

Оптимизация схемы деконтаминации перевиваемых культур клеток человека антибиотиками различного механизма действия

Т. А. ГРИГОРЬЕВА, А. А. ПОЖАРСКИЙ, Я. А. ГРИГОРЬЕВ,
Д. Н. КИНДТ, *Д. С. НОВИКОВА

НИЛ «Молекулярная фармакология», Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Россия

Резюме

При проведении экспериментов на клеточных культурах важным условием достоверности получаемых результатов является отсутствие контаминации. При этом долгосрочное культивирование существенно повышает риски заражения клеточного материала, в связи с чем возникает необходимость поддержания клеточной чистоты и удаления контаминантов в случае обнаружения заражения. В качестве контаминантов чаще всего выступают бактерии, дрожжи и грибы, в редких случаях вирусы и простейшие. Соответственно, для борьбы с биологическим заражением необходимо использовать препараты различной направленности в зависимости от природы контаминанта. В данной работе исследовано влияние наиболее распространённых в лабораторной практике препаратов антибиотической и антимикотической направленности на жизнедеятельность адгезивных перевиваемых клеточных культур человека. Показано, что разные клеточные культуры обладают различной чувствительностью к используемым для деконтаминации препаратам, что свидетельствует о необходимости разработки индивидуальных схем лечения для конкретной клеточной линии. Установлены безопасные диапазоны концентрации препаратов для клеток аденокарциномы лёгкого, остеосаркомы, колоректальной карциномы и эмбриональных клеток почки человека. С учётом полученных данных проведено лечение спонтанной контаминации в длительно культивируемом штамме линии H1299. Искусственное заражение исследуемых клеточных линий выявленным контаминантом с последующим лечением по аналогичной схеме подтвердило адекватность использования ципрофлоксацина для деконтаминации различных адгезивных культур в лабораторной практике.

Ключевые слова: контаминация; ципрофлоксацин; H1299; U2OS; HEK293; HCT116; микоплазма

Для цитирования: Григорьева Т. А., Пожарский А. А., Григорьев Я. А., Киндт Д. Н., Новикова Д. С. Оптимизация схемы деконтаминации перевиваемых культур клеток человека антибиотиками различного механизма действия. *Антибиотики и химиотер.* 2024; 69 (11–12): 16–24. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-16-24>. EDN: OEYYZZ.

Optimization of the Scheme for Decontaminating Continuous Human Cell Cultures with Antibiotics of Different Mechanisms

TATYANA A. GRIGOREVA, ARTUR A. POZHARSKII, YAROSLAV A. GRIGOREV,
DARIA N. KINDT, *DARIA S. NOVIKOVA

St. Petersburg State Institute of Technology (Technical University), St. Petersburg, Russia

Abstract

The absence of contamination is an important condition for the reliability of the results obtained when conducting experiments on cell cultures. At the same time, long-term cultivation significantly increases the risk of contamination of the cellular material, and therefore it is necessary to maintain cellular purity and remove contaminants in the event of contamination. The most common contaminants are bacteria, yeast and fungi, and, in rare cases, viruses and protozoa. Accordingly, to combat biological contamination, it is necessary to use drugs of different mechanisms depending on the nature of the contaminant. The article examines the effect of the most common antibiotic and antimycotic drugs in laboratory practice on the vital activity of continuous adherent human cell cultures. It was shown that different cell cultures have different sensitivity to the drugs used for decontamination, which indicates the need to develop individual treatment regimens for a specific cell line. Safe ranges of drug concentrations were established for lung adenocarcinoma, osteosar-

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: dc.novikova@gmail.com



*Correspondence to:
E-mail: dc.novikova@gmail.com



EDN: OEYYZZ

coma, colorectal carcinoma, and human embryonic kidney cells. Taking into account the obtained data, spontaneous contamination was treated in a long-cultivated strain of the H1299 line. Artificial infection of the studied cell lines with the identified contaminant followed by treatment according to a similar scheme confirmed the adequacy of using ciprofloxacin for decontamination of various adherent cultures in laboratory practice.

Keywords: contamination; ciprofloxacin; H1299; U2OS; HEK293; HCT116; mycoplasma.

For citation: Grigoreva T. A., Pozharskii A. A., Grigorev Ya. A., Kindt D. N., Novikova D. S. Optimization of the scheme for decontaminating continuous human cell cultures with antibiotics of different mechanisms. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2024; 69 (11–12): 16–24. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-16-24>. EDN: OEYZZZ. (in Russian)

Введение

Контаминация клеточных линий — важная, но часто игнорируемая проблема при использовании клеточных культур в исследованиях или производстве. Из возможных видов клеточного загрязнения наиболее опасно заражение биологическими объектами, последствия которого непредсказуемы.

Загрязнители с высокими темпами размножения — дрожжи, бактерии — опасны чрезмерным потреблением питательных веществ и наполнением среды вредными метаболитами. В случае же развития малозаметной контаминации, такой как микоплазменная, последствия могут быть более разнообразными и менее очевидными, чем гибель используемых клеток.

Микоплазма, являясь внутриклеточным паразитом, может долгое время оставаться незамеченной, значительно влияя при этом на заражённую культуру. В данном случае исследователи будут получать недостоверные данные: присутствие контаминанта способно инициировать каскад метаболических процессов, уникальный для каждой системы «клеточная линия — загрязнитель». Чем дольше загрязнение игнорируется, тем сильнее возрастает ущерб для исследований [1].

Важной особенностью биологической контаминации является возможность заражения других клеточных линий. Риск загрязнения клеток значительно увеличивается при длительном культивировании. Таким образом, во избежание негативных последствий возникновения загрязнения исследователям необходимо тщательно соблюдать правила асептической работы с клетками, а также иметь эффективные методы устранения загрязнения.

