

УДК 579.8.05

Микоплазменные контаминации клеточных культур: везикулярный трафик у бактерий и проблема контроля инфектогенов

В. М. Чернов^{1,2}, О. А. Чернова^{1,2}, Х. Т. Санчес-Вега³, А. И. Колпаков^{2*}, О. Н. Ильинская²¹Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, 420111, Казань, ул. Лобачевского, 2/31²Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18³Национальный автономный университет Мексики, Койокаян, 04510, Мексика

E-mail: ljoscha@mail.ru

Поступила в редакцию 16.04.2014

РЕФЕРАТ Клеточные культуры подвержены контаминации как клетками других культур, так и микроорганизмами, включая грибы, вирусы, бактерии. Особое значение имеет контаминация клеточных культур микоплазмами. Поскольку культуры клеток используются для получения вакцин и физиологически активных соединений, разработка системы контроля контаминации актуальна как для фундаментальной науки, так и для биотехнологических производств. Обнаружение у микоплазм внеклеточных мембранных везикул диктует необходимость учета везикулярного трафика бактерий в системе контроля инфектогенов. Внеклеточные везикулы бактерий опосредуют трафик белков и генов, участвуют в межклеточных взаимодействиях, патогенезе и развитии резистентности к антибактериальным препаратам. В обзоре рассмотрены особенности микоплазм и их внеклеточных везикул, а также взаимодействие контаминантов с клетками эукариот, проанализированы проблемы современных способов диагностики, эрадикации микоплазменной контаминации клеточных культур и перспективы их решения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА диагностика и эрадикация, клеточные культуры, микоплазменная контаминация.

ВВЕДЕНИЕ

Активное использование клеточных культур в фундаментальных исследованиях и биотехнологическом производстве делает необходимым разработку системы строгого контроля контаминации материалов. При работе с клеточными культурами всегда существует риск их контаминации как эукариотическими клетками других культур, так и микроорганизмами, включая грибы, вирусы, бактерии. Особое значение имеет контаминация микоплазмами, которая визуально никак не проявляется [1–3].

В 1956 году Робинсон с сотрудниками инфицировали клеточные культуры микоплазмами с целью выяснения влияния этих организмов на эукариотические клетки. В процессе исследования было установлено, что исходная клеточная культура уже была заражена микоплазмой. Эти данные легли в основу первого сообщения о микоплазменной контаминации клеточных культур [4], а в дальнейшем очевидным стало то, что микоплазменная контаминация – бич клеточных культур. Оказалось, что клеточные культуры всех

типов, ведущие свое происхождение от различных эукариотических организмов (млекопитающие, птицы, рептилии, рыбы, насекомые и растения), подвержены контаминации микоплазмами. По результатам экспериментальных работ, проведенных в разных странах мира, пораженность культур микоплазмами в различных лабораториях варьирует от 15 до 80%; в некоторых достигает 100% [3, 5].

Микоплазмы – собирательное название представителей класса Mollicutes, мельчайших, лишенных клеточной стенки бактерий, способных к самостоятельному воспроизведению. Малый размер генома определяет ограниченные биосинтетические возможности этих микроорганизмов и соответственно паразитический образ жизни. Большой интерес к микоплазмам сегодня связан, с одной стороны, с изучением молекулярных закономерностей «логики жизни» минимальной клетки, а с другой – диктуется практической необходимостью. Микоплазмы – паразиты человека, животных, растений, причем некоторые из них являются возбудителями социально

значимых заболеваний, основными контаминантами клеточных культур и вакцинных препаратов. Контроль микоплазменных инфекций представляет серьезную проблему, решение которой связывают с выяснением молекулярных механизмов адаптации, определяющих выживание микоплазм в различных условиях, преодоление ими защитных систем высших эукариот и персистенцию [1–3, 6–8].

МИКОПЛАЗМЫ – ОСНОВНЫЕ КОНТАМИНАНТЫ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

Значительный объем теоретических и практических данных, полученных за последние годы, коренным образом изменил представления о патогенности микоплазм. Стало ясно, что эти бактерии выработали изощренные механизмы для выживания в экстремальных условиях и реализации вирулентности [9–18], а условия культивирования *in vitro* клеток эукариот благоприятны для роста микоплазм [1–3, 19]. Помимо исходных организмов, клетки тканей которых были переведены в культуры *in vitro*, источниками микоплазменной контаминации могут быть сами исследователи, компоненты сред и лабораторное оборудование. В связи с этим все представители

класса Mollicutes являются потенциальными контаминантами клеточных культур. На сегодняшний день в клеточных культурах выявлено около трех десятков видов микоплазм, при этом почти в 95% случаев это шесть видов – *Mycoplasma arginini*, *M. fermentans*, *M. hominis*, *M. hyorhinae*, *M. orale* и *Acholeplasma laidlawii* [2, 3]. Это позволяет предполагать, что данные бактерии обладают особыми свойствами, определяющими доминирование в соответствующей экосистеме, а решение проблемы контроля микоплазменной контаминации лежит в области механизмов их адаптации.

Уникальным по своим адаптивным свойствам видом микоплазмы представляется *A. laidlawii*. Эта широко распространенная в природе микоплазма является возбудителем фитомикоплазмозов [1, 20, 21]. Она обнаруживается у человека и животных при различных патологических процессах, однако, строгие доказательства патогенности этой бактерии пока отсутствуют [1, 3, 5]. Расшифровка генома *A. laidlawii*, выполненная в России [22], определила возможность применения постгеномных технологий для выявления механизмов адаптации этой микоплазмы. В результате геномно-транскриптомно-протеомного профилиро-

