

СФЕРОИДЫ НА ОСНОВЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ЛЕГКОГО ЭМБРИОНА ЧЕЛОВЕКА (ЛЭЧ-3) И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ НАКОПЛЕНИЯ ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА ТИПА 1

© 2024 г. И. А. Ивашенко¹, *, О. С. Федотова¹, И. А. Короткова¹,
Ю. А. Михайленко¹, В. В. Василевский¹, А. В. Остапчук¹, А. Е. Панова¹

¹Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций “Виром” Роспотребнадзора,
Екатеринбург, 620030 Россия

*e-mail: ivashenko_ia@niiviom.ru

Поступила в редакцию 20.08.2024 г.

После доработки 29.08.2024 г.

Принята к публикации 10.09.2024 г.

Традиционные двумерные (2D) клеточные культуры имеют ограниченные возможности для моделирования сложных взаимодействий вирусов с клетками хозяина, что снижает эффективность исследований при попытке переноса полученных данных на модели *in vivo*. Трехмерные (3D) клеточные культуры – наиболее физиологически релевантные модели, без ограничений, присущих 2D-культурам. Использование 3D-моделей открывают новые возможности при изучении вирусных инфекций и разработке новых противовирусных препаратов и средств профилактики. Нами сконструирована биологическая модель на основе 3D-сфероидов из клеточной линии легких эмбрионов человека (ЛЭЧ-3) и проведена ее апробация на примере анализа репликативной активности вируса простого герпеса типа 1, штамм L₂ (ВПГ-1/L₂). Сфероиды получали при культивировании клеток в микролунках гидрогеля. Репликативную активность ВПГ-1 в 3D-культуре клеток ЛЭЧ-3 оценивали по цитопатическому действию культуральной жидкости зараженных вирусом сфероидов на монослойную культуру тех же клеток (2D-формат). Показано, что ВПГ-1 эффективно реплицируется в сфероиде. Таким образом, модель на основе 3D-сфероидов из клеток ЛЭЧ-3 можно рассматривать как перспективный инструмент для исследования цикла репликации ВПГ-1 *in vitro*, молекулярных механизмов его патогенеза и персистенции, а также анализа потенциальных противовирусных препаратов и вакцин.

Ключевые слова: трехмерные культуры клеток, сфероиды, вирус простого герпеса

DOI: 10.56304/S0234275824050065

По данным Всемирной организации здравоохранения, во всем мире вирусом простого герпеса человека 1 типа (ВПГ-1) инфицировано около 3.7 млрд человек в возрасте до 50 лет, что составляет 67% населения (<https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>). Персистенция ВПГ-1 в организме хозяина приводит к широкому спектру рецидивирующих заболеваний, оказывает влияние на развитие хронической соматической патологии у пациентов различного возраста [1]. Данные отечественных и зарубежных публикаций последних лет свидетельствуют о высокой актуальности исследований, направленных на разработку новых противовирусных препаратов и средств профилактики ВПГ-1 [2, 3].

Широко применяемые в диагностике ВПГ-1 методы иммуноферментного анализа (ИФА), реакции иммунофлуоресценции (РИФ), ПЦР в режиме реального времени в полной мере не заме-

няют культуральный метод исследования вирусов, основанный на работе с живой культурой клеток. Клеточные культуры представляют собой незаменимую биосистему для исследования вирусов *in vitro* и наработки вирусного материала, как для детального изучения самого патогена, так и его компонентов, а также разработки новых терапевтических и профилактических средств. В настоящее время основным клеточным субстратом для наработки и изучения вирусов *in vitro* являются двумерные (2D) клеточные культуры. При исследованиях ВПГ-1 обычно используют монослойные клеточные культуры роговицы или почки кролика, почки обезьяны, фибробласты куриного эмбриона, клетки карциномы человека [4]. При анализе противовирусной активности препаратов для лечения герпесвирусной инфекции чаще всего используют культуру клеток почки обезьяны (Vero) [5, 6]. Особый интерес в исследовании ВПГ-1 представляют отечественные клеточные

линии ЛЭЧ-3 и ЛЭЧ-4(81), выделенные из нормальной ткани легкого эмбриона человека в Свердловском научно-исследовательском институте вирусных инфекций [7]. Согласно литературным данным, использование штамма диплоидных клеток ЛЭЧ позволяет достоверно оценить цитотоксичность потенциальных лекарственных препаратов, а также исследовать их противовирусную активность в отношении ВПГ-1 [7, 8]. Клеточная культура ЛЭЧ-3 также успешно апробирована при изучении молекулярных механизмов патогенеза герпесвирусной инфекции [9], где для регистрации изменений клеточной активности авторы использовали лазерную спекл-визуализацию. Этот метод позволяет детектировать микроизменения в клеточной структуре за счет анализа интерференционных узоров лазерного излучения. Клеточные культуры ЛЭЧ уже рассматривают в качестве перспективного субстрата для производства вакцин против герпетической инфекции [10, 11].