Наиболее частыми источниками контаминации являются бактерии, дрожжи и грибы, включая *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus casseliflavus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus felis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Candida* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp. [2]. Реже возможно заражение культуры вирусами или простейшими.

Для устранения загрязнения в лабораторной практике рекомендуется использовать следующие препараты: пенициллин–стрептомицин, ген-

тамицин, стрептомицин, канамицин, неомицин, полимиксин В, амфотерицин В, нистатин [2]. Однако использование деконтаминирующих препаратов может также оказывать негативное влияние на клеточную линию: влиять на метаболизм и пролиферацию, нарушать проницаемость клеточной мембраны [3] и приводить, в том числе, к полной гибели клеток.

Цель работы — изучение влияния используемых для деконтаминации препаратов на адгезивные человеческие клеточные культуры и эффективности их применения.

Материал и методы

Клеточные линии аденокарциномы лёгкого H1299, остеосаркомы U2OS и линия HEK293, полученные из эмбриональных почек человека, предоставлены ФГБУН «Институт цитологии РАН» (Санкт-Петербург, Россия), клетки колоректальной карциномы HCT116 — АО «БИОКАД», Санкт-Петербург, Россия.

Использовали реактивы производства Invitrogen Corporation (Carlsbad, California, USA) — Hoechst 33342; ThermoFisher (Waltham, Massachusetts, USA) — питательные среды DMEM, 0,25% раствор трипсина в ЭДТА; ООО «БиолоТ» — пенициллин/стрептомицин, гентамицин, амфотерицин В, ципрофлоксацин, L-глутамин.

Клетки культивировали в питательной среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 2 mM L-глутамин при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Пересев клеток осуществляли каждые 3 дня с использованием 0,25% трипсина.

При изучении токсического эффекта антибиотиков клетки культивировали аналогично в присутствии препаратов на протяжении двух недель. Параллельно осуществляли пересевы контрольных образцов клеточных линий без препаратов, для количественной оценки наблюдаемых эффектов за 100% принимали количество клеток контрольного образца в соответствующие сутки, оценивая по пять полей в каждом образце.

Заражение культур осуществляли путём переноса питательной среды от контаминированных клеток к здоровым после фильтрации (фильтр 0,4 мкм). При пересевах таких образцов каждые 3 дня клетки центрифугировали в течение 5 мин при скорости 800 об/мин. Для оценки долговременного эффекта препаратов клетки после 2 нед. обработки переносили в DMEM с 10% эмбриональной телячьей сывороткой и 2 mM L-глутамин без каких-либо антибиотиков.

Оптическую микроскопию при увеличении ×200 и ×400 (микроскоп Olympus CKX41, камера Olympus SC30, программное обеспечение Olympus analySIS FIVE) применяли для ежедневного контроля состояния культур и оценки их конфлюэнтности.

Для детекции ДНК контаминанта внутри клеток использовали флуоресцентную микроскопию с покраской Hoechst 33342 [4]. Для этого клетки обрабатывали раствором красителя в концентрации 8 мкМ на протяжении 20 мин в

темноте. Затем краситель удаляли, и клетки в питательной среде визуализировали при помощи системы высокосо­держательного анализа Operetta CLS™ (фильтры: brightfield (excit./emmis. — transmission/650–760 нм), Hoechst 33342 (excit./emmis. — 360–400 нм/410–480 нм)) [5–7].

Результаты и обсуждение

При длительном культивировании часто возникает необходимость использовать антибиотические препараты для поддержания чистоты клеточной культуры. К сожалению, в настоящее время не существует единого протокола лечения заражённых клеток в лабораторной практике, однако можно найти информацию о наиболее широко применяемых антибиотических препаратах и их рекомендуемых концентрациях. Для исследования воздействия антибиотиков различных групп на эукариотические клетки мы выбрали ряд общедоступных препаратов, чаще всего используемых при культивировании: пенициллин/стрептомицин, гентамицин, амфотерицин В, ципрофлоксацин, генетицин. В табл. 1 приведены сведения об их механизме действия и рекомендуемые диапазоны концентраций согласно данным литературы.

Исследование проводили на четырёх адгезивных клеточных линиях: H1299 (немелкоклеточная карцинома лёгкого человека), актуальная для исследований функционирования АМФ-активируемой протеинкиназы [15], HCT116 (карцинома тол-

стой кишки человека), активно используемая для изучения процессов р53-опосредованного апоптоза [16], U2OS (остеосаркома человека), модельная культура для исследования ингибирования MDM2 [17], а также HEK293 (клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека). В качестве контроля использовали культуры, культивируемые в среде без антибиотика, их кон­флюэнтность каждый раз принимали за 100%. Оценка эффекта препаратов производилась с помощью микроскопирования в ходе культивирования клеток в присутствии различных концентраций соединений на протяжении 2 нед.

В первую очередь эксперименты проводили на клетках немелкоклеточной карциномы лёгкого человека. Диапазоны концентраций выбирались на основе данных, представленных в табл. 1. Исследование влияния генетина в концентрациях, существенно превышающих представленные значения, было обусловлено тем, что данный антибиотик широко используется для селекции при трансфекции плазмидного генетического материала [18].