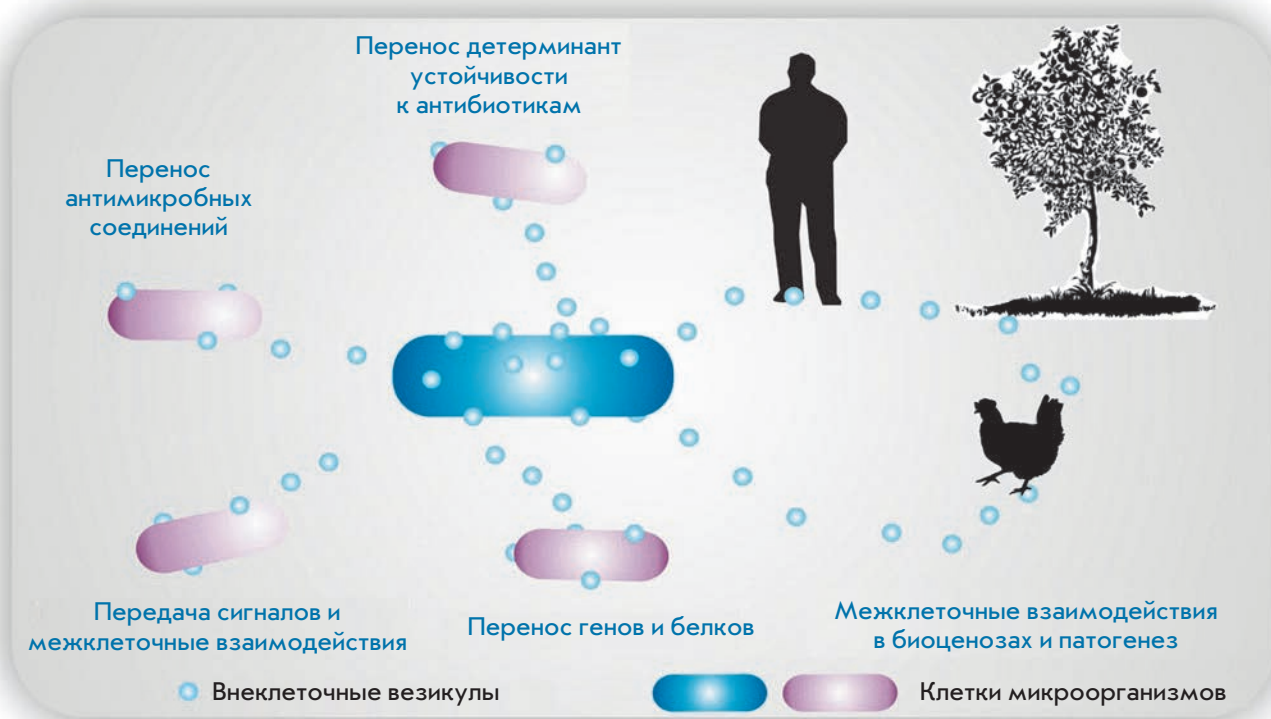


Рис. 1. Внеклеточные везикулы опосредуют трафик широкого спектра компонентов, перенос детерминант вирулентности и формирование резистентности к антибактериальным препаратам, участвуют в передаче сигналов, межклеточных взаимодействиях и патогенезе [41]

вания и наноскопического анализа были идентифицированы стресс-реактивные белки и гены *A. laidlawii*. Показано, что механизмы выживания микоплазмы в неблагоприятных условиях, а также формирования системы паразит-хозяин и реализации вирулентности связаны с секрецией этой бактерией внеклеточных мембранных везикул [16, 20, 21, 23, 24].

Внеклеточные мембранные везикулы опосредуют универсальный способ секреции у про- и эукариот и представляют собой важнейшую часть бактериального секрета [25]. Помимо мембранных компонентов они могут содержать цитоплазматические белки, токсины, а также ДНК и РНК [26, 27]. Обнаруженные несколько десятилетий назад у грамотрицательных бактерий [26] внеклеточные везикулы недавно выявили у архей [28], грамположительных бактерий [29] и у мельчайших бесстеночных прокариот – микоплазм [16, 24]. Было установлено, что везикулы, как переносчики эссенциальной клеточно-специфичной информации, играют важную роль в межклеточной коммуникации [25, 30–32]. Интернализация этих наноструктур определяет репрограммирование клеток-мишеней, которое регистрируется при протеомном и транскриптомном анализе [33, 34]. Внеклеточные везикулы, секретлируемые клетками бактерий, опосредуют белковый трафик и перенос детерминант вирулентности, участвуют в формировании системы паразит-хозяин, а также резистентности к антибактериальным препаратам и соответственно в адаптации к различным условиям среды (рис. 1) [25, 27]. В соответствии с критериями вирулентности внеклеточные везикулы патогенных бактерий представляют новый тип инфектогенов, что определяет необходимость коррекции подходов к решению проблем контроля бактериальных инфекций [21, 31, 35].

Показано, что клетки микоплазмы *A. laidlawii* секретируют во внеклеточную среду везикулы (диаметр 20–120) в различных условиях роста, однако в стрессовых условиях уровень образования везикул существенно возрастает (рис. 2). Везикулы определяют такие вирулентные свойства микоплазмы, как инфекционность, инвазивность и токсигенность, индуцируют кластогенный эффект в отношении эукариотических клеток *in vitro* (рис. 3). Проникновение везикул предшествует проникновению клеток микоплазмы в ткани растений и вызывает нарушение их ультраструктуры, индуцирует модуляцию экспрессии генов и синтеза белков инфицированных организмов, опосредует развитие резистентности микоплазмы к антибактериальным препаратам [16, 20, 21, 24, 36]. В результате глобального протеомного профилирования проведена «инвентаризация» белков внеклеточных везикул *A. laidlawii* PG8, секре-

тируемых в аксеничной культуре [37]. Оказалось, что значительная часть полипептидов, экспортируемых из клеток микоплазмы в составе везикулярных структур, это факторы вирулентности, в том числе адгезины и ферменты деградации белков, полисахаридов и нуклеиновых кислот (рис. 4).

Помимо мембранных компонентов и цитоплазматических белков, внеклеточные везикулы *A. laidlawii* PG8 содержат специфичный набор нуклеотидных последовательностей ДНК, которые могут использоваться в качестве маркеров бактериальных везикул в анализируемых образцах [20, 24, 36]. Сходные данные по структуре и составу внеклеточных везикул получены также для *M. gallisepticum* (рис. 2) – широко распространенного возбудителя заболеваний птиц и основного контаминанта вирусных вакцин, создаваемых на основе куриных эмбрионов [24]. Полученные результаты свидетельствуют, что везикулярный трафик, ассоциированный с внеклеточными мембранными везикулами у архей, классических грамположительных и грамотрицательных бактерий, обнаружен и у мельчайших бесстеночных прокариот. Это определяет необходимость коррекции представлений о взаимодействии микоплазм с клетками высших организмов, а также стратегии контроля инфектогенов.

КОНТРОЛЬ МИКОПЛАЗМЕННЫХ КОНТАМИНАЦИЙ

Отсутствие у микоплазм ригидной клеточной стенки обеспечивает возможность тесного контакта цитоплазматических мембран клеток паразита и хозяина, что в определенных условиях может приводить к слиянию клеток [1, 38]. Некоторые микоплазмы имеют такие специфичные полярные структуры, как «tip» или «bleb», опосредующие скользящее движение и адгезию бактерий к мембране эукариотической клетки [1, 39]. Адгезия может сопровождаться инвазией – проникновением в клетку [3]. Однако, даже оставаясь на поверхности, микоплазмы пребывают в тесной связи с мембраной хозяйской клетки и индуцируют модуляцию экспрессии генома и существенные изменения метаболизма эукариотической клетки [3, 38]. В серии специальных работ, посвященных выяснению особенностей модуляции транскрипционного профиля у клеточных культур при контаминации микоплазмами, показано, что заражение микоплазмами вызывает изменение экспрессии широкого ряда генов в хозяйской клетке (табл. 1). В число генов с выраженным изменением экспрессии входят важнейшие гены, кодирующие регуляторные белки – онкогены, гены-супрессоры опухолевого роста [40], цитокины [41], рецепторы и компоненты сигнальных путей [42]. Изменения экспрессии могут быть значительными уже через несколько часов по-

сле заражения [42], а длительное культивирование зараженных клеток (18 недель) может приводить к их необратимой трансформации, в том числе малигнизации [40]. Характер модуляции транскрипционного профиля у зараженных клеток в зависимости от вида микоплазм, типа клеточных культур, множественности инфекции, сроках культивирования

существенно различается. Таким образом, контаминация клетками микоплазмы исключает возможность адекватной оценки результатов, полученных с использованием таких культур. В частности, невозможно изучать влияние соединений, которые предполагается использовать в качестве перспективных фармакологических средств.

