

## САНАЦІЯ ПЕРЕЩЕПЛЮВАНИХ ЛІНІЙ КЛІТИН ВІД МІКОПЛАЗМЕННОЇ ІНФЕКЦІЇ

**С. Г. ТАШУТА**, кандидат ветеринарних наук, доцент, завідувач сектору культур клітин відділу біотехнології і контролю вірусних препаратів

**Г. С. КУЗЬМИЧ**, науковий співробітник

**О. С. ВАТЛІЦОВА**, кандидат біологічних наук, завідувача лабораторією стандартизації та контролю ВІЗ та вивчення вірусних інфекцій

**З. С. КЛЕСТОВА**, доктор ветеринарних наук, професор, завідувача відділом біотехнології і контролю вірусних препаратів

*Державний науково-контрольний інститут біотехнології і  
штамів мікроорганізмів*

*E-mail: STashuta@i.ua*

<https://doi.org/10.31548/dopovid2020.05.010>

**Анотація.** У статті наведено результати експериментальних досліджень з деконтамінації 12 перещеплюваних культур клітин тваринного походження від мікоплазм. Була визначена оптимальна допустима концентрація препарату ципрофлоксацин, який використовувався авторами для санації культур клітин від мікоплазм. Експериментально встановлено, що цей препарат, в концентрації 20 мкг/см<sup>3</sup> в повній мірі пригнічує розмноження та життєвий цикл мікоплазм та при цьому не викликав суттєвого впливу на самі клітини. Така концентрація ципрофлоксацину додавалась в ростове та підтримуюче середовища протягом п'яти послідовних пасажів до контамінованих мікоплазмами культур клітин. Після формування в культуральному посуді клітинного моношару, він завжди піддавався ретельному п'ятикратному промиванню розчином Хенкса, а лише потім замінювалось середовище на підтримуюче. Таким чином, повний цикл санації культур клітин, з моменту висіву клітин в культуральний посуд і до наступного пересіву клітин займав 3-4 доби. З кожною ураженою мікоплазмами культурою клітин проводили від 2 до 5 тактх циклів. По завершенні санації зразки надосадової культуральної рідини з кожної лінії культур клітин відбирали та досліджували методом ПЛР на наявність у них мікоплазм. Мікоплазменна інфекція після проведеної санації культур клітин була виявлена лише в одному зразку. Ефективність методу складає 88,9 %. Таким чином, препарат ципрофлоксацин можна з успіхом використовувати для деконтамінації культур клітин у наукових і виробничих вірусологічних лабораторіях.

**Ключові слова:** деконтамінація, санація, мікоплазми, ципрофлоксацин, культура клітин, ПЛР

**Актуальність.** З початку 50-х років минулого сторіччя і по нині культура клітин (КК) є наріжним каменем для вірусологічних, цитологічних, біохімічних та інших біологічних досліджень. У сучасному світі без культур клітин не обійтись у вивчення механізмів клітинної регуляції, взаємодії вірусів при їх реплікації в чутливих клітинах, а також для отримання біологічно активних матеріалів, включаючи вакцини, ферменти, гормони та моноклональні антитіла. Але, на сьогодні однією та дуже поширеною і часто катастрофічною проблемою є забруднення культур клітин іншими мікроорганізмами [3, 4, 5, 7, 12]. Контамінація їх мікоплазмою викликає особливе занепокоєння науковців всього світу, оскільки її важко виявити, частіш за все це відбувається непомітно у культурах клітин, але ця обставина згубно впливає на функції клітин та їх морфологічний стан. Контаміновані мікоплазмами клітинні лінії є досить суттєвою проблемою в лабораторіях дослідницьких центрів та на об'єктах біотехнологічних виробництв. Ураженість мікоплазмами колекцій культур клітин коливається в межах від 15 до 96 % [3, 4, 6]. У більшості випадків контамінація культур клітин перебігає безсимптомно. Але, поряд з тим, латентна присутність їх у культурі клітин суттєво впливає на: - метаболізм клітин; - викликає хромосомні аберації та змінює

