

КОНТАМИНАЦИЯ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ

Нет более универсальной проблемы, чем контаминация культуры клеток. Контаминация бывает химическая и механическая, видимая и скрытая, разрушающая и на первый взгляд безобидная. В любом случае она будет влиять на ход и результаты ваших экспериментов.

Проблемы контаминации делятся на 3 класса:

Незначительная – случайная потеря нескольких сосудов;

Серьезная – частота контаминаций увеличивается, что может привести к потере опытных образцов;

Катастрофическая – контаминаты не «прячутся», что ставит под сомнение общую ценность работы.

Контаминация никогда не может быть полностью элиминирована, лишь ее случаи могут быть сведены к минимуму.

Основные контаминанты клеток

Контаминацию можно определить как нежелательный элемент (химические или биологической природы) культуральной системы, влияющий как на сами клетки, так и на результаты экспериментов.

Химическая контаминация – присутствие *в воде, питательной среде, добавках, сыворотке, на поверхности посуды*, лабораторных инструментов и приспособлений некоторых не живых компонентов, оказывающих нежелательное влияние на систему культуры клеток. Точный спектр этих веществ очень сложно обозначить – это могут быть не обязательно токсические вещества и материалы, даже естественные необходимые питательные вещества, ростовые факторы и гормоны в высокой концентрации могут быть опасны.

Types and sources of potential chemical contaminants

1. Free radicals (токсичные для клеток) generated in the media by the photoactivation of tryptophan, riboflavin or HEPES exposed to fluorescent light.
2. Metal ions, endotoxins, and other impurities in water, media and sera.
3. Plasticizers (пластификаторы) in plastic tubing and storage bottles.
4. Deposits on glassware, pipets, instruments etc. left by disinfectants or detergents, antiscaling compounds in autoclave water, residues from aluminium foil or paper.
5. Impurities in gases used in CO₂ incubators. Наиболее опасны масла и CO.

6. Белки сыворотки способны адсорбировать тяжелые металлы

7. Эндотоксины

Важно помнить, что ХК способны накапливаться в среде: малые количества разнообразных ХК нетоксичных по отдельности, могут быть в композиции сильно токсичны.

Биологическая контаминация

Контаминанты делятся на две группы по сложности обнаружения их в культуре: легко детектируемые (бактерии, плесневые грибы и дрожжи) и трудно детектируемые и, как результат, вызывающие более серьезные проблемы в культуре (вирусы, простейшие, насекомые, микоплазмы и другие линии клеток).

Bacteria, Molds and Yeasts могут развиваться везде, где существует богатая и относительно не защищенная окружающая среда. Их размер и быстрый рост позволяют быстро обнаружить их.

Они обнаруживаются после 2-х суток с момента контаминации в микроскоп или по их действию на культуру (скачки pH, разрушение клеток, помутнение среды). Однако, при постоянном использовании антибиотиков, инфекции (резистентные) могут перейти в фазу фонового роста, и тогда инфекция будет трудно установима. Сходные проблемы существуют с некоторыми мелкими или медленно растущими организмами, а также с интрацеллюлярными бактериями. Они обнаруживаются значительно позже, со временем.

Viruses – ввиду своего малого размера – самое сложно обнаруживаемое заражение. Малый размер мешает удалять их из среды, сыворотки и т.д. Однако многие вирусы с точки зрения возможности жизнедеятельности имеют вполне определенные требования к хозяину, высокую специфичность, лимитирующую способность поражать клетки других типов. Поэтому чаще всего вирусы не представляют серьезной проблемы для исследований. Плюс к этому после разрушения зараженных клеток, вирусы встают на путь «самолимитирования». Всегда следует опасаться заражения персонала лаборатории!!! (HIV, hepatitis B, Epstein-Barr (вызывает, например, атеросклероз), Simian herpes B virus и т.д.).

Protozoa – паразитические или свободноживущие простейшие (амеба) редко обнаруживаются в культуре. Обычно почвенного происхождения, амeboидные могут образовывать споры, распространяющиеся через персонал воздушным путем. Простейшие могут вызывать эффекты, схожие с вирусным повреждением и полностью убивать культуру

за 10 дней. Ввиду их медленного роста и внешнего сходства с клетками, их трудно обнаружить в культуре.

