

Получение иммортализованных клеточных линий гепатоцитов обыкновенных игрунок для моделирования инфекции вирусом гепатита В**Научный руководитель – Гордейчук Илья Владимирович****Коляко Юлия Викторовна***Аспирант*

Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия

E-mail: Yulya.Kolyako@mail.ru

В настоящее время количество доступных систем для *in vitro* и *in vivo* моделирования инфекции, вызываемой вирусом гепатита В (ВГВ), недостаточно. Обыкновенные игрунки (*Callithrix jacchus*, ОИ) часто используются как лабораторные животные и представляют собой перспективный вид для исследований гепатотропных вирусов.

Целью данной работы являлось получение моноклональной иммортализованной культуры гепатоцитов ОИ для разработки модели ВГВ-инфекции на ОИ.

Первичную культуру гепатоцитов получили путем перфузии печени мертворожденно-го детеныша ОИ и культивировали с использованием среды ДМЕМ/F12 с добавлением 10% FBS (HyClone), 15 мМ HEPES-Na pH 7,55 (ПанЭко), 1 мМ пирувата натрия (ПанЭко), 0,1 μ М гидрокортизона, и добавки ITS+ (Corning) на пластике, покрытом коллагеном I (Abscam) в течение двух месяцев, после чего культивировали на среде ДМЕМ/F12 без добавок. Полученную гетерогенную культуру трансдуцировали лентивирусом, кодирующим человеческий рецептор ВГВ (*hNTCP*), после чего полученную культуру заражали ВГВ. Репликацию ВГВ определяли по наличию HBsAg и ДНК ВГВ в культуральной среде, а также иммуноцитохимическим окрашиванием на HBsAg. Исходную гетерогенную культуру клеток трансдуцировали лентивирусными частицами, кодирующими TERT человека (*hTERT*) или крысы (*rTERT*). Синтез мРНК *hTERT* и *rTERT* определяли методом ПЦР-РВ. Теломеразную активность оценивали методом RTA относительно контрольных клеток MCF7. Для оценки колониального потенциала гепатоциты сажали в количестве 500/1000/2000 клеток на чашку (60 мм). Гетерогенную культуру, экспрессирующую *hTERT*, трансдуцировали лентивирусом, кодирующим ген люциферазы светлячка (*LUC2*). Моноклональные производные клеток, экспрессирующих *hTERT* и *hTERT+LUC2*, были получены методом серийных разведений. Уровень биолюминесценции гетерогенной культуры и субклонов, кодирующих *hTERT+LUC2*, был измерен с помощью прибора Fluoroskan FL (Thermo Fisher Scientific). Динамику роста субклонов, экспрессирующих *hTERT* и *hTERT+LUC2*, определяли с использованием резазуринового теста.

Было показано, что культура гепатоцитов ОИ, экспрессирующих *hNTCP*, является восприимчивой и перmissive для ВГВ. Для получения иммортализованной культуры гепатоцитов ОИ их трансдуцировали лентивирусными частицами, кодирующими TERT различной природы. В полученных культурах клеток была подтверждена вставка и экспрессия генов *hTERT* и *rTERT*, а также теломеразная активность в данных культурах была статистически выше, чем в исходной. Колониальный анализ показал, что только экспрессия *hTERT* приводит к способности клеток расти в условиях разреженной популяции. Вставка *hTERT* была подтверждена во всех 12 субклонов, вставка *LUC2* была подтверждена в 4/7 субклонов, при этом только в трех из них детектировали ферментативную активность люциферазы. 4/12 полученных субклонов обладают повышенной динамикой роста в сравнении с остальными.

Было показано, что культура гепатоцитов ОИ, экспрессирующих hNTCP, восприимчива и перmissive к заражению ВГВ. Для разработки модели инфекции ВГВ были получены моноклональные культуры гепатоцитов ОИ, 3 из которых будут использованы в дальнейшей работе.