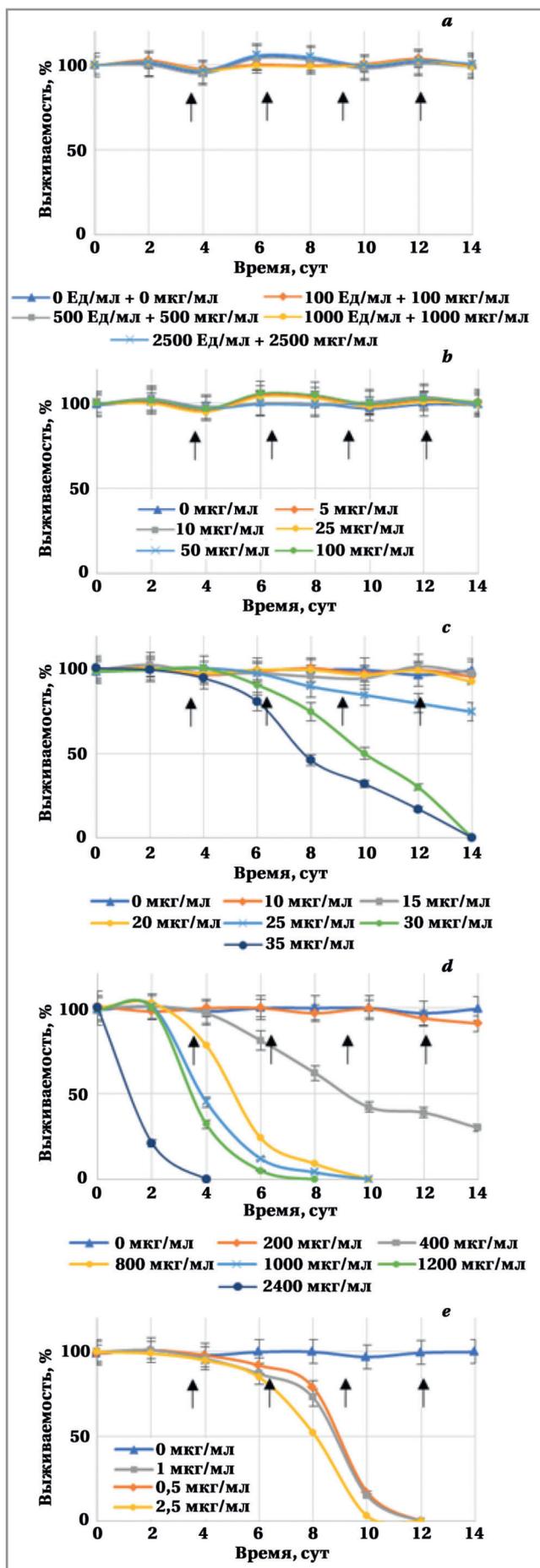
Было показано, что рекомендуемые концентрации антибиотиков безопасны для клеток линии H1299, за исключением амфотерицина В. Данный препарат антимикотического действия даже в концентрации 0,5 мкг/мл оказывает влияние на жизнедеятельность клеток (рис. 1).

Таблица 1. Характеристика использованных препаратов
Table 1. Characteristics of the drugs used

Препарат	Класс антибиотика	Чувствительные микроорганизмы	Механизм действия	Рекомендуемая эффективная концентрация	Источник литературы
Пенициллин	Бета-лактамы антибиотик	Бактерии	Подавление синтеза компонентов клеточной стенки	50–100 Ед/мл	[2, 3, 8]
Стрептомицин	Аминогликозид I поколения	Бактерии	Подавление синтеза белка за счёт связывания с 30S субъединицей рибосомы	50–100 мкг/мл	[2, 3, 9, 10]
Гентамицин	Аминогликозид II поколения	Бактерии	Подавление синтеза белка за счёт связывания с 30S субъединицей рибосомы	5–50 мкг/мл	[2, 9, 10]
Генетицин	Аминогликозид	Прокариоты и эукариоты	Подавление синтеза белка за счёт связывания рибосомой	200 мкг/мл*	[11]
Ципрофлоксацин	Фторхинолон II поколения	Бактерии, простейшие	Нарушение репликации ДНК	≥10 мкг/мл	[12]
Амфотерицин В	Макроциклический полиеновый антибиотик	Микромицеты	Лизис за счёт взаимодействия со стеролами клеточной мембраны	0,5–2,5 мкг/мл	[2, 13, 14]

Примечание. * — представлена концентрация, безопасная для эукариотических клеток по данным [11].

Note. * — the concentration shown is safe for eukaryotic cells according to [11].



Также была проведена оценка влияния выбранных концентраций исследуемых препаратов на клеточные линии НСТ116, U2OS и НЕК293. Аминогликозиды в рекомендуемых концентрациях оказались безопасны для рассматриваемых культур. Даже в сочетании с пенициллином они не оказывали заметного влияния на рост и морфологию клеток. Генетицин в высоких концентрациях также проявлял токсический эффект уже на 4-е сутки, однако в концентрации 200 мкг/мл не оказал пагубного влияния на рост и морфологию клеток на протяжении всего периода испытаний.

Известно, что фторхинолоны оказывают цитотоксическое действие на опухолевые клетки [19], тем не менее, в ходе нашего исследования токсический эффект ципрофлоксацина был отмечен лишь спустя неделю непрерывной обработки при превышении концентрации 25 мкг/мл на всех рассмотренных клеточных линиях. В случае амфотерицина В исследуемые клетки выдерживали концентрации, рекомендуемые для подавления микромицетов, на протяжении недели, однако при увеличении срока обработки препарат оказывал на них сильное токсическое действие. При этом наиболее чувствительными к этому препарату оказались клетки линии НСТ116. На рис. 2 приведена выживаемость клеток линий НСТ116, U2OS и НЕК293 при культивировании в присутствии препаратов в максимальных используемых концентрациях (в случае безопасных для Н1299 пенициллина/стрептомицина, гентамицина), в концентрациях, при которых наблюдается негативный эффект (ципрофлоксацин, генетицин, амфотерицин В).

