

А.Н. Алескерова<sup>1</sup>, Н.Н. Алиев<sup>2</sup>, С.В. Серкерев<sup>1</sup>, Л.И. Рустамова<sup>2</sup><sup>1</sup>Институт Ботаники Национальной Академии Наук Азербайджана, Баку, Азербайджан<sup>2</sup>Научно-Исследовательский Институт Медицинской Профилактики им В.Ахундова, Баку, Азербайджан**КОМПОНЕНТНЫЙ СОСТАВ И АНТИВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭФИРНОГО МАСЛА ARTEMISIA ISSAYEVII RZAZADE**

В условиях увеличения вирусных инфекций в патологии человека, повышенную актуальность приобретает поиск новых лекарственных средств вирулицидного действия. Вирулицидный эффект свойствен прежде всего полифенолам, флавоноидам, сапонинам и эфирным маслам. Эфирные масла различных видов рода *Artemisia L.* широко используются как дезинфицирующее, противопаразитарное, ранозаживляющее, фунгицидное средство, а также для ароматизации пищевых продуктов, в парфюмерно-косметической и медицинской промышленности.

Впервые приведены результаты исследования компонентного состава и антивирусной активности эфирного масла эндемичного вида *Artemisia issayevii Rzazade*. Установлено, что спиртово-водный раствор эфирного масла указанного вида полыни подавляет цитопатическое действие неполиоэнтеровирусов в культуре клеток на 50% в 72 пробах, на 25% в 40 и на 75% в 13-ти пробах. Выявлена антивирусная активность в нативной форме спиртово-водного раствора эфирного масла *Artemisia issayevii Rzazade*.

Основными компонентами эфирного масла *Artemisia issayevii* являются (%) камфора 37 и 1,8 цинеол 31. Дальнейшей целью исследования было изучение действия эфирного масла, разведенного в 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> степени на нейтрализацию цитопатического действия неполиоэнтеровирусов в первичной клеточной культуре.

**Ключевые слова:** *A. issayevii Rzazade*, полынь, эфирное масло, хромато-масс-спектрометрия, неполиоэнтеровирусов.

**Введение.**

Виды рода (*Artemisia L.*) широко распространены во всех географических и экологических зонах. Род включает более чем 500 видов на Земном шаре. В пределах СНГ наиболее распространены европейские, кавказские и центрально-азиатские виды полыни. Полынь, как доказано многими исследователями, богата эфирными маслами, которые могут быть применены в народной и традиционной медицине в качестве антибактериальных, противораковых, противовоспалительных, противоязвенных, противовирусных, спазмолитических и других средств [1, 2, 3, 4, 5].

Эфирные масла различных видов рода *Artemisia L.* широко используются как дезинфицирующее, противопаразитарное, ранозаживляющее, фунгицидное средство, а также для ароматизации пищевых продуктов, в парфюмерно-косметической и медицинской промышленности [6, 7, 8, 9, 10, 11, 12].

Нашими исследованиями на основе сравнительного изучения сесквитерпеновых лактонов представителей рода полынь для флоры Азербайджана выявлены 42 вида полыни.

В обширном арсенале лечебных средств, применяемых в настоящее время в мировой практике для профилактики и лечения заболеваний, около треть составляют препараты растительного происхождения [1, 13, 14].

Вообще, большинство растений в целом или отдельные их части используются для приготовления галеновых и нео-галеновых препаратов.

В условиях увеличения вирусных инфекций в патологии человека, повышенную актуальность приобретает поиск новых лекарственных средств вирулицидного действия.

Вирулицидный эффект свойствен прежде всего полифенолам, флавоноидам, сапонинам и эфирным маслам. Установлено вирулицидное действие эфирных масел, выделенных из некоторых видов полыни, мяты, эвкалипта и кедры на вирусы Коксаки А 18 и 20 [4, 12, 15].

Имеются также данные японских ученых об ингибирующем действии галлатэпигаллокатехина из зеленого чая и дигаллатеофлавина из черного чая на развитие ротавирусов и энтеровирусов в культуре клеток почек обезьяны линии MA104 [13, 16].

**Материал и методы исследования.**

Объектом исследования являлось эфирное масло, полученное из надземной части *Artemisia issayevii Rzazade*, собранной в фазе бутонизации в окрестностях с. Бичанак Шахбузского района Нахичеванской АР Азербайджанской Республики. Эфирное масло получено методом гидродистилляции по Клевенджеру. Компонентный состав образцов эфирного масла анализировали методом газовой хроматографии и хромато-масс-спектрометрии на приборе Agilent 6890N с масс-спектрометрическим детектором Agilent 5978N [12].

