

Патологические аспекты микоплазменной контаминации клеточных культур

Колокольцова Т.Д.¹, Сабурова И.Н.^{1,2}

¹ — ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

² — ГБОУ ДПО РМАПО (Государственное общеобразовательное учреждение дополнительного профессионального образования Российская медицинская академия последипломного образования), Москва

Известно, что культуры клеток активно используются как в научных исследованиях, так и в производстве медицинских иммунобиологических препаратов. В последние годы клетки, выращенные in vitro, рассматриваются как высокоперспективные для репарации или восстановления органов. Серьезной проблемой при использовании культивированных клеток остается контаминация посторонними микроорганизмами. Контаминация бактериями или грибами происходит неизбежно с той или иной частотой в каждой лаборатории, она легко выявляется, но практически каждый случай означает потерю культуры. Но более серьезной остается проблема микоплазменной контаминации, обусловленная, в первую очередь, широкой распространенностью этого микроорганизма, высокой скоростью размножения и способностью использовать компоненты питательной среды. В обзоре рассматриваются источники микоплазменной контаминации, патологические аспекты влияния микоплазм на структуру и функции клеток, изменение характеристик их роста in vitro; анализируются методы контроля и деконтаминации клеток.

Ключевые слова: культура клеток, контаминация, микоплазма, микоплазменная контаминация, патогенез

Успешное применение в медицине метода культур клеток привело к совершенствованию методов и развитию многих современных технологий. Клетки применяют в производстве медицинских иммунобиологических препаратов (вакцины против кори, гриппа, полиомиелита и другие), для получения биологически активных соединений и препаратов или наработки генно-инженерных препаратов [10, 11, 24]. Получены продуценты гормонов человека, интерферона, моноклональных антител, клетки-продуценты факторов, необходимых для заместительной терапии, в частности фактора VIII свертывания крови для больных тяжелыми формами гемофилии, или используемые при создании противоракового препарата «Канцеролизин» [15–17, 26].

В последние годы особенно активно развивается новое направление выращивания и применения стволовых, прогениторных и дифференцированных клеток человека и животных, перспективных для регенеративной медицины [5, 8, 12–16, 32]. Важное преимущество культивируемых клеток, заключающееся в возможности прижизненного наблюдения поведения клеток с помощью микроскопа, делает их незаменимой моделью для проведения множества исследований в биологии, медицине или фармакологии.

Вместе с тем, серьезной проблемой, ограничивающей возможность их применения, является контаминация культур клеток различными микроорганизмами, в том числе бактериями, грибами, вирусами и микоплазмами. Применение таких клеток в исследованиях не только приводит к получению искаженных результатов, но, прежде всего, небезопасно и для получаемого продукта, и для исследователей, работающих с ними.

Контаминация бактериями или грибами происходит неизбежно с той или иной частотой в каждой лаборатории. Несмотря на то, что существуют схемы обработки клеточных культур с целью устранения такого рода контаминации, практически каждый случай означает потерю культуры. Контаминация латентными и хронически инфицирующими вирусами выявляется наиболее трудно, и

наличие ее может длительное время оставаться незамеченным [2, 11, 12, 19, 24].

Но более серьезной остается проблема микоплазменной контаминации, обусловленная, в первую очередь, широкой распространенностью этого микроорганизма. Как показывает мировой опыт, от 10–15% до 45–90% случаев длительно культивируемых линий клеток были заражены микоплазмами [8, 28, 29, 31]. Наиболее часто микоплазмы, контаминирующие культуры клеток, относятся к видам, поражающим человека, крупный рогатый скот или свиней. Среди часто встречаемых в культуре являются: *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma arginini*, *M. fermentans*, *M. hominis*, *M. hyorhinae*, *M. orale* [33].