Insects and arachnids постоянно обнаруживаются в лаборатории, especially мухи, муравьи, тараканы, клещи могут сами быть contaminants так и важными источниками микробного заражения. Хотя эти многоногие контаминанты и не контактируют с культурой напрямую, перемещаясь от одних флаконов к другим, они разносят микробы. Наиболее опасны эти переносчики для культуры растений, особенно когда идет речь о выращивании крупных элементов ткани.

Mycoplasmas – самые опасные контаминанты клеток, впервые обнаружены в культуре Robinson в 1956. Показано, что микоплазмы способны модулировать клеточные функции, рост, метаболизм, морфологию, адгезивность, мембраны, размножение и распространение вирусов, вызывать хромосомные абберации и повреждение и др.

На основании тестов, проведенных в США, минимум 11-15% клеточных культур в США поражены микоплазмой. В Европе уровень еще выше – исследовали 1949 клеточных культур в Нидерландах (более 25%), в бывшей Чехословакии 327 (более 37%). Другие части света: 65% of the cultures in Argentina and 80% in Japan заражены.

Что дает возможность микоплазмам поражать такой широкий спектр культур? В первую очередь простота морфологии, - похожие на бактерии, наименьший по размеру из известных самореплицирующихся микроорганизмов (0,3-0,8 микрометра в диаметре); отсутствие клеточной стенки; и высокая избирательность к параметрам среды. Первые две характеристики позволяют микоплазмам достичь высокой плотности в клеточной культуре без видимых в микроскоп и просто визуальных (pH, замутнение) проявлений. Также поэтому их невозможно удалить из питательной среды путем фильтрования. Третья характеристика очень интересна. Микоплазмы с успехом могут существовать внутри многих типов клеток. Но избирательность к условиям существования не позволяет выявлять их в стандартных микробиологических тестах на заражение, проводимых на агаризованной среде.

Перекрестная контаминация другими типами клеток

С развитием методов определения кариотипа в конце 1950's, стало возможным отделять клеточные культуры друг от друга. В 1967 isoenzyme analysis было показано, что 20 линий клеток человека несут в себе клетки-контаминанты HeLa. Тесты (246 линий) показали, что

30% клеток заражены разными типами клеток. Некоторые были заражены не одним типом клеток.

Последствия – неверные результаты опытов. Как избавиться – вы знаете (см. более ранние лекции)

Steps for reducing contamination problems

1. Use good aseptic techniques. Работайте стерильно.
2. Исключение случайностей.
3. Протоколирование результатов
4. Keep the laboratory clean.
5. Постоянно тестируйте for contamination.
6. Use antibiotics мягко, если вообще используете.

ЭНДОТОКСИН

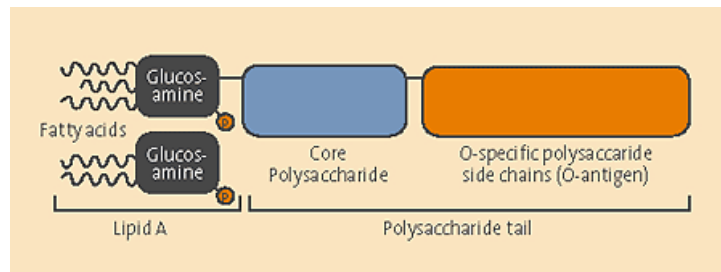
(использован автопереводчик с английского с незначительной правкой на кооректность)

Контаминация клеточной культуры – основная проблема для исследователей и производителей лекарств (продуктов метаболизма клеток). В прошлом, большинство мер для избегания заражения были сфокусированы на биологических загрязняющих веществах: бактерии, микоплазмы, дрожжи, грибок и даже другие клеточные линии. Тем не менее для компаний, производящих ЛВ (метаболиты клеток), как например, вакцины и лекарства, вводящие и т.д., эндотоксины, химические загрязняющие вещества, производимые некоторыми бактериями, также было крупное беспокойство. Присутствие endotoxin в продуктах для инъекции может закончиться ответами pyrogenic, колеблющимися из лихорадки и озноба, до септического шока. Есть, тем не менее, подтверждение, которое endotoxins может также создать целый ряд проблем для исследователей, культивирующих культуру клетки. Наша цель должна просмотреть некоторую текущую информацию о endotoxin: характеристики, потенциальные источники, и особенно эффекты в клетках; и предложить некоторые варианты в избегании проблемы культуры, связанной с эндотоксинами.

