

Научная статья

УДК 577.2: 606

DOI: 10.18101/2306-1995-2026-1-43-49

**ПЕРСПЕКТИВЫ МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ РИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ  
ИЗ КЛЕТОК ЛИНИИ HaCaT ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ РАЗНЫХ ФАКТОРОВ  
ДЛЯ ЗАДАЧ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ БИОМЕДИЦИНЫ**

© Капустина Юлия Алексеевна

кандидат биологических наук, доцент кафедры фармакологии,  
клинической фармакологии с курсом биохимии  
uas.2003@mail.ru

© Цыденова Александра Владимировна

студентка,  
tsydenovasasha2001gmail.com

© Сагдеева Регина Равильевна

студентка  
sagdeewaregina@yandex.ru

Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова  
Россия, 670000, г. Улан-Удэ, ул. Октябрьская, 36а

**Аннотация.** Регенеративная биомедицина — приоритетное направление, одной из задач которого является восстановление структуры и функций поврежденных тканей. Клетки линии HaCaT — спонтанно иммортализованные кератиноциты человека, в научных исследованиях активно используемые в качестве модели для изучения функций нормальных клеток кожи человека. В работе изучено влияние различных концентраций β-аланина на пролиферацию, морфофункциональное состояние кератиноцитов линии HaCaT *in vitro*. Также исследовано влияние данных условий культивирования клеток на выход рибонуклеиновых кислот. Результаты исследования демонстрируют наличие оптимального диапазона концентраций β-аланина, при котором проявляется его пролиферативное действие, а также возможность получения качественной РНК из клеток HaCaT для дальнейших молекулярно-биологических исследований.

**Ключевые слова:** β-аланин, клеточная линия HaCaT, цитопротективное действие, цитотоксичность, культивирование клеток *in vitro*, морфофункциональное состояние клеток, рибонуклеиновая кислота.

**Для цитирования**

Капустина Ю. А., Цыденова А. В., Сагдеева Р. Р. Перспективы метода выделения рибонуклеиновой кислоты из клеток линии HaCaT при воздействии разных факторов для задач регенеративной биомедицины // Вестник Бурятского государственного университета. Медицина и фармация. 2026. № 1. С. 43–49.

**Введение**

В настоящее время исследования, проводимые на клеточных культурах, занимают важное место в биомедицинских и экспериментальных работах. Использо-

зование клеток *in vitro* позволяет оценивать влияние различных веществ на жизнеспособность, пролиферацию и морфофункциональное состояние клеток в контролируемых условиях. Такой подход является удобным инструментом для предварительной оценки биологической активности соединений перед их дальнейшим исследованием в экспериментах *in vivo*.

Клеточная линия HaCaT представляет собой стабильную и хорошо изученную модель перевиваемых кератиноцитов человека. Эти клетки широко используются для исследования влияния биологически активных веществ на клеточную жизнеспособность, поскольку они устойчивы к культивированию и чувствительны к изменению состава культуральной среды. Изменение количества жизнеспособных клеток и их морфологии позволяет оценить как цитотоксические, так и пролиферативные эффекты исследуемых факторов [4; 6].

$\beta$ -аланин — одна из распространенных небелковых аминокислот, участвующая в метаболических путях, включая синтез дипептида карнозина. Аминокислота может действовать как нейромедиатор или нейромодулятор, влияет на уровень таурина и выступает в качестве конкурентного антагониста гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) [1; 2].

Актуальность исследования обусловлена потребностью регенеративной биомедицины и клеточных технологий в поиске новых условий и компонентов культивирования *in vitro*, для получения функционально полноценных клеточных материалов. Одним из компонентов, вызывающим интерес, является  $\beta$ -аланин, однако эффекты его прямого воздействия на клетки, например линии HaCaT, мало изучены [5]. Помимо оценки жизнеспособности клеток важным этапом исследования является оценка влияния аминокислоты на выделение тотальной РНК из клеток, так как ее количество и качество отражают функциональное состояние клеток, что является важным этапом на пути определения транскрипционной активности генов, кодирующих белки, которые могут существенно влиять на скорость ранозаживления. Поэтому важно получение РНК, пригодной для последующего молекулярно-биологического анализа [7; 9].

