

3. Human Papillomavirus and Related Diseases in Russian Federation / L Bruni, G Albero, B Serrano [et al.]. – ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). – Barcelona, Spain: 2023. – 164 p.
4. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2024624660 Российская Федерация. База данных мониторинга отношения к вакцинации обучающихся медицинских и немедицинских высших учебных заведений : № 2024623169 : заявл. 24.07.2024 : опубл. 23.10.2024 / А. С. Нечитайло, А. А. Косова, П. Л. Шулев [и др.] ; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Уральский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации.
5. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2024669673 Российская Федерация. Классификатор модуля отношения индивида к вакцинопрофилактике «ImmuMind» : № 2024667325 : заявл. 25.07.2024 : опубл. 20.08.2024 / А. С. Нечитайло, А. А. Косова, В. И. Чалапа [и др.] ; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования "Уральский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации.
6. Мелкумян, Э.Х. Выявление информированности женщин о вакцинации против вируса папилломы человека / Э.Х. Мелкумян, И.В. Гамова // Бюллетень медицинских интернет-конференций. – 2019. – №9 (1). – С. 50.
7. Knowledge about HPV and vaccination among young adult men and women: Results of a national survey / N.L. Kops, G.F. Hohenberger, M. Bessel [et al.] // Papillomavirus Res. – 2019. – Vol. 7. – P. 123– 128.

Сведения об авторах

Е.А. Балабанова* – студент

М.А. Фролова – студент

А.С. Нечитайло – ассистент кафедры

Information about the authors

E.A. Balabanova* – Student

M.A. Frolova – Student

A.S. Nechitailo – Department assistant

***Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):**

ekaterina.basova02@mail.ru

УДК: 576.08

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПОДСЧЕТА КЛЕТОК В 3D КУЛЬТУРАХ С ПОМОЩЬЮ ИЗМЕРЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА РНК

Бехтер Алексей Андреевич¹, Корнилов Даниил Олегович¹, Симарзина Вероника Михайловна¹, Зорников Данила Леонидович¹, Фадеев Федор Алексеевич^{1,2}

¹Кафедра медицинской микробиологии и клинической лабораторной диагностики

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

²ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Существующие методы подсчета клеток в 3D– культурах, такие как ручной подсчет и автоматизированные системы, имеют значительные недостатки. Ручной подсчет требует сравнительно много времени и подвержен влиянию человеческого фактора, что делает его ненадежным для доклинических и поисковых исследований. Автоматизированные системы, хотя и более быстрые, но зачастую неспособны к точному подсчету клеток в 3D– культурах, особенно когда образцы являются гетерогенными. **Цель исследования** – разработать способ подсчета клеток в 3D– культурах с помощью измерения количества РНК. **Материал и методы.** Для создания трехмерных культур клеток использовались первичные хондроциты. Сфероиды культивировались в течение 7 дней, при этом среду обновляли по необходимости. Для количественной оценки РНК и ДНК использовали флуориметр Qubit 2.0. При измерении флуоресценции концентрацию РНК и ДНК определяли на основе стандартной кривой, построенной с использованием предоставленных стандартов РНК и ДНК. **Результаты.** В ходе исследования было проанализировано 15 образцов 2D– и 3D– культур. Были выявлены значительные расхождения в результатах, связанные с использованием связывающего раствора. Отсутствие консерванта ST– 100 значительно снижало выход РНК в контрольных образцах, что подчеркивает важность условий хранения. Анализ жизнеспособности показал преобладание живых клеток с некротическим ядром в центре сфероидов, что указывает на особенности метаболизма и выживаемости в 3D– культурах. **Выводы.** Исследованный способ может в перспективе стать точным методом подсчета количества клеток в 3D– культурах, однако требует изучения, дальнейшей доработки и валидации.

Ключевые слова: 3D– культура, количество клеток, выделение нуклеиновых кислот, определение концентрации РНК, флуориметрия.