Использовалась капиллярная кварцевая колонка DB-XLB FSC (30 м ´ 0,25 мм) с газом-носителем гелием. Скорость подачи 1 мл/мин. Газохроматографическую колонку выдерживали при температуре 40°C в течение 10 мин с программированием температуры до 240°C со скоростью изменения температуры 2°C/мин, и затем выдерживали в изотермическом режиме в течение 10 мин. Режим ввода пробы – с делением потока. Объем пробы - 1 мкл. Температура испарителя – 250°C. Масс-спектры записывались в диапазоне m/z 10-425. Процентный состав эфирного масла вычисляли по площадям пиков без использования корректирующих коэффициентов. Качественный анализ основан на сравнении времен удерживания и полных масс-спектров с соответствующими данными компонент эталонных масел и чистых соединений, если они имелись, и с данными библиотек масс-спектров (Wiley, 7th edition (390 тыс. спектров), NIST 02 (175 тыс. соединений) [12].

Исследования биологической активности эфирного масла велись двухэтапно. На первом этапе изучалось влияние эфирного масла на нормальные клетки без воздействия вирусов. Затем изучалось действие различной степени разведения (10<sup>-1</sup> - 10<sup>-5</sup>) эфирного масла на нейтрализацию цитопатического действия вирусов [16, 17, 18].

На втором этапе как контроль бралась питательная среда 199. Исследования велись *in vitro* на первичной культуре, клеток фибробластов 6-8 недельного человеческого эмбриона, приготовленной методами Y. Younger (1959) и E. Dosser (1959) [16].

Для приготовления первичной культуры фибробластов человеческого эмбриона брался материал 6-8 недельного человеческого эмбриона из родильного дома.

Материал взятый из роддома сразу фиксировался в бычьей сыворотке и помещался в стерильные флаконы с антибиотическим гидролизатом лактоальбумина. Перед трипсинизацией ткань переносят в чашки Петри с добавлением антибиотика и отмывают от слизи, плацента и от кровяных сгустков.

Кожа и мышцы 6-8 недельных эмбрионов отделяются для дальнейшей работы, головы 8 недельных эмбрионов изолируются, а тело берется для трипсинизации. Ткань помещают в стерильную посуду, тонко измельчают ножницами до жижеобразной массы для дальнейшей трипсинизации в колбе объемом 0,5 литр. 2-3 раза ткань промывают раствором Хенкса и добавляют 300 мл рабочего раствора трипсина. Меняя раствор трипсина 4-5 раз ведут поэтапную трипсинизацию отделяя клетки друг от друга. Если тканевая масса значительна, то повторно ведут трипсинизацию в течение 20 минут. После трипсинизации для полного разделения клеточных фрагментов добавляют гидролизат лактоальбумина.

Скорость разделения тканевых эмбрионов на клеточные фрагменты зависит от срока эмбрионов, например 6-7 недельные эмбрионы быстро разделяются при поэтапной трипсинизации.

Смесь с остатком клеток, трипсина и гидролизата лактальбумина для нейтрализации трипсина переносим во флакон с и центрифугируем 10 мин при 1000 об/мин. Надосадочная жидкость выбрасывается, осадок с малым количеством питательной среды ресуспендируется, фильтруется через 2-х слойную марлю. Для подсчета клеток образец переносится в счетную камеру Горяева. Для получения однородной массы рабочий образец клеток человеческого эмбриона готовится в количестве 700 тыс. – 1 млн. в/мл, а для цитологических исследований 150-300 млн./1 мл. Для достижения пика митотической активности клетки человеческого эмбриона берутся после 72 часов после посева.

**Результаты и обсуждение.**

Из эфирного масла ArtemisiaissayeviiRzazade были выделены следующие компоненты: 1-октен-3-ол-0.25%, 0-Цимол-1.64, 1,8 Цинеол- 31, 4 метил- 1(метил-этил) бицикло [3.1.0] гексан-3-он-7.41,Туйон-3.47,п-Мент-2-ен-1ол-2.56, камфора 37, 4 метил-1(метил-этил)-3-циклогексен-1ол-1.90 и др.

Из выше представленных данных видно что основными компонентами эфирного масла ArtemisiaissayeviiRzazade являются (в%) камфора 37 и 1,8 цинеол 31. Дальнейшей целью исследования было изучение действия эфирного масла, разведенного в 10-1,10-2 10-3, 10-4,10-5 степени на нейтрализацию цитопатического действия неполиоэнтеровирусов в первичной культуре клеток.