**Цель исследования** — изучить влияние различных концентраций  $\beta$ -аланина на жизнеспособность клеток HaCaT *in vitro* и на получение рибонуклеиновой кислоты.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить пролиферативный потенциал клеток линии HaCaT в присутствии разных концентраций в среде культивирования  $\beta$ -аланина *in vitro*.
2. Выявить цитотоксичную концентрацию  $\beta$ -аланина для клеток линии HaCaT.
3. Оценить выход рибонуклеиновой кислоты.

#### **Материалы и методы исследования**

Работа с клеточными культурами проводилась в условиях асептики. Клеточная линия HaCaT была приобретена в институте биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН. Клетки культивировали при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>, в CO<sub>2</sub>-инкубаторе Binder C 150 E2 (Германия). Работа с культурами осуществлялась в ламинарном боксе биологической безопасности БМБ-II-«Ламинар-С»-1,5 (Lamsystems, Россия). Для культивирования использовали среду DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 1%-ного раствора пенициллина/стрептомицина и гентамицина в объеме 100 ед/мл и 100 мкг/мл соответственно (ПанЭко, Россия), 10%-ной фетальной бычьей сыворотки (GlobalKang, Китай). Контроль включал полную сре-

ду и среду без сыворотки с добавлением 1%-ного раствора пенициллина/стрептомицина и гентамицина.

$\beta$ -аланин вносили в концентрациях 2,5, 6,2, 12,5 и 25 мг/мл в среду для культивирования. Посев клеток (пассаж 44) осуществляли в культуральных флаконах площадью 25 см<sup>2</sup> с плотностью  $1 \times 10^5$  клеток/флакон. Культивировали в течение 7 суток с заменой среды каждые 48 часов.

Оценку состояния клеток и фотодокументирование результатов осуществляли методом микроскопии с помощью инвертированного микроскопа, оснащенного цифровой камерой-видеоокуляром ToprCam 5.1 MP (сенсор Aptina MT9P001, разрешение 2 592×1 944 пикселей, производитель ToprTek Photonics). Проводили ежедневное наблюдение адгезированных клеток с сохраненной морфологией в стандартном поле зрения (увеличение  $\times 200$ ) с использованием окулярной сетки. Подсчет клеток вели с помощью счетчика клеток (RWD, Китай).

Выделение тотальной РНК осуществляли методом фенол-хлороформной экстракции с использованием реагента ExtractRNA (BioLabmix, Россия), согласно протоколу производителя. Количество полученной РНК измеряли на микроспектрофотометре (ALLSHENG, Китай).

#### **Воздействие аланина**

$\beta$ -аланин вносили в культуральную среду ДМЕМ в концентрациях 2,5, 6,2, 12,5 и 25 мг/мл во флаконы площадью 25 см<sup>2</sup>. Кроме экспериментальных групп с разной концентрацией аланина были контрольные группы, положительный контроль среда ДМЕМ с 10%-ной сывороткой и контроль отрицательный — среда без сыворотки. Оценку влияния разных концентраций аланина проводили по изменению количества клеток по сравнению с контрольными образцами.

По окончании воздействия исследуемых веществ клетки снимали с поверхности культурального пластика с использованием раствора трипсина. Получали однородную клеточную суспензию и проводили подсчет жизнеспособных клеток с помощью счетчика клеток. Количество клеток в суспензии в опытных группах при концентрации аминокислоты 2,5, 6,2, 12,5 мг/мл составило  $2,8 \times 10^6$ ,  $3,3 \times 10^6$  и  $3,0 \times 10^6$  клеток соответственно, что на 8, 26 и 15% выше данных контрольной группы. Кератиноциты линии HaCaT при микроскопировании после 7 дней культивирования имеют нормальное морфологическое состояние и сохраняют способность к адгезии и пролиферации в присутствии в среде культивирования  $\beta$ -аланина в указанных выше концентрациях. В группе с концентрацией аланина 25 мг/мл в питательной среде количество клеток составило  $1,6 \times 10^6$ , что ниже контрольных данных на 37%. При микроскопировании данной группы было отмечено много открепленных клеток.