Таким образом, можно утверждать, что использование любого из рассмотренных препаратов в рекомендуемых концентрациях в течение недели является безопасным для изучаемых клеточных линий, однако в случае заражений, требующих долгосрочного лечения, необходимо учитывать риски развития токсических эффектов.

Рис. 1. Выживаемость клеток линии Н1299 при культивировании в присутствии препаратов: *a* — пенициллин/стрептомицин; *b* — гентамицин; *c* — ципрофлоксацин; *d* — генетицин; *e* — амфотерицин В. **Примечание.** Здесь и в табл. 2. За 100% принята конфлюэнтность контрольного образца в день измерения, в каждом образце исследовали по 5 полей при увеличении $\times 200$, стрелками показаны дни пересевов.

Fig. 1. Survival of H1299 cells when cultured in the presence of the following drugs: penicillin/streptomycin (*a*), gentamicin (*b*), ciprofloxacin (*c*), geneticin (*d*), amphotericin B (*e*). **Note.** Here and in Table 2. The confluency of the control sample on the day of measurement was taken as 100%, 5 fields were examined in each sample at a magnification of $\times 200$, the arrows indicate the days of reseedings.

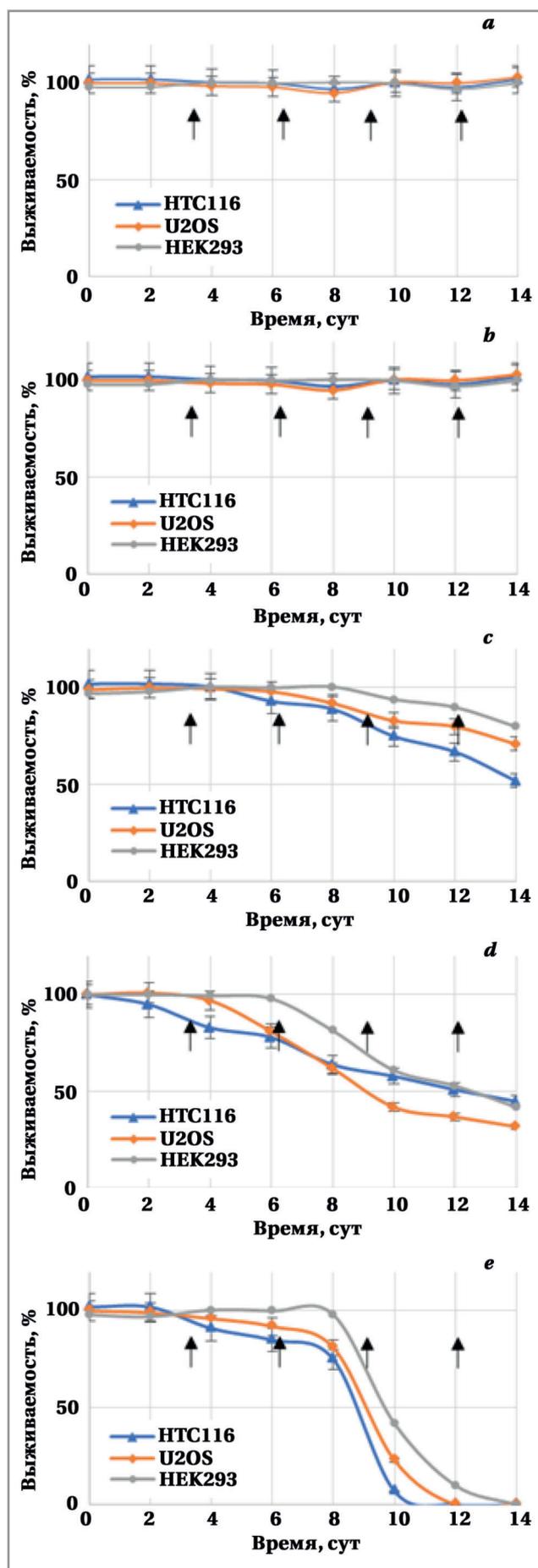
На следующем этапе исследования мы провели оценку возможности использования рассматриваемых препаратов для восстановления чистоты заведомо контаминированной клеточной культуры. В нашем распоряжении оказалась линия H1299, проявлявшая типичные признаки контаминации. Характер первичного заражения клеток H1299 позволил предположить, что контаминант является представителем рода *Mycoplasma*, что впоследствии было подтверждено с использованием коммерчески доступного ПЦР набора. Отмечается, что у клеток, заражённых микоплазмой, изменяется скорость пролиферации, нарушается метаболизм, в некоторых случаях наблюдается вакуолизация и зернистость клеток, возможно образование многоядерных клеток [20].

В лабораторной практике зачастую не тратят время на выяснение типа контаминанта, а незамедлительно начинают проводить обработку антибиотическими агентами. Однако необходимым этапом работы является определение локализации и объёма контаминации, а также его влияния на клеточную культуру. В процессе культивирования загрязнённого штамма мы отметили ослабление адгезивных свойств клеток и замедление их пролиферации. Среда, используемая при культивировании, быстро закислялась, что характерно для микоплазменной инфекции. Мы также провели окрашивание клеток флуоресцентным ДНК-связывающим красителем Hoechst 33342 [21] и проанализировали полученные результаты с помощью системы высокосолевого анализа Opreta, используя чистую культуру клеток H1299 для сравнения. На снимках чистой клеточной культуры (рис. 3, *a*) детектируется только флуоресценция ядерной ДНК, в то время как на снимках заражённых клеток H1299 помимо флуоресценции ядер можно различить границу цитоплазмы (рис. 3, *b*), что подтверждает присутствие и локализацию контаминанта.

