

Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика
А.П. Авцына Российского научного центра хирургии имени академика Б.В.
Петровского

Лаборатория роста и развития
Московская школа на Юго-Западе № 1543

Лечение микоплазменных контаминаций клеточной
культуры карциномы легкого мыши LLC1 с помощью
препарата Плазмоцин

Анна Андреевна Маликова

Научный руководитель:

Анна Геннадьевна Соболева

Москва 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	2
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	3
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ:	7
РЕЗУЛЬТАТЫ.....	12
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	20
ВЫВОДЫ.....	21
БЛАГОДАРНОСТИ	21
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	22

ВВЕДЕНИЕ

На протяжении длительного времени культивирование клеток является важнейшей частью исследований в различных областях биомедицины. Одной из основных проблем этой сферы, является заражение клеточных культур микоплазмой (Chernov et. Al., 2014).

Микоплазма (лат. *Mycoplasma*) — это род прокариот из класса Mollicutes (Razin et al., 1998). Он включает в себя более сотни видов, как патогенных, так и мирно сосуществующих с хозяином (Литусов, 2017).

Микоплазменные контаминации представляют собой серьезную проблему для научных исследований (Chernov et al., 2014). Заражение микоплазмами может существенно изменять биохимические процессы в клетках и приводить к их гибели. (Fogh, Holmgren, Ludovici, 1971). Распространенность микоплазменной контаминации в лабораториях варьирует в диапазоне – от 15% до 80%, а в некоторых случаях достигает 100% (Rottem et al. 2012; Drexler. 2002). Это создает серьезные риски получения невоспроизводимых или ложных экспериментальных результатов и выводов.

Обнаружить контаминации микоплазмы можно с помощью ряда способов: ПЦР различного типа, массивно-параллельного секвенирования, иммуноферментного анализа (Volkhov et al., 2011), метода флуоресцентной микроскопии с использованием красителя DAPI (Ligasová et al., 2019). Долгое время наиболее распространенным методом детекции был ПЦР-тест с последующим электрофорезом (Bohmer, Repiska, Danisovie, 2010). В настоящий момент таковым является ПЦР в реальном времени.

Было показано, что удаление микоплазмы специфическими антибиотиками — один из наиболее эффективных способов очищения клеточных культур (Bradshaw, Jensen, & Waites, 2017). Плазмоцин - одно из популярных средств для лечения микоплазмы. Препарат содержит 2 активных бактерицидных антибиотика, нарушающих механизмы синтеза белка и ДНК в бактериальной клетке.

В связи с этим целью работы было вылечить клеточную культуру карциномы легкого мыши LLC1 от микоплазменной контаминации с помощью препарата Плазмоцин (Plasmocin), (InvivoGen (Франция)).

Задачи:

1. Культивировать клетки карциномы лёгкого мыши LLC1
2. Выявить контаминацию микоплазмой культуры клеток LLC1 при помощи набора реактивов Мусо Real-Time (Евроген (Россия))
3. Вылечить клетки LLC1 при помощи антимикробного препарата Плазмоцин (Plasmocin) (InvivoGen (Франция))

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Общие сведения о микоплазме.

Отличительная особенность микоплазмы - отсутствие ригидной клеточной стенки, так как у них нет собственных ферментных систем, необходимых для синтеза компонентов клеточной стенки (Литусов, 2017, Леонович 2024, рис.1). Геном микоплазмы, состоящий из двухцепочечной кольцевой молекулы ДНК, является одним из самых маленьких среди живых организмов (Альбертс и др., 2015).

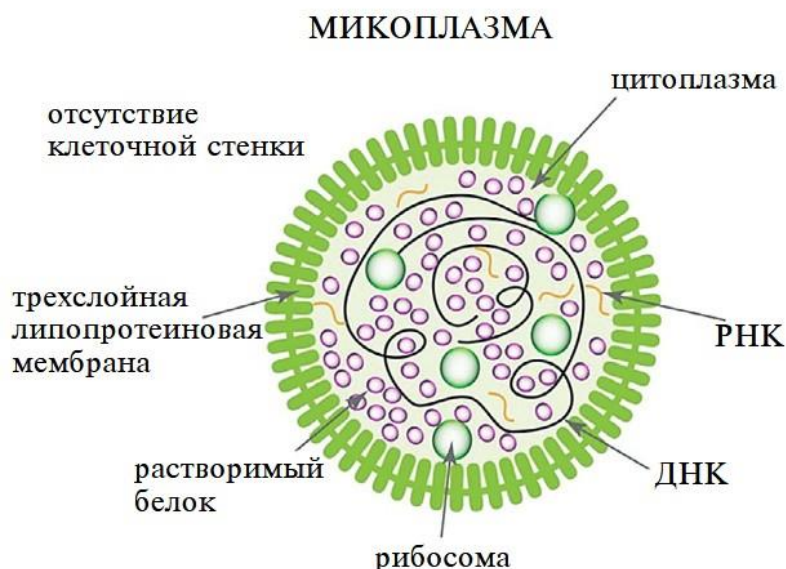


Рисунок 1. Структурная схема микоплазмы. Показано наличие липопротеиновой мембраны с растворимым содержимым в виде белков, РНК, ДНК и отсутствие клеточной стенки и ядерной оболочки. (Леонович, 2024)

2. Влияние микоплазменной контаминации на клеточные культуры, способы заражения

Заражение клеточных культур микоплазмой происходит как в процессе работы, так и через реагенты, компоненты сред и лабораторное оборудование и является частой проблемой культивирования. На сегодняшний день в клеточных культурах выявлено около трех десятков видов микоплазм, при этом в 95% случаев это шесть видов – *Mycoplasma arginini*, *M. fermentans*, *M. hominis*, *M. hyorhinitis*, *M. orale* и *Acholeplasma laidlawii* (Chernov et. Al., 2014).

В латентной форме микоплазменная инфекция может не вызывать видимых изменений в клетках и, следовательно, оставаться незамеченной исследователем даже при высокой концентрации микроорганизмов (до сотни микоплазм на эукариотическую клетку) (Schmidt, Erfle, 1984). Но в большинстве случаев наличие микоплазменных контаминаций приводит к снижению концентрации аргинина, необходимого эукариотической клетке, и, кроме того, к истощению других компонентов питательной среды, так как веществ, которых достаточно для нормального роста клеточных культур, не хватает. Это может привести к остановке деления клеток, апоптозу, замедлению роста и нарушению метаболизма. Аргинин – важный компонент гистонов, и его недостаток может привести к хромосомным перестройкам. Кроме того, бактериальные экзо- и эндонуклеазы могут привести к деградации молекул эукариотических ДНК и РНК (Nikfarjam, Farzaneh, 2012).

3. Детекция микоплазмы

Для обнаружения микоплазмы есть несколько способов: посев на специальные среды, окрашивание клеток флуоресцентными красителями, ПЦР и тест-полоски. В настоящий момент на рынке доступен ряд коммерческих наборов для выявления контаминаций:

Mycoplasma Detection Kit – это набор для детекции микоплазм методом хемилюминесценции основан на активности специфического фермента микоплазмы. Люцифераза в присутствии АТФ катализирует реакцию окисления люциферина, что вызывает биолюминесценцию, измерение которой с помощью люминометра позволяет определить присутствие микоплазменной инфекции в тестируемой пробе.

