УДК 628.315:696.135.(477.44) http://dx.doi.org/10.31548/biologiya14(3-4).2023.007
http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Biologiya/article/view/42712

ІДЕНТИФІКАЦІЯ МІКОПЛАЗМОВОЇ КОНТАМІНАЦІЇ У КУЛЬТУРІ КЛІТИН

Т.А. ТКАЧЕНКО,
кандидат біологічних наук
Національний університет біоресурсів і природокористування України
E-mail: tttkach82@gmail.com
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7590-8879
М.І. КОКОВІН,
студент ОС «Магістр»
Національний університет біоресурсів і природокористування України
E-mail: maxim.kokovin@gmail.com
П.Ю. ДРОЗД,
кандидат історичних наук, доцент
Національний університет біоресурсів і природокористування України
E-mail: petro.drozd@gmail.com
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1939-2967
С.В. ПРИЛУЦЬКА,
доктор біологічних наук, професор
Національний університет біоресурсів і природокористування України
E-mail: psvit_1977@ukr.net
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5280-8341

Анотація. *Мікоплазми - найменші та найпростіші прокаріоти, які локалізуються в ендосомах клітин ссавців та є досить поширеними забруднювачами клітинних культур. У роботі нами було ідентифіковано мікоплазмову інфекцію в клітинній культурі лінії BR раку молочної залози людини методом фазово-контрастної і флуоресцентної мікроскопії з фарбуванням 4,6-діамідино-2-феніліндолом (DAPI), який має афінність до ДНК ядра. Інфіковані мікоплазмою клітини раку молочної залози мають підвищену гранулярність (фазово-контрастна мікроскопія), а за використання флуоресцентної мікроскопії, ДНК мікоплазм виглядає як флуоресценціюючі плями, що сконцентровані в цитоплазмі інфікованих клітин та поза ними. Показано, що мікоплазмове забруднення не впливає на кількість пухлинних клітин у культурі, проте, імовірно, може впливати на перебіг їх фізіолого-біохімічних функцій. Для лікування мікоплазмової інфекції у культурі клітин було застосовано два антибіотики: тіамулін (група макролідів) і міноциклін (група тетрациклінів) в концентрації 5 мМ кожного. Ефективність комбінованої антибіотикотерапії мікоплазм була*

підтверджена мікроскопічним методом. Запропонована схема деконтамінації культури клітин раку молочної залози комбінованими антибіотиками дозволяє повністю знищити мікоплазмову інфекцію у культивованих клітинах.

Ключові слова: *культура клітин, мікоплазма, контамінація, ідентифікація.*

Вступ.

Контамінація мікоплазмами становить значну проблему в роботі з культурами клітин різного гістогенезу через їх малий розмір та швидку інвазивність, що утруднює ідентифікацію та елімінацію (Jung H. et al., 2003; Lawson-Ferreira R. et al., 2021; Uphoff C.C. et al., 2014; Uphoff C.C. et al., 1992). Основні джерела мікоплазмового забруднення є різноманітні за природою та походженням, починаючи від персоналу і закінчуючи матеріалами та обладнанням, що використовуються при роботі з культурами клітин, тому дослідження методів боротьби з мікоплазмовою контамінацією у культурі клітин різного гістогенезу є наразі досить актуальним (Coté R., 2001; Ligasová A. et al., 2019; Nikfarjam L. et al., 2012; Yin Z.F. et al., 2019).

Культури клітин різного походження інтенсивно використовуються у сучасних наукових і діагностичних дослідженнях та клітинній біології (Carthew J. et al., 2021; Regent F. et al., 2019; Work T.S. et al., 1980), при біотехнологічному виробництві вакцин і біологічно активних речовин (Work T.S. et al., 1980), для підтримки генофонду рідкісних і вимираючих видів тварин і рослин (Fay M.F., 1992), для тераностики спадкових захворювань (McNerney M.P. et al., 2021)[11], є об'єктами для скринінгу біологічної активності нових хімічних сполук з фармацевтичними властивостями тощо (Peng W. et al., 2017).