DEVELOPING A METHOD FOR CELL COUNTING IN 3D CULTURES BY MEASURING RNA LEVEL

Bekhter Aleksei Andreevich¹, Kornilov Daniil Olegovich¹, Simarzina Veronika Michailovna¹, Zornikov Danila Leonidovich¹, Fadeev Fedor Alekseevich^{1,2}

¹Department of Medical Microbiology and Clinical Laboratory Diagnostics,
Ural State Medical University

²GUZ SB Institute of Medical Cell Technologies
Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. Existing methods of cell counting in 3D cultures, such as manual counting and automated systems, have significant drawbacks. Manual counting is relatively time-consuming and subject to human error, making it unreliable for preclinical and exploratory studies. Automated systems, although faster, are often incapable of accurate cell counting in 3D cultures, especially when samples are heterogeneous. **The aim of the study** was to develop a method to count cells in 3D cultures by measuring the amount of RNA. **Material and Methods.** Primary chondrocytes were used to create 3D cell cultures. Spheroids were cultured for 7 days, with the medium renewed as needed. A Qubit 2.0 fluorimeter was used to quantify RNA and DNA. Fluorescence was measured, and RNA and DNA concentrations were determined from a standard curve constructed using the provided RNA and DNA standards. **Results.** Fifteen 2D and 3D culture samples were analyzed in this study. Significant discrepancies in results were found related to the use of binding solution. The absence of ST-100 preservative significantly reduced RNA yield in control samples, which emphasizes the importance of storage conditions. Viability analysis showed a predominance of living cells with necrotic nucleus in the center of spheroids, indicating peculiarities of metabolism and survival in 3D-cultures. **Conclusions.** The investigated method may potentially become an accurate method for cell counting in 3D cultures, but requires study, further refinement and validation.

Keywords: 3D culture, cell count, nucleic acid isolation, RNA concentration determination, fluorimetry.

ВВЕДЕНИЕ

3D-культура клеток – это искусственно созданная модель, в которой клетки могут расти и взаимодействовать с окружающей средой во всех трех измерениях. В отличие от клеток в монослое, 3D-культура позволяет *in vitro* имитировать условия *in vivo*. 3D-культивирование используется в исследованиях уже несколько десятилетий и применяется для создания точных клеточных моделей *in vitro* [1]. Существующие методы подсчета клеток в 3D-культурах, такие как ручной подсчет и автоматизированные системы, имеют значительные недостатки. Ручной подсчет требует сравнительно много времени и подвержен влиянию человеческого фактора, что делает его ненадежным для доклинических и поисковых исследований. Автоматизированные системы, хотя и более быстрые, но зачастую неспособны к точному подсчету клеток в 3D-культурах, особенно когда образцы являются гетерогенными. К примеру, традиционные источники света для флуоресцентной микроскопии, такие как ртутные и ксеноновые лампы, а также лазеры, могут иметь серьезные недостатки в виде отсутствия монохроматичности, высокой теплогенерации, ограниченного срока службы и возможных искажений из-за когерентных эффектов [2]. Диаметр капилляра в кварцевой камере большинства проточных цитометров составляет не более 20 микрон, тогда как диаметр сфероидов обычно варьируется от 70 микрон до нескольких миллиметров, что делает невозможным проведение анализа на данном типе оборудования, из-за высокой вероятности его повреждения [3]. Использование определения концентрации ДНК также имеет весомый недостаток – необходимость определения стадии клеточного цикла, так как в разные стадии жизненного цикла клетки погрешность подсчета количества клеток может достигать 50%. Все эти недостатки дополняются крайне высокой стоимостью используемого в перечисленных методах оборудования и расходных материалов. Определение концентрации РНК в образце культур клеток при относительно низкой стоимости и доступности, обладает высокой точностью и может стать хорошим подспорьем в подсчете количества клеток в 3D-культурах [4].

Цель исследования – разработать способ подсчета клеток в 3D-культурах с помощью измерения количества РНК.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток

Для создания трехмерных культур клеток использовались первичные хондроциты. В качестве контрольных клеток использовались первичные хондроциты, клетки линий SCP и

НАСАТ. Клетки культивировали во флаконах T- 25 (Sarstedt, Germany) с адгезивным покрытием в среде с содержанием DMEM (Servicebio, China) или Chondrocyte basal medium (для первичных хондроцитов) 88%, FBS 10%, L- глутамина 0,01%, раствора пенициллина, стрептомицина и амфотерицина В (1:1:1) 0,01%, в CO₂ инкубаторе (Panasonic (Sanyo) MCO-15A, Japan) с концентрацией CO₂ 5%, при температуре 37 °С. Сфероиды формировали с помощью размещения клеточной суспензии на 3% агарозном геле в 24- луночной планшете (Sarstedt, Germany). Сфероиды формировались в течение 24 часов. Сфероиды культивировались в течение 7 дней, при этом среду обновляли по необходимости. По истечении 7 дней часть сфероидов консервировали с помощью реагента ST- 100 (Биоламбикс, Россия).