функції клітин. З наукових джерел відомо [3, 5, 7, 8], що ефектами присутності мікоплазм у культурі клітин є: – порушення синтезу ДНК та РНК в клітині; – зміна рівня білка та клітинного метаболізму; – індукція хромосомних аберацій (чисельні та структурні зміни); – зміни складу клітинної мембрани (поверхневого антигену та експресії рецепторів); – виражена зміна клітинної морфології; – вплив на передачу сигналів у клітинах та зміна характеристик поділу клітин та формування клітинного моношару. Контамінація культур клітин мікоплазмами призводить до дегенеративних змін культури клітин і повної їх втрати, а також загибелі клітин, а також є потенційним джерелом артефактів в цитологічних, вірусологічних та біохімічних дослідженнях. Мікоплазми – це ультрамікроскопічні вільноживучі прокаріоти розміри яких коливаються в межах 200 - 400 нм [14]. Вони позбавлені клітинної стінки, що робить неможливим їх виявлення навіть за допомогою мікроскопа. Крім того, мікоплазми не викликають помутніння середовищ культур клітин, що часто їх супроводжує бактеріальне чи грибокве забруднення. Найголовніше це те, що інфікування мікоплазмами, як правило, не призводить до загибелі клітин. Отже, вони можуть розмножуватися та залишатися непоміченими у посуді з культурою

клітин протягом тривалого періоду часу, стаючи головною перешкодою для проведення надійних та стандартних експериментів у системі *in vitro*. У наш час звільнення клітинної лінії від мікоплазм являє собою дуже складну і актуальну проблему. За повідомленнями багатьох дослідників [1, 2, 11] їх спроби деконтамінації від мікоплазм виявилися малоефективними. Тому і висновки із їх робіт вказують на те, що заражені мікоплазмами лінії клітин підлягають негайному знищенню. Поряд з тим, придбання нових ліній КК на їх заміну потребує чималих матеріальних затрат. Звідси і виникає необхідність пошуку реальних підходів в санації клітинних ліній в наукових і виробничих лабораторіях.

**Аналіз останніх досліджень та публікацій.** Вивчивши досвід багатьох науковців [1, 2, 11, 13] з санації КК, ми зробили свій вибір на протимікробному препараті широкого спектру дії, який проявляв би мінімальний цитотоксичний ефект на КК та водночас був би доступний за ціною. Це препарат монофторхінолового ряду, який блокує дію ферменту ДНК-гірази, що спричиняє інгібіцію біосинтезу ДНК, викликає глибокі структурні зміни клітинної мембрани, компонентів цитоплазми та нуклеоїду. Ця дія ципрофлоксацину призводить до вираженого бактерицидного ефекту по відношенню до мікоплазм. Крім

того, ципрофлоксацин не викликає цитотоксичної та генотоксичної дії.

**Мета дослідження** оцінити ефективність застосування препарату ципрофлоксацин при боротьбі з мікоплазменною контамінацією перещеплюваних культур клітин тваринного походження.

**Матеріали та методи досліджень.** Дослідження проводили протягом 2019–2020 років у секторі культур клітин відділу біотехнології і контролю вірусних препаратів Державного науково-контрольного інституту біотехнології та штамів мікроорганізмів. У дослідах використовували перещеплювані лінії культур клітин, в яких методом ПЛР були виявлені мікоплазми, а саме: FLK – клітини ембріональної нирки вівці; PO – клітини нирки вівці; RK-13- клітини нирки кролика; PK-15 – клітини нирки свині; MDBK – клітини ембріону нирки теляти; Vero – клітини нирки африканської зеленої мавпи; Marc-145 – клітини нирки африканської зеленої мавпи; BGM – клітини нирки африканської зеленої мавпи; ВНК-21/13 – клітини нирки сирійського хом'ячка; KCT (KST) – клітини коронарних судин великої рогатої худоби; SPEV (оригінальна назва – СНЕВ) – клітини нирки свині; А-72 – культура клітин підшкірної пухлини собак.

Матеріали, що використовувались для проведення досліджень:

1. Живильне середовище DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) фірми Sigma, Великобританія.

2. Фетальна сироватка крові ВРХ (Fetal Bovine Serum) виробництва фірми Gibco, ФРН.

3. Збалансований сольовий розчин Хенкса, Україна.

4. Збалансований сольовий розчин (буферний) – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS).

5. 0,25 %-ний розчин трипсину (0,25 % trypsin – EDTA) фірми Gibco, ФРН.

6. Гентаміцину сульфату (40 мг/см<sup>3</sup>) виробництва фірми «Дарниця», Україна.

7. Ципрофлоксацин (Ciprofloxacin – 2 мг/см<sup>3</sup>) виробництва фірм «Юрія-Фарм» Україна та «Avanta Medicare», Великобританія.

8. Планшети культуральні (24 лункові) виробництва фірми Nunclon TM Surface, Данія.

9. Матраси (25 см<sup>2</sup>) для культур клітин (Tissue culture flask, 25) виробництва фірми TPP, Швейцарія.

10. Термостат CO<sub>2</sub> Esco Cellculture, CO<sub>2</sub> incubator.