Что такое эндотоксин?

Endotoxin - комплекс lipopolysaccharide (LPS) который является крупным компонентом внешней мембраны большинства бактерий грамма-негатив. Единственный Escherichia coli содержит около 2 миллионов молекул LPS на клетку. Бактерии распространяют endotoxin в

окружающую среду в небольших количествах, когда они активно растут, и на больших суммах, когда, они умирают. LPS СОСТОИТ из очень гидрофобной липидной группы (lipid A) covalently связанной с длинным комплексом polysaccharide хвоста (Смотри Рисунок 1). Lipid обычно состоит из двух фосфорилированных сахаров (глюкозамин, связанные с различными жирными кислотами). Lipid A прикрепляет LPS к бактериальной мембране и ответственный за большинство биологических эффектов.



Молекулярная масса колеблется от 3 до 40 кДа. Она зависит от размера О-полисахарида. Липид А ответственен за большинство эффектов эндотоксинов. Длинный hydrophilic polysaccharide хвост состоит из двух областей: сердцевина (core) состоит из постоянной небольшой группы сахаров, и значительно более крупный и различный по строению полисахаридный участок (О-антиген). Сердцевина содержит heptoses (7 углеродные сахара) плюс два участка восьми углеродных сахаров уникальный для бактериях негатива грамма, которые связывают липид с О-антигеном. Эта область изменяется как в пределах одного вида так и между видами, состоит из 20-40 повторяющихся участков (от трех до восьми сахаров в каждом). О-Антиген ответственный за специфический антигенный ответ на грамм "-" бактерии. Endotoxins имеют отриц заряд в растворе, устойчивы к высоким температурам, и тенденция, чтобы сформировать очень большие агрегаты (1000 kDaltons или более в зависимости от pH, концентрации соли, поверхностно-активных веществ, и т.п.) в водном решении. Из-за их hydrophobicity, они имеют тенденцию иметь прочное сродство к другим гидрофобным материалам, особенно некоторые пластические продукты использованные в лаборатории.

Обнаружение и измерение

Первый метод для обнаружения endotoxinового заражения был разработан в 1940's для скрининга воды и растворов для инъекций. Этот тест базируется на способности endotoxin, чтобы вызвать лихорадку (endotoxin-порождающее ответ pyrogenic), когда впрыснуто в кролики. Хотя очень успешный в уменьшении эпизодов pyrogenic, тест кролика дорог, длителен, и не очень точен. В 1970's, in vitro оценивать, был разработан базировавшееся на наблюдениях, которые лизат из амебоцитов краба подковы (Limulus polyphemus) способен сгущаться в присутствии очень низких уровней endotoxin. Этот тест (Limulus amoebocyte lysate assay (LAL)) очень чувствителен, обнаруживая вплоть до 0.03 Endotoxin Устройств

(EU)/mL. Один EU равные приблизительно 0.1 - 0.2 ng endotoxin/mL раствора. Сейчас в США был разработан более чувствительный тест, что может обнаружиться вплоть до 0.001 EU/mL.

Источники эндотоксинов в культуре клеток

Вода высокой чистоты существующая в любой лаборатории культуры клеток, не только для подготовки среды и растворов, но также для промывки стекольных изделий. Из-за размера endotoxin, ультрафильтрация также очень эффективна. Вода готовится через ионно-обменную смолу с конечной обработкой ultrafiltration - хорошо. Одинаково важно - условия хранения использованные для воды после того, как она очищена. Бактерии часто обнаруживаются в стеклянных или пластических контейнерах для хранения воды, и могут быстро поднять endotoxin уровни в сохраненной воде на неприемлемых уровнях. Когда в сомнении о качестве воды из системы очистки, просто LAL оценивать, должно быть сделано, чтобы проверить endotoxin уровни. Если оказывается, что вода будет источник endotoxin и проблема не может быть решена на месте, вода nonpyrogenic для инъекции (WFI) может приобретаться и использоваться для подготовки носителя и других критических решений.

