doi: https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.10.103
УДК 54.0+615.281.8:576.22

М.Я. Співак[1], С.Л. Рибалко[2], Д.Б. Старосила[4], М.П. Завелевич[2], І.П. Олексієнко[2], С.Т. Дядюн[2], А.В. Руденко[3], В.П. Атаманюк[4]

[1] Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ
[2] ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України", Київ
[3] ДУ "Інститут урології НАМН України", Київ
[4] ТОВ "НВК "Екофарм", Київ
E-mail: n.spivak@ukr.net, y_dasha@ukr.net

Оцінка впливу флавоноїдвмісного препарату Протефлазід на моделі папіломавірусної інфекції *in vitro*

Представлено членом-кореспондентом НАН України М.Я. Співаком

За допомогою трансфекції клітин МТ-4 та ВНК ДНК із зразків епітелію шийки матки хворих із папіломавірусною інфекцією створено модель, що є пермісивною для репродукції вірусів папіломи людини (ВПЛ). У стабільно трансфікованих клітинах підтримується високий рівень вірусного навантаження і під час електронно-мікроскопічного дослідження виявляються внутрішньоклітинні вірусні частинки та нуклеокапсиди. Вітчизняний флавоноїдвмісний препарат Протефлазід пригнічує реплікацію вірусної ДНК і нормалізує показники мітозу в трансфікованих клітинах. Пригнічення ВПЛ в трансфікованих клітинах супроводжується збільшенням експресії клітинних білків, що є продуктами генів-супресорів пухлинного росту.

Ключові слова: *віруси папіломи людини, трансфекція, флавоноїди, антивірусні засоби.*

Серед речовин, що мають противірусну активність, останнім часом широко вивчаються і знаходять практичне застосування сполуки природного походження, зокрема сполуки, що належать до великого класу флавоноїдів [1]. Ці речовини, що поширені в рослинному світі, виявляють, крім суто противірусної дії, різноманітні ефекти в клітинах, взаємодіючи з різними біологічними молекулами та модулюючи цілу низку внутрішньоклітинних процесів. Таким чином, вони цілком відповідають сучасній поліфармакологічній концепції, яка передбачає розробку та застосування фармакологічних агентів, що можуть бути полімішеневими за механізмами своєї дії [2].

Одним з таких засобів полімішеневої дії в Україні є флавоноїдвмісний препарат Протефлазід [3], ефективність якого доведена щодо низки вірусних інфекцій. Полімішеневий ме-

© М.Я. Співак, С.Л. Рибалко, Д.Б. Старосила, М.П. Завелевич, І.П. Олексієнко, С.Т. Дядюн, А.В. Руденко, В.П. Атаманюк, 2018

ханізм дії Протефлазіду раніше показаний, зокрема, на моделях ВІЛ-інфекції *in vitro* [4] та грипозної інфекції [5]. Інгібувальна активність препарату встановлена також для фагової РНК-полімерази і Taq-полімерази [6].

Питання своєчасної діагностики та ефективного лікування папіломавірусної інфекції посідають чільне місце серед актуальних проблем сучасної біології і медицини. Це обумовлено все більшим зростанням поширеності інфікування вірусом папіломи людини (ВПЛ), високою контагіозністю цієї інфекції та її роллю в онкогенезі. Незважаючи на розробку та впровадження вакцин проти ВПЛ, чималий контингент жінок вже інфікований ВПЛ і наражається на небезпеку розвитку патологічних процесів шийки матки, що призводять до ракових уражень. Тому виникає потреба в пошуку і розробці засобів, які б запобігали реплікації ВПЛ в організмі, інтегруванню геному ВПЛ до клітини та розвитку непластичних процесів.

Слід зазначити, що, попри чималу кількість препаратів специфічної дії проти вірусів різних таксономічних груп, досі не існує специфічних синтетичних або природних препаратів, спрямованих проти ВПЛ. Це, зокрема, обумовлено особливостями реплікації ВПЛ, в геномі якого кодується лише один вірус-специфічний фермент, пов'язаний із реплікацією вірусу (геліказа — білок Е1), і для реплікації вірусного геному використовується ДНК-полімераза клітини хазяїна [7]. Тому у випадку ВПЛ проблематично розраховувати на високу ефективність препаратів, мішенями яких є полімерази та інші ферменти, специфічні для вірусів інших груп. Водночас, за даними ряду досліджень, флавоноїди ефективно гальмують *in vitro* ріст клітин, одержаних з ракових пухлин, відносно яких доведена участь ВПЛ в онкогенезі [8]. Тому логічно постає питання, а чи можуть флавоноїдні композиції блокувати репродукцію ВПЛ подібно до того, як це відомо для вірусів інших таксономічних груп.