Наборы от компаний "Evrogen", Россия и "Servicebio", Китай детектируют микоплазму с помощью ПЦР классического - с детекцией на агарозном геле (MycosReport) и ПЦР Real-Time (Mycos Real-Time) - с детекцией в режиме реального времени, что существенно быстрее первого варианта.

Mycos-Blue™ Mycoplasma Detector — это реагент для быстрого обнаружения контаминации микоплазмами в клеточных культурах с помощью изотермальной ПЦР.

Тест-полоски на микоплазму MycoStrip - менее чем за час позволяет определить заражение микоплазмой, их чувствительность помогает определить заражение культуры контаминацией на ранних стадиях (до 10^2 - 10^3 КОЕ/мл), до того, как это сильно повлияет на результаты исследований (более $\sim 10^7$ КОЕ/мл).

DAPI – метод флуоресцентной микроскопии с использованием красителя DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол), который связывается с ДНК, в частности с участками, богатыми аденином и тиминами, и при возбуждении ультрафиолетом излучает синий флуоресцентный свет. Этот метод позволяет визуализировать микоплазму, так как она содержит ДНК, и при отсутствии клеточной стенки микоплазмы флуоресценция от DAPI отчетливо выявляет их присутствие в культуре. (Леонович, 2024)

4. Способы лечения микоплазмы

Отсутствие клеточной стенки у микоплазм делает их нечувствительными ко многим распространенным антибиотикам, поэтому используются специфические классы такие как фторхинолоны, плевомутилины, макролиды и тетрациклины. Преимущество этих классов – относительно низкая цитотоксичность для эукариотических клеток. Тетрациклины и макролиды ингибируют синтез белка микоплазм, и часто

используются для лечения контаминаций. Макролиды успешно применяются для лечения микоплазменных инфекций у человека, например, пневмонии и урогенитальных инфекций (Lee et al., 2017; Jensen et al., 2016). Фторхинолоны ингибируют ДНК-гиразу, фермент, необходимый для репликации ДНК. Плевомутилины ингибируют синтез белка путем связывания с рибосомами. Они обладают высокой активностью против микоплазм и представляют собой перспективный вариант лечения. Однако длительное применение приводит к развитию устойчивости. (Bradshaw, Jensen, & Waites, 2017). Использование комбинаций антибиотиков является эффективным стратегическим подходом к борьбе с бактериями, устойчивыми к монотерапии, поскольку сочетание препаратов с различными механизмами действия замедляет развитие резистентности и имеет разные механизмы воздействия на бактериальную клетку. Например, ингибиторы β -лактамаз, такие как клавулановая кислота, в сочетании с β -лактамными антибиотиками восстанавливают их активность против резистентных штаммов (Михалева Т.И., 2019). Также доказано, что комбинации таких антибиотиков, как новобиоцин с тетрациклином предупреждают быстрое формирование устойчивости у золотистого стафилококка, а изониазид со стрептомицином у микобактерий туберкулеза. (Пунченко О.Е., 2024).

Протоколы описывают однократное использование разнообразных фторхинолонов, у которых можно выделить первичную и вторичную мишень действия. Первичный фермент, подавляется в первую очередь, вторичный - со значительно меньшей силой, что усиливает бактерицидный эффект и снижает вероятность развития резистентности (Сидоренко С.В., 2011). А также комбинированную терапию с антибиотиками из различных классов антибиотиков или антибиотиков и антимикробных пептидов. (Uphoff & Drexler, 2014). Плазмоцин, содержащий два антибиотика, эффективен против широкого спектра микоплазм (Uphoff, Denkmann, & Drexler, 2012). Однако высокая стоимость ограничивает его применение. Разработка эффективных антибиотических протоколов для клеточных культур позволит предотвратить потерю ценных культур и повысить надежность исследований.

Реагент Reagent Plus - представляет собой комбинацию хинолонов, тетрациклинов и макролидов, которые подавляют репликацию ДНК и синтез белка микоплазмы. Данный реагент может полностью удалить микоплазму из инфицированных клеток в течение 5-7 дней.

Набор SweMyco-1+2 включает в себя комбинацию антибиотиков хинолонового, тетрациклинового и макролидного ряда, способные эффективно уничтожать микоплазму, ингибируя у нее репликацию ДНК и

синтез белков. Оптимизированный состав набора обеспечивает низкую цитотоксичность и быстрое разрушение микоплазмы в течение 7-10 дней.

Mycoplasma Prevention Reagent, 1000x - используется для проведения профилактических мер от микоплазмы и представляет собой готовый к применению продукт, содержащий комбинацию из 3-х групп антибиотиков: хинолоны, тетрациклины и макролиды.

Плазмоцин является одним из немногих антимикоплазматических реагентов, которые сочетают в себе макролиды и хинолоны. Эти два антибиотика имеют различные механизмы: один блокирует синтез белка, а другой останавливает репликацию ДНК. Таким образом, Plasmocin более эффективен при удалении микоплазмы и предотвращает генерацию резистентных штаммов. Кроме того, в отличие от других антимикоплазменных препаратов, Плазмоцин активен против свободных, а также внутриклеточных форм микоплазмы. Это преимущество обеспечивается одним из компонентов Плазмоцина, который активно транспортируется в клетки млекопитающих. Это гарантирует, что после лечения клеточные культуры не будут повторно инфицированы микоплазмой, которая ранее была выпущена из внутриклеточных отсеков инфицированных клеток.

Другие методы устранения микоплазменных контаминаций: фильтрация, термическая обработка и фаготерапия представляют собой альтернативные методы лечения, но они менее распространены вследствие своей трудоемкости, ограниченной эффективности и сложности реализации.

Развитие резистентности к антибиотикам – основная проблема в лечении микоплазменной контаминации. Необходимы дальнейшие исследования для разработки новых антимикоплазменных агентов и стратегий лечения, включая комбинации антибиотиков, наночастицы с антимикоплазменной активностью и методы генной инженерии. Понимание механизмов резистентности, как показано на примере животных (Bradshaw et al., 2017; Nata et al., 2019), критически важно для разработки эффективных методов борьбы с микоплазмами в клеточных культурах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ:

1. Культивирование клеток:

Работа выполнена на клетках линии карциномы легкого мыши LLC1. Клетки культивировали в среде DMEM/F12 ("ПанЭко", Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки FBS ("HyClon", США), L-глутамина

("ПанЭко", Россия) и антибиотика (100 мкг/мл стрептомицина). Клетки культивировали в инкубаторе в условиях 5% CO₂ и +37°C. Использовали флаконы площадью 25 см², рис. 2.

Для пассирования отбирали питательную среду, промывали клетки раствором Версена ("ПанЭко", Россия), добавляли 0,05% трипсин-ЭДТА ("Gibco", США) и помещали клетки в термостат с температурой 37° на 10 минут до полного отделения клеток от пластика. Перемещали смесь в центрифужные пробирки и осаждали клетки в центрифуге 5 минут на 300 g. Жизнеспособность и общее количество клеток определяли с помощью автоматического счетчика TC-20 ("Bio-Rad", США) по исключению окрашивания 0,4% трипановым синим ("Bio-Rad", США). Прижизненное наблюдение за культурами клеток осуществляли с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа Axiovert 40 CFL ("Zeiss", Германия).



