

Тяпша Ю.И., кандидат ветеринарных наук, доцент
Стрельчена И.И., кандидат ветеринарных наук, доцент
Дубаневич О.В., старший научный сотрудник
Андрусевич А.С., кандидат ветеринарных наук, доцент
Черевако О.В., младший научный сотрудник

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселесского», г. Минск,
Республика Беларусь

ДЕКОНТАМИНАЦИЯ ЛИНИЙ КУЛЬТУР КЛЕТОК ОТ МИКОПЛАЗМ И АХОЛЕПЛАЗМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Резюме

В статье представлены экспериментальные данные по разработке и оценке эффективности схем деконтаминации перевиваемых культур клеток от бактерий класса *Mollicutes* (микоплазмы и ахолеплазмы). На линиях клеток СПЭВ и ЗКГ, контаминированных микоплазмами, проводилась сравнительная оценка эффективности трех схем антимикробной терапии: коммерческих препаратов *Plasmocin* и *Plasmocure*, а также комбинации тилозина с доксициклином. Установлена высокая эффективность всех схем при их адаптации к конкретным условиям культивирования. Рассмотрены механизмы действия применяемых антибиотиков и их потенциальная активность в отношении микоплазм и ахолеплазм, учитывая общие мишени в прокариотических клетках. Сформулированы принципы и алгоритм действий для разработки эффективных схем деконтаминации.

Ключевые слова: деконтаминация, культура клеток, микоплазмы, ахолеплазмы, антибиотики, *Plasmocin*, *Plasmocure*, тилозин, доксициклин, ПЦР.

Summary

The article presents experimental data on the development and evaluation of the effectiveness of decontamination schemes for transplanted cell cultures from *Mollicutes* class bacteria (mycoplasma and acholeplasma). The efficacy of three antimicrobial regimens, commercial *Plasmocin* and *Plasmocure*, as well as the combination of tylosin and doxycycline, was compared in mycoplasma-contaminated EPS and 3KG cell lines. The high efficiency of all schemes in their adaptation to specific cultivation conditions has been established. Mechanisms of action of applied antibiotics and their potential activity against mycoplasmas and acholeplasmas, considering common targets in prokaryotic cells, are considered. Principles and algorithm of actions for development of effective decontamination schemes are formulated.

Keywords: decontamination, cell culture, mycoplasmas, acholeplasmas, antibiotics, *Plasmocin*, *Plasmocure*, tylosin, doxycycline, PCR.

Поступила в редакцию 05.12.2025 г.

ВВЕДЕНИЕ

Применение перевиваемых культур клеток является частью современной биомедицины, вирусологии, биотехнологии и фармакологии. Однако надежность и воспроизводимость экспериментов напрямую зависят от чистоты и стабильности используемых клеточных линий. Одной из наиболее распространенных проблем в этой области является контаминация микроорганизмами класса *Mollicutes* – микоплазмами *Mycoplasma spp.* и ахолеплазмами *Acholeplasma spp.* [1, 2].

Эти бактерии, являясь одними из самых мелких и самовоспроизводящихся прокариот, лишены ригидной клеточной стенки [3]. Данная особенность обуславливает их естественную устойчивость к β-лак-

тамным антибиотикам (пенициллинам, цефалоспоринам), широко применяемым в практике клеточного культивирования. Микоплазмы могут длительно персистировать в культуре, не вызывая выраженного помутнения среды или резкого цитолиза, что затрудняет их визуальную детекцию [4].

По разным оценкам, около 50 % клеточных линий в мире контаминыированы микоплазмами [5, 6]. Наиболее часто в культурах клеток встречаются виды *Mycoplasma orale* (источник – персонал лабораторий), *M. hyorhinis* (источник – трипсин и сыворотка свиного происхождения), *M. arginini* и *Acholeplasma laidlawii* (источник – бычья сыворотка) [7, 8].

Патогенное воздействие микоплазм на культуру клеток включает конкуренцию

за питательные субстраты (глюкозу, аргинин, аминокислоты), выделение токсичных метаболитов (например аммиака), индукцию цитопатических эффектов, изменение пролиферативной активности, индукцию хромосомных aberrаций и апоптоза, а также модуляцию экспрессии генов клетки-хозяина [9, 10]. Все это приводит к получению некорректных и невоспроизводимых экспериментальных данных, потере уникальных клеточных линий, а в биопроизводстве – к браку дорогостоящих партий вакцин или терапевтических белков [11].

В связи с этим разработка и оптимизация эффективных методов деконтаминации (очистки) клеточных культур является актуальной научно-практической задачей. Стратегия борьбы с микоплазмами и ахолеплазмами основана на применении antimикробных препаратов, действующих на синтез белка и репликацию ДНК [12].