Але пошук речовин, які б ефективно інгібували реплікацію ВПЛ, ускладнюється ще й відсутністю доступних моделей інфекції ВПЛ *in vitro*, зокрема ВПЛ неможливо культивувати в моношарових культурах, як це роблять з багатьма вірусами різних таксономічних груп, оскільки життєвий цикл вірусу тісно пов'язаний із диференціюванням епітеліальних клітин, в яких він репродукується *in vivo*. Тому більшість досліджень *in vitro* проводиться або в органотипових експлантатах, або на складних моделях рекомбінантних вірусів, реплікація яких відбувається незалежно від диференціювання клітин-хазяїв [9].

Мета нашого дослідження полягала у створенні моделі папіломавірусної інфекції *in vitro* і визначенні на цій моделі противірусної активності флавоноїдвмісного препарату Протефлазід. Для створення моделі застосовували метод трансфекції ДНК із зразків епітелію шийки матки хворих із папіломавірусною інфекцією. Для підтвердження того, що в одержаних культурах персистує ВПЛ, визначали вірусне навантаження та наявність вірусоподібних структур на ультратонких зрізах трансфікованих клітин. Розроблена модель дала можливість дослідити вплив препарату Протефлазід на реплікацію вірусу та стан трансфікованих клітин.

Матеріали і методи. *Культури клітин*. Дослідження проводили на перещеплюваних лініях культур клітин: МТ-4 — культура Т-клітинного гострого лімфобластного лейкозу; ВНК — клітини нирки хом'яка; HeLa — клітини епітеліоїдної карциноми шийки матки. Культури клітин вирощували за стандартними методиками.

Флавоноїдвмісний препарат. Застосовували препарат Протефлазід ("НВК "Екофарм", Україна), що містив суміш флавоноїдів трицину, лютеоліну, апігеніну та кверцетину, а та-

кож їхніх О- та С-глікозидів, одержану шляхом етанольної екстракції з трави щучки дернистої (*Deschampsia caespitosa* L.) та війника наземного (*Calamagrostis epigeios* L.) Вміст кожного з компонентів було визначено методами високоефективної рідинної хроматографії та ЯМР мас-спектрометрії [3]. Загальний вміст флавоноїдів в етанольному розчині становив 0,64 мг/мл у перерахунку на рутин. Для дослідів у культурі клітин препарат розводили в живильному середовищі так, аби кінцева концентрація етанолу не перевищувала 0,2 %.

Модельна система папіломавірусної інфекції in vitro. У хворих з патологією шийки матки, у яких було визначено персистентну папіломавірусну інфекцію, з матеріалів цервікальних вишкрібань виділяли ДНК за допомогою набору innuPREP Virus DNA Kit-KFml (Analityk Jena AG, Німеччина). Препаратами виділеної ДНК трансфікували суспензійну культуру МТ-4 (щільність $5 \cdot 10^5$ клітин/мл), а також епітеліальну культуру ВНК за допомогою трансфікувального агента Turbofect (ThermoFisher Scientific, США) за стандартними протоколами. Трансфіковані культури інкубували при 37 °С в газовому середовищі з 5 % CO_2 з регулярним додаванням інтактних клітин МТ-4. Через 7 діб після трансфекції клітини в суспензії тестували на наявність ДНК ВПЛ методом ПЛР. Для виявлення та генотипування ДНК вірусів папіломи високого канцерогенного ризику проводили ПЛР у реальному часі за допомогою набору реагентів АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL (AmpliSens, РФ). ПЛР виконували на приладі qTOWER 2.2 (Analytik Jena, Німеччина). Вірусне навантаження для ДНК ВПЛ за даними ПЛР визначали як логарифм кількості копій ДНК на 10^5 клітин.

Електронна мікроскопія трансфікованих клітин. Осад клітин МТ-4, одержаний центрифугуванням, фіксували спочатку 3 % глутаральдегідом, а потім 4 % тетраоксидом осмію. Фіксований осад клітин заливали в епон-аралдит. Ультратонкі зрізи виготовляли на ультрамікротомі УМПП-5 та досліджували в трансмісійному електронному мікроскопі ЕМВ-100А при збільшенні 100 тис.