11. Мікроскоп біологічний – С. Zeiss – Aviovert 40CFL, ФРН.

12. Дозатори Eppendorf на 100 та 1000 мкл.

13. Ламінарний бокс Jokan MSC9.

Для санації перещеплюваних культур клітин від мікоплазм

використовували ципрофлоксацин в дозі 20 мкг/см<sup>3</sup>. Клітини культивували протягом 2–5 послідовних пасажів в живильному середовищі, що містило ципрофлоксацин в оптимальній кількості. У дослідах враховували концентрацію клітин при висіві, а також контролювали морфологію клітин та життєздатність самої культури клітин та проводили ПЛР дослідження щодо відсутності мікоплазм.

**Результати досліджень та їх обговорення.** На першому етапі провели дослідження щодо визначення оптимально допустимої концентрації препарату (ДКП) ципрофлоксацин, який використовувався в нашій лабораторії для санації культур клітин від мікоплазм. Для цього, як модель було обрано культуру клітин MDBK – клітини ембріону нирки теляти. Клітини цієї культури висівали в два культуральні планшети (24 лункові) в концентрації  $1,2 \times 10^6$  живих клітин в см<sup>3</sup>. Планшети інкубували в CO<sub>2</sub>-інкубаторі до формування однорідного моношару у всіх лунках. Далі робили робочі розведення препарату ципрофлоксацин (обох виробників) в середовищі DMEM починаючи з 5 мкг/см<sup>3</sup> до 40 мкг/см<sup>3</sup> і після цього їх вносили в лунки (по 4) планшету. Методика внесення та кінцевий результат наведений в таблиці 1.

## 1. Визначення оптимально допустимої концентрації ципрофлоксацину в перещеплюваній культурі клітин MDBK

Концентрація препарату, мкг/см <sup>3</sup>	Ципрофлоксацин виробництва фірми	
	Юрія - Фарм	Avanta Medicare
5	-----	-----
10	-----	-----
20	-----	-----
30	++--	+++-
40	++++	++++
Контроль	-----	-----

*Примітка:* + відмічається цитотоксична дія препарату на клітини;  
– цитотоксична дія препарату на клітини відсутня.

По 4 лунки у кожній планшеті залишали в якості контролю і замість препарату вносили середовище DMEM. Після інкубування у CO<sub>2</sub>-інкубаторі протягом 96 год. враховували результати. Дані, наведені в таблиці, свідчать про те, що оптимально допустимою концентрацією препарату ципрофлоксацин є доза 20 мкг/см<sup>3</sup>, яка в наших дослідах використовувалася для деконтамінації всіх уражених мікоплазмою культур клітин.

Лінія клітин MDBK слугувала моделлю випробування антимікоплазменного ефекту препарату ципрофлоксацин двох виробників «Ананта» та «Юрія-Фарм». До проведення випробувань методом ПЛР було

встановлено, що дана культура клітин, як і всі решта є контамінованими мікоплазмами. Була запропонована унікальна схема обробки цієї КК препаратом ципрофлоксацин у відповідних максимально допустимих концентраціях діючої речовини на мікоплазми. У результаті проведених досліджень нам вдалося позбутися контамінації КК MDBK мікоплазмами, що підтверджено в ПЛР. Набутий нами досвід з деконтамінації КК MDBK ми з успіхом використовували для санації решти культур клітин із нашої колекції. Контроль проведеної деконтамінації здійснювали методом ПЛР. Результати проведеної роботи наведені в таблиці 2.

## 2. Санація перещеплюваних культур клітин (КК) ципрофлоксацином в кінцевій концентрації 20 мкг/см<sup>3</sup>

№ п\п	Назва культури клітин	Наявність мікоплазм в КК до санації	Наявність мікоплазм після санації КК	Кількість пасажів КК із санацією
1.	MDBK	+*	-**	5
2.	FLK	+	-	5
3.	PO - 2	+	-	5
4.	PK-15	+	-	2
5.	RK-13	+	-	5
6.	Vero	+	-	2
7.	BHK-21	+	+	2
8.	BGM	+	-	5
9.	Marc-145	+	+	5
10.	KCT	+	+	2
11.	SPEV	+	-	5
12.	A-72	+	-	5

*Примітка:* +\* – Перевірені КК, в яких виявлено генетичний матеріал *Mycoplasma spp.*; -\*\* – Перевірені КК, в яких не виявлено генетичний матеріал *Mycoplasma spp.*.