Целью настоящего исследования являлась разработка и сравнительная оценка эффективности различных схем antimикробной терапии для очистки конкретных линий контаминированных культур клеток с учетом механизмов действия препаратов и обоснованием их потенциальной применимости для борьбы с микоплазмами и ахолеплазмами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали перевиваемые линии клеток ЗКГ и СПЭВ. Обе линии были предварительно исследованы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени и идентифицированы как контаминированные микоплазмами. Ахолеплазмы в данных линиях обнаружены не были.

Для деконтаминации применяли три схемы antimикробной терапии:

- коммерческий препарат Plasmocin Treatment («InvivoGen», США), который содержит два бактерицидных компонента: ингибитор синтеза белка (действует на рибосомальную трансляцию) и ингибитор репликации ДНК. Использовали согласно инструкции производителя;

- коммерческий препарат Plasmocure («InvivoGen», США), содержащий два антибиотика, ингибирующих синтез белка через разные механизмы: связывание с 50S субъединицей рибосомы и ингибирование

изолейцил-тРНК-синтетазы. Применяли согласно инструкции;

- комбинация антибиотиков: смесь тилозина (16-членный макролид) в концентрации 15,0 мг/15,0 мл и доксициклина (тетрациклин) в концентрации 75,0 мг/7,5 мл, смешанных в соотношении 1:1. Рабочая концентрация в среде подбиралась эмпирически.

Клеточную линию ЗКГ культивировали в среде ФГМС:DMEM/F12 («ПанЭко», Россия), линию СПЭВ – в среде Игла 199-15. Обе среды обогащали 10%-ной эмбриональной сывороткой крупного рогатого скота (Беларусь) и антибиотиками (100,0 Ед/мл пенициллина, 100,0 мкг/мл стрептомицина). Пассирование клеток проводили стандартным методом с использованием раствора трипсин-Версена (0,25%ный трипсин, «Central Drug House», Индия) или его аналога.

Клетки культивировали в пластиковых флаконах площадью 25,0 см² («SPL», Корея) и многоразовых планшетах («Corning» или «CoStar Group», США). Все манипуляции выполняли в ламинарном боксе биологической безопасности класса II («Telstar Bio Vanguard», Испания) с соблюдением строгих правил асептики.

Клетки высевали в 24-луночные планшеты из расчета 300,0 тыс. кл/мл и добавляли рабочие концентрации антибиотиков для каждой схемы. После формирования монослоя (48–72 ч), а в дальнейшем – ежедневно состояние клеток контролировали с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS 100 (Япония). Визуальную оценку морфологии и плотности проводили для мониторинга пролиферативной активности и выявления признаков цитотоксичности. 8 последовательных пассажей выполняли каждые 2–3 дня, постоянно поддерживая рабочие концентрации антибиотиков. При каждом пересеве отбирали образцы клеточной суспензии для контроля уровня контаминации микоплазмами методом ПЦР и, при необходимости, корректировки дозы антибиотиков. Тестирование на наличие микоплазм с видоспецифичными праймерами проводили до начала, в процессе и после завершения курса лечения.

После успешной деконтаминации клеточную суспензию смешивали с крио-

протектором (10%-ный диметилсульфоксид (ДМСО), «Sigma», Германия) и замораживали при температуре минус 86 °С. После разморозки жизнеспособность клеток и отсутствие контаминации контролировали повторно с помощью ПЦР. Микоплазмы в пробах размороженных линий обнаружены не были.

Таблица – Изучение эффективности элиминации микоплазм из клеточных культур различными антибиотиками методом ПЦР в режиме реального времени

Наименование культуры клеток	Plasmocure				Plasmocin				Тилозин + доксициклин			
	пассаж	Ct	контроль	Ct	пассаж	Ct	контроль	Ct	пассаж	Ct	контроль	Ct
ЗГК	0	23,7	K	23,7	0	23,7	K	23,7	0	23,7	K	23,7
	IV	40,0	K	23,8	IV	40,0	K	23,8	IV	31,4	K	23,8
	VI	NA	K	23,4	VII	NA	K	25,4	VIII	NA	K	25,7
СПЭВ	0	24,1	K	24,1	0	24,1	K	24,1	0	24,1	K	24,1
	I	NA	K	24,2	III	29,1	K	24,2	III	30,0	K	24,2
	III	NA	K	23,5	VII	NA	K	24,4	VIII	NA	K	25,4