Рисунок 2. Культуральные флаконы с питательной средой площадью 25 см².

2. Лечение клеток

Клетки пассировали согласно стандартной процедуре, использовали культуральный флакон площадью 25 см². Готовили раствор Плазмоцина в

питательной среде в конечной концентрации 25 мкг/мл. Вносили один миллион клеток на 5 мл приготовленной среды с препаратом. Каждые 3-4 дня на протяжении двух недель пассировали клетки для поддержания активной пролиферации. Далее культивировали клетки в течение такого же времени без препарата. Для подтверждения удаления микоплазмы использовали набор реагентов Myco Real-Time ("Evrogen", Россия).

3. Выделение ДНК

Геномную ДНК выделяли из клеток линии LLC1 с использованием набора реагентов ExtractDNA Blood & Cells ("Evrogen", Россия) согласно протоколу производителя.

Клетки культивировали до достижения 80-90% конfluence. Перед началом процедуры выделения клетки осаждали центрифугированием (5 минут при 300 g) и ресуспендировали в пробирке. К клеточному материалу последовательно добавляли 10 мкл Протеинкиназы К и 100 мкл Лизирующего раствора, а затем 10 мкл суспензии Gaus, предварительно перемешав на вортексе. Полученную смесь перемешивали в течение 20 секунд. Пробирки инкубировали в термостате «Гном» при 56°C в течение 10 минут, при этом содержимое перемешивали на вортексе каждые три минуты. После добавляли 100 мкл 96% этанола и перемешивали на вортексе 1 минуту. Затем вносили 400 мкл Связывающего раствора и перемешивали на вортексе до получения гомогенной смеси. Смесь центрифугировали при 11000 rpm в течение 1 минуты. Затем 700 мкл супернатанта аккуратно переносили в микроцентрифужные колонки, помещенные в собирательные пробирки. Колонки центрифугировали в течение 30 секунд. Затем колонки трижды промывали, добавляя по 700 мкл промывочного раствора и центрифугируя после каждого добавления в течение 30 секунд. Для удаления остаточного этанола, колонки центрифугировали без раствора и затем переносили в новые 1.5 мл микроцентрифужные пробирки. Колонки оставляли открытыми на 5 минут для полного испарения спирта. Для элюции ДНК, в центр мембраны колонки добавляли 50 мкл предварительно нагретого до 56°C Элюирующего раствора и инкубировали 5 минут при комнатной температуре. Окончательно, колонки центрифугировали 1 минуту при 11000 rpm для сбора очищенной ДНК.

4. Скрининг клеток для определения контаминации микоплазмой

Набор Myco Real-Time ("Evrogen", Россия) позволяет обнаружить

геномную ДНК *Mycoplasma orale*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. hominis*, *M. hyorhinitis* и *Acholeplasma laidlawii*, *M. salivarium*, *M. bovis*, *M. lipophilum*, *M. canadense*. Анализ проводится методом ПЦР в реальном времени с зондами типа TaqMan.

Реакции с исследуемыми образцами выполняли одновременно с двумя контролями: – отрицательный контроль без матрицы (NTC) — контроль чистоты реактивов от примесей экзогенной ДНК. В качестве NTC использовали «Deionized water, nuclease-free», входящий в состав набора; – положительный контроль (ПКО) — образец «MycDNA Control», содержащий фрагмент ДНК *M. arginini* (входит в состав набора). Для получения достоверных результатов все реакции выполняли в двух технических повторах (табл.2, лунки A1 и B1).

Перед началом составления реакционной смеси, все компоненты набора были разморожены при комнатной температуре. Содержимое каждой пробирки тщательно перемешивали на вортексе, избегая образования пены, и центрифугировали для осаждения капель.

Реакционная смесь была приготовлена на основе числа исследуемых образцов (N), с учетом контрольных образцов NTC (контроль без матрицы) и ПКО (позитивный контрольный образец). Расчет необходимого объема каждого компонента представлен в Таблице 1. После приготовления, смесь тщательно перемешивалась на вортексе.

Таблица 1. Расчет количества образцов для реакционной смеси

Компонент	Количество на N образцов, мкл*
5X PCRmix Myco RT	5.5 x (2N + 4)
5X Oligo Myco RT	5.5 x (2N + 4)
Deionized water, nuclease-free	14.3 x (2N + 4)

* N – количество исследуемых образцов.

В каждую пробирку для ПЦР вносили по 23 мкл подготовленной реакционной смеси. Затем в соответствующие пробирки добавляли:

- 2 мкл «Deionized water, nuclease-free» – для контроля без матрицы (NTC);
- 2 мкл ДНК исследуемых образцов – в пробирки для образцов;
- 2 мкл «MycDNA Control» – для позитивного контрольного образца (ПКО).

После внесения всех компонентов, пробирки центрифугировали в течение 15 секунд для осаждения капель со стенок.

В каждой пробирке проходят одновременно две реакции: специфическая и внутреннего контроля. Для определения ДНК микоплазмы проводили специфическую амплификацию фрагмента высококонсервативного участка генома, кодирующего 16S рРНК. Образование специфического продукта амплификации регистрируется в канале FAM (Green). Для выявления ингибиторов ПЦР одновременно в этой же пробирке проходила амплификация внутреннего контроля (ВК) с искусственной ДНК матрицы, включенной в состав реакционной смеси. Реакцию ВК регистрировали в канале HEX (Yellow, VIC). (Инструкция по применению Myco Real-Time ("Evrogen", Россия)).

ПЦР в реальном времени проводили при помощи амплификатора DTprime 4 ("ДНК-Технология", Россия) с использованием программы амплификации, приведенной в таблице 2. Всего клетки тестировали трижды: до лечения, спустя неделю лечения и через две недели после окончания лечения.

Результаты ПЦР теста мы приводим в виде таблицы (табл.3) и графиков (рис.5). Где рост синей линии выше базового уровня (0) указывает на присутствие ДНК микоплазмы в образце. Чем раньше (меньше номер цикла) она начинает расти, тем выше изначальная концентрация ДНК микоплазмы. Зелёный канал используется для детекции внутреннего контроля амплификации. Наличие четкой зеленой кривой во всех образцах подтверждает, что ПЦР-реакция прошла успешно и реагенты работают корректно.

Таблица 2. Температурно-временные этапы ПЦР (Программа амплификации)

Этап	Температура	Продолжительность	Считывание флуоресценции
Денатурация (Hold)	95 °C	3 мин	-
Отжиг и элонгация 45 циклов (Cycling)	95 °C	10 с	-
	60 °C	1 мин	FAM, HEX

(Денатурация – разрыв двухцепочной ДНК; Отжиг и элонгация – праймеры связываются с одноцепочечной матрицей и ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь.)