Загрозою для ведення клітин у культурі in vitro є контамінація чужорідними мікроорганізмами, які впливають на результати досліджень, ускладнюють оцінку та порівняння результатів, а також на біологічні властивості клітин (Cando-Dumancela C. et al., 2021; Uphoff C.C. et al., 2014). Таке біологічне зараження у культурі клітин переважно виникає внаслідок неналежних асептичних умов проведення досліджень *in vitro*. Найбільш поширеними біологічними забруднювачами є бактерії, грибки, віруси та мікоплазми (Coté R., 2001; Timenetsky J. et al., 2006).

Мікоплазми – це рід мікробактерій розміром близько 0,2 мкм, для яких характерна відсутність клітинної мембрани, паразитування на різних видах тварин і рослин, а також їх клітинах (Ahangaran S. et al., 2019; Jung H. et al., 2003; Nikfarjam L. et al., 2012; Pastore M. et al., 1995). Через відсутність клітинної стінки мікоплазми набувають резистентності до дії антибіотиків та антибактеріальних препаратів, зокрема пеніциліну та стрептоміцину (Doyle M. et al., 2020; Uphoff C.C. et al., 2012; Uphoff C.C. et al., 1992; Uphoff C.C. et al., 2002). Мікоплазма впливає на фенотипові та функціональні характеристики клітин in vitro, зокрема обумовлюючи хромосомні аберації, порушення синтезу нуклеїнових кислот, зміни антигенності мембран, інгібування клітинної проліферації та метаболізму, зниження швидкості трансфекції, зміни у профілях експресії генів

і загибель клітин (Yin Z.F. et al., 2019; Young L. et al., 2010; Yu T. et al., 2016).

Наразі не існує ефективного та адаптованого методу ерадикації мікоплазм. Найбільш поширеними є фізичні (автоклавування), хімічні (обробка детергентами), імунологічні (використання специфічних антисироваток) та хіміотерапевтичні (антибіотики) методи боротьби з мікоплазмовою контамінацією у клітинних культурах (Borup-Christensen P. et al., 1988; Coté R., 2001; Doyle M. et al., 2020; Jung H. et al., 2003; Nikfarjam L. et al., 2012; Uphoff C.C. et al., 2014).

Найбільш дієвим методом елімінації мікоплазм є введення у культуральне середовище інкубування клітин антибіотиків, ефективність дії яких може становити від 66 до 85% (Jung H. et al., 2003; Uphoff C.C. et al., 2012). Для лікування інфікованих мікоплазмою клітин широко використовують такі антибіотики як хінолони, тетрацикліни та макроліди. Тетрацикліни і макроліди діють за рахунок блокування синтезу білка, гальмуючи процес трансляції в рибосомах, а хінолони пригнічують реплікацію ДНК мікоплазми. Доведено, що ефективним є використання кількох антибіотиків з різними механізмами бактерицидної дії (плазмацин) (Borup-Christensen P. et al., 1988; Doyle M. et al., 2020; Uphoff C.C. et al., 2012; Uphoff C.C. et al., 2002). Використання антибіотиків може супроводжуватись цитотоксичною дією та зниженням життєздатності хронічно інфікованих клітин у культурі, проте зазвичай не викликає постійних змін еукаріотичних клітин (Uphoff C.C. et al., 2002).

Необхідною умовою боротьби з мікоплазмовою контамінацією є проведення регулярного контролю і перевірки клітин, та у випадку їх забруднення – негайної ідентифікації й лікування (Timenetsky J. et al., 2006; Uphoff C.C. et al., 2013). Для визначення повторної мікоплазмової контамінації в клітинних культурах, слід провести якісний тест на мікоплазму. Клітини повторно перевіряються у культуральному середовищі, що не містить антибіотиків, принаймні через чотири-шість пересівів.

Метою дослідження було ідентифікувати мікоплазмове забруднення у культурі клітин раку молочної залози людини та з'ясувати ефективність комплексного використання антибіотиків різних груп для лікування уражених клітин

Матеріали і методи дослідження.

Культивування клітин. У роботі було використано лінію клітин BR раку молочної залози людини. Клітини культивували у середовищі DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose, Sigma, США) за присутності 10 % ембріональної телячої сироватки (ЕТС), 2 мМ L-глутаміну в зволоженій атмосфері з 5 % CO_2 при 37 °С. Клітини пересівали через кожні 72 год шляхом розведення клітин у культуральному середовищі у співвідношенні 1:5. Обробку трипсином (1:10 в фосфатно-сольовому буфері) використовували для субстрат-залежних клітин.