Измерение концентрации ДНК и РНК

В среднем каждый сфероид состоял из 1 миллиона клеток. Тотальную РНК выделяли из сфероидов с использованием набора для выделения РНК RUpplus- 50 'Набор для выделения РНК на колонках модифицированный' (Биоламбикс, Россия). Вместе с набором для выделения использовался набор Cleanup Standard (Eurogen, Germany). Для количественной оценки РНК и ДНК использовали флуориметр Qubit 2.0 (Invitrogen, USA), набор для анализа РНК Equalbit RNA BR Assay Kit (Vazyme, China), набор для анализа ДНК QuDye dsDNA BR Assay Kit (Lumiprobe, Россия). При измерении флуоресценции концентрацию РНК и ДНК определяли на основе стандартной кривой, построенной с использованием предоставленных стандартов РНК и ДНК. Чтобы оценить корреляцию между количеством РНК и ДНК и количеством клеток, рассчитывали концентрацию РНК и ДНК на клетку для каждого сфероида. Расчет производился по следующей формуле $X \cdot 1000000 / 20000$ для РНК и $Y \cdot 1000000 / 6000$ для ДНК, где X – концентрация РНК в мкг/мл, Y – концентрация ДНК в мкг/мл [5].

Оценка жизнеспособности

Для части сфероидов проводили оценку жизнеспособности с помощью окраски набором Apoptosis/ Necrosis Assay Kit (blue, green, red) (Abcam, UK). В соответствии с инструкцией производителя, сфероиды окрашивали и анализировали жизнеспособность при флуоресцентной микроскопии на микроскопе NIB620FL (Nexscope, China).

Статистические методы

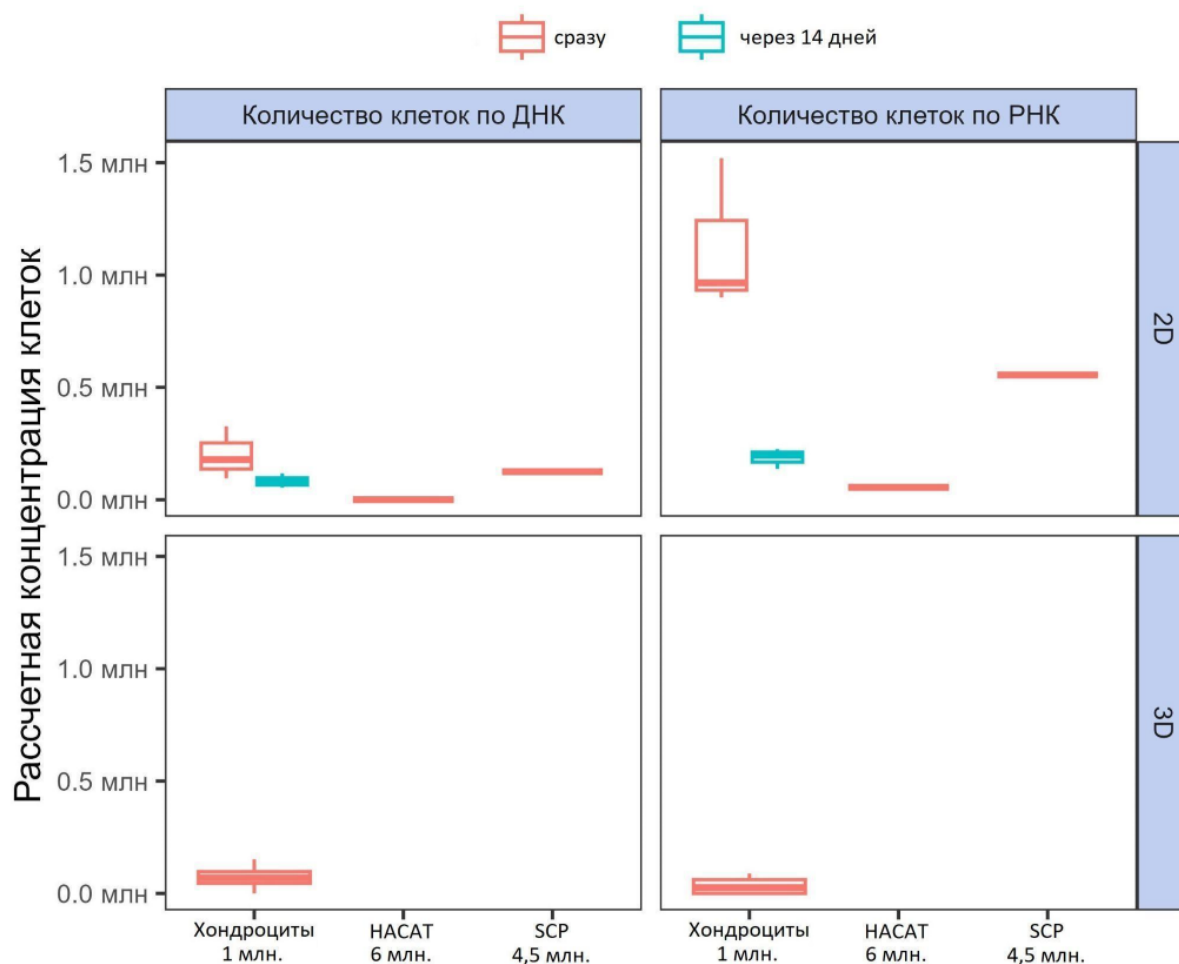
Статистическую обработку данных проводили с помощью R- 4.4.3 (сборка от 28 февраля 2024 г.). В качестве меры центральной тенденции при описании переменных указывали медиану со значениями 1- го и 3- го квартилей.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Во время выполнения работы было проанализировано 15 образцов 2D и 3D культур. Результаты включали ожидаемое количество клеток, концентрацию РНК и ДНК, а также количество клеток, рассчитанное на основе измерений РНК и ДНК. Все образцы были разделены на 4 группы: Сфероиды на плоскости (3 образца), сфероиды на плоскости со связывающим раствором (2 образца), сфероиды в лунке со связывающим раствором (2 образца) и контрольные 2D- культуры (8 образцов).