Несмотря на широкий диапазон клеток-хозяев, позволяющий моделировать различные аспекты инфекции, вызванной ВПГ-1, 2D-культуры отличаются от животных моделей *in vivo* отсутствием тканевой структуры и ограниченным доступом клеток к таким компонентам ростовой среды, как кислород, питательные вещества и метаболиты. Эти факторы ограничивают воспроизведение взаимодействий вирусов с клеточными компонентами, искажают результаты и, как следствие, их воспроизводимость на моделях *in vivo* — для прогноза того или иного эффекта в макроорганизме [12]. Недостатки традиционного подхода культивирования приводят к неоправданному превышению числа лабораторных животных, что поднимает этические вопросы и связано с перерасходом денежных средств [13]. Все большую актуальность приобретают разработки альтернативных биосистем, способных имитировать процессы в тканях и органах. Это модели на основе трехмерных (3D) культур клеток. 3D-культуры относятся к наиболее физиологически релевантным моделям тканей и органов, что позволяет получать адекватные результаты при исследовании вирусов в этой системе *in vitro* и затем клинически значимые подтверждать на моделях *in vivo* [13, 14]. Разработкам методов 3D-культивирования клеток посвящены многочисленные научно-исследовательские работы в области онкологии, выполненные как коллективами зарубежных стран (см. обзор [15]), так и Российской Федерации [16–18]. Однако отечественных разработок, связанных с культивированием вирусов в 3D-формате, пока нет.

Среди различных 3D-клеточных моделей для изучения вирусов наибольший интерес представляют сфероиды. Это агрегаты клеток, взаимодействующих друг с другом в пространстве, что позволяет моделировать сложные биологические процессы и воспроизводить микроокружение клеток в

организме [19–21]. В работах, где для культивирования вирусов использовали сфероиды, продемонстрирована возможность получения высокой репродукции вирусного материала [22–24]. А. Rosellini и др. [25] проанализировали эффективность репликации ВПГ-1 в сфероиде на чувствительных клеточных линиях: A-549, Vero и MRC-5. Показано, что 3D-культуры более чувствительны к заражению ВПГ-1 по сравнению с традиционными клеточными культурами. Как отметили авторы, 100 копий ВПГ-1 было достаточно для инфицирования 27% клеток в 3D-культурах, в то время как в 2D-культурах, зараженных такой же дозой, вирусный антиген детектировать не удавалось вообще — для достижения результата, сопоставимого с 3D-форматом, требовалось 100-кратное увеличение дозы патогена.

Таким образом, культивирование вирусов в сфероиде открывает новые возможности в вирусологических исследованиях, разработке новых лекарственных и профилактических средств, в частности современных противовирусных препаратов, антисептиков, дезинфектантов и вакцин [26]. Новые форматы систем для культивирования ВПГ-1 представляют большой научно-практический интерес. Учитывая чувствительность клеток ЛЭЧ к ВПГ-1, а также доступность этих клеточных линий для российских ученых, мы разработали 3D-клеточную систему на основе сфероидов из клеточной линии ЛЭЧ-3 и оценили возможность ее использования для репродукции ВПГ-1.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Клетки, вирус

В работе использовали культуру ЛЭЧ-3 из коллекции ФБУН ФНИИВИ “Виром” Роспотребнадзора (Екатеринбург, Россия). Клеточная линия была выделена в 1980 году из нормальной ткани легкого 12-недельного эмбриона человека (от здоровой женщины, не имеющей в генеалогии злокачественных или наследственных заболеваний) в лаборатории клеточных культур Екатеринбургского научно-исследовательского института вирусных инфекций (в настоящее время — ФНИИВИ “Виром”) под руководством Н.П. Глинских.

Вирус простого герпеса типа 1, штамм L₂ (ВПГ-1/L₂), был получен из Государственной коллекции вирусов научно-исследовательского института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ “Национальный центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России (ФНИЦЭМ; Москва).

Приготовление гидрогеля агрозы

Методика получения сфероидов основана на размещении клеток на поверхности с низкими

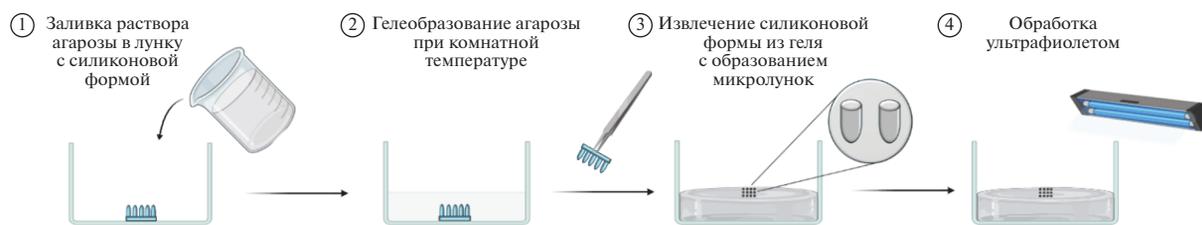


Рис. 1. Формирование агарозного геля с микролунками.

Fig. 1. Formation of agarose gel with microwells.

адгезивными свойствами. В одном из возможных вариантов данной технологии из гидрогеля, чаще всего агарозы, создают формы, в которые затем помещают суспензию клеток [27]. Под действием силы тяжести клетки оседают на дно форм и, так как не могут прикрепиться к неадгезивной поверхности, взаимодействуют друг с другом, образуя сфероиды.

Для создания массива микролунок в гидрогеле агарозы использовали напечатанную на 3D-принтере форму. Массив микролунок состоял из 6 строк и 6 столбцов. Расстояние между центрами микролунок составляло 1 мм, диаметр – 400 мкм, высота – 2 мм.