Аналіз проведених досліджень показав, що ефективність застосування препарату ципрофлоксацин за п'ятикратного послідовного застосування у заражених мікоплазмою культурах клітин становить 88,9 %, а за двократного – лише 50 %. Лише одна культура клітин Marc-145 за п'ятикратного послідовного застосування залишилася

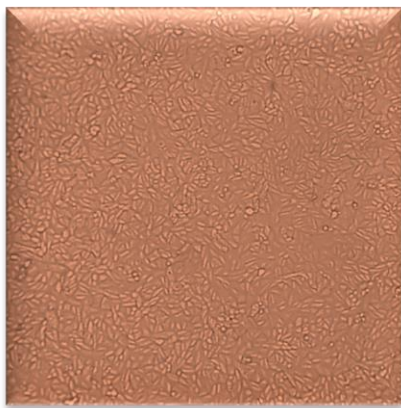
контамінованою мікоплазмою. Ця обставина вказує на те, що дана культура клітин контамінована таким видом мікоплазм, який є стійким до ципрофлоксацину. Обробка контамінованих мікоплазмою культур клітин оптимально допустимою концентрацією препарату ципрофлоксацин (20 мкг/см<sup>3</sup>) не впливала на морфологічні характеристики (рис. 1).



А

Б

В



Г

Д

Е

**Рис. 1.** Культури клітин після санації препаратом ципрофлоксацин ×96 (72 години після висіву): А – MDBK; Б – РК-15; В – РО-2; Г – BGM; Д – А-72; Е – СНЕВ.

**Висновки та перспективи подальших досліджень.** Проведені дослідження показали значну ефективність препарату ципрофлоксацин для санації культур клітин від мікоплазменної інфекції. А саме головне, співробітники відділу отримали великий досвід в боротьбі з мікоплазменною інфекцією в культурі клітин. Використовуючи модельний не дорогий препарат,

автори опрацювали методику, і саме головне, розробили тактику та основні підходи і нюанси, боротьби із цією проблемою. Тому, в подальших пошуках з поліпшення ефективності деконтамінації культур клітин від мікоплазм, плануємо провести порівняльні дослідження із специфічними високоартісними антимікоплазменними препаратами: плазмоцин та плазмокур.

**Подяка.** Висловлюємо вдячність колегам відділу молекулярної біології ДНКІБШМ Дерябіну О. М. та Мандзі І. М. за проведені дослідження зразків перещеплюваних культур клітин тварин методом ПЛР.

**References**

1. Nochevny V.T., Novokhatsky A.S., Karpukhina O.G. (2002). Prevention and methods of cell culture decontamination from bacteria and mycoplasmas using fluoroquinolones (review). Cell cultures. Newsletter. Issue. 17. SPb., P. 9–15 [in Russian].
2. Radaeva I.F., Kutserubova N.S., Sementsova A.O., Trifonova K.E., Bogryantseva M.P., Usova S.V., Nechaeva E.A. (2018). Detection and decontamination of mycoplasma infection in human cell culture lines. Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology named by Yu.A. Ovchinnikova. Scientific and Practical Journal Vol. 14, № 2, P. 17-22 [in Russian].
3. Shalunova N.V., Volkova R.A., Volgin A.R., Petrushuk E.M., Berdnikova Z.E., Elbert E.V., Shevtsov V.A., Rukavishnikov A.V., Semenova I.S., Merkulova O.V., Trusov G.A., Tereshkina N.V., Rachinskaj O.A., Indikova I.N., Lebedinskaya E.V., Mytsa E.D. (2016). Mycoplasma – contamination of cell cultures. BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.;16(3):151-160 [in Russian].
4. Drexler H.G., Uphoff C.C. (2000). Contamination of cell culture, Mycoplasma. Encyclopedia of cell technology. Ed. by R.S. Spier. N.Y.; Toronto, Vol. 1. P. 609–627.
5. Drexler H.G., Uphoff C.C., Dirks W.G., MacLeod R.A.F. (2002). Mixups and mycoplasma: The enemies within. Leukemia Res. 26. P. 329–333.
6. Harasawa R., Uemori T., Asada K., Kato I. (1993). Sensitive detection of mycoplasmas in cell cultures by using two-step polymerase chain reaction // Rapid diagnosis of mycoplasmas / Eds. I. Kahane, A. Adoni. N.Y.; London, P. 227–232.
7. Hay R.J., Macy M.L., Chen T.R. (1989). Mycoplasma infection of cultured cells. Nature. 339. P. 487–488.
8. Langdon S.P. (2004). Cell culture contamination: an overview. Methods Mol. Med. Vol. 88. P. 309–317.
9. Uphoff C.C., Drexler H.G. (1999). Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by PCR analysis. Human Cell. 12: P. 229–236.
10. Uphoff C.C., Drexler H.G. (2002). Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. Vitro Cell Dev Biol Anim. 38: P. 79–85.
11. Uphoff C.C., Drexler H.G. (2002). Comparative antibiotic eradication of mycoplasma infections from continuous cell lines. Vitro Cell Dev Biol Anim. 38: P. 86–89.
12. Uphoff, C. C., & Drexler, H. G. (2014). Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures. Current Protocols in Molecular Biology, 106, P. 28.4.1 – 28.4.14.
13. Uphoff, C. C., & Drexler, H. G. (2014). Eradication of Mycoplasma Contaminations from Cell Cultures. Current Protocols in Molecular Biology, 106, P. 28.5.1-28.5.12.
14. Young, L., Sung, J., Stacey, G., Masters, J. R. (2010). Detection of Mycoplasma in cell cultures. Nature Protocols, 5(5), P. 929–934.