Сыворотка. В прошлом, сыворотки, особенно эмбриональные бычьи сыворотки (FBS), было крупным источником endotoxin в культуре ячейки. Но как улучшающее endotoxin тесты (LAL оценивать) проведенное к возрастающей осведомленности endotoxin уровней в сыворотках, изготовителях смогли значительно уменьшать эти уровни обрабатывая сырье при асептических условиях. В раннем 1980's, Case Gould (*Case Gould, M. J. Endotoxin in Vertebrate Cell Culture: Its Measurement and Significance in Uses and Standardization of Vertebrate Cell Lines, (Tissue Culture Association, Gaithersburg, MD, 1984) 125-136*) обнаруживал endotoxin уровни так же низкие как и 0.006 ng/mL и так же высоко как и 800 ng/mL в ЭТС от десяти изготовителей сывороток. В общей сложности из 111 сывороток, 86 (77%) имело менее чем 1 ng/mL endotoxin. Большинство изготовителей сывороток к настоящему времени предлагают оплату или высокое качество, низкий уровень endotoxin FBS (менее чем 1 ng/mL); это обычно более дорого чем их стандартное качество FBS и не смогло быть необходимым для многих культур. В зависимости от целей эксперимента надо использовать различную по качеству сыворотку.

Среда и добавки

К настоящему времени, большинство коммерчески подготавливающиеся среды тестируются для endotoxin и удостоверяются, чтобы содержать менее чем 0.1 ng/mL endotoxin. Для среды, подготовленной в лаборатории, endotoxin уровень будет определяться первоначальным endotoxin уровнем в воде, использованной, чтобы растворять другие компоненты. Тем не менее, реагенты добавленные к среде после фильтрации, даже если они стерильные, могут

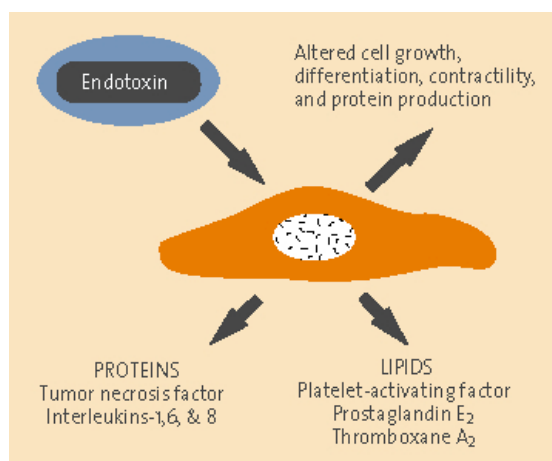
также быть источником endotoxin. В тесте пяти разных пакетов коммерчески подготовленного бычьего альбумина сыворотки (5 mg/mL), Dumoulin et al. (5) обнаружил endotoxin уровни колебались с низкого уровня 0.1 ng/mL до уровня 12 ng/mL. Case Gould сообщала на ее обследовании добавок к среде (2), что erythropoietin имел endotoxin уровни изменяющиеся от 80 до 2,000 ng/mL; некоторые 1 молярные растворы аминокислот имели endotoxin уровни также высокие (50 ng/mL). Эти аминокислоты, возможно, произведены бактериальными ферментами брожением. В любом случае надо всё тестировать.

Стекло. Endotoxins могут задерживаться в лабораторных стеклянных изделиях и может быть трудным удалить полностью в течение промывки. Стандартная лабораторная процедура автоклавирования имеет небольшой эффект, т.к. высокой теплоустойчивости endotoxin. Подвергая стеклянные изделия +250C более чем на 30 минут или +180C в течение трех часов рекомендуется для уничтожения любого заражения endotoxin.

Пластик. Высокие температуры при изготовлении различных лабораторных пластиковых приспособлений и планшетов обычно достаточны для уничтожения заражения endotoxins. Тем не менее, значимые уровни как биологического так и химического заражения могут произойти в течение обычной обработки связанной со сборкой и пакетированием. К несчастью, пока процесс стерилизации (луч электрона или гаммы-излучение) уничтожит микробные загрязняющее вещества, endotoxin будет оставлен в основном, целый. Roslansky et al. показали, что endotoxin уровни в 50 mL стерильных polypropylene плашках от разных производителей с низкого уровня 0.007 EU/шт. на уровне 15.0 EU/шт.

Эффект эндотоксинов на рост и функциональную активность клеток in vitro

In 1984, Case Gould опубликовал обзор эффектов эндотоксинов в культуре клеток. Среди эффектов отмечалась стимуляция в культуре лейкоцитов продуцировать тканевые факторы, активация мышинных макрофагов, ингибция эритропоэза у мыши при низком уровне содержания эндотоксина (менее 1 нг/мл). С тех пор много больше статей опубликованы, что сообщили об эффектах endotoxins на in vitro функциях клетки и при росте (Рис.2).