#### **Результаты**

Кератиноциты линии HaCaT, относящиеся к эпидермальному слою кожи, обладают следующими морфологическими особенностями: округлые и полигональные мелкие до 25 мкм клетки с центрально расположенным ядром и 2–3 ядрышками, с преобладанием в цитоплазме зернистости, без отростков. Физиологические особенности кератиноцитов *in vitro* следующие: сильная адгезия (прикрепление) к культуральному пластику (поверхности), образование на поверхности монослоя, активное взаимодействие с окружающими клетками, заключающееся в тесном контакте, что демонстрировалось в поле зрения.

При анализе в положительном контроле (культуральная среда с сывороткой без добавления исследуемых концентраций аминокислоты) клетки сохраняли типичную эпителиальную морфологию, высокую степень адгезии и пролиферативную активность. Клеточный монослой был равномерным, без признаков деструкции, что соответствовало нормальному уровню жизнеспособности (рис. 1а).

В негативном контроле (культивирование в среде без сыворотки) отмечалось снижение плотности клеточного монослоя, замедление пролиферации и появление слабоадгезивных клеток, что свидетельствовало о снижении метаболической активности и жизнеспособности (рис. 1б).

В культуре клетки эпидермиса кератиноциты адгезивны к поверхности, способны активно делиться в среде ДМЕМ с 10% фетальной бычьей сывороткой, и с добавлением аминокислоты в концентрациях 2,5, 6,2, 12,5 мг/мл образовывать монослой, т. е. функционировать как полноценные клеточные системы (рис. 2).

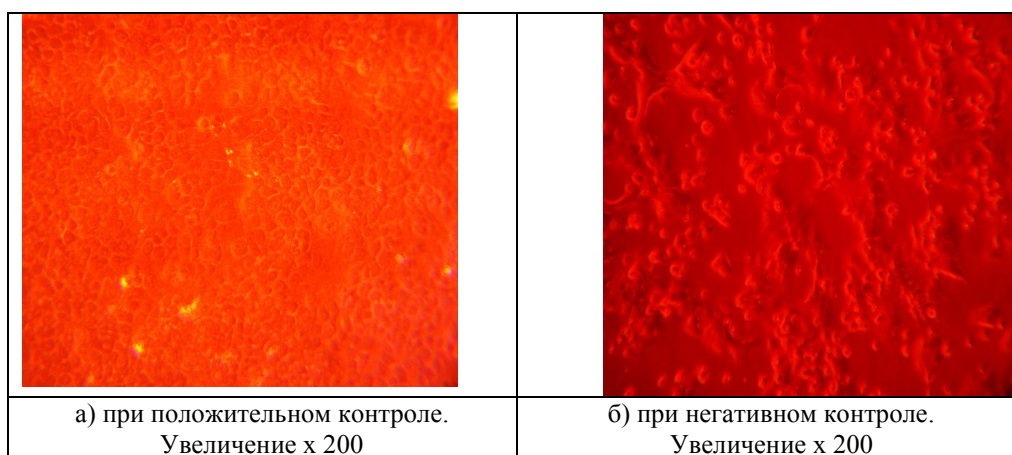


Рис. 1. Клетки линии NaCaT (P44) в среде с фетальной сывороткой и без добавления сыворотки