Предполагая, что нам достоверно не известен контаминант, мы провели оценку воздействия всех рассматриваемых классов препаратов на клетки H1299. Заражённую культуру культивировали с препаратами в течение 14 дней, лишь

Рис. 2. Выживаемость клеток линий HCT116, U2OS и HEK293 при культивировании в присутствии препаратов: *a* — пенициллин/стрептомицин 2500 Ед/мл + 2500 мкг/мл; *b* — гентамицин 100 мкг/мл; *c* — ципрофлоксацин 25 мкг/мл; *d* — генетицин 400 мкг/мл; *e* — амфотерицин В 0,5 мкг/мл.

Fig. 2. Survival of HCT116, U2OS and HEK293 cell lines when cultured in the presence of the following drugs: penicillin/streptomycin 2500 U/ml + 2500 µg/ml (*a*), gentamicin 100 µg/ml (*b*), ciprofloxacin 25 µg/ml (*c*), geneticin 400 µg/ml (*d*), amphotericin B 0.5 µg/ml (*e*).



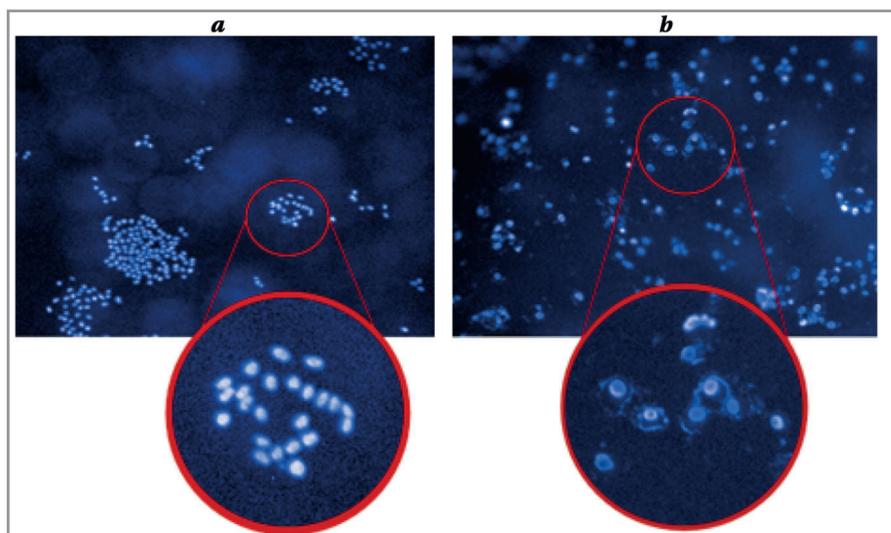


Рис. 3. Окраска клеток линии H1299 флуоресцентным ДНК-связывающим красителем Hoechst 33342.

Примечание. *a* — здоровая клеточная линия; *b* — заражённая клеточная линия. Увеличение $\times 10$.

Fig. 3. Staining of H1299 cells with the fluorescent DNA-binding dye Hoechst 33342: healthy cell line (*a*), infected cell line (*b*).

Note. $\times 10$ magnification.

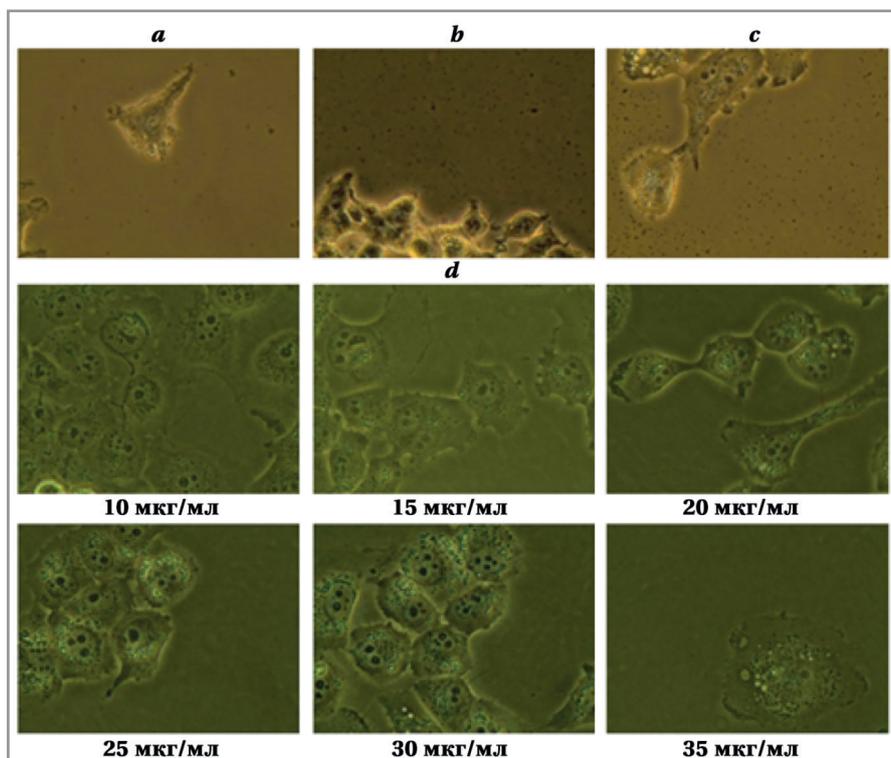


Рис. 4. Влияние исследуемых препаратов на клетки H1299 и контаминацию по данным оптической микроскопии.

Примечание. *a* — амфотерицин В 2,5 мкг/мл, 8 сут; *b* — пенициллин/стрептомицин 2500 Ед/мл + 2500 мкг/мл, 14 сут; *c* — гентамицин 100 мкг/мл, 14 сут; *d* — ципрофлоксацин, 14 сут. Увеличение $\times 400$.