Мітотичний режим та аномальні мітози. Для визначення показників мітозу клітини, вирощені на покривних скельцях, фіксували в нітраті міді на етанолі — формаліні (9 : 1) і фарбували гематоксилін-еозином. Цитологічні препарати досліджували під мікроскопом Standard 20 (Zeiss, Німеччина). Мітотичний індекс розраховували в проміле (‰, кількість мітозів на 1000 клітин). Одночасно аналізували кількість патологічних мітозів.

Імуноферментний аналіз. Вміст вірусасоційованих антигенів та клітинних білків — продуктів генів-супресорів пухлинного росту визначали в осаді та в культуральній рідині трансфікованих клітин. Клітини перед проведенням аналізу руйнували шляхом триразового циклу заморожування — відтавання. Одержані розчинні антигени сорбували в лунках мікропланшетів (Maxisorp, Бельгія). Для виявлення антигенів використовували такі моноклональні антитіла (монАТ): монАТ проти онкопротеїну Е7 ВПЛ (Novus Biologicals, США), монАТ проти капсидного білка L1 ВПЛ (Novus Biologicals, США), анти-р53 монАТ (Biomol, Німеччина), антиRB монАТ (Bioss, США). Після відмивання та блокування вільних ділянок розчином знежиреного молока до лунок планшета з адсорбованими антигенами додавали антитіла у відповідних розведеннях. Після інкубування з первинними антитілами лунки промивали і проводили інкубування із козячими антитілами проти IgG миші, кон'югованими з пероксидазою. Для проявлення як субстрат використовували тетраметилбензидин (набір ДіапрофМед, Україна). Оптичну густину в лунках вимірювали за допомогою мікропланшетного фотометра iMark (Bio-Rad, США) у двохвильовому режимі (450/630 нм).

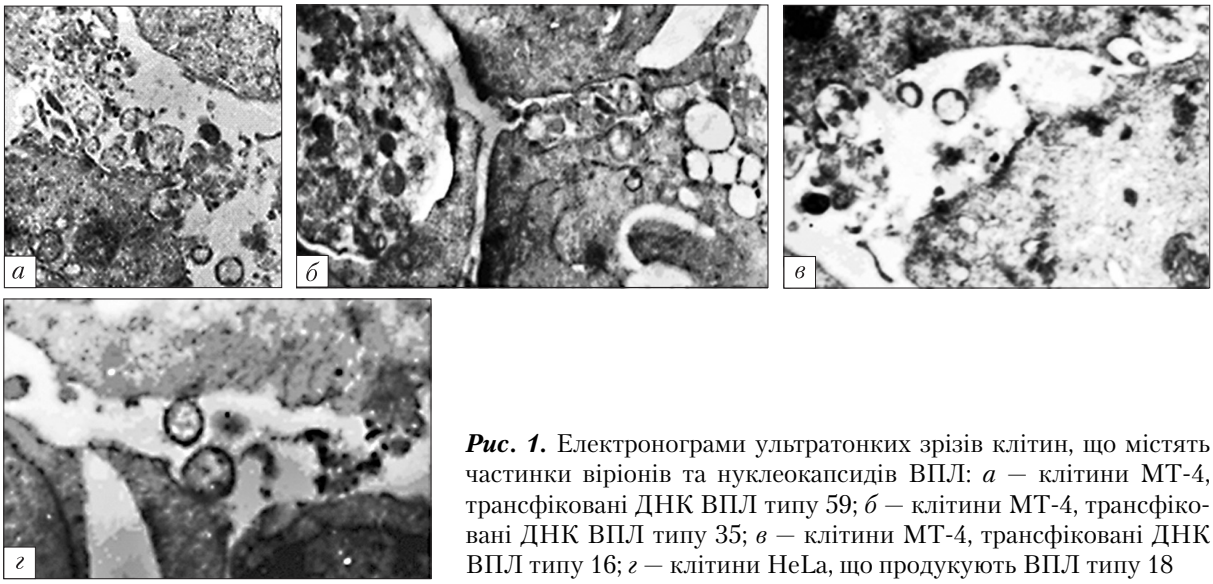

Рис. 1. Електронограми ультратонких зрізів клітин, що містять частинки віріонів та нуклеокапсидів ВПЛ: *а* — клітини МТ-4, трансфіковані ДНК ВПЛ типу 59; *б* — клітини МТ-4, трансфіковані ДНК ВПЛ типу 35; *в* — клітини МТ-4, трансфіковані ДНК ВПЛ типу 16; *г* — клітини HeLa, що продукують ВПЛ типу 18