На первом этапе исследований биологической активности выявлено, что эфирное масло в нативном виде и в разведениях 10-1 -10-4 оказывает токсическое действие на нормальные клетки, а 10-5 разведение даже после 72 часов экспозиции не оказывает токсического действия (таблица 1).

Таблица 1 - Результаты влияния эфирного масла из ArtemisiaissayeviiRzazadeinvitro

Образец	Разведение	Время экспозиции	Влияние на первичную культуру клеток
Эфирное масло Artemisia issayevii Rzazade	нативная	24	+
		48	+
		72	+
	10 <sup>-1</sup>	24	+
		48	+
		72	+
	10 <sup>-2</sup>	24	+
		48	+
		72	+
	10 <sup>-3</sup>	24	+
		48	+
		72	+
	10 <sup>-4</sup>	24	+
		48	-
		72	-
	10 <sup>-5</sup>	24	-
		48	-
		72	-
Питательная среда 199 (контрольная группа)		24	-
		48	-
		72	-

**Примечание:** «-» не оказывает токсическое действие; «+» оказывает токсическое действие.

На втором этапе было изучено антивирусное действие нативного и разведенного 10-4 и 10-5 эфирного масла на зараженный вирусом патологический материал в виде фекальной суспензии. В виде контроля была взята среда 199.

Опыты проводились invitro при температуре 37°C.

Результаты опытов на втором этапе приведены в таблице 2.

Таблица 2—Результаты вирулицидного действия эфирного масла ArtemisiaissayeviiRzazade в первичной культуре клеток

Эфирное масло (10 <sup>-5</sup> )	Подавление ЦПД в культуре клеток		
	25%	50%	75%
Пробы (n=125)	40	72	13

Эфирное масло (10-5) Подавление ЦПД в культуре клеток 25% 50% 75%

Пробы (n=125) 40 72 13

Как видно из таблицы 2, эфирное масло Artemisiaissayevii в разведении 10-5 нейтрализует цитопатическое действие в первичной клеточной культуре на 25% и 50%. Полученные результаты позволяют рекомендовать эфирное масло Artemisiaissayevii в профилактических целях [12].

Эфирное масло в 72 случаях на 50%, в 40 случаях на 25% и в 13 случаях на 75% нейтрализовало цитопатическое действие неполиоэнтеровирусов.