Агарозный гель с микролунками был приготовлен по следующей методике. Агарозу (HiMedia, Индия) разводили в среде Дульбекко (“ПанЭко”, Россия) до концентрации 2% и полученную взвесь нагревали на водяной бане до полного растворения агарозы. Полученный раствор вносили в лунки 6-луночного планшета (SPL Lifesciences, Корея), в которые была вложена форма, напечатанная на 3D-принтере Form 3B+ (FormLabs, США), так, чтобы раствор полностью покрывал ее. Для печати использовали фотополимерную смолу BioMed Clear Resin (FormLabs). Планшет оставляли при комнатной температуре (22°C) на 40 мин – до полного застывания агарозы. После удаления формы из геля его подвергали УФ-облучению с длиной волны 254 нм, интенсивностью 100 мВт/см² в течение 60 мин. В результате в каждой лунке 6-луночного планшета получали стерильный гидрогель с массивом микролунок. Схема создания массива микролунок в агарозном гидрогеле представлена на рис. 1.

Культивирование сфероидов ЛЭЧ

Культивирование клеток ЛЭЧ-3 проводили на среде DMEM (HiMedia) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (FBS; HiMedia) в пластиковых флаконах площадью 25 см² (Corning, США) в стандартных условиях.

После формирования монослоя для снятия клеток с культурального матраса использовали смесь

0.25%-ного раствора трипсина (“ПанЭко”) и 0.02%-ного раствора версена (“ПанЭко”). Для наращивания клеточной массы проводили 3 пассажа. Плотность клеток при посеве в 6-луночный планшет (SPL Life Sciences, Корея) с агарозной формой составляла 1×10^5 клеток/мл. Планшеты инкубировали в термостате при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Питательную среду меняли каждые двое суток. Схема культивирования сфероидов ЛЭЧ-3 представлена на рис. 2.

Инфицирование сфероидов вирусом простого герпеса

Для заражения клеток использовали штамм ВПГ-1/L₂. От среды роста сфероиды однократно отмывали DMEM, в лунки вносили по 200 мкл вирусосодержащей жидкости (ВСЖ) и добавляли 1.8 мл DMEM. В результате концентрация вируса в лунке составляла 10² TCID₅₀/мл. В контрольную лунку добавляли 2.0 мл DMEM (без вируса). Планшет инкубировали в условиях CO₂-инкубатора при 37°C в течение 5 сут. Схема эксперимента представлена на рис. 3.

Оценка цитопатического действия ВПГ-1 на сфероиды

Цитопатическое действие (ЦПД) вируса на сфероиды оценивали с помощью инвертированного микроскопа Zeiss Axio Vert.A1 (Carl Zeiss, Германия) по изменениям морфологии и плотности сфероидов. Измерения проводили ежедневно, на протяжении 5 сут эксперимента.

Анализ репродукции ВПГ-1 в сфероидах

Для анализа репликативной активности ВПГ-1 в сфероидах использовали монослой клеток ЛЭЧ-3. Клетки культивировали в 48-луночном планшете до образования плотного монослоя в каждой лунке (1.05×10^5 клеток/лунка). Для заражения использовали ВСЖ, отобранную из лунок с гидрогелем на 5 сутки культивирования сфероидов с ВПГ-1. В 48-луночный планшет с плотным монослоем клеток ЛЭЧ-3 вносили 10-кратные разведе-

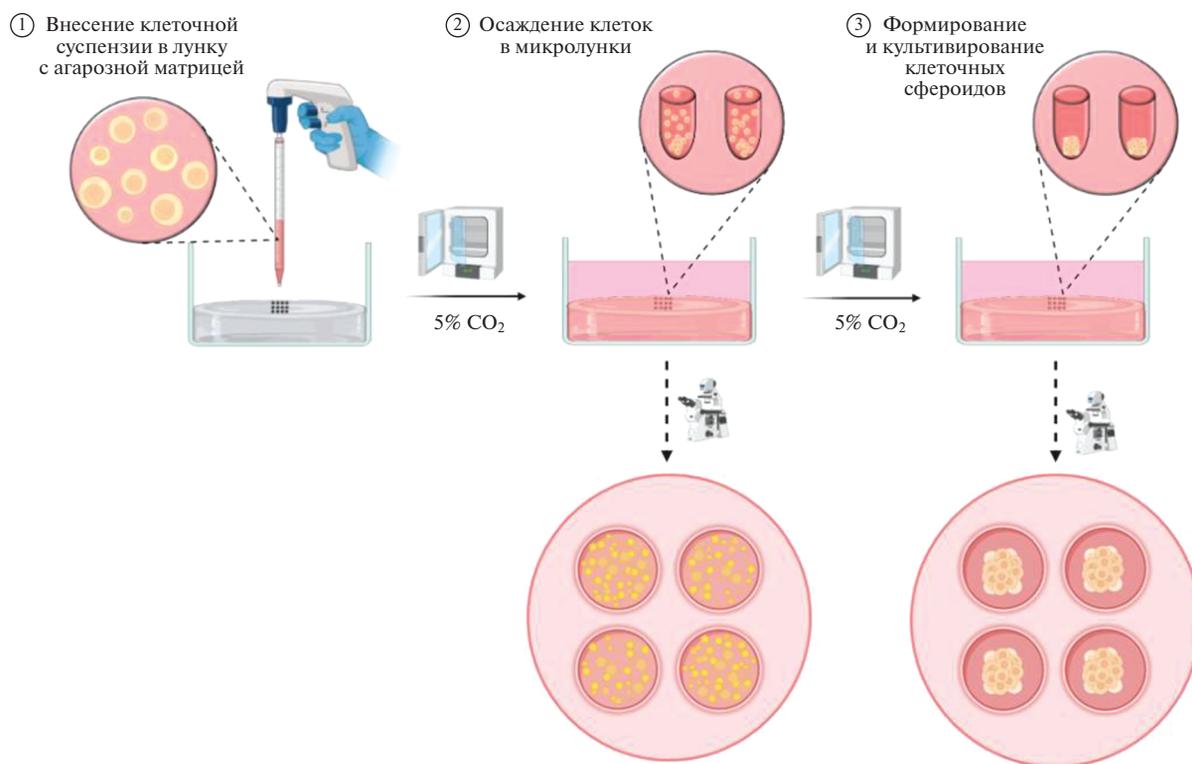


Рис. 2. Культивирование сфероидов ЛЭЧ-3 в агарозных микролунках.