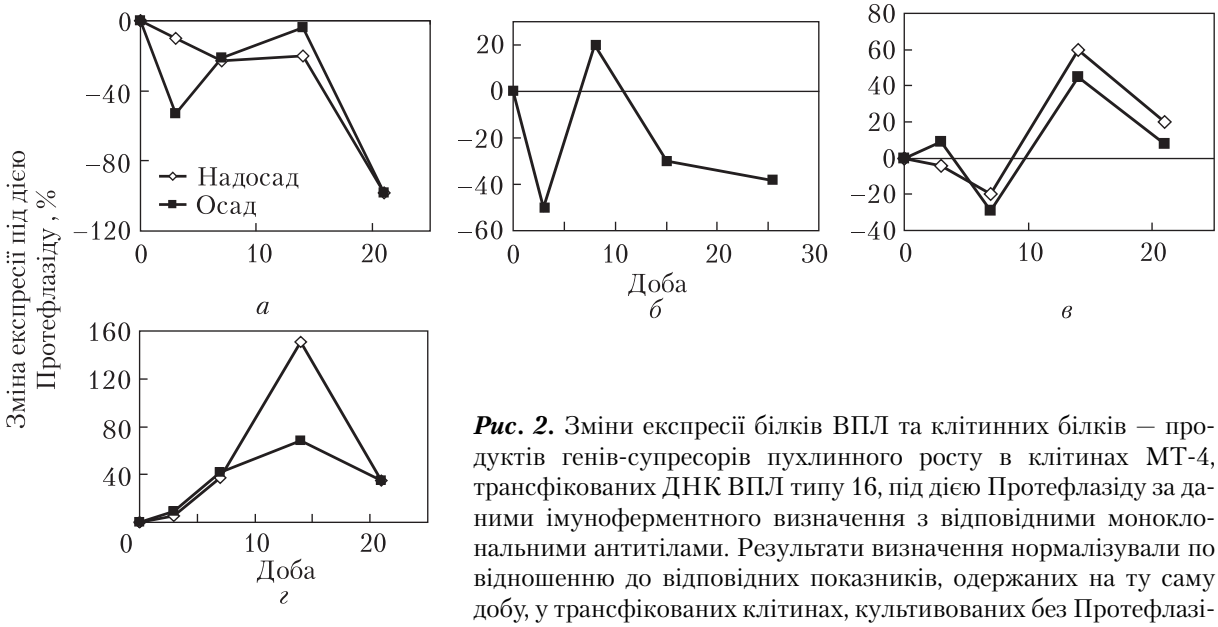

Рис. 2. Зміни експресії білків ВПЛ та клітинних білків — продуктів генів-супресорів пухлинного росту в клітинах МТ-4, трансфікованих ДНК ВПЛ типу 16, під дією Протефлазіду за даними імуноферментного визначення з відповідними моноклональними антитілами. Результати визначення нормалізували по відношенню до відповідних показників, одержаних на ту саму добу, у трансфікованих клітинах, культивованих без Протефлазіду, які для кожної часової точки приймали за 100 %. Значення по ординаті відповідають збільшенню або зменшенню експресії відповідного білка у відсотках під впливом Протефлазіду: *а* — L1; *б* — E7; *в* — p53; *г* — Rb

Результати та їх обговорення. Трансфекція ДНК, виділених із цервікальних вишкрібань хворих із папіломавірусною інфекцією, в клітинах МТ-4 виявилась ефективною (табл. 1). Генотипування вірусу та вірусне навантаження вперше визначали на 7-му добу після трансфікування. Показники вірусного навантаження в діапазоні 3—5 $\lg/10^5$ клітин, що зберігалися стабільно впродовж подальшого культивування, свідчили про активну реплікацію вірусної ДНК в трансфікованих клітинах. Оскільки трансфіковані клітини МТ-4 через 3—4

доби зазнавали часткових дегенеративних змін, для підтримання віруспродукувальної системи раз на 3 доби до трансфікованих клітин додавали інтактні клітини МТ-4. Отримані таким чином культури стабільно підтримувалися впродовж багатьох пасажів та могли бути використані для подальшого вивчення. Було отримано п'ять культур клітин МТ-4, що містили ДНК різних генотипів ВПЛ високого канцерогенного ризику, з яких три, що містили ДНК генотипів ВПЛ 16, 35 та 59, були відібрані для подальших досліджень.