На рисунке (Рис. 1) представлены результаты, полученные при определении количества нуклеиновых кислот в 2D- культурах.

Консервация клеток



Линии клеток

Рис. 1 «Определение количества нуклеиновых кислот в 2D– культурах»

При выделении нуклеиновых кислот из образцов клеток НАСАТ (1.1– 1.1; M=1.1 (Q1– Q3:1.1– 1.1)) и SCP (11.1– 11.1; M=11.1 (Q1– Q3:11.1– 11.1)) выход РНК был соответственно в 17,5 и 1,73 раза меньше чем из образцов хондроцитов с немедленной консервацией (18– 30.4; M=19.3 (Q1– Q3:18.6– 24.9)). При этом выход ДНК в данных группах не отличался. Выход РНК из образцов хондроцитов с немедленной консервацией был в 4,8 раз больше, чем из образцов хондроцитов после 14 дней хранения.

На Рисунке 2 представлены результаты, полученные при сравнении сфероидов, в зависимости от того, добавлялся ли к ним при выделении нуклеиновых кислот связывающий раствор.

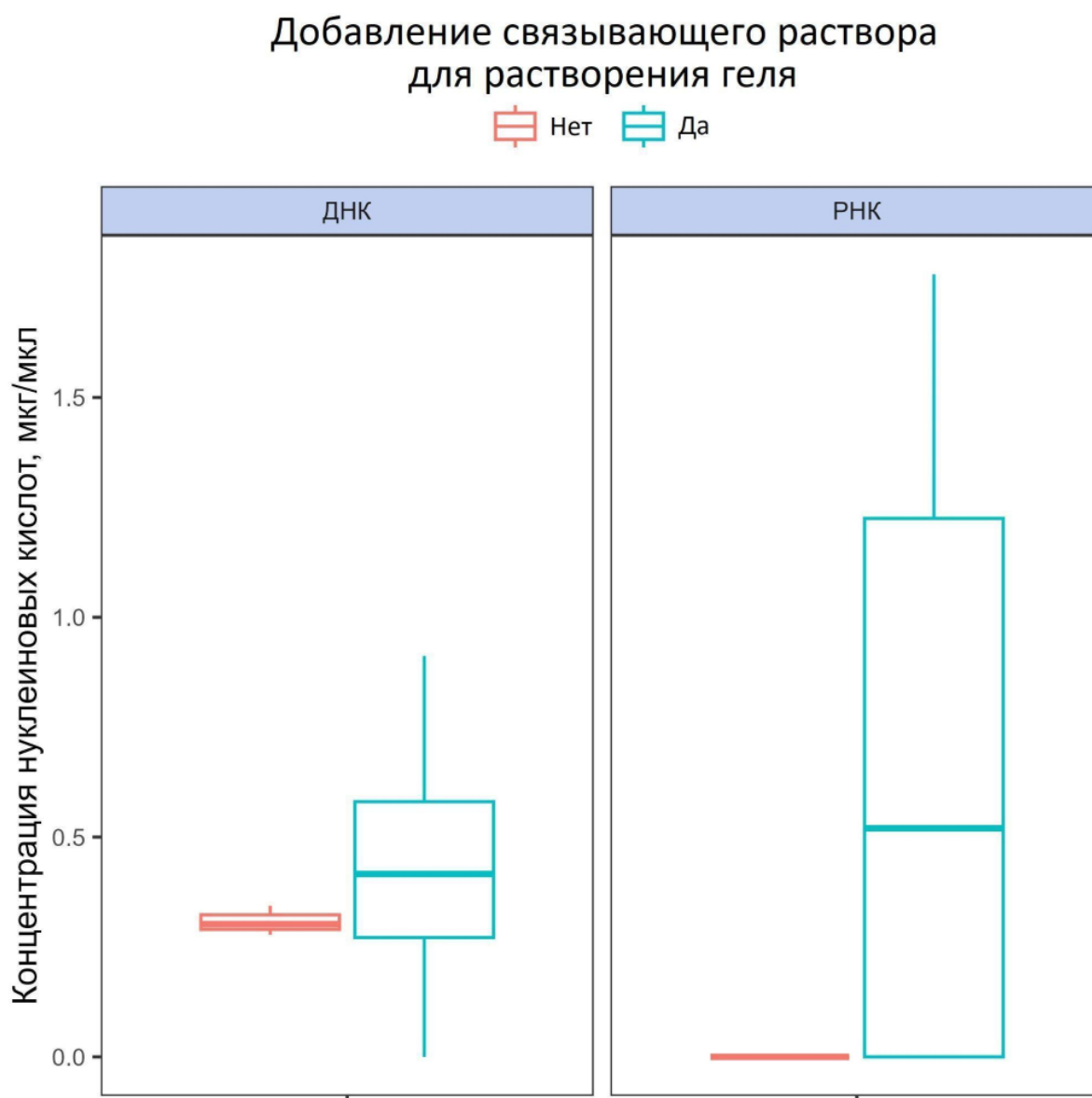
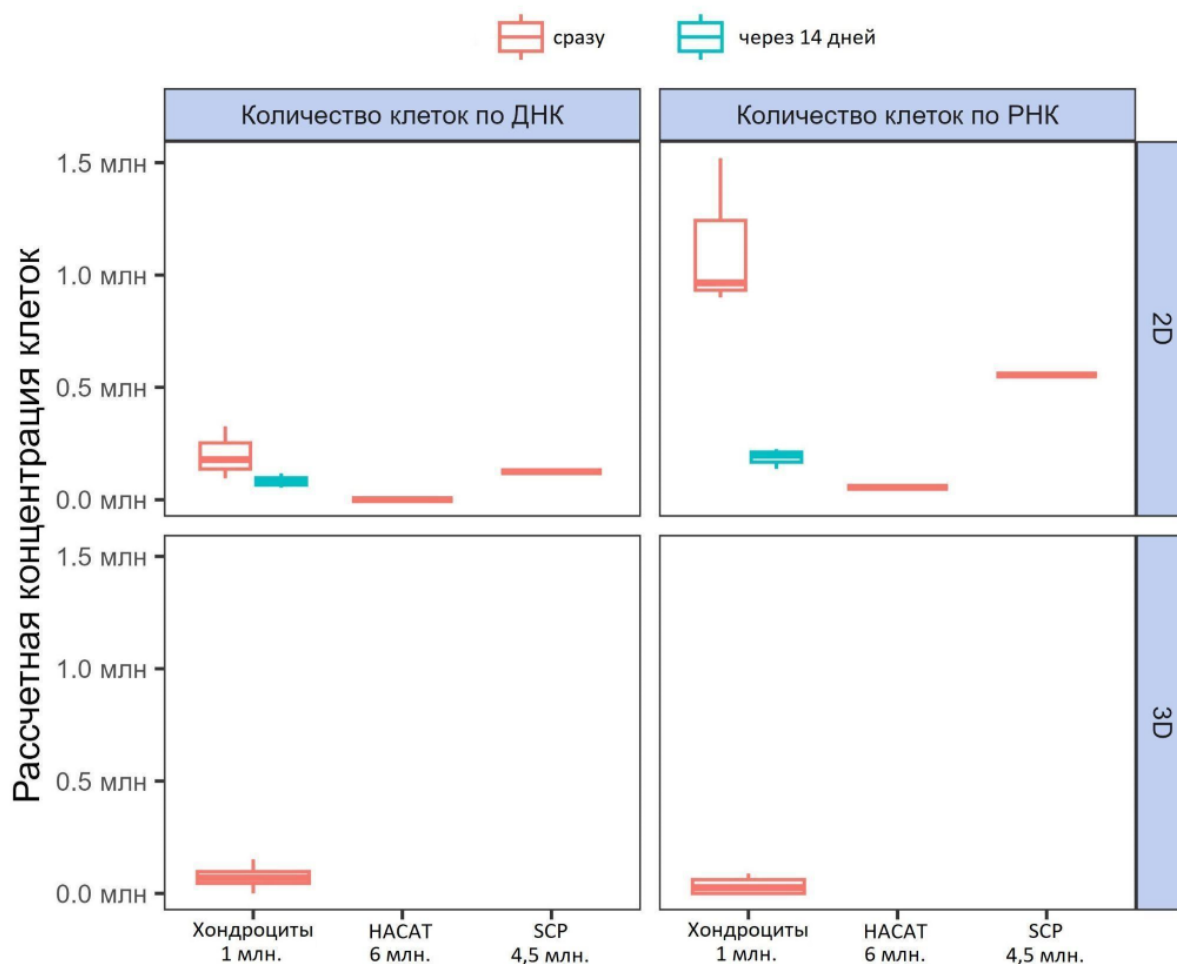