Fig. 2. Cultivation of human embryonic lung cells (HELC-3) spheroids in agarose microwells.

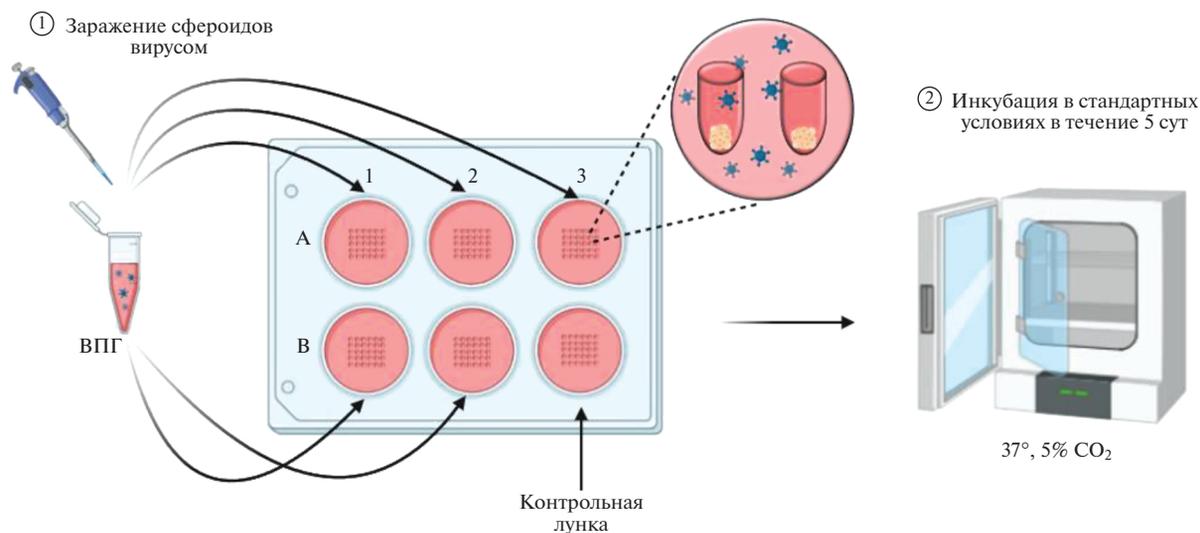


Рис. 3. Схема эксперимента по культивированию ВПГ-1 в сфероидах ЛЭЧ-3.

Fig. 3. Experimental scheme for culturing HSV-1/L₂ in HELC-3 spheroids.

дения (от 10^{-1} до 10^{-8}) ВСЖ в пяти повторах; шестой ряд планшета использовали для клеточной культуры без вируса (отрицательный контроль). Планшет инкубировали при 37°C и $5\% \text{CO}_2$ в течение 5 сут с ежедневной визуальной оценкой морфо-

логии клеток. Первые признаки характерного для ВПГ-1 ЦПД появились на 3 сутки, а на 5 сутки инфекционный титр ВПГ-1 составил $10^4 \text{TCID}_{50}/0.2 \text{мл}$ по методу Рида–Менча. Схема эксперимента представлена на рис. 4.