Fig. 4. The effect of the studied drugs on H1299 cells and contamination according to optical microscopy data.

Note. *a* — amphotericin B 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, day 8; *b* — penicillin/streptomycin 2500 U/ml + 2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, day 14; *c* — gentamicin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, day 14; *d* — ciprofloxacin, day 14. $\times 400$ magnification.

для амфотерицина В длительность обработки ограничивалась 7 сут. Ожидается, антимикотик амфотерицин В не оказал терапевтического эффекта даже при использовании токсичных для клеток концентраций препарата — количество контаминанта в межклеточном пространстве снижалось соответственно количеству выживших клеток (рис. 4, *a*).

Аналогично, сочетание пенициллин–стрептомицин оказалось неэффективным для борьбы с контаминантом во всём достижимом диапазоне концентраций (рис. 4, *b*). Данные результаты объясняются тем фактом, что у представителей класса *Mollicutes* отсутствует клеточная стенка, определяющая механизм действия бета-лактамов антибиотиков и амфотерицина В [22]. Отсутствовал эффект и в случае гентамицина (рис. 4, *c*), что согласуется с данными литературы о вариабельности чувствительности микоплазм к этому препарату [23]. Различий во влиянии препаратов на рост заражённых клеток по сравнению со здоровыми также не было отмечено, в отличие от пагубного влияния контаминанта.

Наиболее популярной группой препаратов, используемых для подавления микоплазменных инфекций и контаминаций клеточных культур, являются фторхинолоны. В частности, применение цiproфлоксацина рекомендуется, в том числе, при иммунодефицитных состояниях и сочетанных инфекциях [22]. При обработке заражённой клеточной культуры H1299 использовали тот же диапазон концентраций, что и в случае здоровых клеток: 10, 15, 20, 25, 30, 35 мкг/мл. Было подтверждено отсутствие токсического действия цiproфлоксацина на клетки H1299 в concentra-

циях 10–20 мкг/мл, слабо выраженное антипролиферативное и цитотоксическое действие в концентрации 25 мкг/мл и значительное токсическое воздействие препарата в концентрациях 30–35 мкг/мл, приводящее к гибели клеток через 14 дней культивирования (рис. 4, *d*). При этом все рассмотренные концентрации, включая 10 мкг/мл ципрофлоксацина, вызывали объективное снижение контаминации.

Чтобы оценить эффективность применения ципрофлоксацина для деконтаминации клеток в лабораторных условиях, жизнеспособные после двухнедельной обработки препаратом клетки H1299 культивировали в питательной среде DMEM без добавления каких-либо антибиотиков в течение следующих 2 нед. После этого оценивали наличие и объёмы загрязнения с помощью оптической и флуоресцентной микроскопии (табл. 2). В случае клеток, которые были обработаны 10 мкг/мл ципрофлоксацина, наблюдалось возобновление контаминации как внутри клеток, так и в межклеточном пространстве. Концентрации 15–25 мкг/мл не только оказались безопасны для клеток H1299, но и продемонстрировали стабильный антибиотический эффект. Дальнейшее культивирование не привело к повторному выявлению контаминанта, в то же время наблюдалось отсутствие признаков закисления среды и восстановление скорости пролиферации клеток.

Для оценки применимости подхода для других клеточных культур, заражённую питательную среду клеток H1299 добавляли к здоровым клеткам HCT116, U2OS и HEK293. Обработку ципрофлоксацином начинали после появления признаков заражения, при этом использовали тот же

диапазон концентраций, что и в случае клеток H1299. Результаты экспериментов по деконтаминации первично заражённой линии H1299 и вторично заражённых линий HCT116, U2OS и HEK293 сведены в табл. 2.

Согласно полученным данным, обработка ципрофлоксацином оказалась наиболее эффективной в случае клеточной линии HCT116. При обработке линий U2OS и HEK293 долгосрочного эффекта удалось добиться только при использовании повышенных концентраций ципрофлоксацина, которые оказывают негативное влияние и на сами клетки, причём в случае линии остеосаркомы удовлетворительный эффект был достигнут после повышения концентрации препарата до 40 мкг/мл. Вероятно, такое различие в требуемых концентрациях связано с особенностями клеток, которые выступают в роли резервуаров, сохраняющих контаминант.

Таким образом, оптимальной концентрацией для первичной обработки клеточной культуры стоит считать диапазон 20–35 мкг/мл ципрофлоксацина в условиях постоянного контроля с изменением концентрации препарата в зависимости от проявляющихся эффектов.

Заключение

В результате исследования установлено, что пенициллин/стрептомицин (до 2500 Ед/мл и 2500 мкг/мл, соответственно), гентамицин (до 100 мкг/мл), ципрофлоксацин (до 25 мкг/мл) и генетицин (до 400 мкг/мл) безопасны для адгезивных человеческих клеточных культур, в то время как амфотерицин В вызывает гибель кле-

Таблица 2. Наличие признаков контаминации при обработке клеточных линий ципрофлоксацином
Table 2. Signs of contamination during treatment of cell lines with ciprofloxacin

Концентрация ципрофлоксацина, мкг/мл	Условия	Клеточные линии			
		H1299	HCT116	U2OS	HEK293
10	14 сут ципрофлоксацин	—	—	+	+
	14 сут ципрофлоксацин + 14 сут среда	+	+	+	+
15	14 сут ципрофлоксацин	—	—	+	+
	14 сут ципрофлоксацин + 14 сут среда	—	—	+	+
20	14 сут ципрофлоксацин	—	—	+	+
	14 сут ципрофлоксацин + 14 сут среда	—	—	+	+
25	14 сут ципрофлоксацин	—	—	+	+
	14 сут ципрофлоксацин + 14 сут среда	—	—	+	+
30	14 сут ципрофлоксацин	×	×	—	—
	14 сут ципрофлоксацин + 14 сут среда	Н. о.	Н. о.	+	—
35	14 сут ципрофлоксацин	×	×	—	×
	14 сут ципрофлоксацин + 14 сут среда	Н. о.	Н. о.	+	Н. о.
40	14 сут ципрофлоксацин	Н. о.	Н. о.	—	Н. о.
	14 сут ципрофлоксацин + 14 сут среда	Н. о.	Н. о.	—	Н. о.

