgeon, A. Fasano. – Text: visual // *Tissue Barriers*. – 2016. – Vol. 4, No. 4. – P. e1251384. DOI: 10.1080/21688370.2016.1251384.
213. Systems Proteomics View of the Endogenous Human Claudin Protein Family / F. Liu, M. Koval, S. Ranganathan [et al.]. – Text: visual // *Journal of Proteome Research*. – 2016. – Vol. 15, No. 2. – P. 339-359. DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00769.
214. Tang, S.W. Inflammatory neuropsychiatric disorders and COVID-19 neuroinflammation / S.W. Tang, D. Helmeste, B. Leonard. – Text: visual // *Acta Neuropsychiatrica*. – 2021. – Vol. 33, № 4. – P. 165-177.
215. Th2 cytokines orchestrate the secretion of MUC5AC and MUC5B in IL-5-positive chronic rhinosinusitis with nasal polyps / Y. Zhang, L. Derycke, G. Holtappels [et al.]. – Text: visual // *Allergy*. – 2019. – Vol. 74. – P. 131-140.
216. The Basic Requirement of Tight Junction Proteins in Blood-Brain Barrier Function and Their Role in Pathologies / S. Dithmer, I.E. Blasig, P.A. Fraser [et al.]. –

Text: visual // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Vol. 25, No. 11. – P. 5601. DOI: 10.3390/ijms25115601.

217. The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover / A.H. Huber, D.B. Stewart, D.V. Laurents [et al.]. – Text: visual // The Journal of Biological Chemistry. – 2001. – Vol. 276, № 16. – P. 12301-12309.

218. 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 / M.E. Kreft, U.D. Jerman, E. Lasič [et al.]. – Text: visual // Pharmaceutical Research. – 2015. – Vol. 32, № 2. – P. 665-679. DOI: 10.1007/s11095-014-1494-0.

219. The dual role of zonula occludens (ZO) proteins / H. Bauer, J. Zweimueller-Mayer, P. Steinbacher [et al.]. – Text: visual // Journal of Biomedicine and Biotechnology. – 2010. – Vol. 2010. – P. 402593. DOI: 10.1155/2010/402593.

220. The Effect of Oxidative Stress-Induced Autophagy by Cadmium Exposure in Kidney, Liver, and Bone Damage, and Neurotoxicity / Y. Ma, Q. Su, C. Yue [et al.]. – Text: visual // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23, № 21. – P. 13491. DOI: 10.3390/ijms232113491.

221. The Evolution, Immunopathogenesis and Biomarkers of Type 2 Inflammation in Common Allergic Disorders / Y.D. Gao, Z.J. Wang, I. Ogulur [et al.]. – Text: visual // Allergy. – 2025. – Vol. 80, № 7. – P. 1848-1877.

222. The expression and tyrosine phosphorylation of E-cadherin/catenin adhesion complex, and focal adhesion kinase in invasive cervical carcinomas / H.S. Moon, W.I. Park, E.A. Choi [et al.]. – Text: visual // International Journal of Gynecological Cancer. – 2003. – Vol. 13, № 5. – P. 640-646. DOI: 10.1046/j.1525-1438.2003.13396.x.

223. The influence of absorption enhancers on nasal absorption of naloxone and naltrexone in rats / R.U. Agu, H.V. Dang, M. Jorissen [et al.]. – Text: visual // International Journal of Pharmaceutics. – 2001. – Vol. 216, № 1-2. – P. 147-155.

224. The Integrated Role of Wnt/ β -Catenin, N-Glycosylation, and E-Cadherin-Mediated Adhesion in Network Dynamics / D.A. Vargas, M. Sun, K. Sadykov [et al.]. –

Text: visual // PLOS Computational Biology. – 2016. – Vol. 12, № 7. – P. e1005007. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005007.

225. The nasal basal cell population shifts toward a diseased phenotype with impaired barrier formation capacity in allergic rhinitis / E. Ruysseveldt, B. Steelant, T. Wils [et al.]. – Text: visual // Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2024. – Vol. 154, № 3. – P. 631-643. DOI: 10.1016/j.jaci.2024.04.021.