5. Цитохимический анализ

5.1. Фиксация клеток

Для проведения цитохимического (ЦХ) анализа клетки выращивали в чашках Петри (диаметр 52 мм) на покровном стекле (confocal dishes). На

стекло вносили 100 000 клеток в 700 мкл полной питательной среды и равномерно распределяли их по поверхности при помощи наконечника дозатора. Для адгезии клетки инкубировали в течение ночи во влажной камере при 37°C. На следующий день культуру фиксировали следующим образом: дважды промывали клетки теплым буферным раствором (PBS или раствор Хэнкса) для удаления остатков среды, полностью удаляя жидкость с помощью автоматического дозатора. Затем проводили префиксацию, добавляя охлажденный до –20°C абсолютный метанол (2 мл на чашку диаметром 35 мм), помещая чашку на хладоэлемент. Фиксацию осуществляли в течение 1–2 минут, после чего метанол тщательно удаляли. Далее добавляли 2% раствор параформальдегида в PBS (2 мл на чашку 35 мм) и фиксировали клетки при комнатной температуре в течение 10 минут. После фиксации отмывали клетки не менее двух раз по 5 минут буферным раствором (PBS, 3–4 мл).

5.2 Окрашивание DAPI

Буферный раствор удаляли, затем добавляли 2 мл раствора DAPI (0,1 мкг/мл). Чашки с клетками инкубировали при 37°C в течение 5 минут. По окончании инкубации раствор DAPI удаляли и клетки дважды промывали PBS в течение 3 минут.

5.3 Монтаж образцов

На чистое предметное стекло наносили 1–2 капли AquaPolyMount. Покровное стекло с окрашенными клетками брали за края руками и вертикально ставили на фильтровальную бумагу на несколько секунд для удаления излишков PBS. Затем стекло осторожно помещали клетками вниз на каплю монтирующей среды и плотно прижимали к предметному стеклу, чтобы избежать образования воздушных пузырей.

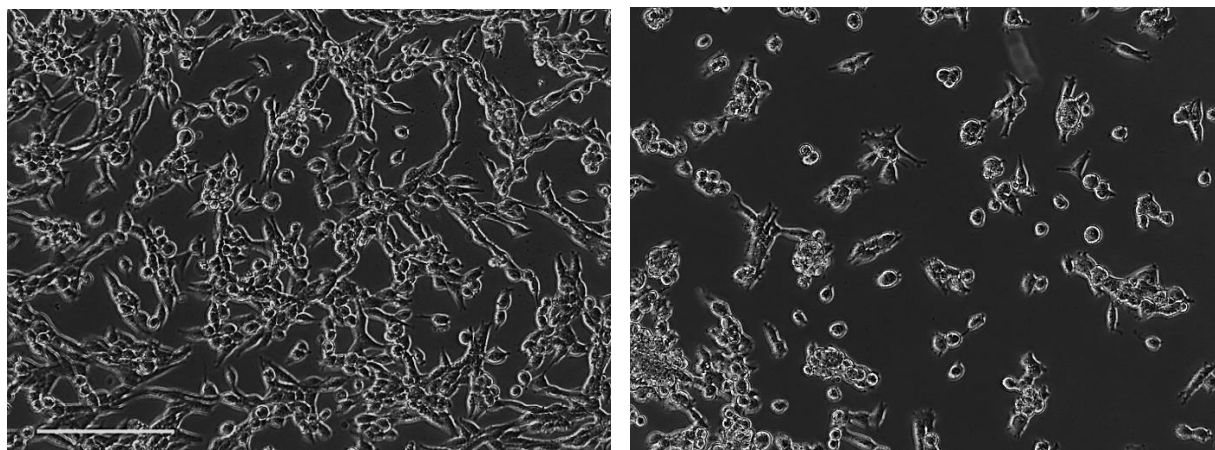
Полученные образцы визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000 B (Leica Microsystems, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Морфология исследуемых клеток

В эксперименте были использованы клетки линии LLC1, представленные на рис. 3 в различной степени конфлюентности. Морфологически эти клетки вытянутые, веретенообразной формой и при росте образуют разветвленную сеть. Наблюдается изменчивость клеток по размеру. Ядра крупные, содержат выраженные глыбки хроматина и 1–2 крупных ядрышка (Рис. 4). Наблюдаются фигуры митоза (например, анафазы) в отдельных клетках и единичные клетки

с признаками апоптоза или некроза. Лечение Плазмоцином снижало скорость пролиферации клеток на 50-60%.



а)

б)

Рисунок 3. Клетки карциномы лёгкого мыши LLC1 до лечения в разной степени конfluентности. Увеличение 200×. а) – 93% проективного покрытия; б) – 20% проективного покрытия.

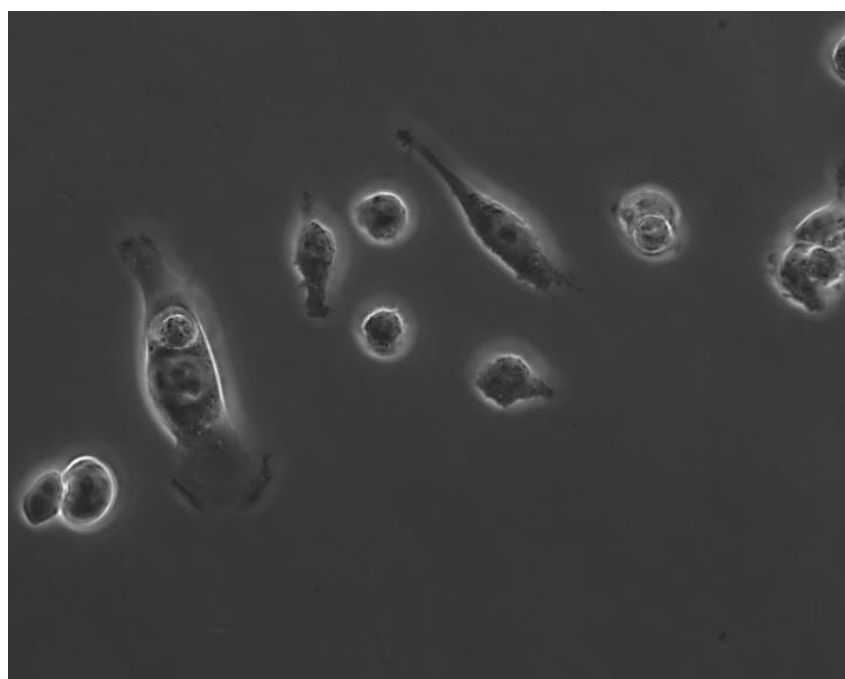


Рисунок 4. Единичные клетки LLC1. Увеличение 400×.

2. Результаты лечения клеточной культуры LLC1 при помощи Плазмоцина.

Детекцию микоплазмы проводили до лечения клеток линии LLC1 и получили следующие результаты:

Анализ контрольных образцов подтвердил достоверность полученных результатов (табл.3): отрицательный контроль (Deionized water, nuclease-free; лунки A1, B1) показал стабильное значение C_p в канале HEX (16,2-16,3) и полное отсутствие сигнала C_p в канале FAM. Это подтверждает отсутствие контаминации микоплазмой и чистоту реагентов. Положительный контроль (MycDNA Control; лунки E1, F1) продемонстрировал стабильные значения C_p в канале HEX (15,7–16,1). В канале FAM были получены значения C_p 21,5–20,7, что значительно ниже порогового значения 38,0. Это свидетельствует о корректной амплификации и детекции микоплазмы в контрольном образце.

В образцах клеточной линии LLC1 (лунки C1, D1) значения C_p в канале HEX также оставались стабильными (16,0-16,3). В канале FAM для обеих лунок было зафиксировано значение C_p 27,6. Хотя это значение выше, чем у положительного контроля, оно значительно ниже порогового значения 38,0. Согласно протоколу производителя, это указывает на наличие контаминации в исследуемых образцах LLC1 (табл. 3).