Для підтвердження утворення вірусних частинок у створеній модельній системі трансфікованих клітин МТ-4 досліджували ультратонкі зрізи клітин за допомогою електронної мікроскопії (рис. 1). Вірусні частинки виявляли в ядрі, цитоплазмі та в невеликій кількості в міжклітинному просторі. Зокрема, в нуклеоплазмі були виявлені електроннощільні гранули діаметром 40—50 нм, що, ймовірно, являли собою нуклеокапсиди. В цитоплазмі виявляли структури діаметром 60—70 нм, що відповідали віріонам ВПЛ. Для порівняння на рис. 1 наведено також електронограму клітин HeLa, що стабільно продукують ВПЛ типу 18.

Аналогічні дані отримані при трансфікуванні епітеліальних клітин ВНК, в результаті чого вдалося одержати дві лінії клітин, стабільно продукуючих ВПЛ типів 16 та 35.

Таким чином, як дані щодо вірусного навантаження, так і дані електронно-мікроскопічного дослідження свідчать про ефективну трансфекцію клітин МТ-4 ДНК ВПЛ. Трансфіковані клітини, які стабільно підтримуються шляхом періодичного додавання неінфікованих клітин МТ-4, можна розглядати як нову модель репродукції ВПЛ високого концерогенного ризику *in vitro*, що дає можливість досліджувати вплив тих чи інших чинників на продуктивну інфекцію ВПЛ.

Трансфіковані клітини МТ-4 культивували в присутності Протефлазіду в дозі 4,2 мкг/мл. Препарат вносили в культуру один раз на тиждень впродовж 4 тижнів. Показником впливу препарату на репродукцію ВПЛ у даній модельній системі було зниження вірусного навантаження, що визначали методом ПЛР. Короткотермінове культивування з Протефлазідом (до 5 діб) не спричиняло до зменшення вірусного навантаження. Водночас вірусне навантаження, визначене через 1 місяць культивування в присутності Протефлазіду, значно знижувалося, що свідчило про пригнічення репродукції вірусу в

Таблиця 1. **Вірусне навантаження ВПЛ у трансфікованих культурах МТ-4**

Тип вірусу	Вірусне навантаження, $lg/10^5$ клітин	Вірусне навантаження після інкубування з Протефлазідом, $lg/10^5$ клітин
16	4,15	3,10
35	3,13	2,21
59	5,25	4,38

Таблиця 2. **Мітотичний індекс і патологічні мітози в трансфікованих ДНК ВПЛ клітинах ВНК**

Клітини ВНК	Мітотичний індекс, ‰		Патологічні мітози, %	
	Без обробки Протефлазідом	Після культивування з Протефлазідом	Без обробки Протефлазідом	Після культивування з Протефлазідом
Контроль	13,0 ± 0,6	14,2 ± 0,4	23,0±0,9	22,1 ± 1,1
ВПЛ тип 16	27,6 ± 0,8	20,0 ± 0,5	40,9±1,9	25,5 ± 0,7
ВПЛ тип 35	40,3 ± 0,9	23,0 ± 0,5	32,2±1,1	23,1 ± 0,6

ції системі (див. табл. 1). Вірогідне зниження вірусного навантаження досягалося для усіх трьох досліджуваних генотипів ВПЛ, що продукувалися в трансфікованих клітинах МТ-4.

Важливим показником інфікування клітин ВПЛ було також збільшення мітотичної активності та зростання кількості патологічних мітозів у клітинах ВНК, трансфікованих ДНК ВПЛ типів 16 та 35 (табл. 2). Протефлазід істотно знижує мітотичну активність трансфікованих ВПЛ клітин ВНК і зменшує рівень патологічних мітозів у них, "протидіючи", таким чином, проліферативній та деструктивній активності ВПЛ. Водночас наведені дані свідчать про відсутність впливу Протефлазіду на досліджувані показники мітозу в інтактних клітинах ВНК.