Рис. 2 Определение количества нуклеиновых кислот в 3D– культурах.

При выделении нуклеиновых кислот с добавлением связывающего раствора удалось определить количество РНК (0– 1.8; $M=0.5$ ($Q1-Q3:0-1.2$)), в отличие от выделения без него. Выход ДНК в данных группах не отличался. Не удалось определить количество РНК в образцах из группы сфероидов в лунке, вне зависимости от добавления связывающего раствора.

На Рисунке 3 представлены результаты, полученные при определении расчетного количества клеток в 2D– культурах, в сравнении с 3D– культурами.

Консервация клеток



Линии клеток

Рис. 3 Расчетное количество клеток в 2D– и 3D– культурах

Во всех образцах из группы хондроцитов с немедленной консервацией количество клеток, рассчитанное по количеству РНК, соответствовало ожидаемому, что составило 20% исследованных образцов (900000– 1520000; M=965000 (Q1– Q3:932500– 1242500)). Во всех остальных исследованных образцах количество клеток по количеству РНК было значительно ниже ожидаемого. Во всех исследованных образцах расчетное количество клеток по концентрации ДНК было значительно ниже ожидаемого.

При исследовании жизнеспособности с помощью окраски набором Apoptosis/ Necrosis Assay Kit (blue, green, red) (Abcam, UK) при флуоресцентной микроскопии наблюдалось большое количество жизнеспособных клеток (голубая окраска; подсчет был затруднен в связи с 3х– мерным расположением клеток) и незначительное количество апоптотических клеток (зеленая окраска; при 100х увеличении 1– 2 в поле зрения). В центре сфероиды было обнаружено некротическое ядро (красная окраска).

ОБСУЖДЕНИЕ

В образцах из группы контрольных 2D– культур низкое количество клеток после измерения при первоначальных 4.5 и 6 миллионов клеток объясняется хук– эффектом так– как, было превышено количество анализа, рекомендуемое инструкцией к набору для выделения (3 миллиона животных клеток). Относительно низкое количество РНК и ДНК в образцах группы контрольных 2D– культур может быть вызвано отсутствием консервации с помощью реагента ST– 100, что по всей видимости приводило к разрушению нуклеиновых кислот (особенно РНК) в образцах за 2 недели после снятия клеток с планшета. Эффективность консерванта ST– 100 подтверждают остальные образцы из группы