Данные графика (рис. 5) подтверждают корректность проведения ПЦР-теста, так как присутствует 6 четких амплификационных зеленых кривых в канале HEX. Две чётко выраженные синие кривые с низким значением C_p , указывающие на наличие микоплазмы в положительном контроле (ПКО) и отсутствие её в отрицательном (NTC). Наблюдаются две выраженные красные кривые с низким значением C_p , что однозначно указывает на сильную микоплазменную контаминацию клеточной линии LLC1.

Таким образом, полученные данные подтверждают обнаружение микоплазмы в культуре LLC1.

Таблица 3. Результаты ПЦР-теста клеточных культур на наличие микоплазменных контаминаций до начала лечения.

Номер лунки	Идентификатор пробирки	C_p , Fam	C_p , Hex
A1	H2O		16,2
B1	H2O		16,3
C1	LLC1	27,6	16,0
D1	LLC1	27,6	16,3
E1	Мусо	21,5	15,7
F1	Мусо	20,7	16,1

A1, B1 - отрицательный контроль (вода); C1, D1 – клоны клеток LLC1; E1, F1 – положительный контроль (клетки, зараженные микоплазмой)

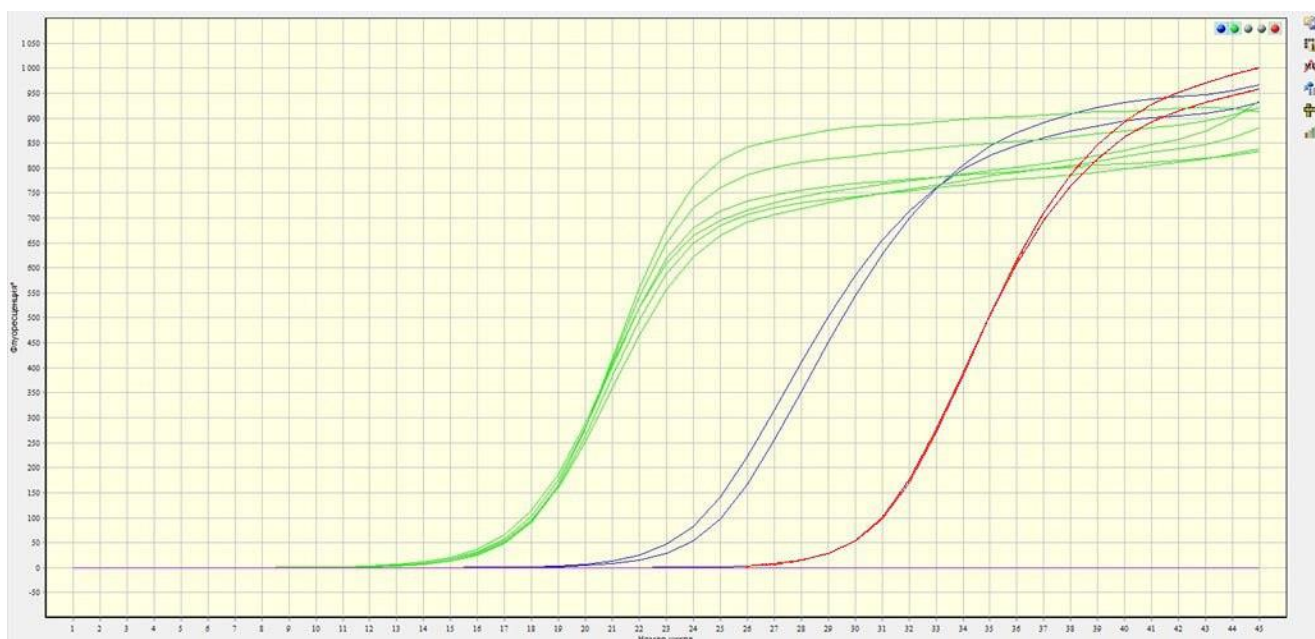


Рисунок 5. Кривые накопления флуоресценции в ходе ПЦР-анализа. Ось X: номер цикла амплификации. Ось Y: относительная интенсивность флуоресценции (R_n или ΔR_n), пропорциональная количеству амплифицированного продукта. Синие (MycDNA Control) и красные (исследуемый образец) кривые представляют флуоресцентный сигнал, детектируемый в FAM-канале. Зелёные кривые представляют флуоресцентный сигнал, детектируемый в HEX канале.

Спустя неделю (половину срока) лечения был проведен аналогичный пцр тест. Анализ контрольных образцов (Deionized water, nuclease-free; лунки A1, B1 и MycoDNA Control; лунки E1, F1, табл.4) так же подтвердил достоверность полученных результатов.

В образцах клеточной линии LLC1 (лунки C1, D1) значения C_p в канале HEX также оставались стабильными (среднее 14,7-15). В канале FAM зафиксировано повышение значения: с 27,6 до 35,1 (среднее по двум), но оно всё еще ниже порогового значения 38,0. Что свидетельствует о следовых количествах микоплазмы (табл.4).

Данные графика (рис. 6) так же подтверждают корректность проведения ПЦР-теста. Наблюдаются две выраженные красные кривые (которые гораздо короче кривых с рис. 5) с достаточно высоким значение C_p , что так же указывает на остаточные количества микоплазмы.

Таблица 4. Результаты ПЦР-теста клеточных культур на наличие микоплазменных контаминаций через неделю лечения.

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср, Fam	Ср, Hex
A1	H2O		15
B1	H2O		15,2
C1	LLC1	35,3	15
D1	LLC1	34,7	14,7
E1	Myco	20,3	14,7
F1	Myco	20,5	15,2

A1, B1 - отрицательный контроль (вода); C1, D1 – клоны клеток LLC1; E1, F1 – положительный контроль (клетки, зараженные микоплазмой).