Для подальшого з'ясування особливостей дії Протефлазіду як на репродукцію ВПЛ, так і на параметри, пов'язані із канцерогенними властивостями вірусу та його взаємодією з клітиною-хазяїном, визначали продукцію в трансфікованих клітинах МТ-4 раннього вірусного білка L1, білка E7, що є онкопротеїном ВПЛ, та клітинних білків — продуктів генів-супресорів пухлинного росту p53 та Rb. Продукцію білків визначали імуноферментним методом в динаміці впродовж 3 тижнів у трансфікованих клітинах, культивованих у звичайному середовищі або середовищі, до якого періодично (один раз на тиждень) вносили Протефлазід в концентрації 4,2 мкг/мл. Результати визначення нормалізували по відношенню до відповідних показників, одержаних на ту саму добу, у трансфікованих клітинах, культивованих без Протефлазіду, які для кожної часової точки приймали за 100 % (рис. 2). Протефлазід зменшував експресію раннього вірусного білка L1, що опосередковано підтверджувало інгібування реплікації вірусу за наведеними вище даними, одержаними за допомогою інших методів. Водночас, починаючи з 14-ї доби, відстежували зниження експресії онкопротеїну E7. Зменшення експресії онкопротеїну E7 на 14-ту добу супроводжувалося збільшенням порівняно з контролем експресії p53 та Rb. Механізми виявленої взаємозалежності експресії зазначених білків потребують подальшого дослідження.

Таким чином, створено нову модель на основі трансфекції ДНК з клітин хворих, уражених папіломавірусною інфекцією, що є пермісивною для репродукції ВПЛ. Реплікацію ДНК ВПЛ та утворення внутрішньоклітинних вірусоподібних частинок підтверджено результатами визначення навантаження вірусної ДНК та електронно-мікроскопічних досліджень трансфікованих клітин. Підтримання репродукції вірусу та утворення вірусоподібних частинок досягається періодичним рекультивуванням з інтактними клітинами лінії, що була використана для трансфекції. Не виключено інфікування інтактних клітин за рахунок безпосередніх міжклітинних контактів або через секретовані в середовище клітинні фрагменти, що містять віріони та нуклеокапсиди ВПЛ. Нещодавно було виявлено ефективне інфікування первинних кератиноцитів ВПЛ, частинки якого були зв'язані з позаклітинним матриксом, секретованим кератиноцитами [10].

Показано, що досліджувана флавоноїдвмісна композиція Протефлазід зменшує вірусне навантаження і нормалізує показники мітотичної активності трансфікованих клітин, а також інгібує експресію вірусних білків L1 та E7 з одночасним збільшенням експресії клітинних білків, що є продуктами генів-супресорів пухлинного росту.

Дані, отримані останніми роками, свідчать про те, що речовини класу флавоноїдів є перспективними для застосування з метою хіміопрофілактики у разі передракових процесів, зокрема дисплазій шийки матки, асоційованих з папіломавірусною інфекцією [11]. У низці

робіт показано проапоптотичну дію флавоноїдів *in vitro* на ВПЛ-позитивні клітини раку шийки матки [12]. Таким чином, терапевтичний ефект флавоноїдів як полімішеневих агентів на передракові процеси та онкогенез може досягатися завдяки поєднанню антипроліферативної та проапоптотичної дії цих речовин із безпосередньою антивірусною дією.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Zakaryan H., Arabyan E., Oo A., Zandi K. Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. *Arch. Virol.* 2017. **162**, № 9. P. 2539—2551. doi: https://doi.org/10.1007/s00705-017-3417-y
2. Reddy A.S., Zhang S. Polypharmacology: drug discovery for the future. *Exp. Rev. Clin. Pharm.* 2013. **6**, № 1. 10.1586/ecp.12.74. doi: https://doi.org/10.1586/ecp.12.74
3. Біологічно активна речовина поліфармакологічної дії рослинного походження: пат. 99969 Україна. МПК A61K 36/00, A61K 36/899, A61P 31/12; заявл. 24.04.2015. Опубл. 25.06.2015.
4. Trokhymchuk T., Zavelevich M., Liulchuk M., Starosyla D., Rybalko S., Rudenko A. In vitro study of anti-HIV activity of proteflazid herbal composition. *Am. J. Fundam. Appl. Exp. Res.* 2017. **7**, № 4. P. 87—91.
5. Рыбалко С.Л, Старосила Д.Б., Завелевич М.П. Современное состояние химиотерапии и профилактики гриппа и ОРВИ в Украине. *Укр. мед. часопис.* 2018. № 1. С. 64—67.
6. Пальчиковська Л. Г., Васильченко О. В., Платонов М. О., Старосила Д. Б., Порва Ю. І., Римар С.Ю., Атаманюк В.П., Самійленко С.П., Рибалко С.Л. Антивірусні властивості рослинних флавоноїдів – інгібіторів синтезу ДНК і РНК. *Biopolim. Cell.* 2013. **29**, № 2. С. 150—156. doi: https://doi.org/10.7124/bc.000813
7. Conger K.L., Liu J.S., Kuo S.R., Chow L.T., Wang T.S. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase alpha/primase. *J. Biol. Chem.* 1999. **274**. P. 2696—2705.
8. Catanzaro D., Vianello C., Ragazzi E., Caparrotta L., Montopoli M. Cell cycle control by natural phenols in cisplatin-resistant cell lines. *Nat. Prod. Commun.* 2014. **9**, № 10. P. 1465—1468.
9. Biryukov J., Meyers C. Papillomavirus infectious pathways: A comparison of systems. *Viruses.* 2015. **7**, № 8. P. 4303—4325. doi: https://doi.org/10.3390/v7082823
10. Bienkowska-Haba M., Luszczek W., Myers J.E., Keiffer T.R., DiGiuseppe S., Polk P., Bodily J.M., Scott R.S., Sapp M. A new cell culture model to genetically dissect the complete human papillomavirus life cycle. *PLoS Pathog.* 2018. **14**, № 3. e1006846. doi: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006846
11. Moga M.A., Dimienescu O.G., Arvatescu C.A., Mironescu A., Dracea L., Ples L. The role of natural polyphenols in the prevention and treatment of cervical cancer—an overview. *Molecules.* 2016. **21**, № 8. pii: E1055. doi: https://doi.org/10.3390/molecules21081055
12. Ham S., Kim K.H., Kwon T.H., Bak Y., Lee D.H., Song Y.S., Park S.H., Park Y.S., Kim M.S., Kang J.W., Hong J.T., Yoon D.Y. Luteolin induces intrinsic apoptosis via inhibition of E6/E7 oncogenes and activation of extrinsic and intrinsic signaling pathways in HPV-18-associated cells. *Oncol. Rep.* 2014. **31**, № 6. P. 2683—2691. doi: https://doi.org/10.3892/or.2014.3157