Основным источником контаминантов может стать и инфицированная сыворотка крови животных, используемая для выращивания клеток человека или животных, трипсин, факторы роста, гормональные и другие препараты животного происхождения [19, 31]. Из литературы известно, что до 32% серий сыворотки крупного рогатого скота содержат микоплазмы [19]. По другим данным, 10–15% всех линий клеток, используемых в США, так же, как и в Европе, контаминированы микоплазмами [34]. Немецкие ученые из коллекции культур микроорганизмов и клеточных культур Германии опубликовали данные, согласно которым, от 15 до 35% широко используемых линий клеток контаминированы микоплазмами [35].

Другой источник — люди, работающие с этими культурами, и окружающая среда: воздух, пыль, нестерильность посуды, боксового помещения и т.п. Микрокапли, возникающие при работе с культурами, могут содержать до $0,5 \times 10^6$ микоплазм. Такие микрокапли оседают из воздуха на посуду, рабочие поверхности и руки персонала в течение нескольких секунд и могут даже после работы с единичными инфицированными культурами вызывать тяжелое заражение рабочего пространства [175, 323].

Серьезность проблемы заключается в том, что микоплазмы могут никак не проявлять себя, но вместе с тем вызывать серьезные патологические изменения структуры и функции клеток, индуцировать хромосомные аберрации

[4, 24]. Даже при концентрации свыше 10^7 микоплазм в культуральной среде культуры клеток внешне могут выглядеть нормально. При контроле клеток даже под микроскопом можно не увидеть изменений. Эти невидимые изменения, тем не менее, могут приводить к получению фальшивых результатов, публикуемых в научных статьях, а также значительно влиять на производство биологических продуктов вследствие конкуренции за питательные компоненты среды или выделению токсичных продуктов метаболизма [41].

Американские исследователи использовали культуру клеток в качестве модели для исследования метаболизма амилоид-бета пептида при болезни Альцгеймера. Авторы представили доказательства, что микоплазмы, контаминирующие культуры клеток, эффективно и быстро разрушали внеклеточный белок, таким образом искажая результаты исследования [18].

H.S. Cheng с соавторами показали высокую вероятность появления токсического эффекта на клетки, выражающегося в появлении вакуолизованных клеток, дегенерации монослоя, формировании сетчатого, а не плотного монослоя, снижении скорости роста и даже полной гибели клеток [20]. Кроме того, микоплазмы вызывают спонтанную дегенерацию клеток, изменение рН как в кислую, так и щелочную сторону [27].

Показано, что микоплазмы влияют на синтез белков, нуклеиновых кислот, ангиогенез, клеточных мембран, индукцию туморогенных потенциалов, вызывают цитопатический эффект и гибель клеток [19].

В литературе описано множество методов контроля микоплазменной контаминации. Используя разные методы, House W. с соавторами провели исследование клеточных культур. Сравнивая методы специфической окраски, посева на среды, анализа последствий действия микоплазма-специфических ферментов и результатов иммунологического и электронно-микроскопического анализов авторы не пришли к удовлетворительной оценке одного из испытанных тестов [7, 25]. Аналогичные данные получены и другими авторами [22, 39, 40]. В последние годы все больше внимания уделяется методам контроля с помощью PCR-реакции [21, 30].

При создании и поддержании уникальных клеточных линий, высокочувствительных к разным вирусам, продуцирующих в высоких титрах вакцинные штаммы вирусов, или культур клеток-продуцентов рекомбинантных препаратов, возникает проблема освобождения клеток от микоплазм. Для этого используют: антибиотики, химические реагенты либо физические методы [23, 37, 38]. К последним можно отнести воздействие повышенной (до 40–42°C) температуры, фотоинактивацию с помощью предварительной обработки Nuclech 33258/5-Bromiracil или частотно-резонансный метод [6]. Согласно мнению немецких исследователей, удаление микоплазм фактически равносильно нарушению свойств клеток либо созданию новой линии клеток [36].

Учитывая вышеизложенное, важно не только понимать эффективность методов деконтаминации, но и учитывать возможное изменение свойств клеток после обработки препаратами. Именно поэтому контаминированные микоплазмами или другими микроорганизмами выделенные стволовые, прогениторные или малодифференцированные клетки, выращиваемые для проведения научных исследований по их дифференцировке, исследования метаболизма

разных типов клеток или потенциального их применения в регенеративной медицине, не подлежат процессу деконтаминации и обязательно выбраковываются.