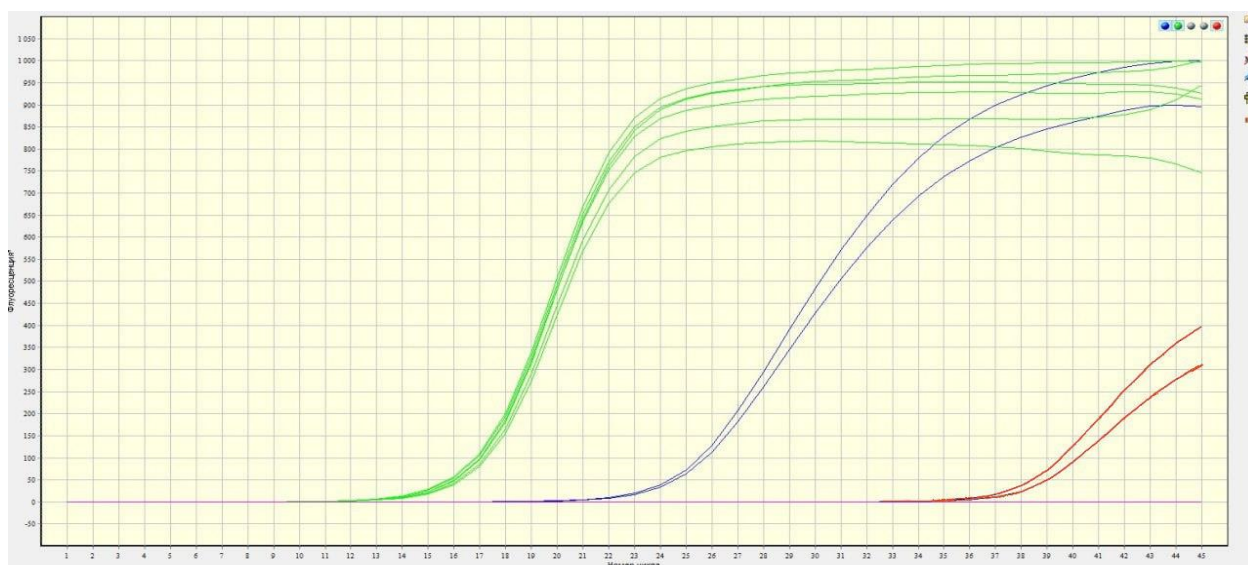


Рисунок 6. Кривые накопления флуоресценции в ходе ПЦР-анализа. Ось X: номер цикла амплификации. Ось Y: относительная интенсивность флуоресценции (R_n или ΔR_n), пропорциональная количеству амплифицированного продукта. Синие (MycoDNA Control) и красные (исследуемый образец) кривые представляют флуоресцентный сигнал, детектируемый в FAM-канале. Зелёные кривые представляют флуоресцентный сигнал, детектируемый в HEX канале.

По завершении лечения анализ контрольных образцов (Deionized water, nuclease-free; лунки A1, B1 и MycoDNA Control; лунки E1, F1, табл.5) так же подтвердил достоверность полученных результатов.

В образцах клеточной линии LLC1 (лунки C1, D1 - табл.5) значения Ср в канале HEX также оставались стабильными (среднее 17,4-17,8). В канале FAM в обоих лунках отсутствует значение, что свидетельствует о полном отсутствии микоплазмы. Данные результаты подтверждает график (рис.7), на нём полностью отсутствуют красные кривые, характеризующие

флуоресцентный сигнал, детектируемый в FAM-канале, указывающий на наличие контаминаций.

Таблица 5. Результаты ПЦР-теста клеточных культур на наличие микоплазменных контаминаций через две недели после завершения лечения.

Номер	Идентификатор	Cp, Fam	Cp, Hex
A1	H2O		18,6
B1	H2O		18,2
C1	LLC1		17,8
D1	LLC1		17,4
E1	Myco-control	20,3	17,7
F1	Myco-control	20,8	18,6

A1, B1 - отрицательный контроль (вода); C1, D1 – клоны клеток LLC1; E1, F1 – положительный контроль (клетки, зараженные микоплазмой).

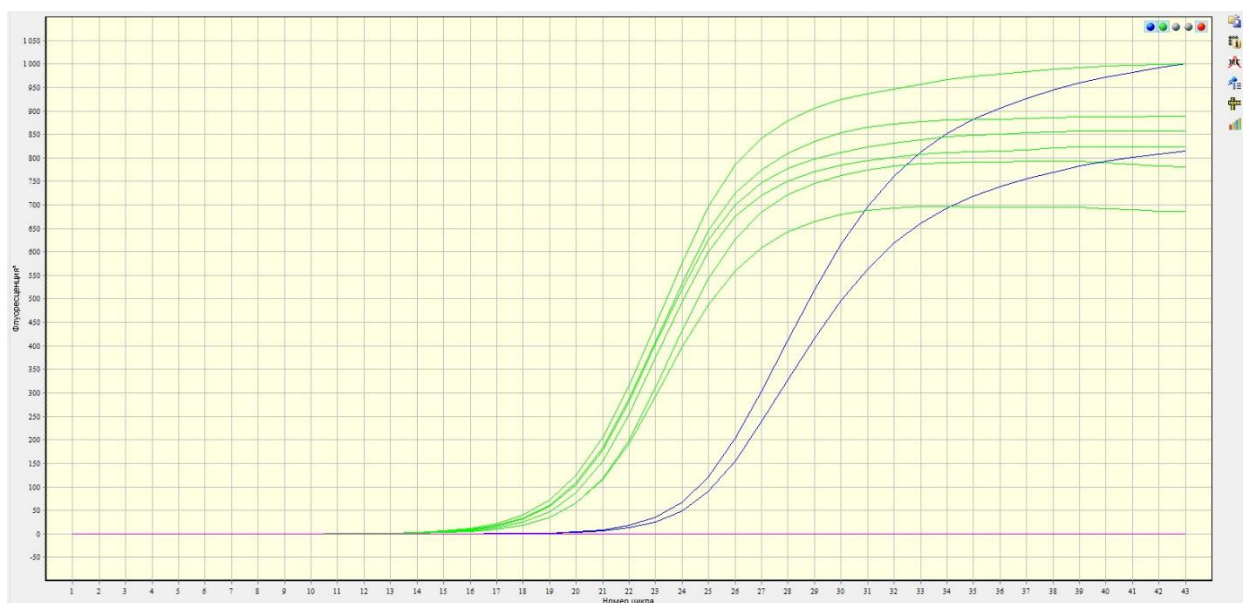


Рисунок 7. Кривые накопления флуоресценции в ходе ПЦР-анализа. Ось X: номер цикла амплификации. Ось Y: относительная интенсивность флуоресценции (R_n или ΔR_n), пропорциональная количеству амплифицированного продукта. Синие (MycoDNA Control) кривые представляют флуоресцентный сигнал, детектируемый в FAM-канале.

Зелёные кривые представляют флуоресцентный сигнал, детектируемый в HEX канале.

3. Результаты ЦХ анализа клеток LLC1 после лечения.

DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол) связывается с ДНК микоплазмы, что позволяет визуализировать их под флуоресцентным микроскопом.