**Заключение.**

Таким образом, проведенные исследования позволяют нам прийти к заключению о том, что спиртово-водное разведение эфирного масла из ArtemisiaissayeviiRzazade в разведении 10 – 5 обладает антивирусной активностью и перспективно для дальнейшего исследования.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Сирота И.Б. Антиоксидантное действие арглабина в комплексном лечении распространенного рака молочной железы. // Министерство образования и науки Республики Казахстан Институт фитохимии. – Алматы: Гылым, 2004. - С. 247-257.
- 2 Lindegardh N., Tarning J., Toi P.V. et al. Quantification of artemisinin in human plasma using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry // Thailand. J. Pharm. Biomed. Anal. – 2009. - Vol. 49, №3. - P. 768-773.
- 3 Lesiak K., Koprowska K., Zalesna I. et al. Parthenolide, a sesquiterpene lactone from the medical herb feverfew, shows anticancer activity against human melanoma cells in vitro // Melanoma Res. – 2010. - vol. 20, №1. - P. 21-34.
- 4 Алескерова А. Н., Асадова А. И., Рустамова Л.И., Ибрагимова С.И. Гейдарова Ф.Н. Джангирова И.П. Исследование биоэкологических особенностей, эфирномасличности и антивирусной активности вида *Artemisia fragrans* Willd. // Гигиена, Эпидемиология и Иммунобиология. – Алматы: 2015. - №4. - С. 120-126.
- 5 Алескерова А.Н., Сулейманова С.Ф., Серкерова С.В., Ибрагимова С.И., Рустамова Л.И., Гусейнова Ф.И. Компонентный состав эфирного масла *Artemisia issayevii* и его антимикробная активность. // Гигиена, эпидемиология Жене Иммунобиология. – Алматы: 2016. - №2. - С. 28-34.
- 6 Чобанов Р.Э., Алескерова А.Н., Джанахметова Ш.Н., Сафиева Л.А. Экспериментальная оценка антипаразитарных свойств эфирных масел некоторых видов *Artemisia L. (Asteraceae)* флоры Азербайджана. Санкт-Петербург «Наука» // Растит. Ресурсы. – 2004. - Т. 40. - С. 94-98.
- 7 Пак Р.Н., Бейсенбаева А.А., Сеидахметова Б.Б., Атаханова Г.А., Рахимов К.Д., Адекенов С.М. Ранозаживляющие свойства эфирного масла *Artemisia glabella* / Karri. et Kir. // Растит. Ресурсы. – 2004. - Т. 40, вып. 2. - С. 101- 107.
- 8 Кириченко Е.Б., Орлова Ю.В., Курилов Д.В. *Artemisia lerecheana* (Web.) как продуцент эфирных масел // Физиология растений. – 2008. - №6. - С. 934-941.
- 9 Алиев Н. Н., Гаджиев В.С., Сафиева Л.А., Алескерова А. Н. Баку 2009 / Патент № P12009 0194. Профилактические средства обладающие протозооцидным действием.
- 10 Valeri Ann Worwod. The complete Book of Essential oils and Aromatherapy. - Novato, CA: NewWorldLibrary, 2010. – 188 p.
- 11 Алиев Н. Н., Алили М.И, Сафиева Л.А., Алескерова А. Н Протозооцидное средство против возбудителей протозозов. Баку. 2012/ Патент № P 2012 0100 27.11.2012.
- 12 Алескерова А.Н, Ибрагимова С.И. Серкерова С.В., Садырбеков Д.Т., Рязанцев О.Г. и др. «Компонентный состав эфирного масла *Artemisia issayevii* Rzazade», Институт Ботаники НАН Азербайджана / Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия». - Караганда: 2012. - Т. XXXIV. - С.142-144.
- 13 Мукояма А., Ushijima H. et al. Inhibition of rotavirus and enterovirus in tea extracts // Jap. J. Med. Sci. and Biol. – 1991. - Vol. 44, №4. - P. 81-86.
- 14 Gering A.V., Tizhanov Kh.I., Zhabayeva A.N., Atazhanova G.A. Development of technology of the medicinal spray on the basis of essential oil of *Artemisia glabella* / International scientific and practical conference. Achievement and prospects for development of phytochemistry. – Karaganda: 2015. – 183 p.
- 15 Asadova A.I., Aleskerova A.N., Serkerov S. V. Antiviral Activity of the *Artemisia szowitziana* (Bess.) Grossh. and *A. issayevii* Rzazade and Achievements and prospects for the development of phytochemistry. – Karaganda: 2015. – 144 p.
- 16 Григорьева Л.В. Энтеровирусы во внешней среде. - М.: 1968. - 287 с.
- 17 Лябина Л.М., Соминина А.А., Черенковская И.А. и др. Методические рекомендации по работе с клеточными культурами и средами. – Ленинград: 1975. – 41 с.
- 18 Алиев Н.Н., Курбанов С.М., Асадова А.И. и др. Использование ряда лекарственных растений в лечении и профилактики острых респираторных заболеваний. – Баку: 2000. – 8 с.

A.N. Aleskerova<sup>1</sup>, N.N. Aliev<sup>2</sup>, S.V. Serkerov<sup>1</sup>, L.I. Rustamova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Azerbaijan, Baku, Azerbaijan;

<sup>2</sup>The National Research Institute of Medical Prophylaxis named after V. Akhundov, Baku, Azerbaijan

#### COMPONENT COMPOSITION AND ANTIVIRAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL OF ARTEMISIA ISSAYEVII RZAZADE

**Resume:** In the conditions of an increase in viral infections in human pathology, the search for new drugs of virucid action acquires increased urgency. The virucid effect is especially characteristic of polyphenols, flavonoids, saponins and essential oils. Essential oils of various species of the genus *Artemisia L.* are widely used as a disinfectant, antiparasitic, wound-healing, fungicidal agent, as well as for aromatization of food products, in the perfumery, cosmetics and medical industries.

The results of the study of the component composition and antiviral activity of the essential oil of the endemic species *Artemisia issayevii* Rzazade are presented for the first time. It was found that the alcoholic-aqueous solution of essential oil of this type of wormwood suppresses the cytopathic effect of non-fluorescent viruses in cell culture by 50% in 72 samples, 25% in 40 and 75% in 13 samples. Antiviral activity in the native form of an alcohol-aqueous solution of essential oil *Artemisia issayevii* Rzazade was detected.

The main components of essential oil *Artemisia issayevii* are (in%) camphor 37 and 1.8 cineol 31. The further purpose of the study was to study the effect of essential oil diluted in 10-1, 10-2, 10-3, 10-4, 10-5 degree to neutralize the cytopathic effects of non-fluenteric viruses in the primary cell culture.

**Keywords:** *A. issayevii*, wormwood, essential oil, chromat-mass-spectroscopy, nonpolio- enterovirus.