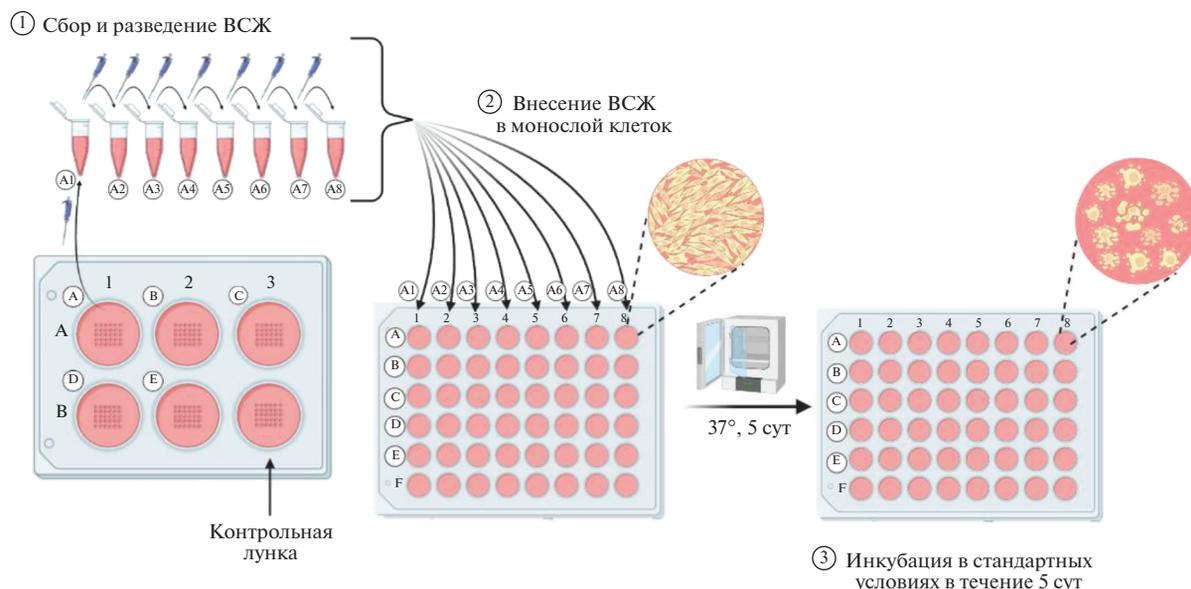


Рис. 4. Схема эксперимента по анализу репродукции ВПГ-1 в сфероиде ЛЭЧ-3. А, В, С, D, Е – лунки с гидрогелем и сфероидом, зараженным ВПГ-1, через 5 сут совместного культивирования; А1–А8 – 10-кратные разведения собранной ВСЖ (от 10^{-1} до 10^{-8}).

Fig. 4. Scheme of the experiment for the analysis of HSV-1 replication in HELC-3 spheroids. A, B, C, D, E – wells with hydrogel and spheroids infected with HSV-1 after 5 days of co-cultivation; A1–A8 – tenfold dilutions (from 10^{-1} to 10^{-8}) of the collected virus-containing fluid.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Формирование и анализ сфероидов

В результате культивирования ЛЭЧ-3 в течение 48 ч в микролунках агарозного геля образовывались трехмерные клеточные агрегаты. При визуальной оценке структуры установлено, что сфероиды состояли из фибробластов и имели стабильную компактную структуру. Это важнейший фактор для их использования в вирусологических исследованиях. Для углубленного изучения морфологии сфероидов необходимо использовать флуоресцентную микроскопию, однако высокая плотность и оптическая непрозрачность этих 3D-структур существенно затрудняют их визуализацию. Непрозрачность сфероидов для световых лучей – причина низкого качества изображений. Для решения этой задачи применяют методы оптического “просветления”, такие как SeeDB, Scale, CUBIC, Focus-Clear и другие, которые уменьшают светорассеяние и выравнивают оптические свойства внутри образца [28]. Однако эти методы требуют сложных подготовительных процедур, что приводит к дополнительным временным и финансовым затратам на этапе пробоподготовки. Кроме того, для получения изображений высокого разрешения необходимо использование конфокальной микроскопии [29] – с дорогостоящим оборудованием, доступным далеко не каждой лаборатории. Безусловно, это ограничивает широкое применение вышеописанных технологий.

Цитопатическое действие ВПГ-1 на сфероиды

Зараженные ВПГ-1 сфероиды культивировали в течение 5 сут и при этом ежедневно анализировали морфологию клеток. Только на четвертые сутки в опытных образцах сфероиды утратили плотную структуру (рис. 5а), хотя контрольные образцы оставались без изменений (рис. 5б). Из этого следует, что на начальных этапах инфицирования сфероиды сохраняют морфологию, по-видимому, из-за низкой концентрации вируса и только по достижении определенного его уровня в клетках наблюдается их гибель. В общем случае тенденция та же, что и в зараженных клеточных культурах 2D-формата.

Анализ репродукции ВПГ-1 в сфероиде по ЦПД в монослой клеток ЛЭЧ-3

Для оценки репродукции ВПГ-1 в 3D-моделях клеток мы использовали традиционный 2D-формат клеточной культуры – для упрощенной и адекватной интерпретации результатов. Так, на третьи сутки культивирования монослоя клеток ЛЭЧ-3 с ВСЖ, собранной со сфероидов, детектировали явное изменение морфологии клеток, вызванное ЦПД ВПГ-1, в то время как контрольные образцы оставались без изменений. Как показано на рис. 6а, на четвертые сутки во всех лунках с ВСЖ регистрировали лизис 100% клеток (рис. 6а) – в отличие от контрольных лунок, где лизиса не было (рис. 6б). На основании полученных резуль-