До суспензії уражених клітин одночасно вносили два антибіотики: тіамулін (група макролідів) і міноциклін (група тетрациклінів). Концентрація антибіотиків в середовищі становила 5 мМ тіамуліну і 5 мМ міноцикліну.

Виживаність клітин. Кількість живих/мертвих клітин підраховували

у камері Горяєва за допомогою світлового мікроскопу Olympus „CKX 41SF" (Японія) з використанням 0,4 % розчину вітального барвника трипанового синього, який зафарбовує в синій колір мертві клітини з пошкодженою мембраною, тоді як живі клітини залишаються незабарвленими (Strober W., 2015). Морфологічні ознаки клітин оцінювали візуально за використання фазово-контрастної мікроскопії.

Фарбування клітин барвником DAPI та флуоресцентна мікроскопія. Клітини (100×10^3 на лунку) висівали у 6-ти лунковий планшет (GreinerBioOne, ФРН) на скельця у культуральному середовищі, яке містило 10 % ЕТС. Через 24 години клітини двічі промивали у PBS (pH 7,4), фіксували (100 мкл формаліну, 10 мкл Triton X-100 на пробу) упродовж 15 хв за кімнатної температури, фарбували барвником DAPI (4',6-диаміно-2-феніліндол) у кінцевій концентрації 1 % упродовж 5 хв та знову двічі промивали у PBS (pH 7,4). На предметне скло з клітинами та покривне скло наносили спеціальне середовище GelMount (Sigma, США) для тривалого збереження флуоресценції. Цитоморфологічне дослідження проводили з використанням флуоресцентного мікроскопу Carl Zeiss AxioImager A1 (Carl Zeiss, Gottingen, ФРН) та зразки фотографували цифровою фотокамерою (Canon, Японія).

Статистична обробка отриманих результатів дослідження. Статистичну обробку результатів досліджень проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики, зокрема за допомогою t-тесту, одно- та двофакторного дисперсійного аналізу (one-/two-way ANOVA). Відмінність показників при значеннях $p\leq0,05$ вважалась статистично значущою (Prylutskyi Yu.I. et al., 2017). Досліди проводили мінімум у трьох паралелях у кожному з варіантів. Побудову графіків та обробку даних здійснювали за допомогою програм Microsoft Excel 2010 та GraphPad Prism 7. Отримані результати наведені у вигляді середнього арифметичного значення та середньоквадратичного відхилення (M±SD).

Результати дослідження та їх обговорення.

Мікоплазми у культурах клітин можна виявити після фарбування флуоресцентним барвником, зокрема DAPI (4',6-диамідіно-2-феніліндол), який зв'язується з ДНК ядра (Coté R., 2001).Оскільки мікоплазми містять ДНК, відповідно після фарбування афінним до ядра флуоресцентним барвником, можна візуалізувати невеликі точкові сигнали флуоресценції, які можуть концентруватися всередині/на поверхні клітини, а також у культуральному середовищі (Borup-Christensen P. et al., 1988). Тому, флуоресцентна мікроскопія за використання ядерно-афінних барвників, таких як DAPI, є ефективним методом ідентифікації мікоплазм у культурі клітин.

Клітини BR (рис. 1) до (1-2) та після (3-4) комбінованої обробки антибіотиками 5 мМ тіамуліну і 5 мМ міноцикліну культивували на предметних скельцях, після чого забарвлювали 1 мкг/мл DAPI в метанолі та досліджували за допомогою фазово-контрастної (1 і 3) та флуоресцентної (2 і 4) мікроскопії при 400-кратному збільшенні.