контрольных 2D– культур, которые были проанализированы так же, как и предыдущие через 2 недели, но находились в консерванте. Почти полное отсутствие РНК и ДНК в образцах сфероидов на плоскости объясняется незавершенностью на тот момент протокола выделения, так как сфероиды формировались на агарозном геле. При их извлечении часть геля неизбежно попадает в пробу вместе со сфероидом. Агарозный гель может связывать РНК, что снижает эффективность ее извлечения. Фрагменты агарозы могут загрязнять конечный продукт, что приводит к снижению чистоты РНК [6]. Поэтому в протокол выделения был добавлен коммерческий набор Cleanup Standard, каждую пробу ресуспендировали в 50 мкл связывающего раствора S с дальнейшей инкубацией при 37 градусах в течение 15 минут. Эффективность внесенных изменений подтверждается образцами из группы сфероидов на плоскости со связывающим раствором, в которых значительно увеличилось количество РНК и ДНК. Образцы сфероидов в лунке со связывающим раствором имеют результаты ниже чувствительности прибора и требуют дальнейшего изучения. Различия между ожидаемым количеством клеток и расчетным в образцах из группы сфероидов на плоскости со связывающим раствором могли быть объяснены наличием в сфероидах некротического центра, который формировался из– за чрезмерно большого размера сфероидов. Исследованный способ может в перспективе стать точным методом подсчета количества клеток в 3D– культурах, однако требует изучения, дальнейшей доработки и валидации.

ВЫВОДЫ

1. Удалось предсказать количество клеток по уровню РНК у 2D культур, которые хранились в консерванте ST– 100. В остальных пробах не удалось предсказать количество клеток по уровню РНК.
2. Добавление в протокол выделения связывающего раствора увеличивает выход РНК и ДНК при выделении из 3D культур, выращенных на агарозном геле.
3. Хранение образцов перед выделением в консерванте ST– 100 позволяет сохранить значительную часть РНК и ДНК в течение 14 дней после снятия клеток, тогда как из образцов без ST– 100 не получилось выделять детектируемые уровни РНК и ДНК.
4. В 3D культурах было обнаружено некротическое ядро, способное создать расхождение между ожидаемыми и полученными результатами.
5. Необходимо дальнейшее изучение сфероидов, сформированных в лунке агарозного геля, которые показали нулевой выход по РНК.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Fey, S. J. Determination of Acute Lethal and Chronic Lethal Thresholds of Valproic Acid using 3D Spheroids Constructed from the Immortal Human Hepatocyte Cell Line Hepg2 C3A / S. J. Fey, K. Wrzesinski // Valproic Acid. – Nova Science Publishers. – 2013. – P. 141– 165.
2. LEDs for fluorescence microscopy / Young I. T. et al. // Three– dimensional and multidimensional microscopy: image acquisition and processing XI. – SPIE. – 2004. – Vol. 5324. – P. 208– 215.
3. Скапцов, М. В. Содержание ядерной ДНК в некоторых сортах растений, используемых в качестве внешних стандартов в проточной цитометрии / М. В. Скапцов, С. В. Смирнов, М. Г. Куцев // Turczaninowia. – 2014. – Т. 17, №. 3. – С. 72– 78.
4. Precise RNA quantification by counting individual RNA molecules using high– sensitivity capillary flow cytometry / H.B. Yoo, S. R. Park, K.S. Hong, I. Yang // Analytical Chemistry. – 2022. – Vol. 94, №. 3. – С. 1752– 1759.
5. Relationship between RNA content and progression of lymphocytes through S phase of cell cycle / Z. Darzynkiewicz, D. Evenson, L. Staiano-Coico [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1979. – Vol. 76, №. 1. – С. 358– 362.
6. A modified cotton– wool column method for the rapid recovery of DNA from agarose gel slice / B. Liu, W. Xu, Z. Luo, Q. Liu // Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology. – 2008. – Vol. 16, №. 1. – P. 55– 61.

Сведения об авторах

А.А. Бехтер – студент
Д.О. Корнилов* – ассистент кафедры
В.М. Симарзина – ассистент кафедры
Д.Л. Зорников – кандидат медицинских наук, доцент
Ф.А. Фадеев – кандидат биологических наук, доцент.