Таким образом, микоплазменная контаминация является одной из серьезнейших проблем при получении новых или культивировании известных культур клеток, используемых в научных или прикладных исследованиях. Показано, что микоплазмы влияют на метаболизм, структуру и функции клеток, вызывая, в том числе и цитопатические изменения.

Использование неидентифицированных или неконтролируемых клеток в научных исследованиях приводит к получению ложных результатов, а в производстве препаратов — к нарушению стандартности и их безопасности. Все это еще раз подчеркивает чрезвычайную важность регулярного контроля клеток на возможное присутствие посторонних агентов, в том числе загрязнение микоплазмами. Это особенно важно для научных лабораторий, проводящих исследования с несколькими линиями клеток из разных источников или создающих новые культуры клеток из первичного материала человека или животных. Производство клеток или биопрепаратов в условиях с соблюдением современных правил GLP и GMP значительно снижает риск контаминации.

В свете изложенного особое значение приобретает постановка вопроса о разработке новых отраслевых стандартов по созданию клеточных культур с регламентированными биологическими характеристиками, определяющих качественный уровень проводимых исследований и безопасность получаемых продуктов с учетом известных национальных или международных рекомендаций, принятых ранее для культур клеток, используемых в производстве вакцин [1, 9].

Список литературы

1. Аттестация перевиваемых клеточных линий — субстратов производства и контроля медицинских иммунобиологических препаратов: Методические указания. РД 42-28-10-89. — М., 1989. — 46 с.
2. Биохимические методы выявления латентных онкорнавирусов и микоплазм / В.М. Жданов, А.М. Быковский, Т.А. Бектемиров и др. // *Вопр. мед. химии.* — 1974. — №4. — С. 396—400.
3. Борхсениус С.Н. Микоплазмы: молекулярная и клеточная биология, патогенность, диагностика / С.Н. Борхсениус, О.А. Чернова. — Л.: Наука, 1989. — 156 с.
4. Влияние микоплазменной контаминации клеточной линии легкого эмбриона человека MRC-5 на кариотипическую изменчивость / Г.Г. Полянская, Т.Н. Ефремова, Г.А. Сакута // *Цитология.* — 2000. — №2. — С. 45—46.
5. В Корею нервные клетки теперь восстанавливаются // <http://www.celltherapy.ru/stemcells> (12 февраля 2004).
6. Использование частотно-резонансного метода для деконтаминации клеток от микоплазм / З.Я. Подчерняева, Г.А. Данлыбаева, Т.М. Хижнякова и др. // *Вет. патология.* — 2003. — №1. — С. 15—18.
7. Колокольцова Т.Д. Анализ современных методов выявления микоплазменной контаминации клеточных культур / Т.Д. Колокольцова // *Ведомственный сборник трудов* — 1987. — №10. — С. 128—137.
8. Колокольцова Т.Д. Создание системы аттестованных коллекций и банков культур клеток, используемых для исследований и производства препаратов для иммунопрофилактики, диагностики и лечения: Дисс. на соискание ученой степени д.м.н. — 2008. — 350 с.
9. Комитет экспертов ВОЗ по стандартизации биологических препаратов. 38 доклад. — Женева, 1991. — 44 с.
10. Новохатский А.С. Проблема контаминации клетками и новые подходы к контролю перевиваемых клеток / А.С. Новохат-

