DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-186

ТРЕХМЕРНЫЕ МОДЕЛИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА

THREE-DIMENSIONAL CELL CULTURE MODELS FOR STUDYING HUMAN VIRUSES

И. А. Иващенко, О. С. Федотова, И. А. Короткова, А. Е. Панова, В. В. Василевский, А. В. Остапчук

Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Вирром» Роспотребнадзора, Екатеринбург

I. A. Ivashchenko, O. S. Fedotova, I. A. Korotkova, A. E. Panova, V. V. Vasilevsky, A. V. Ostapchuk

Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virom", Yekaterinburg

✉ ivashenko_ia@niivirom.ru

Аннотация

Традиционные двумерные клеточные культуры недостаточно эффективны для моделирования сложных взаимодействий вирусов с клетками хозяина, что может снижать точность предсказаний патогенеза и оценки эффективности противовирусных препаратов. Использование 3D-модели клеток для культивирования вирусов предлагает новые перспективы для более точного и эффективного исследования вирусных инфекций.

Abstract

Traditional two-dimensional cell cultures are not sufficiently effective for modeling complex interactions between viruses and host cells, which can reduce the accuracy of predictions regarding pathogenesis and the evaluation of antiviral drug efficacy. The use of 3D cell models for virus cultivation offers new prospects for more precise and effective study of viral infections.

По оценкам Всемирной организации здравоохранения, к 2016 г. около 3,7 млрд человек в возрасте до 50 лет, что составляет 67 % населения, были инфицированы вирусом простого герпеса человека Herpes simplex virus-1 (HSV-1), относящимся к респираторной группе вирусных инфекций. В связи с этим актуальны разработка улучшенных методов терапии и профилактики герпесвирусной инфекции, а также создание эффективной вакцины. Несмотря на широкий диапазон клеток-хозяев, позволяющий моделировать различные аспекты инфекции, традиционные 2D-клеточные культуры имеют ограниченные возможности в точном воспроизведении взаимодействий вирусов с тканями и органами хозяина, что снижает корректность результатов исследований и их применимость к клиническим ситуациям [1]. При этом чрезмерное применение экспериментальных животных моделей значительно повышает стоимость исследований, обостряет вопросы этичности и правомерности их проведения [2]. Современные методы культивирования клеток предлагают разнообразные подходы к имитации физиологических процессов и изучению патологий *in vitro*. Среди них особое внимание привлекают трехмерные (3D) клеточные культуры, такие как сфероиды, которые способны более точно воспроизводить микроокружение клеток в организме по сравнению с двухмерными (2D) культурами [3]. Это способствует получению более достоверных результатов исследований *in vitro* и их эффективному переносу на модели *in vivo*, что особенно актуально в контексте проведения дорогостоящих и трудоемких фаз клинических испытаний при производстве лекарственных средств [2, 4].

Таким образом, цель настоящего исследования — апробация способа культивирования вируса простого герпеса в трехмерных сфероидах, сформированных из клеток легких эмбрионов человека (ЛЭЧ-3), с использованием агарозного гидрогеля.

Для формирования микролунок в гидрогеле агарозы применили силиконовую матрицу. В эксперименте использовали диплоидную клеточную культуру ЛЭЧ-3 на 10 пассаже. Для формирования сфероидов наносили суспензию клеток на массив микролунок, в концентрации 3000 клеток на микролунку. Культивирование сфероидов проводили в 6-луночном планшете (SPL Life Sciences, Корея) в условиях термостата при 37 °С во влажной атмосфере с 5%-м содержанием CO_2. Смену питательной среды проводили раз в двое суток.

В результате роста ЛЭЧ-3 в течение 48 ч в микролунках агарозного геля образовались трехмерные клеточные агрегаты. При визуальной оценке структуры установлено, что сфероиды состоят из фибробластов и имеют стабильную компактную структуру. Дальнейший эксперимент заключался в анализе культивирования вируса ВПГ-1/L2 в сфероидах ЛЭЧ-3. Исходная инфекционная активность штамма вируса составляла 10^5TCID50/мл.

© И. А. Иващенко, О. С. Федотова, И. А. Короткова, А. Е. Панова, В. В. Василевский, А. В. Остапчук, 2024

Опытные сфероиды однократно отмывали средой DMEM от среды роста, далее вносили по 200 мкл образцов вируссодержащей жидкости в концентрации 10^3TCID50/мл и добавляли поддерживающую среду DMEM в количестве 1,8 мл. В контрольные лунки со сфероидами после отмывки от среды роста добавляли 2,0 мл поддерживающей среды без вируса. Инкубацию проводили в стандартных условиях в течение 5 суток. Для оценки цитопатического эффекта (ЦПЭ) инфицированные сфероиды наблюдались ежедневно с 1-го по 5-й день инкубации с использованием инвертированного микроскопа (Zeiss Axio Vert.A1, Carl Zeiss, Германия). Степень ЦПЭ оценивали по морфологическим изменениям клеток ЛЭЧ и степени разрушения сфероидов. В опытных образцах на 4-й день культивирования выявлено цитопатическое действие вируса, сфероиды утратили плотность структуры, в то время как в контрольных образцах оставались без изменений.

Для установления активности репродукции вируса в сфероидах использовали методику титрования вируса. В 48-луночный планшет с плотным монослоем клеточной культуры ЛЭЧ-3 внесли десятикратные (с 10^{-1} до 10^{-8}) разведения ВСЖ, взятой из сфероидов на 5-е сутки эксперимента. Планшет инкубировали в стандартных условиях в течение 5 суток с ежедневной визуальной оценкой наличия характерного для ВПГ-1 ЦПЭ. Первые признаки цитопатогенного действия были отмечены на третьи сутки, на 5-й день инфекционный титр ВПГ-1 составил 4 lgTCID50/ml по методу Рида — Менча. Эксперимент свидетельствует о жизнеспособности вируса в сфероидах ЛЭЧ.

Таким образом, результаты экспериментов показали, что сфероиды ЛЭЧ-3 могут поддерживать репликацию вируса простого герпеса, что делает их перспективной моделью для изучения вирусного патогенеза и тестирования новых терапевтических и профилактических средств против данного агента.

Литература

1. 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. Vol. 9, No. 6. P. 602.

2. Kiani A.K., Pheby D., Henehan G. et al. Ethical considerations regarding animal experimentation // J. Preventive Med. and Hygiene. 2022. Vol. 63, No. 2S3. P. E255.

3. Kim W., Gwon Y., Park S. et al. Therapeutic strategies of three-dimensional stem cell spheroids and organoids for tissue repair and regeneration // Bioactive Materials. 2023. Vol. 19. P. 50–74.

4. Zanoni M., Cortesi M., Zamagni A. et al. Modeling neoplastic disease with spheroids and organoids // J. Hematology Oncology. 2020. Vol. 13, No. 1. P. 97.