Примечание – Ct – пороговый цикл детекции (низкое значение Ct (23–25) указывает на высокий уровень загрязнения, высокое значение Ct (>40) или NA (отрицательный результат) свидетельствует об элиминации загрязнения. K (контроль) – необработанные контамированные клетки, пассаж «0» – исходная точка до лечения

Анализ данных таблицы позволяет сделать следующие выводы: для клеточной линии ЗКГ с Plasmocure элиминация произошла между пассажами IV и VI, с Plasmocin – между IV и VII, а с комбинацией тилозин + доксициклин – к VIII пассажу. Для линии СПЭВ Plasmocure показал самую высокую скорость элиминации – уже на I пассаже, Plasmocin и тилозин + доксициклин привели к очищению культуры к VII и VIII пассажам соответственно. Таким образом, Plasmocure показал самую высокую скорость элиминации, особенно для линии СПЭВ. Линия СПЭВ в целом очищалась быстрее, чем ЗКГ (кроме схемы с Plasmocin). Комбинация тилозин + доксициклин потребовала самого длительного курса (до VIII пассажей) для обеих линий.

Основываясь на визуальной оценке монослоя (рисунки 1-2), можно сделать следующий вывод. До обработки клетки линии ЗКГ и СПЭВ имели типичную мор-

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты контроля контаминации методом ПЦР в режиме реального времени в процессе обработки антибиотиками представлены в таблице.

фологию и отсутствие видимых признаков дегенерации, что, однако, не исключало наличия скрытой микоплазменной контаминации, подтвержденной позднее методом ПЦР. После обработки антимикоплазменными препаратами наблюдалась различия в состоянии культур в зависимости от применяемого антибиотика. В схемах, эффективных против микоплазм (например Plasmocure/Plasmocin), к заключительным пассажам лечения (например VI–VIII) монослой имел характерную морфологию: клетки выглядели здоровыми, более крупными, без вакуолизации цитоплазмы, что визуально коррелирует с данными ПЦР об элиминации микоплазм. В комбинации с цитотоксическим эффектом (тилозин + доксициклин) на начальном этапе лечения отмечались признаки токсического воздействия: снижение плотности клеток, их округление, вакуолизация цитоплазмы, дегенерация и фрагментация монослоя, поэтому доза лечения корректировалась.