Information about the authors

A.A. Bekhter – Student
D.O. Kornilov* – Department Assistant
V.M. Simarzina – Department Assistant
D.L. Zornikov – Candidate of Sciences (Medicine), Associate Professor
F.A. Fadeev – Candidate of Sciences (Medicine), Associate Professor

УДК: 618.1

ЗАБОЛЕВАНИЯ ЖЕНСКОЙ ПОЛОВОЙ СФЕРЫ: БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ВАГИНОЗ И ЗАБОЛЕВАНИЯ, ПЕРЕДАЮЩИЕСЯ ПОЛОВЫМ ПУТЕМ

Габдрашитов Ринат Габдрашитович, Татаринов Сергей Максимович, Гилева Ольга Борисовна
Кафедра биологии и биотехнологии

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России
Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Заболевания женской половой сферы представляют собой значительную проблему для общественного здравоохранения, так как оно влияет не только на здоровье женщины, но и на здоровье окружающих её людей. Согласно данным, выпущенным Всемирной организацией здравоохранения, каждый день более 1 миллиона человек в возрасте 15–49 лет заражаются излечимыми инфекциями, передающимися половым путем. При отсутствии лечения или неправильной диагностики может привести к печальным последствиям. **Цель исследования** – исследовать и оценить процент заболеваний женской половой системы (бактериального вагиноза и ИППП) на основе изучения теоретических и статистических аспектов. **Материал и методы.** Проведен сравнительный статистический и ретроспективный полученных данных от ГАУЗ СО «Свердловской областной клинической больницы №1». **Результаты.** За 2023 и 2024 годы было выявлено в консультативно–диагностической поликлинике распространенность: ИППП 13 (0,15%) за 2023 и 25 (0,28%) за 2024г. случаев от общего числа посещений. БВ диагностирован у 93 (1,10%) за 2023г. и 134 (1,51%) за 2024г. Невоспалительные патологии составили 5160 (61,00%) за 2023 и 5412 (61,13%) за 2024 гг. Воспалительные болезни составили за 2023г. 396 (4,68%) и за 2024г. 311 (3,51%). Другие заболевания мочеполовой системы составили 944 (11,16%) за 2023г. и 976 (11,02%) за 2024г. Новообразования составили 1853 (21,91%) за 2023г. и 1995 (22,53%) за 2024г от общего числа всех посещений. **Выводы.** Полученные данные отражают необходимость комплексного подхода к гинекологическому здоровью, сочетающего профилактику, важность ранней диагностики и персонализированного лечение, предотвращающих различные осложнения и улучшает качество жизни женщин. **Ключевые слова:** бактериальный вагиноз, заболевания передающиеся половым путем, вагинальные выделения, женское здоровье, репродуктивное здоровье.

DISEASES OF THE FEMALE REPRODUCTIVE SYSTEM: BACTERIAL VAGINOSIS AND SEXUALLY TRANSMITTED DISEASES

Gabdrashitov Rinat Gabdrashitovich, Tatarinov Sergey Maksimovich

Department of Biology and Biotechnology

Ural State Medical University

Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. Diseases of the female reproductive system represent a significant public health problem, impacting not only the woman's health but also that of those around her. According to data released by the World Health Organization, over 1 million people aged 15–49 years contract curable sexually transmitted infections daily. Untreated or misdiagnosed infections can lead to serious consequences. **The aim of the study** is to investigate and estimate the percentage of diseases of the female reproductive system (bacterial vaginosis and STIs) based on the study of theoretical and statistical aspects. **Material and methods.** A comparative statistical and retrospective analysis of the obtained data from the Sverdlovsk Regional Clinical Hospital No. 1 was carried out. **Results.** In 2023–2024, the prevalence of STDs was revealed in the consultative and diagnostic polyclinic: 13 (0.15%) in 2023 and 25 (0.28%) of the total number of visits. BV was diagnosed in 93 (1.10%) in 2023 and 134 (1.51%) in 2024. Non– inflammatory pathologies accounted for 5,160 (61.00%) in 2023 and 5,412 (61.13%) in 2024. Inflammatory diseases accounted for 396 (4.68%) in 2023 and 311 (3.51%) in 2024. Other diseases of the genitourinary system accounted for 944 (11.16%) in 2023 and 976 (11.02%) in 2024. Neoplasms accounted for 1,853 (21.91%) in 2023 and 1995 (22.53%) in 2024 of the total number of all visits. **Conclusions.** The obtained data reflect the necessity of a comprehensive approach to gynecological health, combining prevention, the importance of early diagnosis, and personalized treatment, which prevent various complications and improve the quality of life for women. **Keywords:** bacterial vaginosis, sexually transmitted infections, vaginal discharge, women's health, reproductive health.

ВВЕДЕНИЕ

Заболевания женской половой сферы представляют собой значительную проблему для общественного здравоохранения. Болезни могут передаваться при половом акте и от матери к