Следующие примеры дадут обзор некоторых разнообразных и значимых эффектов, которые endotoxins могут иметь в клетках в культуре (Смотри также табл.3).

TABLE 3
Some of the Documented In Vitro Effects of Endotoxin

CELL TYPE	CONC. (ng/mL)*	ENDOTOXIN EFFECTS
Equine macrophages	0.5	Induced production of IL-6
Human IVF embryos	1	Reduced pregnancy success rates in in vitro fertilization programs 3-4 fold
Aortic rings	1	Reduced contractility and induced production of IL-1 and TNF
Aortic endothelium	10	Dose dependent изменения in heparin sulfate proteoglycan production
Murine B lymphomas	10	Increased production of immunoglobulin light chains 30-40 fold
Recombinant CHO	10	Изменение protein production
Cardiac myocytes	10	Induced contractile dysfunction
Human T Cells	100	Induced proliferation and lymphokine production in presence of monocytes
Uretal epithelium	5000	Изменение clonal efficiency

**Lowest concentration of endotoxin that showed the effect*

Endotoxin in vivo способен тормозить мышцу вазоконстриктор, что приводит к расширению сосуда и циркуляторному коллапсу. Были получены результаты на клетках из кровеносных сосудах in vitro. Organ cultures дуги аорты крысы. В них увеличивалось высвобождение TNF and IL-1. Таким образом, показано, что эндотоксин действует на внешние клетки эндотелия (выход цитокинов) и на внутренний слой гладких мышц (угнетение сужения сосудов) в дуге аорты. Colburn et al. reported that endotoxin (10 ng/mL) увеличивает внутриклеточную продукцию гепаран сульфата в клетках линии аорты кролика. Tao and McKenna demonstrated that 10 ng/mL endotoxin может индуцировать дисфункцию сокращения миоцитов (сердце крысы) за счет увеличения активности NO-синтазы. Результатом of exposure to 25 ng/mL endotoxin совместно с exposure to a с нелетальным тепловым шоком был вызов апоптоза у клеток эндотелия аорты. Sugiura et al. showed that высокие уровни эндотоксина (100 ng/mL) приводят к стимуляции выделения эндотелина - сильного вазоконстриктора из трансформированных бычьих эндотелиальных клеток аорты.

Макрофаги и моноциты (как известно) производят и выпускают целый ряд cytokines, включая фактор некроза опухоли (TNF) и interleukins (1 и 6), в ответ на endotoxin-зависимое стимулирование в vivo и в vitro. Эти cytokines передают пагубные эффекты endotoxins in vivo, ведущие к endotoxemia (воспалительное отравление), что может закончиться септическим шоком или системным заболеванием. Morris et al. обнаруживал, что низкие