226. The Path from Nasal Tissue to Nasal Mucosa on Chip: Part 2-Advanced Microfluidic Nasal *In Vitro* Model for Drug Absorption Testing / E. V. Koch, S. Bendas, K. Nehlsen [et al.]. – Text: visual // Pharmaceutics. – 2023. – Vol. 15, No. 10. – P. 2439. DOI: 10.3390/pharmaceutics15102439.

227. The Rheumatology Drugs for COVID-19 Management: Which and When? / F. Atzeni, I.F. Masala, J. Rodríguez-Carrio [et al.]. – Text: electronic // Journal of Clinical Medicine. – 2021. – Vol. 10, № 4. – P. 783.

228. The role of tight junctions in the pathogenesis of inflammatory bowel disease: immune modulation and barrier dysfunction / J.W. Heo, M.J. Kim, Y.J. Yang [et al.]. – Text: visual // Molecular & Cellular Toxicology. – 2025. – Vol. 21. – P. 495-506.

229. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics / D.I. Jang, A.H. Lee, H.Y. Shin [et al.]. – Text: electronic // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22, № 5. – P. 2719.

230. The Tight Junction Protein Occludin and the Adherens Junction Protein α -Catenin Share a Common Interaction Mechanism with ZO-1 / S.L. Müller, M. Portwich, A. Schmidt [et al.]. – Text: visual // The Journal of Biological Chemistry. – 2005. – Vol. 280, No. 5. – P. 3747–3756. DOI: 10.1074/jbc.M411365200

231. The Tight Junction Protein ZO-1 Is Dispensable for Barrier Function but Critical for Effective Mucosal Repair / W.T. Kuo, L. Zuo, M.A. Odenwald [et al.]. – Text: visual // Gastroenterology. – 2021. – Vol. 161, № 6. – P. 1924-1939. DOI: 10.1053/j.gastro.2021.08.047.

232. The unique-5 and -6 motifs of ZO-1 regulate tight junction strand localization and scaffolding properties / A.S. Fanning, B.P. Little, C. Rahner [et al.]. – Text: visual // *Molecular Biology of the Cell*. – 2007. – Vol. 18, № 3. – P. 721-731.

233. Tight junction dysfunction in the stratum granulosum leads to aberrant stratum corneum barrier function in claudin-1-deficient mice / T. Sugawara, N. Iwamoto, M. Akashi [et al.]. – Text: visual // *Journal of Dermatological Science*. – 2013. – Vol. 70, № 1. – P. 12-18.

234. Tight junction proteins occludin and ZO-1 as regulators of epithelial proliferation and survival / W.T. Kuo, M.A. Odenwald, J.R. Turner [et al.]. – Text: visual // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2022. – Vol. 1514, No. 1. – P. 21-33. DOI: 10.1111/nyas.14798.

235. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates / C. Zihni, C. Mills, K. Matter [et al.]. – Text: visual // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2016. – Vol. 17, No. 9. – P. 564-580. DOI: 10.1038/nrm.2016.80.

236. Tinnikov, A.A. A novel cell lysis approach reveals that caspase-2 rapidly translocates from the nucleus to the cytoplasm in response to apoptotic stimuli / A.A. Tinnikov, H.H. Samuels. – Text: visual // *PLOS ONE*. – 2013. – Vol. 8, № 4. – P. e61085. DOI: 10.1371/journal.pone.0061085.

237. TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3 / A. Amour, P.M. Slocombe, A. Webster [et al.]. – Text: visual // *FEBS Letters*. – 1998. – Vol. 435, № 1. – P. 39-44. DOI: 10.1016/s0014-5793(98)01031-x.

238. TNFR signalling and its clinical implications / W.Y. Tseng, Y.S. Huang, H.H. Lin [et al.]. – Text: visual // *Cytokine*. – 2016. – Vol. 82. – P. 23-36. DOI: 10.1016/j.cyto.2016.08.027.