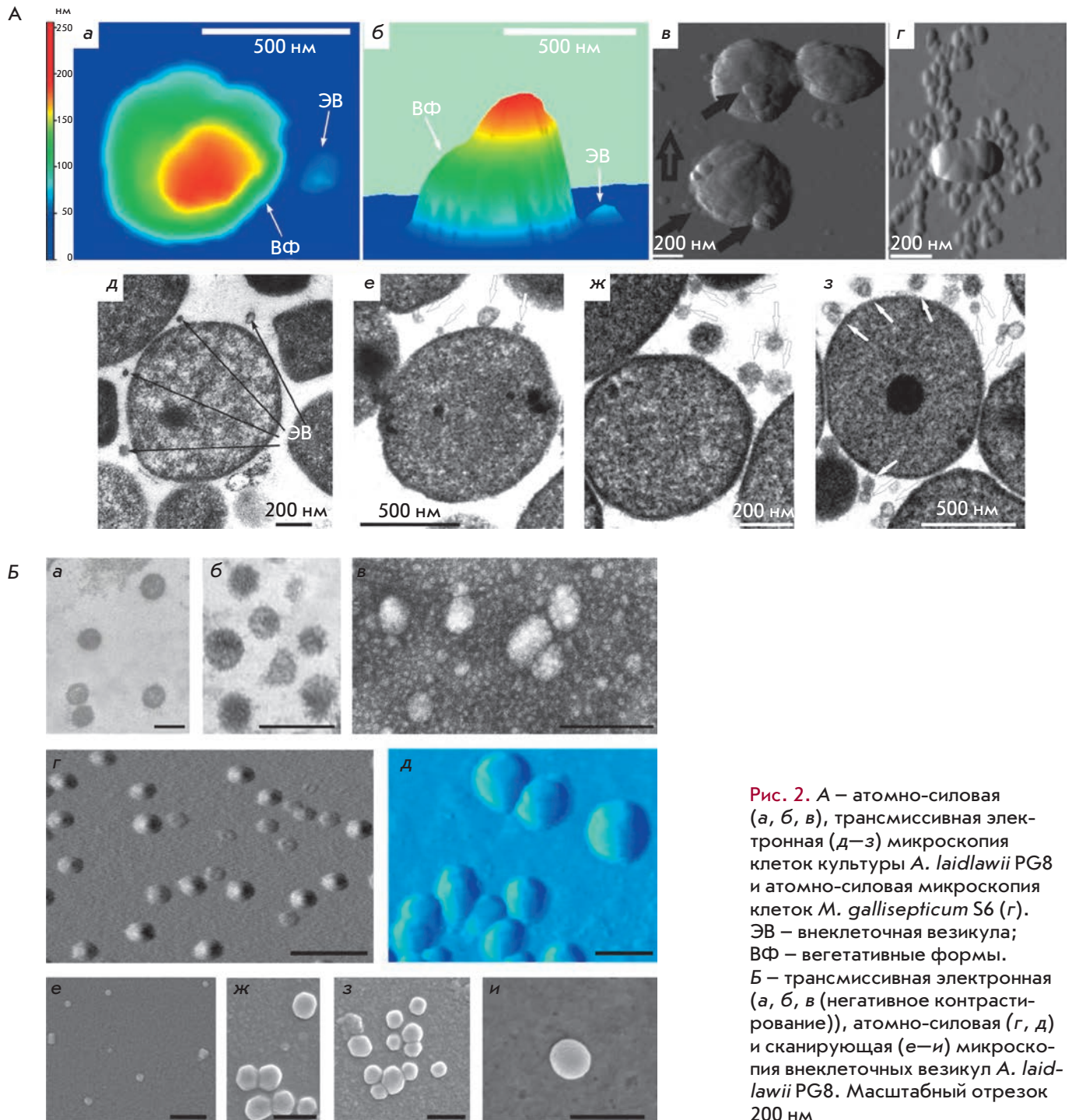


Рис. 2. А – атомно-силовая (а, б, в), трансмиссивная электронная (д–з) микроскопия клеток культуры *A. laidlawii* PG8 и атомно-силовая микроскопия клеток *M. gallisepticum* S6 (г). ЭВ – внеклеточная везикула; ВФ – вегетативные формы. Б – трансмиссивная электронная (а, б, в (негативное контрастирование)), атомно-силовая (г, д) и сканирующая (е–и) микроскопия внеклеточных везикул *A. laidlawii* PG8. Масштабный отрезок 200 нм

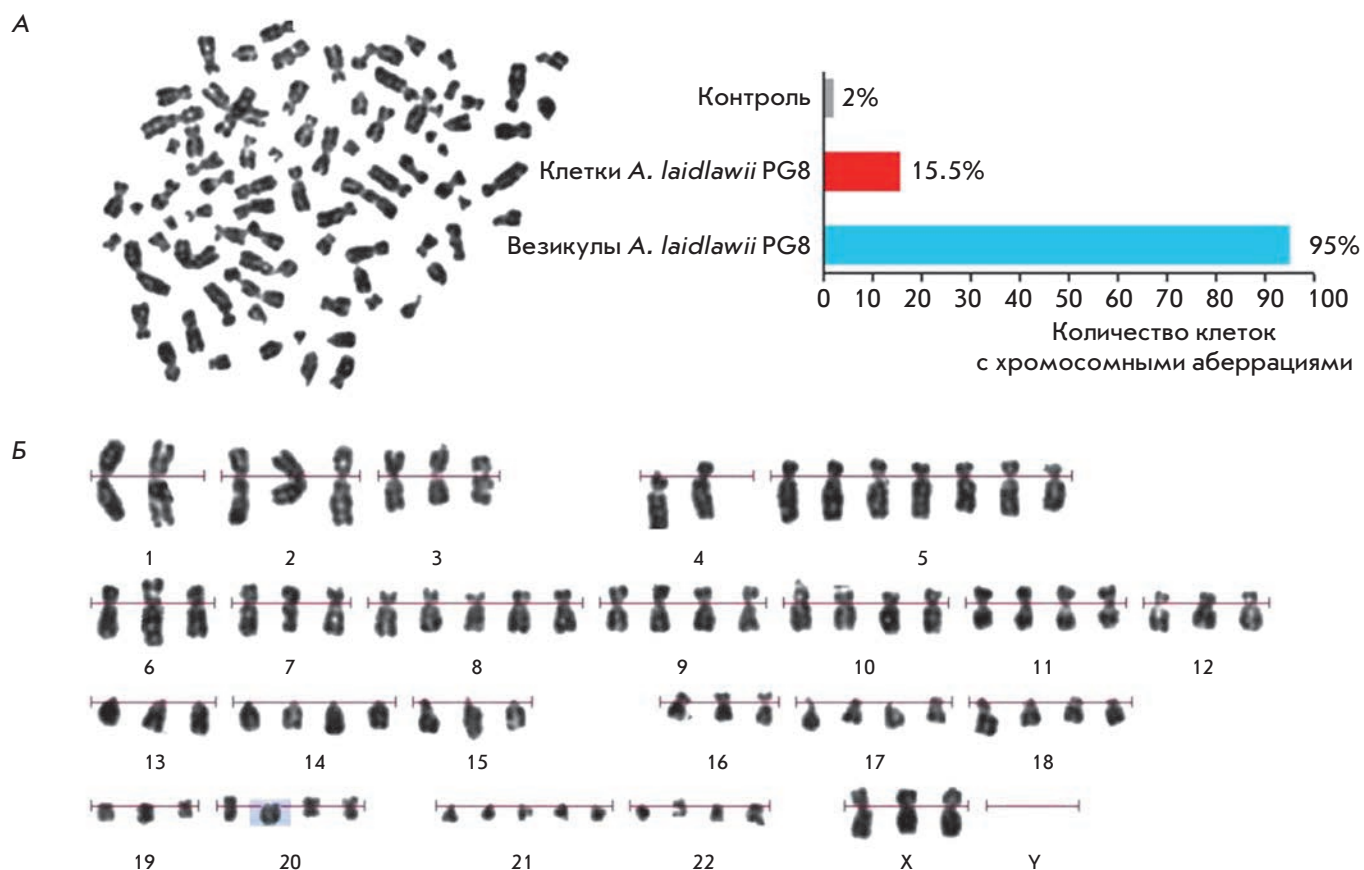


Рис. 3. Метафазная пластинка (А) и кариограмма (Б) лимфоцитов периферической крови человека после инкубации с везикулами *A. laidlawii* PG8