- ский, Г.Р. Михайлова, А.А. Царева // *Вопр. вирусологии.* — 1977. — №1. — С. 94—99.
11. Новохатский А.С. Клеточные культуры в вирусологии // *Общая и частная вирусология* / Под ред. В.М. Жданова, С.Я. Гайдамович. — М.: Медицина, 1982. — С. 463—493.
12. Опыт применения культивированных аллофибробластов при лечении ран различной этиологии / Н.Г. Колосов, А.В. Ефремов, Т.Д. Колокольцова и др. // *Вестн. трансплантологии и искусственных органов.* — 2005. — №3. — С. 57—59.
13. Пат. №2189223. РФ МПК А61К9/10; С12N5/08; А61L27/38 Средство для лечения глубоких кожных дефектов / Н.Д. Юрченко, Т.Д. Колокольцова, О.В. Шумакова, и др. (ГНЦ ВБ «Вектор»). — №2000128911; Заявл. 20.11.2000. — Оpubл. 20.09.2002; Бюлл. №17.
14. Пат. №2285040 С2 РФ. МПК С12N 5/08 Штамм диплоидных клеток человека для заместительной терапии (его варианты) / Т.Д. Колокольцова, Е.А. Нечаева, Г.А. Костина, и др. (ГНЦ ВБ «Вектор»). — №2004126519/13; Заявл. 01.09.2004. — Оpubл. 10.10.2006. Бюлл. №4 — 8с.
15. Перспективы использования аттестованных фетальных фибробластов человека при лечении ран различной этиологии / Т.Д. Колокольцова, Н.Д. Юрченко, Н.Г. Колосов и др. // *Вестн. РАМН.* — 1998. — №6. — С. 32—35.
16. Сравнительная оценка эффективности применения аллогенных эмбриональных фибробластов / В.И. Шумаков, М.Ф. Расулов, М.Е. Крашенинников и др. // 2005. — <http://www.medinform.biz>.
17. Создание банков перевиваемой культуры клеток 293 для производства антиракового вирусного лечебного препарата «Канцеролизин» / Г.В. Вдовиченко, И.Ф. Радаева, А.А. Сергеев, Т.Д. Колокольцова и др. // *Биотехнология.* — 2006. — №1. — С. 62—67.
18. Amyloid-beta peptide degradation in cell cultures by mycoplasma contaminants / Zhao H., Dreses-Werringloer U., Davies P., Marambaud P. // *BMC research Notes.* — 2008. — 1:38, doi:10.1186/1756-0500-1-38 <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/1/38>
19. Cell culture contamination: sources, consequences, prevention, and elimination / C. Lincoln C. et al. // *Meth. Cell Biol.: Animal Cell Culture Methods.* — San Diego: Academic Press, 1998. — Vol. 1, №57. — P. 49—65.
20. Cheng H.S., Shen C.W. Wang S.R.. Effect of storage conditions on detection of mycoplasma in biopharmaceutical products // *In vitro Cellular Developmental Biology — Animal.* — 2007. — Vol. 43. — P. 113—119.
21. Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR / J. Timenetsky, L.M. Santos, M. Buzinhani, E. Mettifofo // *Braz. J. Med. Biol. Res.* — 2006. — July. — Vol. 39, №7. — P. 907—914.
22. Drexler H.G. Mycoplasma Contamination of Cell Cultures // *The Encyclopedia of Cell Technology* / H.G. Drexler, C.C. Uphoff; R.E. Spier (ed). — New York: Wiley, 2000. — P. 609—627.
23. Elimination of mycoplasma from infected leukemia cell lines / S. Brauer, B. Hane, S.M. Gignac et al. // *Leukemia.* — 1991. — Vol. 5. — P. 162—165.
24. Hay R.J. Testing cell cultures for microbial and viral contaminants // *Cell Biology: A Laboratory Handbook.* — San Diego: Ac. Press, 1994. — P. 25—62.
25. House W., Hales A., Armitage R. Methods for detecting mycoplasma in cell cultures // *Imper. Cancer. Res. — Fund. Rept., London,* 1973. — P. 108—109.
26. Increase in the antimeasles immune response using immustimulators / E.A. Nechaeva, M.P. Smolina, S.V. Usova, T.D. Kolokoltsova // *Intern. J. Immunorehabilitation.* — 2001. — Vol. 3, №2. — P. 45—46.
27. Macpherson I. Mycoplasmas in tissue culture // *J. Cell Sci.* — 1966. — Vol. 1. — P. 145—168.
28. Mycoplasma detection by PCR analysis / A. Hopert, C.C. Uphoff, M. Wirth et al. // *In Vitro Cell Dev. Biol.* — 1993. — Vol. 29. — P. 819—821.