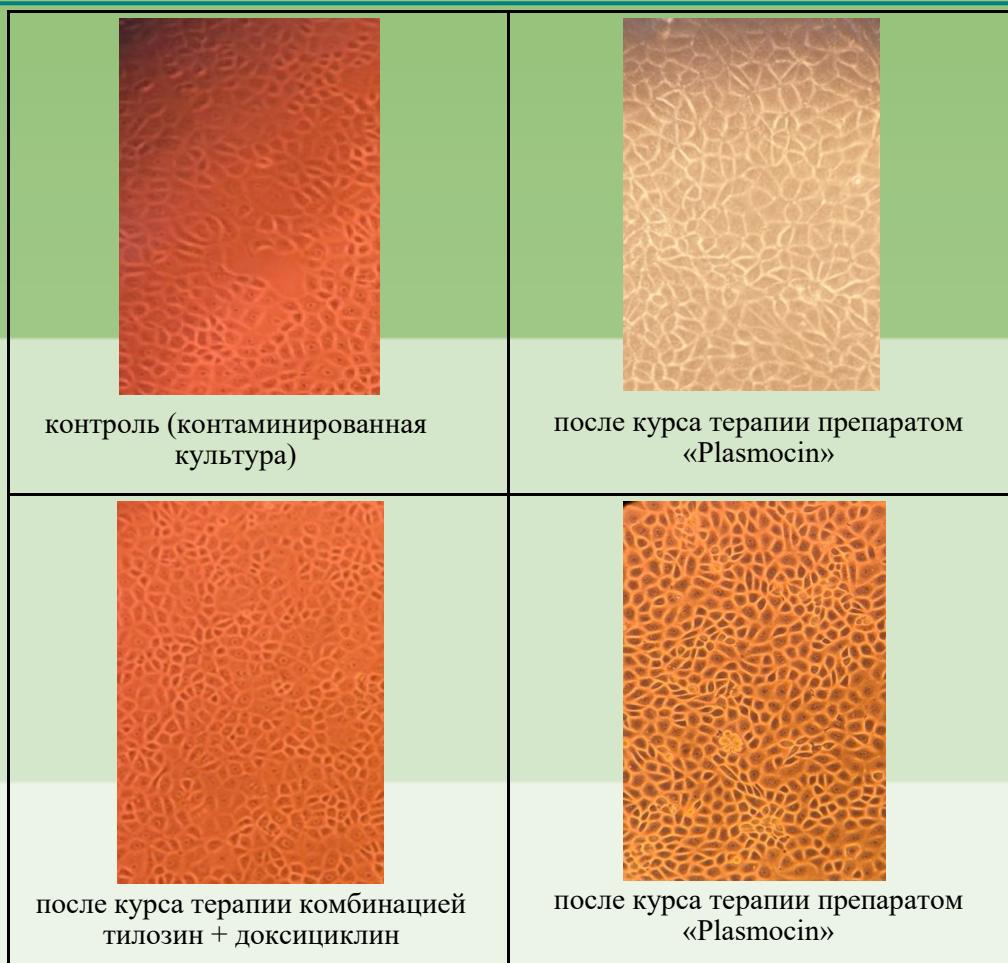


Рисунок 1 – Визуальная оценка состояния клеточной культуры линии СПЭВ до и после обработки антимикоплазменными препаратами, увеличение ×20

Все три примененные схемы antimикробной терапии основаны на принципе синергичного воздействия на разные мишени внутри бактериальной клетки, что минимизирует риск развития резистентности. Plasmocin сочетает ингибитор синтеза белка и ингибитор репликации ДНК. Plasmocure содержит два антибиотика, блокирующих синтез белка на разных этапах (рибосомальный и ферментативный). В инструкции производителя указана его активность против *Acholeplasma laidlawii*. Комбинация тилозин + доксициклин представляет классическую синергичную комбинацию макролида и тетрациклина, которые ингибируют синтез бактериального белка, связываясь с различными сайтами рибосомы. Важно отметить, что, несмотря на метаболические отличия ахолеплазм (способность синтезировать стеролы), мишени данных антибиотиков – рибосомы, ферменты ДНК-гираза, синтетазы – являются консервативными для всех прокариот. Сле-

довательно, данные схемы теоретически обладают активностью и против ахолеплазм. Ключевым моментом является резистентность ахолеплазм к 14- и 15-членным макролидам (эритромицин), однако они чувствительны в отношении 16-членных макролидов (тилозин) и тетрацикличес (доксициклин) [13, 14]. Это подтверждается и данными [15], где приводится обширный перечень антибиотиков (гентамицин, канамицин и др.) с указанием их эффективности против отдельных видов микоплазм.

В ходе эксперимента на линиях СПЭВ и ЗКГ было установлено, что все три схемы деконтаминации привели к элиминации микоплазм, что было подтверждено отрицательными результатами ПЦР после курса лечения и нескольких последующих пассажей. Plasmocin и Plasmocure показали предсказуемую эффективность согласно инструкциям производителя [16, 17]. При этом наблюдалась следующая особенность: в процессе обработки отмечалось времен-

ное замедление пролиферации клеток. После отмены антибиотиков рост клеток восстанавливался до нормальной скорости. Комбинация препаратов тилозин + доксициклин в лечебной дозе 20,0 мкл/мл (10,0 мкг доксициклина и 100,0 мкг тилозина) также подтвердила свою эффективность, сопоставимую с коммерческими

продуктами. Преимуществом этой комбинации является доступность и низкая стоимость компонентов. Однако для данной схемы крайне важен точный подбор рабочих концентраций для конкретной линии клеток, так как цитотоксический порог может быть узким.



Рисунок 2 – Визуальная оценка состояния клеточной культуры линии З КГ до и после обработки антимикоплазменными препаратами, увеличение ×20

Во всех случаях основную роль сыграла предварительная идентификация контаминанта микоплазм и периодический контроль лечения методом ПЦР. Это позволило применять целенаправленную терапию и объективно оценивать ее результат.

На основании проведенных исследований можно сформулировать следующий алгоритм действий при подозрении на контаминацию микоплазмами/ахолеплазмами:

- подтверждение и идентификация; обязательное периодическое тестирование клеточных линий методом ПЦР в режиме реального времени;

- подбор антимикробного препарата и схемы лечения (следует учитывать видовую принадлежность выявленного контаминанта);

- оценка чувствительности конкретной линии клеток к цитотоксическому действию антибиотиков (необходим предварительный тест);

- строгое соблюдение протокола лечения клеточных линий, как правило, 14 дней (4–8 пассажей);

- использование для лечения клеточных линий эффективных коммерческих препаратов (например Plasmocin, Plasmocure для клеточных линий ЗГК, СПЭВ), а

также препаратов, комбинация которых блокирует синтез белка и является ингибитором репликации ДНК в клетках микоплазм и ахолеплазм;

- культивирование очищенных линий клеток на средах с вышеперечисленными препаратами в профилактических концентрациях;

- криоконсервация очищенной культуры для создания страхового фонда.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволили установить, что устойчивая элиминация микоплазм и ахолеплазм из культур клеток СПЭВ и ЗКГ достижима при применении антибактериальных препаратов «Plasmocin» и «Plasmocure», блокирующих синтез белка и репликацию ДНК, и комбинации препаратов тилозин + доксициклин.