Таблица 1. Изменения экспрессии мРНК ряда генов в зараженных микоплазмами клетках через 3–7 сут после инфицирования

| Микоплазма | Культура клеток | Индукция экспрессии мРНК | Подавление экспрессии мРНК | Ссылка |
|---------------------------------|---|---|---|--------|
| <i>M. fermentans</i> | Эпителиальные клетки предстательной железы HPV E7 | 14 цитокинов | TGFβ1, TGFβ3 | [41] |
| <i>M. genitalium</i> | | 12 цитокинов | GM-CSF, IL-1Ra, M-CSF | |
| <i>M. hominis</i> | | 12 цитокинов | TGFβ2 | |
| <i>M. penetrans</i> | | 14 цитокинов | TGFβ2 | |
| <i>M. fermentans</i> | Эпителиальные клетки цервикального канала HPV E6 | 17 цитокинов | 0 | [41] |
| <i>M. genitalium</i> | | 13 цитокинов | G-CSF, IL-1Ra | |
| <i>M. hominis</i> | | 13 цитокинов | IL-1α, IL-1β | |
| <i>M. penetrans</i> | | 15 цитокинов | TGFβ2, TGF-β3 | |
| <i>M. synoviae</i> | Макрофаги цыплят MDM | Цитокины, лизоцим, ингибитор апоптоза, 11 ферментов, 4 типа рецепторов, 10 белков сигнальных систем | Овотрансферрин, глутатион-S-трансфераза, гуанилат-связывающие белки | [42] |
| <i>M. fermentans incognitas</i> | Эмбриональные клетки мышцы СЗН | 92 гена, кодирующих онкогены и супрессоры онкогенеза | 43 гена, кодирующих онкогены и супрессоры онкогенеза | [40] |
| <i>Phytoplasma</i> | Культура растительных клеток павлонии | 769 генов | 437 генов | [45] |

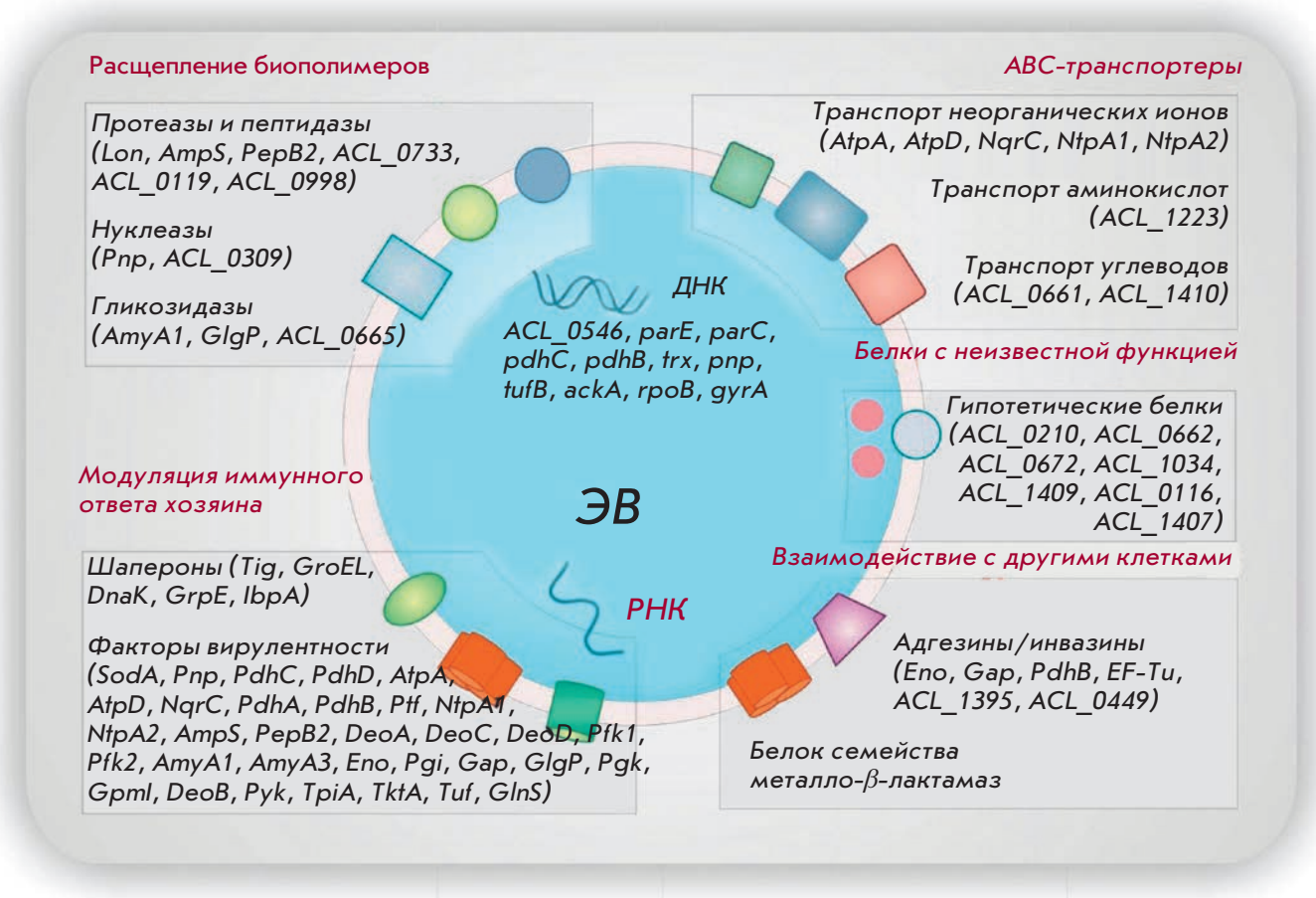


Рис. 4. Внеклеточные везикулы *A. laidlawii* PG8 содержат специфичный набор ДНК и РНК

Несмотря на идентификацию сотен генов, экспрессия которых изменяется при заражении эукариотических клеток микоплазмами [41–45], универсальные маркеры для контроля микоплазменных контаминаций выявить не удалось. Микоплазмы могут индуцировать активацию макрофагов, культивируемых *in vitro*, подавление презентации антигенов, модификацию иммунореактивности, сигнальной трансдукции, вирусной пролиферации и апоптоз [40, 46–54]. Микоплазменная контаминация может длительное время оставаться незамеченной, видимыми изменения становятся лишь при высокой множественности инфекции [1, 3]. Самым выраженным эффектом контаминации является полная потеря клеточной культуры из-за роста микроорганизмов и соответственно необратимого ухудшения состояния клеток. В зависимости от вида микоплазмы, типа клеточной линии и условий культивирования могут регистрироваться разнообразные цитопатические реакции, например конденсация хроматина, появление леопардовых клеток, возникновение хромосомных aberrаций, по-

давление клеточного деления, угнетение роста культуры [3, 5]. Основной причиной этого является вмешательство микоплазмы в клеточный метаболизм, конкурентное поглощение питательных компонентов и высвобождение бактериальных токсинов, ферментов деградации белков, ДНК, РНК [1, 38]. Активное участие в этих процессах могут принимать и внеклеточные везикулы микоплазм. В серии специальных экспериментов нами было показано, что на РНКазную активность везикул *A. laidlawii* PG8 и *M. hominis* RQ37 приходится 86 и 89% от общей активности всех клеточных и внеклеточных РНКаз этих бактерий [55]. Рибонуклеолитическая активность секретлируемых везикул может в значительной мере обуславливать выявленные нами ранее генотоксические свойства этих контаминантов клеточных культур [56–58]. Учитывая цитотоксический потенциал многих бактериальных РНКаз [59–61], можно предположить, что цитопатические реакции загрязненных микоплазмами клеточных культур могут в значительной мере определяться активностью их везикулярных