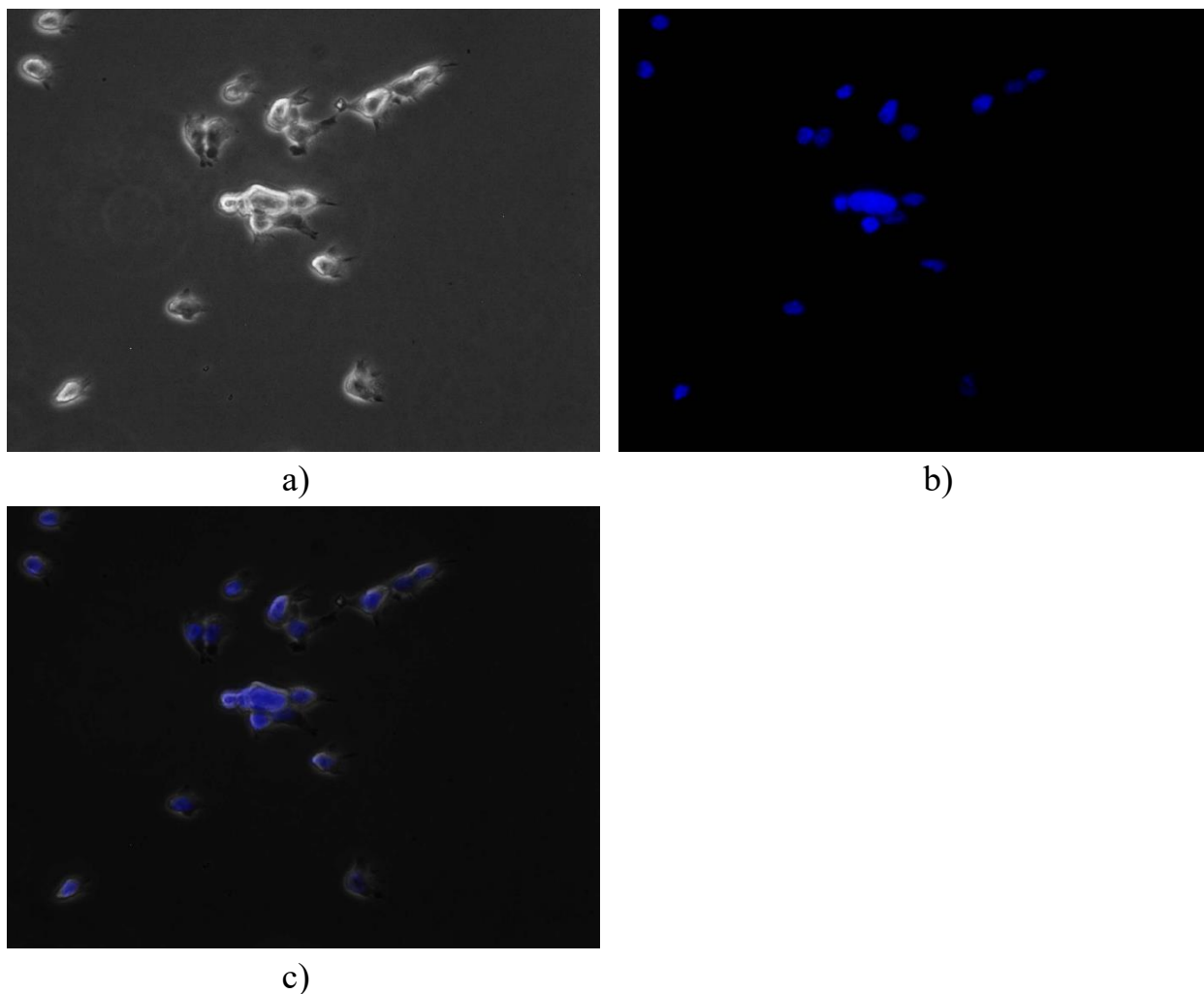
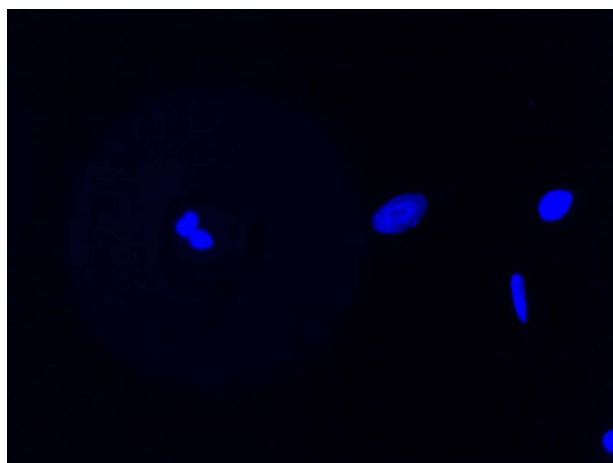
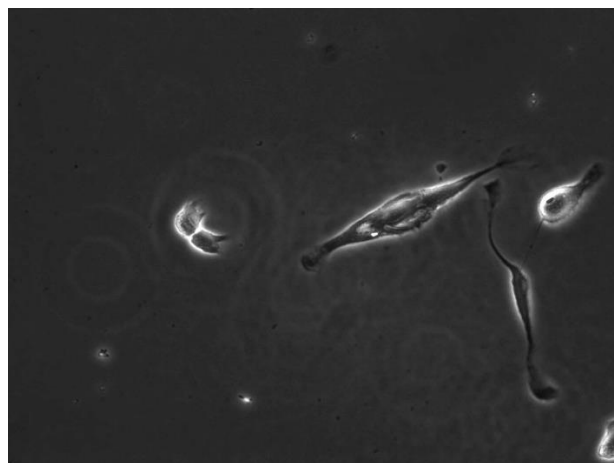


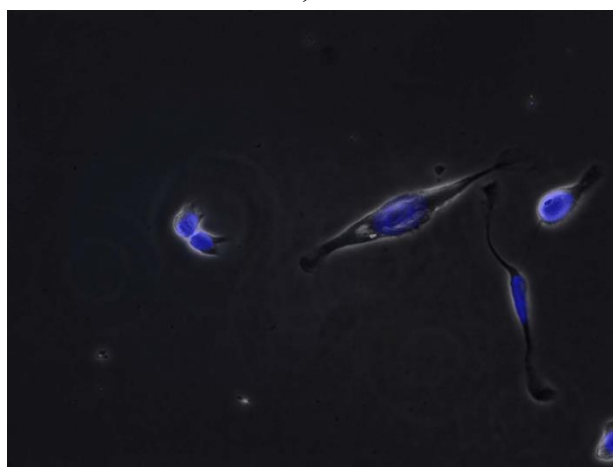
Рисунок 8. Клетки линии LLC1, окрашенные DAPI, после лечения. а) Клетки LLC1, визуализированные с помощью фазово-контрастной микроскопии; б) Ядра клеток LLC1, окрашенные DAPI (флуоресцентное синее свечение), визуализированные с помощью флуоресцентной микроскопии; в) “merge” объединение изображений.



a)



b)



c)

Рисунок 9. Клетки линии LLC1, окрашенные DAPI, после лечения. а) Клетки LLC1, визуализированные с помощью фазово-контрастной микроскопии; б) Ядра клеток LLC1, окрашенные DAPI (флуоресцентное синее свечение), визуализированные с помощью флуоресцентной микроскопии; c) “merge” объединение изображений.

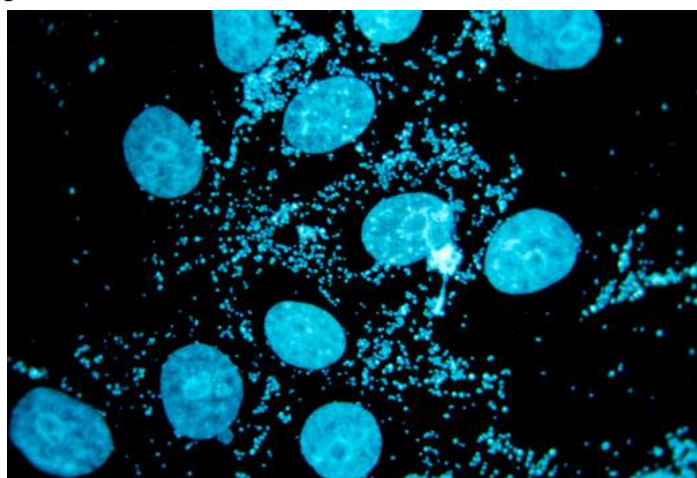


Рисунок 10. Ядра клеток, зараженные микоплазмой, окрашенные DAPI и визуализированные с помощью флуоресцентной микроскопии. Фотография Susan Hubchak, 2019.