Ключевыми факторами успеха деконтаминации являются обязательная предварительная видовая идентификация контаминаента методом ПЦР, подбор антимикробных схем с учетом чувствительности микоплазм и толерантности (цитотоксического порога) конкретной клеточной линии, а также строгое соблюдение протокола лечения и мониторинг его эффективности с помощью периодического ПЦР-тестирования.

Разработанный на основании этих принципов алгоритм действий является универсальным и может быть адаптирован для деконтаминации различных клеточных линий.

Результаты работы легли в основу методических рекомендаций по контролю и устранению контаминации представителями класса *Mollicutes* в условиях биотехнологической лаборатории.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Drexler, H. G. *Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention* / H. G. Drexler, C. C. Uphoff // *Cytotechnology*. – 2002. – Vol. 39(2). – P. 75–90.
2. Razin, S. *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas* / S. Razin, D. Yogeve, Y. Naot // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1998. – Vol. 62(4). – P. 1094–1156.
3. Унхофф, К. С. Обнаружение контаминации микоплазмой культур клеток методом полимеразной цепной реакции / К. С. Унхофф, Х. Г. Дрекслер // Методы молекулярной биологии. – 2011. – Т. 731. – С. 93–103.
4. Hay, R. J. *Mycoplasma infection of cultured cells* / R. J. Hay, M. L. Macy, T. R. Chen // *Nature*. – 1989. – Vol. 339(6224). – P. 487–488.
5. Uphoff, C. C. *Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines* / C. C. Uphoff, H. G. Drexler // *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* – 2002. – Vol. 38(2). – P. 79–85.
6. *Mycoplasma testing of cell substrates and biologics: Review of alternative non-microbiological techniques* / D. V. Volokhov, L. J. Graham, K. A. Brorson, V. E. Chizhikov // *Mol. Cell. Probes*. – 2011. – Vol. 25(2-3). – P. 69–77.
7. Barile, M. F. *The identification and sources of mycoplasmas isolated from contaminated cell cultures* / M. F. Barile, H. E. Hopps, M. W. Grabowski // *Ann N Y Acad Sci.* – 1973. – Vol. 225. – P. 251–264.
8. *Survival of Mycoplasma hyorhinis in trypsin solutions* / A. A. Polak-Vogelzang, A. F. Angulo, J. Brugman, R. Reijgers // *Biologicals*. – 1990. – Vol. 18(2). – P. 97–101.
9. Rottem, S. *Interaction of mycoplasmas with host cells* / S. Rottem // *Physiol Rev.* – 2003. – Vol. 83(2). – P. 417–432.
10. Uphoff, C. C. *Treatment of mycoplasma contamination in cell cultures* / C. C. Uphoff, S. A. Denkmann, H. G. Drexler // *Cytotechnology*. – 2010. – Vol. 62(3). – P. 179–189.
11. Armstrong, S. E. *The scope of mycoplasma contamination within the biopharmaceutical industry* / S. E. Armstrong, J. A. Mariano, D. J. Lundin // *Biologicals*. – 2010. – Vol. 38(2). – P. 211–213.
12. Uphoff, C. C. *Comparative antibiotic eradication of mycoplasma infections from continuous cell lines* / C. C. Uphoff, H. G. Drexler // *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* – 2002. – Vol. 38(2). – P. 86–89.
13. Waites, K. B. *Mycoplasma pneumoniae and its role as a human pathogen* / K. B. Waites, D. F. Talkington // *Clin Microbiol Rev.* – 2004. – Vol. 17(4). – P. 697–728.
14. *Activity of moxifloxacin against the urogenital mycoplasmas Ureaplasma spp., Mycoplasma hominis and Mycoplasma genitalium and Chlamydia trachomatis* / C. Bébéar, B. de Barbeyrac, S. Pereyre [et al.] // *Clin Microbiol Infect.* – 2008. – Vol. 14(8). – P. 801–805.
15. Руководство по клеточным культурам. – 3-е изд. – Сигма-АлдричКо, 2008. – 400.
16. Инструкция по применению препарата Plasmocure, InvivoGen. – 2021.
17. Инструкция по применению препарата Plasmocin, InvivoGen. – 2023.