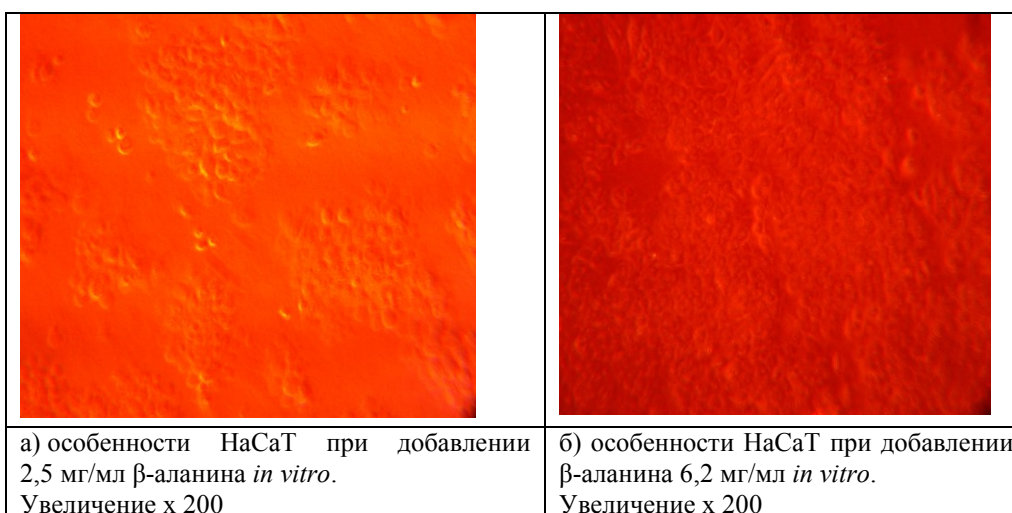


Рис. 2. Клетки линии NaCaT (P44) при введении в среду β-аланина 2,5 и 6,2 мг/мл

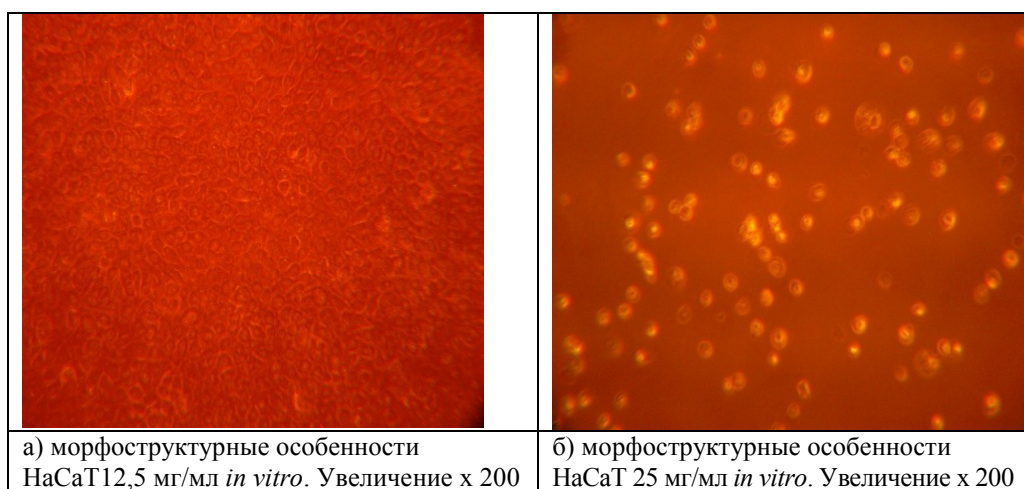


Рис. 3. Клетки линии HaCaT (P44) при введении в среду  $\beta$ -аланина 12,5 и 25 мг/мл

В целом в экспериментальных группах аланин продемонстрировал умеренный пролиферативный эффект, наиболее выраженный в концентрациях  $\beta$ -аланина 6,2, 12,5 мг/мл. При сравнительном анализе контрольных и экспериментальных групп выявлены статистически и биологически значимые различия в жизнеспособности и морфофункциональном состоянии клеток линии HaCaT при концентрации 25 мг/мл. При концентрации 25 мг/мл аминокислоты жизнеспособность клеток была снижена по сравнению с группами 2,5, 6,2, 12,5 мг/мл, что проявлялось в виде цитотоксичности (рис. 3б).