Примечание. «+» — соответствует наличию признаков контаминации; «—» — соответствует отсутствию следов контаминации; «×» — означает 100% гибель клеток через 14 сут; «Н. о.» — эксперимент не проводился.

Note. «+» — corresponds to the presence of signs of contamination; «—» — corresponds to the absence of signs of contamination; «×» — means 100% cell death after 14 days; «Н. о.» — the experiment was not conducted.

ток уже в концентрации 0,5 мкг/мл. Культуры клеток человека H1299, HCT116, U2OS и HEK293 эффективно очищаются от микоплазменной контаминации при использовании ципрофлоксацина в концентрациях 20–25 мкг/мл, однако выбор условий обработки должен определяться чувствительностью к препарату конкретной клеточной культуры.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-73-00296).

Литература/References

1. *Abatenh E., Gizaw B., Tsegaye Z.* Contamination in a microbiological laboratory. *Int J Res Stud Biosci.* 2018; 6 (4): 7–13. doi: <https://doi.org/10.20431/2349-0365.0604002>.
2. *Mahmood A., Ali S.* Microbial and viral contamination of animal and stem cell cultures: common contaminants, detection and elimination. *Stem Cell Res Ther.* 2017; 2 (5): 149–155. doi: <https://doi.org/10.15406/jstrt.2017.02.00078>.
3. *Dalhoff A.* Selective toxicity of antibacterial agents — still a valid concept or do we miss chances and ignore risks? *Infection.* 2021; 49: 29–56. doi: [10.1007/s15010-020-01536-y](https://doi.org/10.1007/s15010-020-01536-y).
4. *Chazotte B.* Labeling nuclear DNA with Hoechst 33342. *Cold Spring Harb Protoc.* 2011; 2011 (1): pdb.prot5557. doi: [10.1101/pdb.prot5557](https://doi.org/10.1101/pdb.prot5557).
5. *Novikova D. S., Grigoreva T. A., Ivanov G. S., Melino G., Barlev N. A., Tribulovich V.* Activating effect of 3-benzylidene oxindoles on AMPK: from computer simulation to high-content screening. *ChemMedChem.* 2020; 15 (24): 2521–2529. doi: [10.1002/cmdc.202000579](https://doi.org/10.1002/cmdc.202000579).
6. *Grigoreva T., Romanova A., Sagaidak A., Vorona S., Novikova D., Tribulovich V.* Mdm2 inhibitors as a platform for the design of P-glycoprotein inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2020; 30 (18): 127424. doi: [10.1016/j.bmcl.2020.127424](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127424).
7. *Grigoreva T., Sagaidak A., Romanova A., Novikova D., Garabadzhiu A., Tribulovich V.* Establishment of drug-resistant cell lines under the treatment with chemicals acting through different mechanisms. *Chem Biol Interact.* 2021; 344: 109510. doi: [10.1016/j.cbi.2021.109510](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109510).
8. *Sharma S. K., Singh L., Singh S.* Comparative study between penicillin and ampicillin. *Sch J App Med Sci.* 2013; 1 (4): 291–294. doi: <https://doi.org/10.36347/sjams.2013.v01i04.019>.
9. *Kornder J. D.* Streptomycin revisited: molecular action in the microbial cell. *Med Hypotheses.* 2002; 58 (1): 34–46. doi: <https://doi.org/10.1054/mehy.2001.1450>.
10. *Jospe-Kaufman M., Siomin L., Fridman M.* The relationship between the structure and toxicity of aminoglycoside antibiotics. *Bioorg Med Chem Lett.* 2020; 30 (13): 127218. doi: [10.1016/j.bmcl.2020.127218](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127218).
11. *Birk A. V., Dubovi E. J., Zhang X., Szeto H. H.* Antiviral activity of geneticin against bovine viral diarrhoea virus. *Antivir Chem Chemother.* 2008; 19 (1): 33–40. doi: [10.1177/095632020801900105](https://doi.org/10.1177/095632020801900105).
12. *Zhang G., Liu X., Zhang S., Pan B., Liu M.* Ciprofloxacin derivatives and their antibacterial activities. *Eur J Med Chem.* 2018; 146: 599–612. doi: [10.1016/j.ejmech.2018.01.078](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.078).
13. *Colozza C., Posteraro B., Santilli S., De Carolis E., Sanguinetti M. A., Girmenia C.* *In vitro* activities of amphotericin B and ambisome against *Aspergillus* isolates recovered from Italian patients treated for haematological malignancies. *J Antimicrob Agents.* 2012; 39: 440–443. doi: [10.1016/j.ijantimicag.2012.01.013](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.01.013).
14. *Дмитриева Н. В., Петухова И. Н.* Сравнительная эффективность и переносимость липидного комплекса амфотерицина В и липосомального амфотерицина В при лечении инвазивных грибковых инфекций у онкогематологических больных: обзор литературы. *Онкогематология.* 2014; 9 (1): 35–41. doi: doi.org/10.17650/1818-8346-2014-9-1-35-41. [*Dmitrieva N. V., Petukhova I. N.* Comparative efficacy and tolerability of amphotericin B lipid complex and liposomal amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: literature review. *Oncohematology.* 2014; 9 (1): 35–41. doi: doi.org/10.17650/1818-8346-2014-9-1-35-41. (in Russian)]
15. *Novikova D. S., Grigoreva T. A., Zolotarev A. A., Garabadzhiu A. V., Tribulovich V. G.* Advanced palladium free approach to the synthesis of substituted alkene oxindoles via aluminum-promoted Knoevenagel reaction. *RSC Adv.* 2018; 60 (8): 34543–34551. doi: [10.1039/c8ra07576j](https://doi.org/10.1039/c8ra07576j).
16. *Grigoreva T. A., Novikova D. S., Gureev M. A., Garabadzhiu A. V., Tribulovich V. G.* Amino acids as chiral derivatizing agents for antiproliferative substituted N-benzyl isoindolinones. *Chirality.* 2018; 30 (6): 785–797. doi: [10.1002/chir.22854](https://doi.org/10.1002/chir.22854).
17. *Gureev M., Novikova D., Grigoreva T., Vorona S., Garabadzhiu A., Tribulovich V.* Simulation of MDM2 N-terminal domain conformational lability in the presence of imidazoline based inhibitors of MDM2-p53 protein–protein interaction. *J Comput Aided Mol Des.* 2020; 34: 55–70. doi: [10.1007/s10822-019-00260-6](https://doi.org/10.1007/s10822-019-00260-6).
18. *Arshad H., Patel Z., Mehrabian M., Bourkas M. E. C., Al-Azzawi Z. A. M., Schmitt-Ulms G., Watts J. C.* The aminoglycoside G418 hinders de novo prion infection in cultured cells. *J Biol Chem.* 2021; 297 (3): 101073. doi: [10.1016/j.jbc.2021.101073](https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101073).
19. *Yadav V., Talwar P.* Repositioning of fluoroquinolones from antibiotic to anti-cancer agents: An underestimated truth. *Biomed Pharmacother.* 2019; 111: 934–946. doi: [10.1016/j.biopha.2018.12.119](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.119).
20. *Шалунова Н. В., Волкова Р. А., Волгин А. Р., Петручук Е. М., Бердникова З. Е., Эльберт Е. В., и др.* Микоплазмы — контаминанты клеточных культур. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2016; 16 (3): 151–160. [*Shalunova N. V., Volkova R. A., Volgin A. R., Petruchuk E. M., Berdnikova Z. E., Elbert E. V. et al.* Mycoplasma — contamination of cell cultures. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2016; 16 (3): 151–160. (in Russian)]
21. *Greenfield E. A.* Testing hybridoma cells for Mycoplasma contamination. *Cold Spring Harb Protoc.* 2021; 2021 (7). doi: [10.1101/pdb.prot103283](https://doi.org/10.1101/pdb.prot103283).
22. *Чернова О. А., Медведова Е. С., Музыкантов А. А., Баранова Н. Б., Чернов В. М.* Микоплазмы и их устойчивость к антибиотикам: проблемы и перспективы контроля микоплазменных инфекций и контаминаций клеточных культур. *Acta Naturae.* 2016; 8 (2): 24–34. doi: <https://doi.org/10.32607/20758251-2016-8-2-24-34>. [*Chernova O. A., Medvedeva E. S., Mouzykantov A. A., Baranova N. B., Chernov V. M.* Mycoplasmas and their antibiotic resistance: The problems and prospects in controlling infections. *Acta Naturae.* 2016; 8 (2): 24–34. doi: <https://doi.org/10.32607/20758251-2016-8-2-24-34>. (in Russian)]
23. *Хилькевич Н. Д.* К вопросу о генитальных микоплазменных инфекциях. *Военная медицина.* 2012; 2: 128–133. [*Khilkevich N. D.* K voprosu o genital'nykh mikoplazmennykh infektsiyakh. *Voennaya meditsina.* 2012; 2: 128–133. (in Russian)]