239. TNF- α is involved in the abnormal thymocyte migration during experimental *Trypanosoma cruzi* infection and favors the export of immature cells / A.R. Pérez, L.R. Berbert, A. Lepletier [et al.]. – Text: visual // *PLOS ONE*. – 2012. – Vol. 7, No. 3. – P. e34360.

240. TNF- α Regulates the Glucocorticoid Receptor Alpha Expression in Human Nasal Epithelial Cells Via p65-NF- κ b and p38-MAPK Signaling Pathways / Y. Jiang, B.

Liu, X. Bao [et al.]. – Text: visual // Iranian Journal of Biotechnology. – 2023. – Vol. 21, № 1. – P. e3117. DOI: 10.30498/ijb.2022.298590.3117.

241. TNF- α , erectile dysfunction, and NADPH oxidase-mediated ROS generation in corpus cavernosum in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic rats / T. Long, G. Liu, Y. Wang [et al.]. – Text: visual // The Journal of Sexual Medicine. – 2012. – Vol. 9, № 7. – P. 1801-1814. DOI: 10.1111/j.1743-6109.2012.02739.x.

242. Tumor necrosis factor receptors: biology and therapeutic potential in kidney diseases / M.M. Speeckaert, R. Speeckaert, M. Laute [et al.]. – Text: visual // American Journal of Nephrology. – 2012. – Vol. 36, No. 3. – P. 261-270. DOI: 10.1159/000342333

243. Tumor necrosis factor-alpha inhibits trophoblast migration through elevation of plasminogen activator inhibitor-1 in first-trimester villous explant cultures / S. Bauer, J. Pollheimer, J. Hartmann [et al.]. – Text: visual // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2004. – Vol. 89, No. 2. – P. 812-822.

244. Tumor Necrosis Factor- α Increases Claudin-1, 4, and 7 Expression in Tubular Cells: Role in Permeability Changes / Y. Amoozadeh, Q. Dan, S. Anwer [et al.]. – Text: visual // Journal of Cellular Physiology. – 2017. – Vol. 232, No. 8. – P. 2210–2220. – DOI: 10.1002/jcp.25736.

245. Tumor necrosis factor- α induces a biphasic change in claudin-2 expression in tubular epithelial cells: role in barrier functions / Y. Amoozadeh, Q. Dan, J. Xiao [et al.]. – Text: visual // American Journal of Physiology-Cell Physiology. – 2015. – Vol. 309, No. 1. – P. C38-C50. DOI: 10.1152/ajpcell.00388.2014.

246. Uchimido, R. The glycocalyx: a novel diagnostic and therapeutic target in sepsis / R. Uchimido, E.P. Schmidt, N.I. Shapiro. – Text: visual // Critical Care. – 2019. – Vol. 23, № 1. – P. 16. DOI: 10.1186/s13054-018-2292-6.

247. Valitutti, F. Breaking Down Barriers: How Understanding Celiac Disease Pathogenesis Informed the Development of Novel Treatments / F. Valitutti, A. Fasano. – Text: visual // Digestive Diseases and Sciences. – 2019. – Vol. 64, No. 7. – P. 1748-1758.

248. Van Itallie, C.M. Phosphorylation of tight junction transmembrane proteins: Many sites, much to do / C.M. Van Itallie, J.M. Anderson. – Text: visual // Tissue Barriers. – 2018. – Vol. 6, No. 1. – P. e1382671. DOI: 10.1080/21688370.2017.1382671.