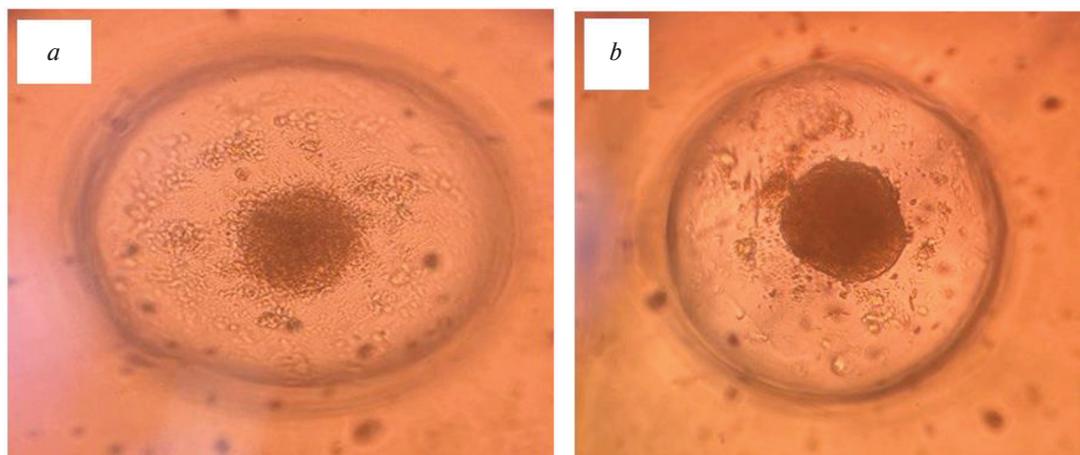


Рис. 5. Морфологический анализ сфероидов ЛЭЧ-3. (a) – Сфероиды заражали ВПГ-1 и культивировали в течение 4 сут; (b) – сфероиды, которые культивировали в тех же условиях без вируса (контроль). Изображения получены на инвертированном микроскопе Zeiss Axio Vert.A1 (Carl Zeiss, Германия) с объективом Primo Plan-ACHROMAT 10×/0.25 Ph1 и окуляром WF 10×/20.

Fig. 5. Morphological analysis of HELC-3 spheroids. (a) – Spheroids were infected with HSV-1 and cultured for 4 days; (b) – spheroids that were cultured under the same conditions without the virus (control). Images were obtained on an inverted microscope Zeiss Axio Vert.A1 (Carl Zeiss, Germany) with a Primo Plan-ACHROMAT 10×/0.25 Ph1 objective and a WF 10×/20 eyepiece.

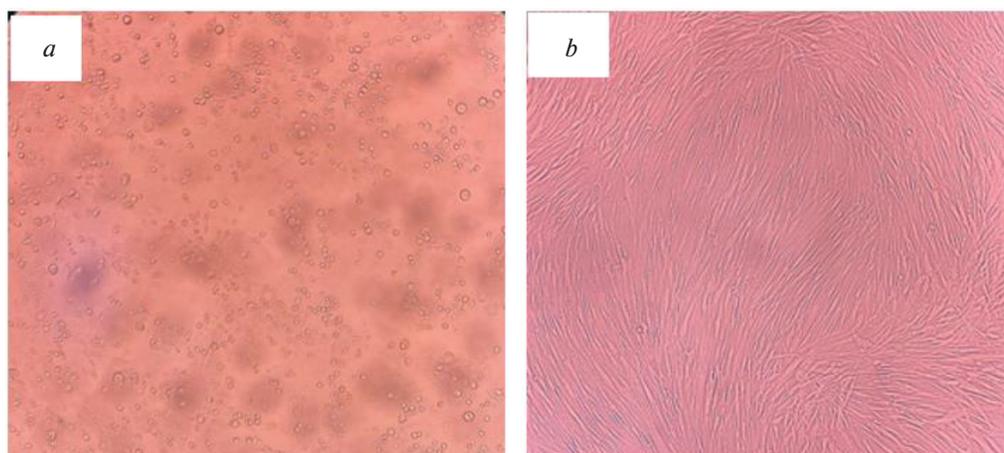


Рис. 6. Культура клеток ЛЭЧ-3 через 3 сут после заражения ВПГ-1 (a) и из контрольной группы (b). Изображения получены на инвертированном микроскопе Zeiss Axio Vert.A1 (Carl Zeiss) с объективом Primo Plan-ACHROMAT 10×/0.25 Ph1 и окуляром WF 10×/20.

Fig. 6. The HELC-3 cell culture 3 days after infection with HSV-1 (a), and from the control group (b). Images were obtained on an inverted microscope Zeiss Axio Vert.A1 (Carl Zeiss, Germany) with a Primo Plan-ACHROMAT 10×/0.25 Ph1 objective and a WF 10×/20 eyepiece.

татов можно сделать вывод об эффективной репликации ВПГ-1 в 3D-модели клеток ЛЭЧ-3.

Таким образом, нами продемонстрирована возможность формирования сфероидов из клеток ЛЭЧ-3. Эта 3D-культура, стабильная и компактная, может быть использована для изучения вирусных инфекций, в частности ВПГ-1. Выявлены и ограничения, преодолеть которые предстоит в дальнейшем при оптимизации методики. Эти трудности возникают на этапе визуализации и

анализа морфологии сфероидов и связаны с недоступностью дорогостоящего оборудования.

Здесь мы предложили простое решение вышеуказанной проблемы при анализе репликативной активности вируса в сфероидах по цитопатическому действию. Это “перенос” условий эксперимента в легко интерпретируемую 2D-модель тех же клеток. В результате использования этого приема была подтверждена репликативная активность вируса в сфероидах ЛЭЧ-3.