Надійшло до редакції 09.07.2018

REFERENCES

1. Zakaryan, H., Arabyan, E., Oo, A. & Zandi, K. (2017). Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. Arch. Virol., 162, No. 9, pp. 2539-2551. doi: https://doi.org/10.1007/s00705-017-3417-y
2. Reddy, A. S. & Zhang, S. (2013). Polypharmacology: drug discovery for the future. Exp. Rev. Clin. Pharm., 6, No. 1, 10.1586/ecp.12.74. doi: https://doi.org/10.1586/ecp.12.74
3. Pat. 99969 UA, IPC A61K 36/00, A61K 36/899, A61P 31/12, Biologically active plant-derived substance of polypharmacological activity, Atamaniuk, V. P., Novyk, A. M., Publ. 25.06.2015 (in Ukrainian).
4. Trokhymchuk, T., Zavelevich, M., Liulchuk, M., Starosyla, D., Rybalko, S. & Rudenko, A. (2017). In vitro study of anti-HIV activity of proteflazid herbal composition. Am. J. Fundam. Appl. & Exp. Res., 7, No. 4, pp. 87-91.

5. Rybalko, S. L., Starosyla, D. B. & Zavelevich, M. P. (2018). State-of-the-art of chemotherapy and prevention of influenza in Ukraine. Ukr. med. chasopys., No. 1, pp. 64-67 (in Russian).
6. Palchykovska, L. G., Vasylchenko, O. V., Platonov, M. O., Starosyla, D. B., Porva, J. I., Rymar, S. J., Atamaniuk, V. P., Samijlenko, S. P. & Rybalko, S. L. (2013). Antiviral properties of herbal flavonoids – inhibitors of the DNA and RNA synthesis. Biopolym. Cell., 29, No. 2, pp. 150-156 (in Ukrainian). doi: https://doi.org/10.7124/bc.000813
7. Conger, K. L., Liu, J. S., Kuo, S. R., Chow, L. T. & Wang, T. S. (1999). Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase alpha/primase. J. Biol. Chem., 274, pp. 2696 &2705.
8. Catanzaro, D., Vianello, C., Ragazzi, E., Caparrotta, L. & Montopoli, M. (2014). Cell cycle control by natural phenols in cisplatin-resistant cell lines. Nat. Prod. Commun., 9, No. 10, pp. 1465-1468.
9. Biryukov, J. & Meyers, C. (2015). Papillomavirus infectious pathways: A comparison of systems. Viruses, 7, No. 8, pp. 4303-4325. doi: https://doi.org/10.3390/v7082823
10. Bienkowska-Haba, M., Luszczek, W., Myers, J. E., Keiffer, T. R., DiGiuseppe, S., Polk, P., Bodily, J. M., Scott, R. S. & Sapp, M. (2018). A new cell culture model to genetically dissect the complete human papillomavirus life cycle. PLoS Pathog., 14, No. 3, e1006846. doi: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006846
11. Moga, M. A., Dimienescu, O. G., Arvatescu, C. A., Mironescu, A., Dracea, L. & Ples, L. (2016). The role of natural polyphenols in the prevention and treatment of cervical cancer-an overview. Molecules, 21, No. 8, pii: E1055. doi: https://doi.org/10.3390/molecules21081055.
12. Ham, S., Kim, K. H., Kwon, T. H., Bak, Y., Lee, D. H., Song, Y. S., Park, S. H., Park, Y. S., Kim, M. S., Kang, J. W., Hong, J. T. & Yoon, D.Y. (2014). Luteolin induces intrinsic apoptosis via inhibition of E6/E7 oncogenes and activation of extrinsic and intrinsic signaling pathways in HPV-18-associated cells. Oncol. Rep., 31, No. 6, pp. 2683-2691. doi: https://doi.org/10.3892/or.2014.3157