Зображення фазово-контрастної мікроскопії (рис. 1) клітин BR показа-

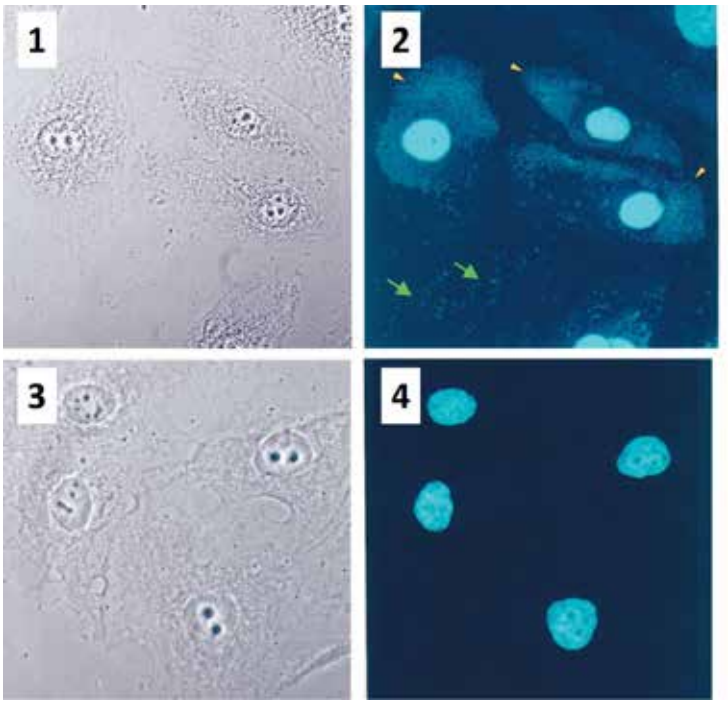

Рис. 1. Зображення інфікованих мікоплазмою клітин BR за допомогою фазово-контрастної (1 і 3) та флуоресцентної (2 і 4) мікроскопії після фарбування DAPI: (1 і 2) – клітини до обробки, (3 і 4) клітини після обробки антибіотиками

ли, що інфіковані мікоплазмою клітини (1) мають щільнішу та підвищену гранулярність, порівняно з неінфікованими клітинами. На зображеннях флуоресцентної мікроскопії (рис. 1 (1)) - жовті стрілки) ДНК мікоплазм має вигляд флуоресценціюючих плям, що сконцентровані в цитоплазмі інфікованих клітин. Зеленими стрілками на рис. 1 (1) позначено вивільнення мікоплазми з клітин хазяїна. Уражені мікоплазмою клітини BR характеризувалися низькою мітотичною активністю.

Нами також було оцінено кількість життєздатних клітин BR в здоровій та інфікованій мікоплазмами культурі з використанням вітального барвника трипанового синього. Встановлено, що кількість життєздатних здорових і заражених мікоплазмою клітин в культурі через 24, 48 та 72 год інкубації суттєво не відрізнялась (табл. 1).

Тобто, отримані результати свідчать, що мікоплазмове забруднення не впливає на кількість пухлинних клітин у культурі, однак може впливати на перебіг фізіолого-біохімічних функції (Coté R., 2001; Uphoff C.C. et al., 2014; Uphoff C.C. et al., 2012), що потребує подальших досліджень.

Контрольне дослідження інфікованих мікоплазмою клітин BR після комбінованої обробки антибіотиками тіамулін і міноциклін в концентрації 5 мМ кожного за використання фазово-контрастної і флуоресцентної мікроскопії та барвником DAPI (рис.1

1. Виживаність клітин BR (% від контролю) після інкубації за використання 0,4 % трипанового синього (M±m, n=5)

Клітини	Терміни інкубації		
	24 год	48 год	72 год
BR (здорові)	100,0±9,4	100,0±9,8	100,0±9,6
BR (інфіковані)	96,0±8,9	90,0±8,9	82,0±7,9

(3,4)) свідчить про повне знешкодження мікоплазмової інфекції в культурі клітин. Слід зазначити, що введення комбінації цих антибіотиків в культуральне середовище на мало впливу на показник виживаності інфікованих мікоплазмою клітин BR.

Висновки та перспективи.

Для ефективного запобігання контамінації мікоплазмами в культурах клітин різного гістогенезу важливим є суворе дотримання асептичних умов, що включає в себе дотримання протоколів підтримки чистоти, стерилізації обладнання та поверхонь, а також мінімізацію утворення аерозолів, які слугують основним шляхом розповсюдження мікоплазми. Як ефективний спосіб деконтамінації за умов in vitro пропонується використання комбінації антибіотиків тіамулін і міноциклін, які ефективно знешкоджують мікоплазми, що доведено на культурі клітин лінії BR.