В дальнейшем наши исследования будут направлены на оптимизацию условий культивирования сфероидов ЛЭЧ-3, их анализа, а также происходящих изменений при заражении вирусами. Это расширит возможности использования клеточной линии ЛЭЧ-3 в вирусологических исследованиях и других областях биомедицины, где требуется надежная и воспроизводимая модель *in vitro*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено в рамках государственного задания (рег. № 124031800092-8).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Xu X., Zhang Y., Li Q. Characteristics of herpes simplex virus infection and pathogenesis suggest a strategy for vaccine development. *Rev. Med. Virol.*, 2019, 29(4), e2054. <https://doi.org/10.1002/rmv.2054>
- Majewska A., Mlynarczyk-Bonikowska B. 40 years after the registration of acyclovir: do we need new anti-herpetic drugs? *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, 23(7), 3431. <https://doi.org/10.3390/ijms23073431>
- Нестерова И.В., Халтурина Е.О. Эффективность дифференцированной таргетной интерфероной иммуномодулирующей терапии, ориентированной на патологические иммунофенотипы, у пациентов с атипичными хроническими активными герпесвирусными инфекциями. *Медицинский вестник Юга России*, 2024, 15(1), 165–175. <https://doi.org/10.21886/2219-8075-2024-15-1-165-175>
- Athmanathan S., Reddy S.B., Nutheti R., Rao G.N. Comparison of an immortalized human corneal epithelial cell line with Vero cells in the isolation of herpes simplex virus-1 for the laboratory diagnosis of herpes simplex keratitis. *BMC Ophthalmol.*, 2002, 2, 3. <https://doi.org/10.1186/1471-2415-2-3>
- van de Sand L., Bormann M., Schmitz Y., Heilingloh C.S., Witzke O., Krawczyk A. Antiviral active compounds derived from natural sources against herpes simplex viruses. *Viruses*, 2021, 13(7), 1386. <https://doi.org/10.3390/v13071386>
- Cohen E.M., Avital N., Shamay M., Kobiler O. Abortive herpes simplex virus infection of nonneuronal cells results in quiescent viral genomes that can reactivate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2020, 117(1), 635–640. <https://doi.org/10.1073/pnas.1910537117>
- Глинских Н.П., Колесникова Г.Г., Устьянцев В.П., Закирова С.Ф., Власова Л.В., Станиславская В.К. Штамм диплоидных клеток легкого эмбриона человека лэч-4 (81), используемый для диагностики вирусных инфекций. *Патент SU1147748A*, бюлл. № 12, опубл. 30.03.1985.
- Нагиева Ф.Г., Баркова Е.П., Лисаков А.Н., Сидоров А.В., Зверев В.В., Осокина О.В., Строева А.Д. Практические аспекты выявления, культивирования и характеристики клинических изолятов вируса varicella-zoster. *Инфекция и иммунитет*, 2020, 10(2), 387–396. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-РАО-1211>
- Владимиров А.П., Малыгин А.С., Михайлова Ю.А., Бахарев А.А., Порываева А.П. Устройство оценки в режиме реального времени метаболической активности клеточных культур с вирусом герпеса. *Медицинская техника*, 2014, 48(4), 8–10.
- Зверев В.В., Нагиева Ф.Г., Баркова Е.П., Осокина О.В. Способ получения живой культуральной аттенуированной вакцины для профилактики ветряной оспы. *Патент RU2637093C1*, бюлл. № 34, опубл. 29.11.2017.
- Зверев В.В., Нагиева Ф.Г., Баркова Е.П., Осокина О.В. Способ получения четырехкомпонентной культуральной живой вакцины против кори, ветряной оспы, эпидемического паротита, краснухи. *Патент RU 2717769C1*, бюлл. № 9, опубл. 25.03.2020.
- De Dios-Figueroa G.T., Aguilera-Marquez J.D.R., Camacho-Villegas T.A., Lugo-Fabres P.H. 3D cell culture models in COVID-19 times: a review of 3D technologies to understand and accelerate therapeutic drug discovery. *Biomedicines*, 2021, 9(6), 602. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9060602>
- Kiani A.K., Pheby D., Henahan G., Brown R., Sieving P., Sykora P., Marks R., Falsini B., Capodicasa N., Miertus S., Lorusso L., Dondossola D., Tartaglia G.M., Ergoren M.C., Dundar M., Michelini S., Malacarne D., Bonetti G., Dautaj A., Donato K., Medori M.C., Beccari T., Samaja M., Connolly S.T., Martin D., Morresi A., Vacu A., Herbst K.L., Kapustin M., Stuppia L., Lumer L., Farronato G., Bertelli M. Ethical considerations regarding animal experimentation. *J. Prev. Med. Hyg.*, 2022, 63(2), 255–266. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/JPMH2022.63.2S3.2768>
- Zanoni M., Cortesi M., Zamagni A., Arienti C., Pignatta S., Tesei A. Modeling neoplastic disease with spheroids and organoids. *J. Hematol. Oncol.*, 2020, 13(1), 97. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00931-0>
- Jubelin C., Muñoz-García J., Griscom L., Cochonneau D., Ollivier E., Heymann M.-F., Vallette F.M., Oliver L., Heymann D. Three-dimensional *in vitro* culture models in oncology research. *Cell Biosci.*, 2022, 12, 155. <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00887-3>
- Южакова Д.В., Лукина М.М., Сачкова Д.А., Юсубалиева Г.М., Баклаушев В.П., Можеров А.М., Дуденкова В.В., Гаврина А.И., Яшин К.С., Ширманова М.В. 3D-модель опухолевого сфероида из краткосрочных культур клеток глиобластомы пациента и ее исследование методом метаболического флуоресцентного времяразрешенного имиджинга. *Современные технологии в медицине*, 2023, 15(2), 28–38. <https://doi.org/10.17691/stm2023.15.2.03>
- Nushtaeva A.A., Savinkova M.M., Ermakov M.S., Varlatov M.E., Novak D.D., Richter V.A., Koval O.A. Breast cancer cells in 3D model alters their sensitivity to hormonal and growth factors. *Cell Tiss. Biol.*, 2022, 16(6), 555–567. <https://doi.org/10.1134/S1990519X22060050>
- Shnaider T.A., Pristyzhnyuk I.E. CLARITY and Light-Sheet microscopy sample preparation in application to human cerebral organoids. *Вавиловский жур-*