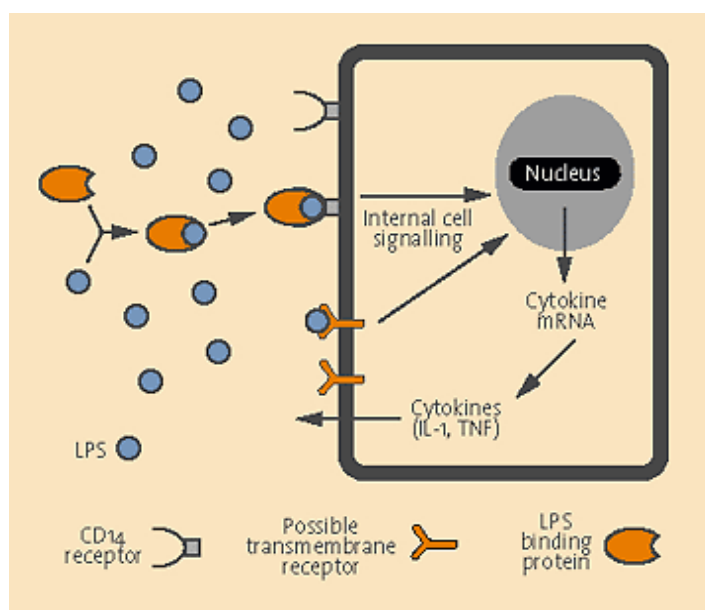
endotoxin уровни (0.5 ng/mL) могли значительно увеличить продукцию interleukin-6 в лошадиных брюшинных macrophages после только шестичасовой экспозиции. Mattern et al. показали, что 100 ng/mL endotoxin могли бы стимулировать пролиферацию человеческих Т-клеток и продукцию ими lymphokines, но это стимулирование требовало прямого физического контакта этих клеток с моноцитами, прежде встречавшимися с endotoxin. Sibley et al. сообщил, что при 10 - 200 ng/mL endotoxin происходит стимулирование роста мышинной опухолевой клеточной линии В-клеток (70Z/3), обеспечение продукции IgM, которые затем выводились на поверхность клетки. Endotoxin in vivo способен тормозить вазоконстрикцию, что приводит к расширению сосуда и циркуляторному коллапсу. Были получены результаты на клетках из кровеносных сосудах in vitro. Organ cultures дуги аорты крысы. В них увеличивалось высвобождение TNF and IL-1. Таким образом, показано, что эндотоксин действует на внешние клетки эндотелия (выход цитокинов) и на внутренний слой гладких мышц (угнетение сужения сосудов) в дуге аорты. Colburn et al. reported that endotoxin (10 ng/mL) увеличивает внутриклеточную продукцию гепаран сульфата в клетках линии аорты кролика. Tao and McKenna demonstrated that 10 ng/mL endotoxin может индуцировать дисфункцию сокращения миоцитов (сердце крысы) за счет увеличения активности NO-синтазы. Результатом of exposure to 25 ng/mL endotoxin совместно с exposure to a с нелетальным тепловым шоком был вызов апоптоза у клеток эндотелия аорты. Sugiura et al. showed that высокие уровни эндотоксина (100 ng/mL) приводят к стимуляции выделения эндотелина - сильного вазоконстриктора из трансформированных бычьих эндотелиальных клеток аорты. Т.о. понятно, что клетки кровеносного русла in vitro чрезвычайно чувствительны к эндотоксинам.

А как насчет endotoxin эффектов на некровные клетки? Wille et al. показали, что очень высокие уровни endotoxin (5,000 - 25,000 ng/mL) могли изменить эффективности клонирования человеческих эпителиальных клеток мочевого пузыря в бессывороточной среде. Эти endotoxins были из целого ряда бактерий: некоторые поднимали эффективность клонирования, некоторые уменьшили, и другие не имели наблюдаемого эффекта. Это вероятно связано с наличием очень разнообразного polysaccharide компонента endotoxins. Эндотоксины не способны влиять на развитие всех типов клеток одинаково. Некоторые культурам возможно недостает соответствующих endotoxin рецепторы, может только быть чувствительным на очень высоких уровнях endotoxin. Клеточные линии, растущие в культуре несколько лет (CHO, 3T3, WI-38, HeLa, и т.п.), возможно, естественно отобраны на резистентность к эндотоксинам.

Возможные механизмы действия эндотоксинов

Многое еще не ясно по поводу механизмов взаимодействия эндотоксинов с клетками. 60 kDa glycoprotein, LPS Binding Protein (LBP), был найден в сыворотке. Он связывает LPS through its участок lipid A и многократно увеличивает их способность взаимодействовать с клетками иммунной системы. Для такого эффекта необходимо присутствие специфического гликопротеинового рецептора (55 kDa) - CD14 на поверхности клеток. Этот укрепленный в мембране рецептор найден у многих типов иммунных клеток. (РИС. 3). Когда он связывается с комплексом LPS-LBP, запускается цепь событий, приводящих синтезу соответствующей мРНК и синтезу различных цитокинов в клетке. Как происходит передача сигнала пока не ясно.

LPS может также взаимодействовать с клетками другими средствами, т.к. некоторые клетки не несут рецептор CD14, который должен был воздействовать на LPS. LPS может войти в ячейку через неизвестный рецептор, endocytosis, или непосредственно входом в мембрану клетки. Risco et al. продемонстрировали, что LPS может связаться с микротрубочками цитоскелета и, в высоких концентрациях тормозить microtubule полимеризацию.



Одна из моделей активации клеток эндотоксином LPS связывается с LPS binding protein (LBP) с формированием комплекса, который взаимодействует с закрепленным на мембране CD14 receptor. Результат - внутриклеточный сигнал, запускающий продукцию цитокинов (TNF-фактор некроза опухоли; IL-1).