## САНАЦИЯ ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЛИНИЙ КЛЕТОК ОТ МИКОПЛАЗМЕННОЙ ИНФЕКЦИИ

С. Г. Ташута, Г. С. Кузьмич, О. С. Ватліцова, З. С. Клестова

***Аннотация.** В статье содержатся результаты экспериментальных исследований по деконтаминации 12 перевиваемых культур клеток животного происхождения от микоплазм. На первых этапах исследования была определена оптимальная допустимая концентрация препарата ципрофлоксацин, который использовался в нашей лаборатории для санации клеточных культур от микоплазм. Экспериментально было установлено, что препарат в концентрации 20 мкг/см<sup>3</sup> полностью подавляет размножение и жизненный цикл микоплазмы и не оказывает существенного влияния на сами клетки. Эта*



Ташута С. Г., Кузьмич Г. С., Ватліцова О. С., Клестова З. С.

концентрация ципрофлоксацина добавлялась в ростовую и поддерживающую среды в течение пяти последовательных пассажей к контаминированным микоплазмой культурам клеток. После формирования в матрасе клеточного монослоя, он всегда подвергался тщательному пятикратному промыванию раствором Хэнкса, и только потом заменялся поддерживающей средой. Таким образом, полный цикл санации клеточной культуры, с момента посева клеток в матрасе и к последующему пересеву клеток занимал 3-4 дня. С каждой пораженной микоплазмами клеточной культурой проводили от 2 до 5 таких циклов. По завершении санации образцы надосадочной культуральной жидкости из каждой линии культуры клеток, отбирались и исследовались методом ПЦР на наличие в них микоплазм. Микоплазменная инфекция после санации клеточных культур была обнаружена только в одном образце. Эффективность составляет 88,9 %. Это доказывает то, что препарат ципрофлоксацин можно с успехом использовать для деконтаминации клеточных культур в научных и производственных вирусологических лабораториях.

**Ключевые слова:** деконтаминация, санация, микоплазмы, ципрофлоксацин, культура клеток, ПЦР.

## REHABILITATION OF CULTURE CELL LINES FROM MYCOPLASMA INFECTION

S. G. Tashuta, G. S. Kuzmych, O. S. Vatlitsova, Z. S. Klestova

**Abstract.** The article represents the results of experimental studies focus on the decontamination of 12 cultures cell lines of animal origin from mycoplasmas. On the early stages of the study, the optimal allowable concentration of the drug ciprofloxacin, which was used in our laboratory to rehabilitate cell cultures from mycoplasmas, was determined. It has been experimentally established that ciprofloxacin at concentration of  $20 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  completely inhibits the reproduction and life cycle of mycoplasmas and does not cause a significant effect on the cells themselves. Ciprofloxacin in concentration of  $20 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  was added into the growth and maintenance medium for five consecutive passages to the flasks with mycoplasma-contaminated cell cultures. After forming a cell monolayer in the flasks, it was always thoroughly washed five times with Hanks' solution, and only then the medium was replaced with a supportive one. Thus, the full cycle of cell culture remediation, from the moment of seeding the cells in the flasks until the next reseeding of cells took 3-4 days. 5 cycles were performed with each cell culture affected by mycoplasmas. At the completion of rehabilitation process, the samples of cell culture supernatant from each cell culture line were collected and examined by PCR for the presence of mycoplasmas. As a result, after remediation process of cell cultures mycoplasma infection was detected in only one sample. The efficiency is 88.9 % and it proves that the drug ciprofloxacin can be successfully used for decontamination of cell cultures in scientific and industrial virological laboratories.

**Key words:** decontamination, rehabilitation, mycoplasmas, ciprofloxacin, cell culture, PCR