

РНК HGV положительно, исследованием на аппарате «Фиброскан» методом непрямой эластометрии определена эластичность печени, которая соответствует 65,2 КПа, соответствует стадии фиброза F4 по METAVIR. Исследование на маркеры гепатитов В, С, D, вирус Эпштейна – Барр, цитомегаловирус, исследование печеночного аутоиммунного профиля показали отрицательные результаты. Был установлен диагноз: «Цирроз печени сочетанной этиологии: хронический вирусный гепатит G (РНК GBV положительно) и НАЖП, синдром портальной гипертензии. Аутоиммунная тромбоцитопения. Эрозивный гастрит. Хронический панкреатит. Ожирение 1–2-й степени. Нарушение углеводного обмена». Пациентке рекомендовано снижение массы тела до целевых показателей, пиоглитазон, урсодезоксихолевая кислота, витамины, глицирризиновая кислота, мочегонные, лактулоза, пентоксифиллин. Противовирусная терапия не проводилась в связи с выраженной тромбоцитопенией. Несмотря на проводимую терапию, снижения веса добиться не удалось. В течение четырех лет динамического наблюдения РНК вирусного гепатита G обнаружена (при повторном ежегодном исследовании).

Выводы. Сочетание хронического гепатита G и неалкогольной жировой болезни печени может являться причиной быстрого прогрессирования фиброза печени. Наличие выраженной тромбоцитопении свидетельствует о том, что вирус гепатита G может выступать триггером аутоиммунных процессов. При обследовании пациентов с гепатитами неясной этиологии важно проводить обследование на гепатит G.

47 | Моделирование инфекции вируса гепатита В в культуре клеток как инструмент испытаний новых противовирусных препаратов

Ряховский А.А.

НИИ «ХимРар», г. Химки

Актуальность. Вирусный гепатит В (ВГВ) остается одной из ведущих проблем медицины. Инфекционность ВГВ в 100 раз больше, чем ВИЧ. И несмотря на вакцинацию, 240–360 млн человек в мире заражены ХГВ. А смертность населения, вызванная ХГВ и сопутствующими заболеваниями (включая ГЦК и цирроз печени), оценивается в 800–900 тыс. человек в год. Важнейшей проблемой ХГВ является отсутствие терапевтических подходов для его полного излечения. Поэтому актуальна разработка новых агентов, действующих на различных этапах жизненного цикла ВГВ: от блокирования интернализации вирусных частиц в гепатоциты при распространении инфекции от клетки к клетке до нарушения функции белков вируса, участвующих в репликации и сборке вирусных частиц.



Цель исследования: разработать экспериментальную *in vitro* модель инфекции ВГВ, которую возможно использовать для скрининга на противовирусную активность библиотеки химических соединений.

Модель и методы. Для выполнения этой задачи необходимо использование простой, но релевантной модели инфекции ВГВ, в частности использование перевиваемой клеточной культуры, имитирующей функции печени, восприимчивой к ВГВ и способной после заражения поддерживать полный цикл репликации ВГВ. В качестве подходящей культуры выбрали линию гепатомы человека HepG2, для способности к инфицированию ВГВ стабильно трансфицированную геном НТСП. В качестве источника вирусных частиц выбрали линию гепатомы человека HepAD38, несущую стабильно интегрированный геном вируса ВГВ и секретирующую вирусные частицы в культуральную среду. В качестве маркера развития инфекции ВГВ выбрали иммуноферментный анализ концентрации НВеАг в культуральной среде, так как НВеАг не вносится с препаратом ВГВ и секретируется только при успешном развитии инфекции в культуре клеток. В ходе разработки модели инфекции ВГВ вначале подтвердили наличие репликации ВГВ в клетках HepG2/НТСП, зараженных препаратом ВГВ, выделенным из супернатанта HepAD38, и возможность детектировать НВеАг. Далее подобрали оптимальные условия инфицирования для проведения скрининга, а именно:

- показали прямую дозовую зависимость концентрации НВеАг в супернатанте от количества внесенного препарата ВГВ и от времени развития инфекции и выбрали минимально приемлемое количество препарата ВГВ и время;
- выбрали оптимальное количество вносимых в лунки клеток;
- показали возможность заражения клеток HepG2/НТСП препаратом ВГВ сразу после переноса в планшеты клеточной суспензии без ожидания прикрепления клеток, что позволяет сократить время скрининга без потери в эффективности развития инфекции;
- показали, что увеличение концентрации ДМСО до 2% при инфицировании не только не снижает выживаемость клеток, но и значительно увеличивает эффективность инфекции, поэтому эту концентрацию выбрали для добавления исходно растворяемых в ДМСО веществ. После подбора условий провели валидацию метода с множеством повторов контролей наличия и отсутствия развития инфекции ВГВ с имитацией добавления химических соединений. Величина z-фактора $(1-3 \times (\text{сумма } \sigma \text{ контролей})) / (\text{разница контролей})$ составила 0,71 при требованиях к используемым в скрининге методам $> 0,4$.

Результаты. Таким образом, протестированы и выбраны оптимальные параметры и проведена валидация, показавшая пригодность разработанной экспериментальной *in vitro* модели инфекции ВГВ для скринирования библиотеки потенциальных ингибиторов развития инфекции ВГВ.