Received 09.07.2018

Н.Я. Спивак[1], *С.Л. Рыбалко*[2], *Д.Б. Старосила*[2],
М.П. Завелевич[2], *И.П. Алексеенко*[2], *С.Т. Дядюн*[2],
А.В. Руденко[3], *В.П. Атаманюк*[4]

[1] Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев
[2] ГУ "Институт эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В. Громашевского НАМН Украины", Киев
[3] ДУ "Институт урологии НАМН Украины", Киев
[4] ОО "НПК "Экофарм", Киев
E-mail: n.spivak@ukr.net, y_dasha@ukr.net

ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ ФЛАВОНОИДСОДЕРЖАЩЕГО ПРЕПАРАТА ПРОТЕФЛАЗИД НА МОДЕЛИ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ *IN VITRO*

С помощью трансфекции клеток МТ-4 и ВНК ДНК из образцов эпителия шейки матки больных с папилломавирусной инфекцией создана модель, пермиссивная для репродукции вирусов папилломы человека (ВПЧ). В стабильно трансфицированных клетках поддерживается высокий уровень вирусной нагрузки и при электронно-микроскопическом исследовании выявляются внутриклеточные вирусные частицы и нуклеокапсиды. Отечественный флавоноидсодержащий препарат Протефлазид подавляет репликацию вирусной ДНК и нормализует показатели митоза в трансфицированных клетках. Подавление ВПЧ в трансфицированных клетках сопровождается увеличением экспрессии клеточных белков, являющихся продуктами генов-супрессоров опухолевого роста.

Ключевые слова: *вирусы папилломы человека, трансфекция, флавоноиды, противовирусные средства.*

M.Ya. Spivak[1], *S.L. Rybalko*[2], *D.B. Starosyla*[2],
M.P. Zavelevich[2], *I.P. Oleksiienko*[2], *S.T. Diadiun*[2],
A.V. Rudenko[3], *V.P. Atamaniuk*[4]

[1] Danylo Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine, Kiev
[2] L. Gromashevsky Institute of Epidemiology and Infectious Diseases of the NAMS of Ukraine, Kiev
[3] Institute of Urology of the NAMS of Ukraine, Kiev
[4] Ecopharm Research and Production Company, Kiev
E-mail: n.spivak@ukr.net, y_dasha@ukr.net

STUDY OF THE EFFECTS OF FLAVONOID-CONTAINING COMPOSITION PROTEFLAZID ON MODELED PAPILLOMAVIRUS INFECTION *IN VITRO*

A model permissive for the reproduction of human papillomaviruses (HPV) is developed by transfecting MT-4 and BHK cells with DNA isolated from cervical epithelium of the patients with papillomavirus infection. The steadily transfected cells maintain the high level of viral load. In cell sections, the intracellular viral particles and nucleocapsids are revealed under electron microscopic studies. The domestic flavonoid-containing composition Proteflazid inhibits the replication of viral DNA and normalizes the mitotic indices in transfected cells. HPV inhibition is in line with increased expression of cell proteins, which are products of tumor suppressor genes.

Keywords: *human papillomavirus, transfection, flavonoids, antiviral agents.*