Выделение рибонуклеиновой кислоты методом фенол-хлороформной экстракции с использованием реактива «Лира» компании ООО «BIOLABMIX» (Россия) производили в несколько этапов, включавших удаление из раствора углеводов, липидов, белков. По окончании с помощью спектрофотометра Nano-500 провели измерение концентрации выделенной РНК (рис. 4). В завершение эта выделенная РНК послужит для дальнейшего молекулярного биологического исследования экспрессии генов белков, кератиноцитов и ламинина.

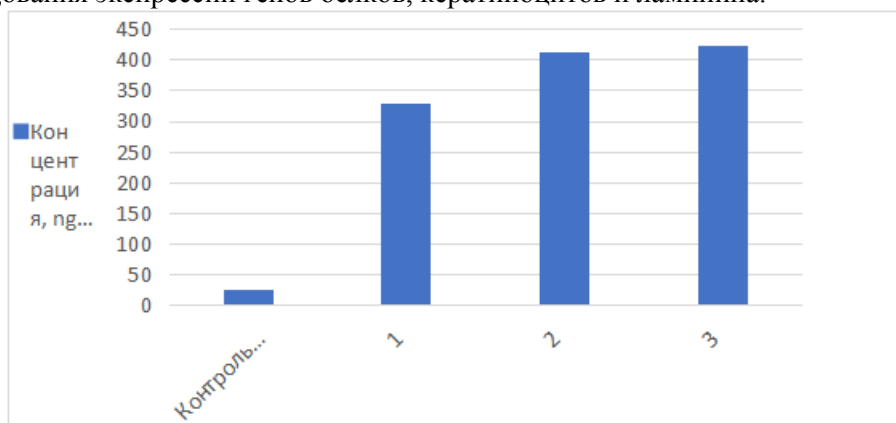


Рис. 4. Концентрация выделенной РНК из клеток линии HaCaT при воздействии различных концентраций  $\beta$ -аланина

На рисунке 4 отражены значения концентрации РНК в исследуемых группах. К<sup>+</sup> — позитивный контроль, последующие группы 1, 2, 3 — с добавлением β-аланина в концентрациях 2,5, 6,2 и 12,5 мг/мл соответственно. Установлено, что во всех экспериментальных группах наблюдается значительное увеличение концентрации РНК по сравнению с контролем (25,742 нг/мл). Максимальные значения достигнуты при концентрациях β-аланина 6,2–12,5 мг/мл, концентрация РНК составила 411–424 нг/мл.

#### Выводы

1. Клеточная линия кератиноцитов человека HaCaT является воспроизводимой и информативной моделью *in vitro* для оценки цитотоксичности и цитопротективного потенциала биологически активных веществ, применяемых в дерматологии и регенеративной медицине.

2. β-Аланин в диапазоне концентраций 2,5–12,5 мг/мл оказывает умеренно выраженное цитопротективное действие на клетки HaCaT, способствуя сохранению их морфофункционального состояния и жизнеспособности по сравнению с данными контрольных групп. Было установлено, что концентрация β-аланина 25 мг/мл в среде культивирования клеток HaCaT является цитотоксичной.

3. Концентрация аминокислоты в среде культивирования влияет на пролиферацию клеток линии HaCaT и на выход РНК.