Таблица 2. Методы, используемые для детекции микоплазм в клеточных культурах

| |
|--|
| Микробиологическое культивирование |
| Электронная микроскопия |
| Биохимические тесты |
| Детекция аденозинфосфорилазной активности (6-MPDR) |
| Ферментативное превращение АТФ → АДФ, выявляемое люциферазой |
| Хроматографическая детекция превращения радиоактивно меченного уридина в урацил с помощью уридинфосфорилазы микоплазмы |
| Иммунологические тесты |
| Иммунофлуоресценция |
| ELISA |
| Молекулярно-биологические тесты |
| Гибридизационный анализ |
| Дот-блот-гибридизация со специфичными зондами |
| ПЦР, ОТ-ПЦР |
| Микроскопическая детекция |
| Прямое окрашивание ДНК флуоресцентными красителями (DAPI, Hoechst 33258) |
| FISH-гибридизация <i>in situ</i> с использованием зондов, меченных флуоресцентными красителями |

■ – официально одобрены рядом международных экспертных организаций:

FDA Points to Consider (May 1993), Regularien 21CFR610.30;

USDA federal code #9CFR113.28;

United States Pharmacopoeia, (USP 33/NF 28 <63> and <1226>, Mycoplasma tests, 2010); European Pharmacopoeia (EP 2.6.7., Mycoplasmas, 7th ed.; 2012);

Japanese Pharmacopoeia (JP);

ICH Guideline for biotechnological/biological products.

РНКа. Обнаруженная нами высокая везикулярная РНКазная активность микоплазм обуславливает возможность апоптогенного действия этих ферментов в отношении клеток-мишеней везикулярного трафика микоплазм.

Поскольку микоплазмы могут влиять практически на любой параметр эукариотической клетки, результаты, полученные при исследовании зараженных микоплазмами клеток, должны вызывать серьезные сомнения. В связи с этим редакции журналов рекомендуют авторам предоставлять данные о проверке экспериментального материала, и особенно клеточных культур, на контаминацию микоплазмами. Поскольку многие вирусные вакцины создаются на основе первичных клеточных культур, проблема заражения их микоплазмами имеет особое значение – контаминация вакцин представляет потенциальную опасность для здоровья человека [1, 3, 5]. В этой связи во многих странах требования к продукции, производимой на основе первичных клеточных культур, в том числе к вирусным вакцинам против кори, краснухи, полиомиелита, бешенства, свинки и некоторых других, включают тщательную проверку на контаминацию микоплазмами [3].

Таким образом, микоплазменная контаминация клеточных культур представляет серьезную про-

блему как для фундаментальных исследований, так и практических разработок. Очевидно, что все приобретенные клеточные культуры должны подвергаться тщательной проверке на инфицированность микоплазмами до введения в лабораторию, а уже используемые культуры должны проходить систематический контроль на микоплазменную контаминацию. Обнаружение у микоплазм везикулярного трафика, ассоциированного с внеклеточными везикулами, диктует необходимость распространения контроля и на инфектогены нового типа.

СПОСОБЫ ДЕТЕКЦИИ МИКОПЛАЗМ

Универсальные индикаторы инфицированности клеток микоплазмами отсутствуют. Среди специальных средств диагностики (табл. 2) есть три способа, которые рекомендованы международными экспертными организациями.

Основной способ детекции микоплазм – микробиологическое культивирование [3, 62]. Для проведения анализа аликвота супернатанта клеточной культуры добавляется к жидкой среде для культивирования микоплазм, после инкубации в течение нескольких дней культура переносится на чашки с агаром, включающим те же компоненты среды. Чашки инкубируются в течение некоторого времени (до 2 недель) в аз-

робных условиях при температуре 37°C. Появление специфических двухфазных колоний типа «fried-eggs» («яичница-глазунья») указывает на присутствие микоплазм в тестируемых образцах. Теоретически этот тест очень чувствителен, но его проведение требует длительного времени (до 4 недель) и дорогих сред. Кроме того, многие виды микоплазм плохо растут на бесклеточных средах, а некоторые вообще не удается вырастить *in vitro* [1, 62]. При проведении этого теста возможно также заражение среды микоплазмами извне от исследователя, компонентов среды и лабораторного оборудования. Таким образом, этот способ детекции микоплазм включает риск получения как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов. Кроме того, метод культивирования не позволяет выявлять внеклеточные везикулы бактерий.

Второй рекомендованный подход к проверке контаминации клеточных культур микоплазмами – метод окрашивания ДНК флуорохромными красителями DAPI или Hoechst 33258 [3, 62, 63]. Этот тест весьма прост, и его проведение не требует длительного времени – результат может быть получен в течение 2–3 ч. Однако некоторые особенности состояния клеточной культуры могут быть причиной ошибочных заключений относительно контаминированности микоплазмами. Так, наличие в свободной от микоплазм культуре секретлируемых эукариотическими клетками внеклеточных везикул, содержащих ДНК и РНК, существенно затрудняет интерпретацию результатов, а обработка культуры антибиотиками исключает возможность использования соответствующего теста. Тем не менее этот способ весьма популярен в связи с его простотой, а также возможностью детекции в клеточных культурах некультивируемых или плохо растущих на бесклеточных средах микоплазм. В таком варианте теста супернатант тестируемой культуры добавляется к индикаторной, свободной от микоплазм клеточной культуре (линии Vero B4, NIH 3T3 или 3T6) [64]. Клетки выращивают во флаконах, содержащих стерильные слипы, которые после роста культуры в течение нескольких дней промывают и окрашивают флуорохромами. Однако в этом случае увеличивается длительность теста и возрастает риск распространения контаминантов в лаборатории.

Наиболее эффективным способом детекции микоплазменных контаминаций сегодня считается полимеразная цепная реакция (ПЦР) [1, 3, 62, 65, 66]. Варианты ПЦР позволяют выявлять ДНК или РНК микоплазм. В качестве праймеров обычно используют олигонуклеотиды для амплификации переменных районов 16S рДНК или рРНК, а также последовательности 16–23S межгенных участков. При этом

ПЦР может быть представлена одним циклом амплификации или гнездовым вариантом с двумя парами праймеров. Последний способ увеличивает чувствительность и специфичность теста, но повышает риск получения ложных результатов из-за возможной контаминации целевой ДНК. Кроме того, компоненты среды могут быть ингибиторами Taq-полимеразы, поэтому ПЦР должна выполняться на экстрагированной ДНК, а не на грубом лизате супернатанта клеточной культуры. Использование антибиотиков в клеточной культуре может привести к ложным результатам, поэтому до проведения теста культура должна расти без антибиотиков на протяжении минимум 2 недель.

Проведение ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) для выявления рРНК, количество которой в клетках существенно превышает количество рДНК, повышает чувствительность теста, однако такой вариант, безусловно, трудоемок. Учитывая, что титр микоплазм в клеточных культурах достаточен для обнаружения бактериальной ДНК, простой одношаговый способ ПЦР вполне приемлем с точки зрения необходимости и достаточности. Он отвечает концепции экспресс-теста, который легко выполним, высокочувствителен, специфичен и экономичен. Вместе с тем положительные результаты ПЦР-теста еще не означают, что в образце присутствуют жизнеспособные клетки контаминанта (что важно учитывать при анализе материала после проведения процедур, направленных на эрадикацию микоплазм). В ряде случаев при положительном ПЦР-тесте культуры, анализируемой на контаминацию микоплазмами, для окончательного заключения все-таки требуется секвенирование ампликона. Тем не менее ПЦР-тест одобрен международными экспертными организациями, и на коммерческом рынке представлено достаточное количество наборов для тестирования клеточных культур на микоплазмы [3, 62]. Используемые в коммерческих наборах праймеры неэффективны для детекции внеклеточных везикул, но обнаружение специфических наборов нуклеотидных последовательностей ДНК в везикулах микоплазм [20, 21, 24, 36] открывает перспективы разработки ПЦР-диагностикомов и для обнаружения соответствующих инфектогенов.