References

1. Ahangaran, S., Pourbakhsh, S. A., Abtin, A., & Asli, E. (2019). Isolation and Detection of Mycoplasma pneumoniae from Cell Culture by Culture and PCR. Iranian Journal of Medical Microbiology, 13(3), 153-163.
2. Borup-Christensen, P., Erb, K., & Jensenius, J.C. (1988). Curing human hybridomas infected with Mycoplasma hyorhinis. Journal of immunological methods, 110(2), 237–240. https://doi.org/10.1016/0022-1759(88)90109-3
3. Cando-Dumancela, C., Liddicoat, C., McLeod, D., Young, J.M., & Breed, M.F. (2021). A guide to minimize contamination issues in microbiome restoration studies. Restoration Ecology, 29. https://doi.org/10.1111/rec.13358.
4. Carthew, J., Abdelmaksoud, H., Cowley, K., Hodgson-Garms, M., Elnathan, R., Spatz, J., Brugger, J., Thissen, H., Simpson, K., Voelcker, N., Frith, J., & V. Cadarso. (2021). Next Generation Cell Culture Tools Featuring Micro- and Nanotopographies for Biological Screening. Advanced Functional Materials, 32(3): 2100881. https://doi.org/10.1002/adfm.202100881.
5. Coté R. (2001). Assessing and controlling microbial contamination in cell cultures. Current protocols in cell biology, Chapter 1. https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0105s01.
6. Doyle, M., Vodstrcil, L.A., Plummer, E.L., Aguirre, I., Fairley, C.K., & Bradshaw, C. S. (2020). Nonquinolone Options for the Treatment of Mycoplasma genitalium in the Era of Increased Resistance. Open forum infectious diseases, 7(8), ofaa291. https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa291
7. Fay, M.F. (1992). Conservation of rare and endangered plants using in vitro methods, Plant, 28, 1–4. https://doi.org/10.1007/BF02632183
8. Jung, H., Wang, S.Y., Yang, I.W., Hsueh, D.W., Yang, W.J., Wang, T.H., & Wang, H.S. (2003). Detection and treatment of mycoplasma contamination in cultured cells. Chang Gung medical journal, 26(4), 250–258.

9. Lawson-Ferreira, R., Santiago, M.A., Chometon, T.Q., Costa, V.A., Silva, S.A., Bertho, A.L., & de Filippis, I. (2021). Flow-Cytometric Method for Viability Analysis of Mycoplasma gallisepticum and Other Cell-Culture-Contaminant Mollicutes. Current microbiology, 78(1), 67–77. https://doi.org/10.1007/s00284-020-02255-1
10. Ligasová, A., Vydržalová, M., Buriánová, R., Brůčková, L., Večeřová, R., Janošťáková, A., & Koberna, K. (2019). A New Sensitive Method for the Detection of Mycoplasmas Using Fluorescence Microscopy. Cells, 8(12), 1510. https://doi.org/10.3390/cells8121510
11. McNerney, M.P., Doiron, K.E., Ng, T.L., Chang, T.Z., & Silver, P.A. (2021). Theranostic cells: emerging clinical applications of synthetic biology. Nature reviews. Genetics, 22(11), 730–746. https://doi.org/10.1038/s41576-021-00383-3
12. Nikfarjam, L., & Farzaneh, P. (2012). Prevention and detection of Mycoplasma contamination in cell culture. Cell journal, 13(4), 203–212.
13. Pastore, M., Marcone, C., Pennone, F., Cristinzio, G., & Ragozzino, A. (1995). Detection of Mycoplasma-like organisms (MLOs) in apricot by fluorescence microscopy (DAPI) in the South of Italy. Acta Horticulturae, 386, 506-510.
14. Peng, W., Datta, P., Ayan, B., Ozbolat, V., Sosnoski, D., & Ozbolat, I. T. (2017). 3D bioprinting for drug discovery and development in pharmaceutics. Acta biomaterialia, 57, 26–46. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.05.025
15. Regent, F., Morizur, L., Lesueur, L., Habeler, W., Plancheron, A., Ben M'Barek, K., & Monville, C. (2019). Automation of human pluripotent stem cell differentiation toward retinal pigment epithelial cells for large-scale productions. Scientific reports, 9(1), 10646. https://doi.org/10.1038/s41598-019-47123-6
16. Strober W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. Current protocols in immunology, 111, A3.B.1–A3.B.3. https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111
17. Timenetsky, J., Santos, L.M., Buzinhani, M., & Mettifogo, E. (2006). Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas, 39(7), 907–914. https://doi.org/10.1590/s0100-879x2006000700009
18. Uphoff, C.C., & Drexler, H.G. (2014). Detection of Mycoplasma contamination in cell cultures. Current protocols in molecular biology, 106, 28.4.1–28.4.14. https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2804s106
19. Uphoff, C.C., Denkmann, S.A., & Drexler, H.G. (2012). Treatment of mycoplasma contamination in cell cultures with Plasmocin. Journal of biomedicine & biotechnology, 2012, 267678. https://doi.org/10.1155/2012/267678
20. Uphoff, C.C., Gignac, S.M., & Drexler, H.G. (1992). Mycoplasma contamination in human leukemia cell lines. I. Comparison of various detection methods. Journal of immunological methods, 149(1), 43–53. https://doi.org/10.1016/s0022-1759(12)80047-0
21. Uphoff, C.C., Meyer, C., & Drexler, H.G. (2002). Elimination of mycoplasma from leukemia-lymphoma cell lines using antibiotics. Leukemia, 16(2), 284–288. https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402364.
22. Uphoff, C.C., Drexler, H.G. (2013). Detection of Mycoplasma Contaminations. In: Helgason, C., Miller, C. (eds) Basic Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology, vol 946. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-128-8_1
23. Work T.S., Work E., Adams R.L.P., & Burdon R.H. (1980). Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Cell culture for biochemists. Vol. 8, New York: North-Holland Publishing Company.
24. Yin, Z.F., Zhang, Y.N., Liang, S.F., Zhao, S.S.,