#### Литература

1. Эффект β-аланина на гуморальный иммунный ответ в низкодозовой модели аллергии / Д. Б. Чудаков, О. Д. Коцарева, Д. С. Царегородцева [и др.] // Медицинская иммунология. 2021. № 23(1). С. 127–136.
2. Shetewy A., Shimada-Takaura K., Warner D., Jong C. J., Al Mehdi A.-B., Alexeyev M., Takahashi K., Schaffer S. W. Mitochondrial defects associated with β-alanine toxicity: relevance to hyper-beta-alaninemia. *Mol. Cell. Biochem.* 2016; 416; 1–2: 11–22.
3. Перспективы развития биомедицинских технологий в диссертационных исследованиях за 60 лет (1963–2023 гг.) / составитель Г. Ф. Цымбалов. Берлин, 2023. 155 с.
4. Современные методы исследования в клеточной биологии и медицине: сборник трудов всероссийской конференции (Орел, 16–17 ноября 2023 г.) / Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, ОГУ им. И. С. Тургенева; редколлегия А. Ю. Абрамов [и др.]. Орел: Изд-во ОГУ им. И. С. Тургенева, 2023. С. 57–500.
5. Gemelli T., de Andrade R. B., Rojas D. B. et al. Chronic Exposure to β-Alanine Generates Oxidative Stress and Alters Energy Metabolism in Cerebral Cortex and Cerebellum of Wistar Rats. *Mol. Neurobiol.* 2018; 55(6): 5101–5110.
6. Meftahi G. H., Jahromi G. P. Biochemical Mechanisms of Beneficial Effects of Beta-Alanine Supplements on Cognition. *Biochemistry (Mosc).* 2023; 88(8): 1181–1190.
7. Cai J., Zhou X., Zhuang Y. et al. Reprogramming of fatty acid metabolism via PPARα-orchestrated FADS2 in keratinocytes modulates skin inflammation in psoriasis. *Adv Sci (Weinh).* 2025; 12(40): e17049.
8. Klinitz F. J., Shen Y., Repetto F. et al. Keratinocytes as active regulators of cutaneous and mucosal immunity: a systematic review across inflammatory epithelial disorders. *Front Immunol.* 2025; 17(16): 1694066.

9. Huang J., Sati S., Ahart O., Rapp-Reyes E., Zhou L., Micheletti R. G., James W. D., Rosenbach M., Leung T. H. SAA1/FPR2 signaling between keratinocytes and neutrophils sustains chronic inflammation in Sweet syndrome. *J Clin Invest.* 2025; 19, 135(20): e193566.

Статья поступила в редакцию 30.03.2026; одобрена после рецензирования 03.04.2026; принята к публикации 09.04.2026.

### Prospects for RNA Isolation from HaCaT Cells under Varying Factors for Applications in Regenerative Biomedicine

*Yuliya A. Kapustina*  
Cand. Sci. (Biol.), A/Prof.  
uas.2003@mail.ru

*Aleksandra V. Tsydenova*  
Student  
tsydenovasasha2001gmail.com

*Regina R. Sagdeyeva*  
Student  
sagdeewaregina@yandex.ru

Dorzhi Banzarov Buryat State University  
36a Oktyabrskaya St., Ulan-Ude 670002, Russia

*Abstract.* Regenerative biomedicine is an interdisciplinary field focused on repairing, replacing, or regenerating damaged human cells and tissues. HaCaT cells are spontaneously immortalized human keratinocytes, actively used in scientific research as a model for studying the functions of normal human skin cells. We have investigated the effect of various concentrations of alanine on the viability and morphofunctional state of HaCaT cells *in vitro*. The cells were cultured under standard conditions with the addition of alanine at concentrations of 2.5, 6.2, 12.5, and 25 mg/ml. Microscopic morphology analysis and counting viable cells have shown a dose-dependent effect of alanine on HaCaT cells: at low and medium concentrations (2.5–12.5 mg/ml) cell viability and proliferative activity are maintained, while high concentrations (25 mg/ml) cause a pronounced cytotoxic effect. We have also investigated the effect of these cell culture conditions on the yield of ribonucleic acids. The results of the study confirm the existence of an optimal range of  $\beta$ -alanine concentrations, at which its cytoprotective effect is manifested, and also demonstrate the possibility of obtaining high-quality RNA from HaCaT cells for further molecular biology studies.

*Keywords:*  $\beta$ -alanine, HaCaT cell line, cytoprotective effect, cytotoxicity, *in vitro* cell culturing, morphofunctional state of cells, ribonucleic acid.

#### *For citation*

Kapustina Yu. A., Tsydenova A. V., Sagdeyeva R. R. Prospects for RNA isolation from HaCaT cells under varying factors for applications in regenerative biomedicine. *Bulletin of Buryat State University. Medicine and Pharmacy.* 2026; 1: 43–49 (In Russ.).

*The article was submitted 30.03.2026; approved after reviewing 03.04.2026; accepted for publication 09.04.2026.*