Поступила / Received 15.03.2023
Принята в печать / Accepted 28.04.2023

Информация об авторах

Григорьева Татьяна Алексеевна — к.х.н., старший научный сотрудник НИЛ «Молекулярная фармакология», Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0003-1271-0328

Пожарский Артур Айварович — студент НИЛ «Молекулярная фармакология», Санкт-Петербург, Россия

Григорьев Ярослав Александрович — студент НИЛ «Молекулярная фармакология», Санкт-Петербург, Россия

Киндт Дарья Николаевна — студент НИЛ «Молекулярная фармакология», Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-0181-4968

Новикова Дарья Сергеевна — к.х.н., старший научный сотрудник НИЛ «Молекулярная фармакология», Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-5310-4570

About the authors

Tatyana A. Grigoreva — Ph. D. in Chemistry, Senior Researcher of the Laboratory of Molecular Pharmacology, St. Petersburg State Institute of Technology (Technical University), St. Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0003-1271-0328

Artur A. Pozharskii — Student, Laboratory of Molecular Pharmacology, St. Petersburg State Institute of Technology (Technical University), St. Petersburg, Russia.

Yaroslav A. Grigorev — Student, Laboratory of Molecular Pharmacology, St. Petersburg State Institute of Technology (Technical University), St. Petersburg, Russia.

Daria N. Kindt — Student, Laboratory of Molecular Pharmacology, St. Petersburg State Institute of Technology (Technical University), St. Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0002-0181-4968

Daria S. Novikova — Ph. D. in Chemistry, Senior Researcher of the Laboratory of Molecular Pharmacology, St. Petersburg State Institute of Technology (Technical University), St. Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0002-5310-4570