249. Van Loo, G. Death by TNF: a road to inflammation / G. Van Loo, M.J.M. Bertrand. – Text: visual // Nature Reviews Immunology. – 2023. – Vol. 23, No. 5. – P. 289-303. DOI: 10.1038/s41577-022-00792-3.
250. Van Roy, F. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin / F. Van Roy, G. Berx. – Text: visual // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2008. – Vol. 65, № 23. – P. 3756-3788. DOI: 10.1007/s00018-008-8281-1.
251. Vitamin-Microbiota Crosstalk in Intestinal Inflammation and Carcinogenesis / Z. Zhai, W. Dong, Y. Sun [et al.]. – Text: electronic // Nutrients. – 2022. – Vol. 14, № 16. – P. 3383.
252. Wakasugi, R. Molecular Mechanisms Regulating Vascular Endothelial Permeability / R. Wakasugi, K. Suzuki, T. Kaneko-Kawano. – Text: visual // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Vol. 25, № 12. – P. 6415. DOI: 10.3390/ijms25126415.
253. Weber, D. Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: Focus on sample preparation and derivatization conditions / D. Weber, M.J. Davies, T. Grune. – Text: visual // Redox Biology. – 2015. – Vol. 5. – P. 367-380.
254. Wengst, A. RPMI 2650 epithelial model and three-dimensional reconstructed human nasal mucosa as *in vitro* models for nasal permeation studies / A. Wengst, S. Reichl. – Text: visual // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2010. – Vol. 74, № 2. – P. 290-297.
255. Wettschureck, N. Passing the Vascular Barrier: Endothelial Signaling Processes Controlling Extravasation / N. Wettschureck, B. Strilic, S. Offermanns. – Text: visual // Physiological Reviews. – 2019. – Vol. 99, № 3. – P. 1467-1525.
256. Wnt signaling in colorectal cancer: pathogenic role and therapeutic target / H. Zhao, T. Ming, S. Tang [et al.]. – Text: visual // Molecular Cancer. – 2022. – Vol. 21, № 1. – P. 144. DOI: 10.1186/s12943-022-01616-7.
257. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities / J. Liu, Q. Xiao, J. Xiao [et al.]. – Text: visual // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2022. – Vol. 7, № 1. – Art. № 3.

258. Wood Heickman, L.K. Zonulin as a potential putative biomarker of risk for shared type 1 diabetes and celiac disease autoimmunity / L.K. Wood Heickman, M.D. DeBoer, A. Fasano. – Text: visual // *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. – 2020. – Vol. 36, No. 5. – P. e3309. DOI: 10.1002/dmrr.3309.

259. Wu, Y. TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion / Y. Wu, B.P. Zhou [et al.]. – Text: visual // *British Journal of Cancer*. – 2010. – Vol. 102, No. 4. – P. 639–644.

260. Yagi, T. Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity / T. Yagi, M. Takeichi. – Text: visual // *Genes & Development*. – 2000. – Vol. 14, № 10. – P. 1169–1180.

261. Zaidel-Bar, R. Cadherin adhesome at a glance / R. Zaidel-Bar. – Text: visual // *Journal of Cell Science*. – 2013. – Vol. 126. – P. 373-378.

262. Zebrafish E-cadherin: expression during early embryogenesis and regulation during brain development / S.G. Babb, J. Barnett, A.L. Doedens [et al.]. – Text: visual // *Developmental Dynamics*. – 2001. – Vol. 221, № 2. – P. 231–237.

263. Zhou, J. Trelagliptin Alleviates Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammation and Oxidative Stress in Acute Lung Injury Mice / J. Zhou, Z. Peng, J. Wang. – Text: visual // *Inflammation*. – 2021. – Vol. 44, № 4. – P. 1507-1517.

264. ZO-1 interactions with F-actin and occludin direct epithelial polarization and single lumen specification in 3D culture / M.A. Odenwald, W. Choi, A. Buckley [et al.]. – Text: visual // *Journal of Cell Science*. – 2017. – Vol. 130, № 1. – P. 243-259.

265. Zonula occludens-1 expression is reduced in nasal epithelial cells of allergic rhinitis patients / C.O. Siti Sarah, S.M. Nur Husna, N.Md Shukri [et al.]. – Text: visual // *PeerJ*. – 2022. – Vol. 22. – P. e13314. DOI: 10.7717/peerj.13314.

266. Zonulin as prehaptoglobin2 regulates lung permeability and activates the complement system / D. Rittirsch, M.A. Flierl, B.A. Nadeau[et al.]. – Text: visual // *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2013. – Vol. 304, No. 12. – P. L863-L872. DOI: 10.1152/ajplung.00196.2012.