Помимо указанных, официально одобренных способов детекции микоплазм, есть и другие методы – иммунологические и гибридизационные тесты с применением антисывороток, моноклональных антител или ДНК-РНК-гибридизации, предполагающие использование зондов с радиоактивной или флуорохромной меткой, а также биохимические, микроскопические и некоторые другие тесты (табл. 2) [1, 3, 43, 62, 67, 68]. Эти методы различаются по чувствитель-

ности и также не свободны от недостатков, присущих описанным способам выявления микоплазменных контаминаций.

Представленные выше данные свидетельствуют, что проблема детекции микоплазменных контаминаций пока не решена. Ни один из имеющихся способов диагностики микоплазм не лишен недостатков и ограничений, поэтому проверку клеточных культур на контаминацию рекомендуется проводить одновременно несколькими способами [1, 3, 62]. Очевидно, что для тестирования компонентов сред на наличие таких инфектогенов, как внеклеточные везикулы бактерий, необходима разработка специальных тестов, основанных на маркерах этих органелл. Выявление универсальных маркерных последовательностей для детекции соответствующих инфектогенов предполагает комплексное исследование внеклеточных везикул у разных представителей класса Mollicutes. Пока в этом направлении сделаны только первые шаги [16, 20, 36, 37].

СПОСОБЫ ЭРАДИКАЦИИ МИКОПЛАЗМ

Лучшим способом решения проблемы микоплазменной контаминации клеточной культуры считается ликвидация зараженной культуры, замена ее на чистую, свободную от микоплазм [1, 3, 69]. Если это невозможно выполнить, то возникает проблема деконтаминации, решение которой предполагает эрадикацию микоплазм без повреждения эукариотических клеток. Однако несмотря на то, что на протяжении нескольких десятилетий разрабатывались и предлагались разнообразные способы элиминации микоплазм, эффективный способ деконтаминации пока не найден. Тем не менее энтузиазм исследователей не иссякает, и периодически появляются сообщения об успешной деконтаминации клеточных культур новым или описанным ранее, но модифицированным способом [1, 3, 69–71]. Наиболее распространенным подходом при этом является применение антибиотиков.

Особенности биологии микоплазм определяют характер чувствительности этих бактерий к антибактериальным препаратам: многие антибиотики неэффективны, поскольку у микоплазм отсутствуют мишени, на которые они действуют, например, пептидогликан клеточной стенки, синтез которого блокирует пенициллин [1, 3, 72]. С другой стороны, некоторые антибиотики не вызывают гибель микоплазмы, но замедляют ее рост и таким образом маскируют присутствие контаминанта [2]. Это обстоятельство является важной причиной рекомендаций не использовать антибиотики в профилактических целях при работе с клетками, культивируемыми *in vitro* [2, 5, 69]. Тем не менее поиск средств деконта-

минации клеточных культур продолжают связывать с антибиотиками [2, 3, 67, 69].

К настоящему времени известно три группы антибиотиков, проявляющих определенную активность в отношении микоплазм, – макролиды, хинолоны и тетрациклины [3, 69, 72]. В ряде публикаций сообщается, что серия обработок специальными комбинациями антибактериальных препаратов этих групп приводит к освобождению клеточных культур от микоплазм [3, 67, 69]. Однако экспериментальные попытки деконтаминации культур на основании опубликованных протоколов часто оказываются безуспешными [1, 71, 73]. Учитывая это, а также негативные результаты воздействия антибиотиков на клеточные культуры, большинство исследователей скептически относятся к попыткам решения проблемы эрадикации микоплазм с помощью антибактериальных агентов, но коммерческие компании продолжают активно рекламировать соответствующие препараты.

Существенная проблема антибиотикотерапии при микоплазменных инфекциях – быстрое приобретение микоплазмами резистентности к антибактериальным препаратам [1, 19, 74]. Механизмы оперативного формирования устойчивости микоплазм к антибактериальным препаратам не вполне ясны. Предполагается, что кроме известных механизмов развития резистентности к таким антибиотикам, как хинолоны, микоплазмы используют и другие, еще не установленные способы формирования устойчивости к антимикробным препаратам [75–77]. Недавно появились сообщения о возможности участия внеклеточных везикул в механизмах формирования резистентности к антибиотикам бактерий [78, 79], в том числе микоплазм [36]. Доказательства участия внеклеточных везикул в формировании резистентности микоплазм к антибиотикам показаны на примере *A. laidlawii*. Для этого были использованы различающиеся по чувствительности к ципрофлоксацину штаммы микоплазмы – лабораторный (PG8) и полученный от него методом пошаговой селекции PG8R, проявляющий повышенную устойчивость к антибиотикам. Оказалось, что эти штаммы микоплазмы различаются также по выведению антибиотика и уровню образования везикул. Обнаружено, что повышенная устойчивость к антибиотикам у штамма PG8R ассоциирована с высоким уровнем образования везикул, и везикулы участвуют в трафике ципрофлоксацина и проявляют бактериостатический эффект в отношении чувствительного к антибиотикам штамма *Staphylococcus aureus*. У штамма с повышенной устойчивостью к ципрофлоксацину в гене-мишени этого антибиотика (топоизомеразы IV) в локусе *parC*, детерминирующем резистентность к фторхинолонам,

выявлена транзигция C → T (в положении 272, определяющая замену серина на лейцин (Ser (91) Leu) в молекуле целевого белка). Оказалось, что везикулы этого штамма микоплазмы экспортируют мутантный ген целевого белка. Опосредованный внеклеточными везикулами экспорт генов-мишеней антибиотика определяет возможность оперативного распространения в микробиоценозах мутантной мишени хинолонов путем горизонтального переноса [80]. Реализация такой возможности была недавно показана в модельных системах *Escherichia coli* и *Pseudomonas aerogenosa* [81, 82]. Изучение аналогичных процессов у микоплазм еще не завершено, однако уже понятно, что внеклеточные везикулы являются важным компонентом механизмов быстрой адаптации этих микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Принимая во внимание, что секреция везикул – это процесс, определяющий выживание микроорганизма в различных условиях [27, 32], поиск эффективных средств деконтаминации клеточных культур среди антибиотиков не представляется перспективным.

Таким образом, микоплазменные контаминации клеточных культур, диагностика и подавление микоплазм остаются серьезной проблемой [1, 3, 7, 69, 83, 84]. Очевидно, что необходима разработка надежных методов детекции инфектогенов и деконтаминации культур, основанных прежде всего на детальном изучении генетики и физиологии микоплазм.

Обнаружение у микоплазм везикулярного трафика, ассоциированного с внеклеточными везикулами, опосредующими межклеточные взаимодействия и патогенез, определяет необходимость учета инфектогенов нового типа. Поскольку клеточные культуры используются для получения вакцин и физиологически активных соединений, оперативное решение рассмотренной проблемы актуально как для фундаментальной науки, так и биотехнологического производства чистых препаратов нового поколения. ●

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории молекулярных основ патогенеза Казанского института биохимии и биофизики РАН, принимавшим участие в проведении экспериментальной работы: А.А. Музыкантову, Н.Б. Барановой, Е.С. Медведевой, Г.Ф. Шаймардановой и М.В. Трушину.