29. Mycoplasma-horror of cell cultures // <http://www.integra-biosciences.com/e-labstores4.html> Dec. 2006.
30. Nikfarjam L., Farzaneh P. Prevention and Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Culture // *Cell Journal.* — Vol. 13, №4. — 2012. — P. 203—212.
31. Rosengarten R. Quality Control — Mycoplasma Testing // <http://www.vu-wien.ac.at/i102/QCMykopl/qcmykoplE.htm> (Dec.2006).
32. Sommer L., Rao M. Neural stem cells and regulation of cell number // *Prog Neurobiol.* — 2002. — Vol. 66. — P. 1—18.
33. Species-specific PCR for identification of common contaminant mollicutes in cell culture / Kong F., James G., Gordon S., Zelynski A., Gilbert G.L. // *Applied and Environmental Microbiology.* — 2001. — Vol. 67, №7. — P. 3195—3200.
34. Tully J.G. Diagnosis of mycoplasma infections of cell cultures. Introductory remarks // Tully J.G., Razin S., Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma, Vol. II., Diagnostic Procedures. — Academic Press, Inc., San Diego, 1996. — P. 405—410.
35. Uphoff C.C., Meyer C., Drexler H.G. Elimination of mycoplasma from leukemia-lymphoma cell lines using antibiotics // *Leukemia.* — 2002. — Vol. 16. — P. 284—288.
36. Uphoff C.C., Drexler H.G. Comparative antibiotic eradication of mycoplasma infections from continuous cell lines // *In Vitro Cellular & Developmental Biology.* — Animal. — 2002. — Vol. 38, №2. — P. 86—89.
37. Uphoff C.C., Denkmann S.A., Drexler H.G. Treatment of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures with Plasmocin // *Journal of Biomedicine and Biotechnology V.* — 2012. — Article ID 267678. — 8 p.
38. Uphoff C.C., Drexler H.G. Eradication of mycoplasma contaminations // *Methods Mol. Biol.* — 2005. — Vol. 290. — P. 25—34.
39. Uphoff C.C., Gignac S.M., Drexler H.G. Mycoplasma detection in human leukemia cell lines. I. Comparison of different detection methods // *J. Immunol. Methods.* — 1992. — Vol. 149. — P. 43—53.
40. Uphoff C.C., Drexler H.G. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* — 2002. — Vol. 38. — P. 79—85.
41. Winner F., Rosengarten R., Citti C. In vitro cell Invasion of Mycoplasma gallisepticum // *Infect. Immun.* — 2000. — Vol. 68. — P. 4238—4244.

Посылана 15.03.2013

Pathologic aspects of mycoplasma contamination of cell cultures

Kolokoltsova T.D.¹, Saburina I.N.^{1,2}

¹ — Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiyskaya Str. 8, 125315, Moscow, Russia

² — Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow, Russia

It is known that cell cultures are widely used both in research and in the production of medical immunobiological preparations. In recent years, cells grown in vitro, are regarded as highly promising for the repair or restoration of organs. A major problem when using cultured cells remains contamination by microorganisms. Contamination by bacteria or fungi is inevitable with some frequency in each laboratory, it is easy to diagnose, but almost every case means the loss of culture. More serious is the problem of mycoplasma contamination, caused, first of all, the prevalence of this organism, a high rate of reproduction and the ability to use components from the cell culture medium. In the present review the sources of mycoplasma contamination, pathological aspects of the effect of mycoplasma on the structure and function of cells, changing its growth in vitro, the methods of control and decontamination of cells were analyzed.

Key words: cell culture, contamination, mycoplasma, mycoplasma contamination, pathogenesis