- нал генетики и селекции, 2022, 25(8), 889–895.
<https://doi.org/10.18699/VJ21.103>
19. Kim W., Gwon Y., Park S., Kim H., Kim J. Therapeutic strategies of three-dimensional stem cell spheroids and organoids for tissue repair and regeneration. *Bioact. Mater.*, 2023, 19, 50–74.
<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.03.039>
 20. Wang A., Madden L.A., Paunov V.N. Advanced biomedical applications based on emerging 3D cell culturing platforms. *J. Mater. Chem. B.*, 2020, 8(46), 10487–10501.
<https://doi.org/10.1039/D0TB01658F>
 21. Rodrigues D.B., Reis R.L., Pirraco R.P. Modelling the complex nature of the tumor microenvironment: 3D tumor spheroids as an evolving tool. *J. Biomed. Sci.*, 2024, 31(1), 13.
<https://doi.org/10.1186/s12929-024-00997-9>
 22. De Melo B.A.G., Benincasa J.C., Cruz E.M., Maricato J.T., Porcionatto M.A. 3D culture models to study SARS-CoV-2 infectivity and antiviral candidates: from spheroids to bioprinting. *Biomed. J.*, 2021, 44(1), 31–42.
<https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.11.009>
 23. Baron M.G., Purcell W.M., Jackson S.K., Owen S.F., Jha A.N. Towards a more representative *in vitro* method for fish ecotoxicology: morphological and biochemical characterisation of three-dimensional spheroidal hepatocytes. *Ecotoxicology*, 2012, 21(8), 2419–2429.
<https://doi.org/10.1007/s10646-012-0965-5>
 24. Fu G.B., Huang W.J., Zeng M., Zhou X., Wu H.P., Liu C.C., Wu H., Weng J., Zhang H.D., Cai Y.C., Ashton C., Ding M., Tang D., Zhang B.H., Gao Y., Yu W.F., Zhai B., He Z.Y., Wang H.Y., Yan H.X. Expansion and differentiation of human hepatocyte-derived liver progenitor-like cells and their use for the study of hepatotropic pathogens. *Cell Res.*, 2019, 29(1), 8–22.
<https://doi.org/10.1038/s41422-018-0103-x>
 25. Rosellini A., Freer G., Quaranta P., Dovere V., Menichini M., Maggi F., Mazzetti P., Pistello M. Enhanced *in vitro* virus expression using 3-dimensional cell culture spheroids for infection. *J. Virol. Methods*, 2019, 265, 99–104.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.12.017>
 26. Harb A., Fakhreddine M., Zaraket H., Saleh F.A. Three-dimensional cell culture models to study respiratory virus infections including COVID-19. *Biomimetics*, 2021, 7(1), 3.
<https://doi.org/10.3390/biomimetics7010003>
 27. Dissanayaka W.L., Zhu L., Hargreaves K.M., Jin L., Zhang C. *In vitro* analysis of scaffold-free prevascularized microtissue spheroids containing human dental pulp cells and endothelial cells. *J. Endod.*, 2015, 41(5), 663–670.
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.12.017>
 28. Costa E.C., Silva D.N., Moreira A.F., Correia I.J. Optical clearing methods: an overview of the techniques used for the imaging of 3D spheroids. *Biotechnol. Bioeng.*, 2019, 116(10), 2742–2763.
<https://doi.org/10.1002/bit.27105>
 29. Genenger B., McAlary L., Perry J.R., Ashford B., Ranson M. Protocol for the generation and automated confocal imaging of whole multi-cellular tumor spheroids. *STAR Protoc.*, 2023, 4(2), 102331.
<https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102331>

Spheroids Based on the Human Embryonic Lung Cells (HELC-3) and Their Use for HSV-1 Accumulation

I. A. Ivashchenko^{a, #}, O. S. Fedotova^a, I. A. Korotkova^a, Y. A. Mikhailenko^a,
 V. V. Wasielewski^a, A. V. Ostapchuk^a, and A. E. Panova^a

^aFederal Research Institute of Viral Infections “Virom” of Rosпотребнадзор, Yekaterinburg, 620030 Russia

[#]e-mail: ivashenko_ia@niivirom.ru

Abstract—Traditional two-dimensional (2D) cell cultures have limited capabilities for modeling complex interactions between viruses and host cells, which reduces the effectiveness of studies when attempting to translate the obtained data to *in vivo* models. Three-dimensional (3D) cell cultures are the most physiologically relevant models, without the limitations inherent in 2D cultures. The use of 3D models opens new opportunities in the study of viral infections and the development of new antiviral drugs and prophylactics. Here, we have constructed a biological model based on 3D spheroids from the human embryonic lung cell line (HELC-3) and tested it by analyzing the replicative activity of herpes simplex virus type 1, strain L₂ (HSV-1/L₂). Spheroids were obtained by culturing the cells in hydrogel microwells. The replicative activity of HSV-1 in 3D culture of HELC-3 cells was evaluated by the cytopathic effect of the culture fluid of virus-infected spheroids on a monolayer culture of the same cells (2D format). As a result, efficient replication of HSV-1 in spheroids was demonstrated. Thus, the model based on 3D spheroids from HELC-3 cells can be considered as a promising tool for studying the replication cycle of HSV-1 *in vitro*, molecular mechanisms of its pathogenesis and persistence, as well as for analyzing potential antiviral drugs and vaccines.

Keywords: 3D cell culture, spheroids, herpes simplex virus