Работа выполнена в рамках Программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета Министерства образования и науки РФ, а также поддержана РФФИ (гранты № 14-04-00883а, 12-04-01052а, 12-04-01226а), грантом Президента РФ (МК-3823.2023.4), грантом по государственной поддержке ведущих научных школ РФ (№ НШ-825.2012.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Борхсениус С.Н., Чернова О.А., Чернов В.М., Вонский М.С. Микоплазмы. СПб.: Наука, 2002. 320 с.
2. Uphoff C., Drexler H. // *Meth. Mol. Biol.* 2011. V. 731. P. 105–114.
3. Rottem S., Kosower N.S., Kornspan J.D. // *Contamination of Tissue Cultures by Mycoplasmas, Biomedical Tissue Culture / Ed. Dr. Luca Ceccherini-Nelli.* 2012.
4. Robinson L.B., Wichelhausen R.H., Roizman B. // *Science.* 1956. V. 124. P. 1147–1148.
5. Drexler H.G., Uphoff C.C. // *Cytotechnology.* 2002. V. 39. № 2. P. 75–90.
6. Razin Sh. // *Prokaryotes.* 2006. V. 4. P. 836–904.
7. Folmsbee M., Howard G., McAlister M. // *Biologicals.* 2010. V. 38. P. 214–217.
8. Nikfarjam L., Farzaneh P. // *Cell J.* 2012. V. 13. № 4. P. 203–212.
9. Kühner S., van Noort V., Betts M.J., Leo-Macias A., Batisse C., Rode M., Yamada T., Maier T., Bader S., Beltran-Alvarez P., et al. // *Science.* 2009. V. 326. № 5957. P. 1235–1240.
10. Yus E., Maier T., Michalodimitrakis K., van Noort V., Yamada T., Chen W.-H., Wodke J.A.H., Güell M., Martínez S., Bourgeois R., et al. // *Science.* 2009. V. 326. № 5957. P. 1263–1268.
11. Maier T., Schmidt A., Gueell M., Kuehner S., Gavin A.C., Aebersold R., Serrano L. // *Mol. Syst. Biol.* 2011. V. 7. P. 511. doi: 10.1038/msb.2011.38.
12. Oshima K., Ishii Y., Kakizawa S., Sugawara K., Neriya Y., Himeno M., Minato N., Miura C., Shiraishi T., Yamaji Y., et al. // *PLoS One.* 2011. V. 6. e23242.
13. van Noort V., Seebacher J., Bader S., Mohammed S., Vonkova I., Betts M.J., Kuhner S., Kumar R., Maier T., O'Flaherty M., et al. // *Mol. Syst. Biol.* 2012. V. 8. P. 571.
14. Lluch-Senar M., Luong K., Lloréns-Rico V., Delgado J., Fang G., Spittle K., Clark T.A., Schadt E., Turner S.W., Korfach J., et al. // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. № 1. e1003191.
15. Hopfe M., Deenen R., Grandi D., Köhrer K., Henrich B. // *PLoS One.* 2013. V. 8 (Suppl 1). e54219.
16. Chernov V.M., Chernova O.A., Medvedeva E.S., Mouzykantov A.A., Ponomareva A.A., Shaymardanova G.F., Gorshkov O.V., Trushin M.V. // *J. Proteomics.* 2011. V. 74. № 12. P. 2920–2936.
17. Parraga-Nino N., Colome-Calls N., Canals F., Querol E., Ferrer-Navarro M. // *J. Proteome Res.* 2012. V. 11. № 6. P. 3305–3316.
18. Liu W., Fang L., Li M., Li S., Guo S., Luo R., Feng Z., Li B., Zhou Z., Shao G., Chen H., Xiao S. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 4. e35698.
19. Razin S., Hayflick L. // *Biological.* 2010. V. 38. № 2. P. 183–190.
20. Чернов В.М., Чернова О.А., Горшков О.В., Баранова Н.Б., Музыкантов А.А., Нестерова Т.Н., Пономарева А.А. // *Докл. АН.* 2013. № 450. С. 483–487.
21. Chernov V.M., Chernova O.A., Mouzykantov A.A., Baranova N.B., Gorshkov O.V., Trushin M.V., Nesterova T.N., Ponomareva A.A. // *Scientific World J.* 2012. V. 2012. Article 315474. doi: 10.1100/2012/315474.
22. Lazarev V.N., Levitskii S.A., Basovskii Y.I., Chukin M.M., Akopian T.A., Vereshchagin V.V., Kostrjukova E.S., Kovaleva G.Y., Kazanov M.D., Malko D.B., et al. // *J. Bacteriol.* 2011. V. 193. № 18. P. 4943–4953.