В результате цитохимического анализа не выявлено нуклеиновых кислот вне ядер клеток, что подтверждается изображением на рисунке 10. На фотографиях, полученных методом флуоресцентной микроскопии (рис. 8 и рис. 9), контаминация отсутствует. Краситель DAPI окрасил исключительно ядра клеток, при этом побочное свечение, характерное для микоплазм, не обнаружено.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Морфология клеток LLC1.

Клетки линии LLC1 демонстрируют типичную для данного типа клеток морфологию — вытянутую веретенообразную форму с образованием разветвленной сети при росте (Plotnikova N.A., 2014). Различие размеров клеток и крупные ядра с выраженными ядрышками указывают на высокую метаболическую и пролиферативную активность культуры. Наличие фигур митоза подтверждает активное деление клеток, что важно для поддержания жизнеспособности культуры в экспериментальных условиях. При этом единичные клетки с признаками апоптоза или некроза могут отражать естественный цикл или стресс от культивирования.

2. Микоплазменная контаминация и эффективность лечения Плазмоцином.

До начала лечения ПЦР-тест выявил наличие микоплазмы в культуре LLC1, что подтверждается значениями C_r в FAM-канале (оно значительно ниже порогового уровня 38.0), а также характерными амплификационными кривыми. Отсутствие сигнала в отрицательном контроле и его наличие в положительном контроле свидетельствуют о корректности и валидности проведенного анализа.

После недели лечения наблюдалось заметное повышение значения C_r в FAM-канале (с 27.6 до 35.1), что указывает на существенное снижение количества микоплазмы, однако контаминация сохранялась на уровне следовых количеств. Это свидетельствует об эффективности Плазмоцина, который смог значительно подавить рост микоплазмы, за половину указанного срока.

По завершении курса лечения микоплазма была полностью удалена: значения C_r в FAM-канале отсутствовали, а амплификационные кривые, характерные для микоплазмы, не были зарегистрированы. Эти данные однозначно свидетельствуют о полной очистке клеточной культуры LLC1 от микоплазменной контаминации.

3. Цитохимический анализ.

Отсутствие микоплазменных сигналов при флуоресцентной микроскопии после лечения дополнительно подтверждает успешность лечения. Окрашивание DAPI выявило только ядра клеток, без признаков микоплазменного побочного свечения (рис.10), что подтверждает результаты ПЦР.

4. Направления дальнейших исследований.

В будущих исследованиях для понимания лучшей эффективности препарата было бы интересно изучить механизм развития резистентности к Плазмоцину у различных клеточных линий и отдельных культур.

Помимо этого, важным направлением является исследование действия новых комбинаций антибиотиков, которые могли бы либо усиливать эффективность, либо снижать риск формирования устойчивых штаммов.

ВЫВОДЫ

1. Клетки карциномы лёгкого мыши LLC1 размножены в необходимом количестве для детекции и лечения микоплазменной контаминации.
2. Клетки LLC1 вылечены от микоплазм с использованием коммерческого препарата Плазмоцин.
3. Эффективность лечения показана при помощи набора реактивов для выявления контаминации микоплазмой культур клеток методом ПЦР-РВ Мусо Real-Time.

БЛАГОДАРНОСТИ

Я благодарю администрацию Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына Российского научного центра хирургии имени академика Б.В. Петровского, в особенности Ельчанинова Андрея Владимировича за возможность проведения исследований на территории института, за предоставление культур клеток и необходимого оборудования, Глаголева Сергея Менделевича за организацию лабораторной практики, Соболеву Анну Геннадьевну за предоставление места в лаборатории и неоценимую помощь в выполнении работы, Лосицкого Георгия Андреевича и Александрову Софию Анатольевну за обучение и помощь в выполнении работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Альбертс Б., Брей Д., Хопкин К. и др. Основы молекулярной биологии клетки; пер. с англ. – М., БИНОМ // Лаборатория знаний. 2015; - 768 с.
2. Литусов Н.В. Микоплазмы. Иллюстрированное учебное пособие // Екатеринбург: Изд-во УГМУ. 2017; – 19 с, илл.
3. Михалёва Т. В., Захарова О. И., Ильясов П. В. Антибиотикорезистентность: современные подходы и пути преодоления (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2019; 55 (2), 124 - 132.
4. Плазмоцин, 1000х, 25 мг/мл (InvivoGen (Франция)) инструкция по применению.
5. Пунченко О.Е., Пунченко Е.В., Гостев В.В., Савченко М.В. Определение чувствительности бактерий к комбинации антибиотиков и фагов: обзор литературы // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2024; 101(5), 699 – 705.
6. Сидоренко С.В. Фторхинолоны: свойства и клиническое применение // Трудный пациент. 2011; 9(5), 21-27.
7. Baron S. Medical Microbiology // University of Texas Medical Branch. 1996; 1(4), - 357 pp.
8. Bohmer D., Repiska V., Danisovie L. Introduction to Medical and Molecular Biology // Bratislava, Asklepios. 2010; - 95 pp.
9. Chernov V.M., Chernova O.A., Sanchez-Vega J.T., Kolpakov A.I., Ilinskaya O.N. Mycoplasma Contamination of Cell Cultures: Vesicular Traffic in Bacteria and Control over Infectious Agents // Acta Naturae. 2014; 3(22), 41-51.
10. Drexler H.G., Uphoff C.C. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention // Cytotechnology. 2002; 39(2), 75–90.
11. Fogh O., Holmgren N.B., Ludovici P.P. A review of cell culture contaminations // In Vitro. 1971; 7(1), 26-41.
12. Hubchak, Susan. Small DAPI dots. blue specks in transfected cells. What can I do to avoid this? // Researchgate. 2019.
13. Ligasová A., Vydržalová M., Buriánová R. et al. A New Sensitive Method for the Detection of Mycoplasmas Using Fluorescence Microscopy // Cells. 2019; 8(12), - 1510
14. Myco Real-Time ("Evrogen", Россия) инструкция по применению.
15. Plotnikova N.A., Pyataev N.A., Kanaev P.M., Kokorev A.V., Kemaykin

- S.P., Kharitonov S.V., Gromova s.v. morphological features of the lewis lung carcinoma during treatment with melatonin and 3-hydroxypiridine // Fundamental research. 2014; 10(3), 549-552.
16. Razin S., Yogev D., Naot Y. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas // Microbiology and Molecular Biology Reviews. 1998; 62(4), 1094-1156.
 17. Rottem S., Kosower N.S., Kornspan J.D. Contamination of tissue cultures by Mycoplasmas, Biomedical tissue culture // Ceccherini-Nelli L, editor. Biomedical Tissue Culture. 2012; - 250 pp.
 18. Schmidt J., Erfle V. Elimination of mycoplasmas from cell cultures and establishment of mycoplasma-free cell lines // Experimental Cell Research. 1984; 152(2), 565-570.
 19. Uphoff C.C., Denkmann S.A., Drexler H.G. Treatment of mycoplasma contamination in cell cultures with Plasmocin // Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2012; 267678.
 20. Volokhov D.V., Graham L.J., Brorson K.A. et al. Mycoplasma testing of cell substrates and biologics: Review of alternative non-microbiological techniques // Molecular and Cellular Probes. 2011; 25(2-3), 69 – 77.