Du, J., & Cheng, B.B. (2019). Mycoplasma contamination-mediated attenuation of plasmid DNA transfection efficiency is augmented via L-arginine deprivation in HEK-293 cells. Journal of Zhejiang University. Science. B, 20(12), 1021–1026. https://doi.org/10.1631/jzus.B1900380

25. Young, L., Sung, J., Stacey, G., & Masters, J.R. (2010). Detection of Mycoplasma in cell cultures. Nature protocols, 5(5), 929–934. https://doi.org/10.1038/nprot.2010.43
26. Yu, T., Wang, Y., Zhang, H., Johnson, C. H., Jiang, Y., Li, X., Wu, Z., Liu, T., Krausz, K. W., Yu, A., Gonzalez, F. J., Huang, M., & Bi, H. (2016). Metabolomics reveals mycoplasma contamination interferes with the metabolism of PANC-1 cells. Analytical and bioanalytical chemistry, 408(16), 4267–4273. https://doi.org/10.1007/s00216-016-9525-9
27. Prylutskyi Yu.I., Ilchenko O.V., Tsymbaliuk O.V., & Kosterin S.O. (2017). Statystychni metody v biolohii, Kyiv : Nauk. dumka.

Kokovin M., Tkachenko T., Drozd P., Prylutska S. (2023).
IDENTIFICATION OF MYCOPLASMA CONTAMINATION IN CELL CULTURE
BIOLOGICAL SYSTEMS: THEORY AND INNOVATION, 14(3-4): 76-83.
https://journals.nubip.edu.ua/index.php/Biologiya/article/view/48289
http://dx.doi.org/10.31548/biologiya14(3-4).2023.007

Abstract. *Mycoplasmas are the smallest and simplest prokaryotes wich were found in the endosomes of mammalian cells. They are widespread contaminants in cell cultures. It was identified a mycoplasma infection in a human breast cancer cell line. It was used fluorescence microscopy and nuclear affinity 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining. For the treatment of mycoplasma infection in cell culture, two antibiotics of the macrolide series (Tiamulin) and tetracyclines (Minocycline) was used. The effectiveness of combined antibiotic therapy against mycoplasmas has been proven, which was confirmed by the microscopic method. Therefore, treatment with combined antibiotics can completely eradicate mycoplasma infection from cultured cells.*

Key words*: cell culture, mycoplasma, contamination, identification.*