23. Чернов В.М., Чернова О.А., Медведева Е.С., Давыдова М.Н. // Докл. АН. 2011. № 438. С. 562–565.
24. Chernov V.M., Chernova O.A., Mouzykantov A.A., Efimova I.R., Shaymardanova G.F., Medvedeva E.S., Trushin M.V. // Scientific World J. 2011. V. 11. P. 1120–1130.
25. Kulp A., Kuehn M.J. // Annu. Rev. Microbiol. 2010. V. 64. P. 163–184.
26. Lee E.Y., Choi D.S., Kim K.P., Gho Y.S. // Mass Spectrom. 2008. V. 27. № 6. P. 535–555.
27. Deatherage B.L., Cookson B.T. // Infect. Immun. 2012. V. 80. № 6. P. 1948–1957.
28. Gaudin M., Gauliard E., Schouten S., Houel-Renault L., Lenormand P., Marguet E., Forterre P. // Environmental Microbiol. Rept. 2013. V. 5. P. 109–116.
29. Lee E.Y., Choi D.Y., Kim D.K., Kim J.W., Park J.O., Kim S., Kim S.H., Desiderio D.M., Kim Y.K., Kim K.P., et al. // Proteomics. 2009. V. 9. № 24. P. 5425–5436.
30. Amano A., Takeuchi H., Furuta N. // Microbes Infect. 2010. № 12. P. 791–798.
31. Yoon H., Ansong C., Adkins J.N., Heffron F. // Infect. Immun. 2011. V. 79. № 6. P. 2182–2192.
32. Schertzer J.W., Whiteley M. // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 23. № 1–2. P. 118–130.
33. Kluge S., Hoffmann M., Benndorf D., Rapp E., Reichl U. // Proteomics. 2012. V. 12. № 12. P. 1893–1901.
34. Pollak C.N., Delpino M.V., Fossati C., Baldi P.C. // PLoS One. 2012. V. 7. № 11. e50214.
35. Pierson T., Matrakas D., Taylor Y.U., Manyam G., Morozov V.N., Zhou W., van Hoek M.L. // J. Proteome Res. 2011. V. 10. № 3. P. 954–967.
36. Medvedeva E.S., Baranova N.B., Mouzykantov A.A., Grigorieva T.Y., Davydova M.N., Trushin M.V., Chernova O.A., Chernov V.M. // Scientific World J. 2014. V. 2014. Article 150615. doi: 10.1155/2014/150615.
37. Музыкантов А.А., Баранова Н.Б., Медведева Е.С., Григорьева Т.Ю., Чернова О.А., Чернов В.М. // Докл. РАН. 2014. Т. 455. № 1. С. 99–104.
38. Rottem S. // Physiol. Rev. 2003. V. 83. № 2. P. 417–432.
39. Razin Sh., Herrmann R. Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. N.Y.: Kluwer Acad. Plenum Publ., 2002. 572 p.
40. Zhang S., Tsai S., Lo S. // BMC Cancer. 2006. № 6. P. 116–126.
41. Zhang S., Wear D.J., Lo S. // FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2000. V. 27. № 1. P. 43–50.
42. Lavrič M., Maughan M.N., Bliss T.W., Dohms J.E., Benčina D., Keeler Jr., Narat M. // Veterinary Microbiology. 2008. V. 126. № 1–3. P. 111–121.
43. Wang Z., Farmer K., Hill G.E., Edwards S.V. // Mol. Ecol. 2006. V. 15. № 5. P. 1263–1273.
44. Cecchini K.R., Gorton T.S., Geary S.J. // J. Bacteriol. 2007. № 189. P. 5803–5807.
45. Mou H.-Q., Lu J., Zhu S.-F., Lin C.-L., Tian G.-Z., Xu X., Zhao W.-J. // PLoS One. 2013. V. 8. № 10. e77217.
46. Harper D.R., Kangro H.O., Argent S., Heath R.B. // J. Virol. Methods. 1988. V. 20. № 1. P. 65–72.
47. Cole B., Mu H.H., Pennock M.D., Hasebe A., Chan F.V., Washburn L.R., Peltier M.R. // Infect. Immun. 2005. V. 73. № 9. P. 6039–6047.
48. Gerlic M., Horowitz J., Farkash S., Horowitz S. // Cell Microbiol. 2007. V. 9. P. 142–153.
49. Quah B., O'Neill H. // J. Leukoc. Biol. 2007. V. 82. № 5. P. 1070–1082.
50. Zhang S., Lo S. // Curr. Microbiol. 2007. V. 54. № 5. P. 3888–3895.
51. Gong M., Meng L., Jiang B., Zhang J., Yang H., Wu J., Shou C. // Mol. Cancer Ther. 2008. V. 7. № 3. P. 530–537.
52. Kraft M., Adler K.B., Ingram J.L., Crews A.L., Atkinson T.P., Cairns C.B., Krause D.C., Chu H.W. // Eur. Respir. J. 2003. V. 31. № 1. P. 43–46.
53. Dusanic D., Bencina D., Oven I., Cizelj I., Bencina M., Narat M. // Veterenary Res. 2012. V. 43. P. 7–20.
54. Elkind E., Vaisid T., Kornspan J.D., Barnoy S., Rottem S., Kosower N.S. // Cell. Microbiol. 2012. V. 14. № 6. P. 840–851.
55. Ильинская О.Н., Сокуренок Ю.В., Ульянова В.В., Вершинина В.И., Зеленихин П.В., Колпаков А.И., Медведева Е.С., Баранова Н.Б., Давыдова М.Н., Музыкантов А.А. и др. // Микробиология. 2014. Т. 83. № 3. С. 320–327.
56. Chernov V.M., Chernova O.A., Margulis A.B., Mouzykantov A.A., Baranova N.B., Medvedeva E.S., Kolpakov A.I., Ilinskaya O.N. // American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci. 2009. V. 6. № 1. P. 104–107.
57. Ilinskaya O.N., Ivanchenko O.B., Karamova N.S. // Mutagenesis. 1995. V. 10. № 3. P. 165–170.
58. Ilinskaya O.N., Ivanchenko O.B., Karamova N.S., Kipenskaya L.V. // Mut. Res. 1996. V. 354. № 2. P. 203–209.
59. Makarov A.A., Ilinskaya O.N. // FEBS Lett. 2003. V. 540. P. 15–20.
60. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. // BioEssays. 2008. V. 30. № 8. P. 781–790.
61. Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O. // FEBS J. 2011. V. 278. № 19. P. 3633–3643.
62. Uphoff C.C., Drexler H.G. // Meth. Mol. Biol. 2013. V. 946. P. 1–13.
63. Chen T.R. // Exp. Cell Res. 1977. V. 104. № 2. P. 255–262.
64. Spierenburg G.T., Polak-Vogelzang A.A., Bast B.J. // J. Immunol. Meth. 1988. V. 114. № 1–2. P. 115–119.
65. Harasawa R., Mizusawa H., Fujii M., Yamamoto J., Mukai H., Uemori T., Asada K., Kato I. // Microbiol. Immunol. 2005. V. 49. № 9. P. 859–863.
66. Sung H., Kang S.H., Bae Y.J., Hong J.T., Chung Y.B., Lee C.K., Song S. // J. Microbiol. 2006. V. 44. № 1. P. 42–49.
67. Mariotti E., D'Alessio F., Mirabelli P., Di Noto R., Fortunato G., Del Vecchio L. // Biologicals. 2012. V. 40. № 1. P. 88–91.
68. Degeling M.H., Maguire C.A., Bovenberg M.S., Tannous B.A. // Anal. Chem. 2012. V. 84. № 9. P. 4227–4232.
69. Uphoff C.C., Drexler H.G. // Meth. Mol. Biol. 2013. V. 946. P. 15–26.
70. Nir-Paz R., Prévost M.C., Nicolas P., Blanchard A., Wróblewski H. // Antimicrob. Agents Chemother. 2002. V. 46. № 5. P. 1218–1225.
71. McGarrity G.J., Kotani H., Butler H. // Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis / Eds Maniloff J., McElhaney R.N., Finch L., Baseman J.B. Washington: ACM, 1992. 906 p.
72. Bébéar C., Pereyre S., Peuchant O. // Future Microbiol. 2011. № 4. P. 423–431.
73. Singh S., Puri S.K., Srivastava K. // Parasitol. Res. 2008. V. 104. № 1. P. 181–184.
74. Coldwell D.L., Tagg K.A., Jeffreys N.J., Gilbert G.L. // Int. J. STD AIDS. 2013. V. 24. № 10. P. 822–828.
75. Raheison S., Gonzalez P., Renaudin H., Charron A., Bébéar C., Bébéar C.M. // Antimicrob. Agents Chemother. 2005. V. 49. № 1. P. 421–424.
76. Ruiz J., Pons M.J., Gomes C. // Int. J. Antimicrob. Agents. 2012. V. 40. № 3. P. 196–203.
77. Yamaguchi Y., Takei M., Kishii R., Yasuda M., Deguchi T. // Agents Chemother. 2013. V. 57. № 4. P. 1772–1776.
78. Ciofu O., Beveridge T.J., Kadurugamuwa J., Walther-Rasmussen J., Hoiby N. // J. Antimicrob Chemother. 2000. V. 45. № 1. P. 9–13.
79. Lee J., Lee E.Y., Kim S.H., Kim D.K., Park K.S., Kim K.P., Kim Y.K., Roh T.Y., Gho Y.S. // Antimicrob. Agents Chemother. 2013. V. 57. № 6. P. 2589–2595.

80. Stanhope M.J., Walsh S.L., Becker J.A., Italia M.J., Ingraham K.A., Gwynn M.N., Mathie T., Poupard J.A., Miller L.A., Brown J.R., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. V. 49. № 10. P. 4315–4326.
81. Manning A.J., Kuehn M.J. // *BMC Microbiol.* 2011. V. 11. P. 258. doi: 10.1186/1471-2180-11-258.
82. Maredia R., Devineni N., Lentz P., Dallo S.F., Yu J., Guentzel N., Chambers J., Arulanandam B., Haskins W.E., Weitao T. // *Scientific World J.* 2012. V. 2012. Article 402919. doi: 10.1100/2012/402919.
83. David S.A., Volokhov D.V., Ye Z., Chizhikov V. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. V. 76. № 9. P. 2718–2728.
84. Windsor H.M., Windsor G.D., Noordergraaf J.H. // *Biologicals.* 2010. V. 38. № 2. P. 204–210.