

Эгэл бавран (*pteridium aquilinum (L.) Kuhn*)-гийн бэлдмэлийн дэлүүний эсийн хуваагдлыг олшруулах идэвхийг судалсан дүн

Пунсанцогвоогийн Отгонсугар*[✉], Цэрэндоржийн Ундрахбаяр, Өлзийбаатарын Отгонжаргал, Хишигийн Сэлэнгэ, Тумбаагийн Ундармаа, Цээсүрэнгийн Бямбажав

Эм, хор судлалын лаборатори, Мал эмнэлгийн хүрээлэн, ХААИС, Зайсан 17024, Улаанбаатар

*Холбоо баригч зохиогч: Sugaraa.p@gmail.com

 - <https://orcid.org/0000-0001-7108-2208>

Хүлээн авсан: 14.10.2020	Хянасан: 16.01.2021	Хэвлэлтэд орсон: 15.02.2021
--------------------------	---------------------	-----------------------------

Хураангуй

Өрнө, Дорнын анагаах ухаан болон хүнсэнд хэрэглэгдэж ирсэн Эгэл бавран (*Pteridium aquilinum (L.) Kuhn*) нь судлаачдын сонирхлыг ихээхэн татаж ирсэн билээ. Энэ нь түүнд агуулагдах норсесквитерпений бүлгийн гликозид болох птаквиклозид нь хорт хавдар үүсгэдэг (канцероген)-тэй холбоотой юм. Бид Эгэл бавранг уламжлалт аргаар номхотгол хийж, Өндөр мэдрэмжит шингэний хроматографиар птаквиклозидын хэмжээг тодорхойлоход номхотгосон дээжинд 0.41 мкг/г, номхотгоогүй дээжинд 10.06 мкг/г хэмжээтэй птаквиклозид агуулагдаж байсан юм. Тиймээс номхотгол хийсэн дээжний дархлаанд үзүүлэх нөлөөг *in vitro* орчинд Balb/c үүлдрийн цагаан хулганы дэлүүний эсийг олшруулах идэвхээр МТТ өнгөт урвалын аргаар судлан тогтоов. Митоген буюу Con A-тэй үүрний эсийн амьдрах чадварын индекс нь 231,4, загвар бэлдмэлтэй үүрний эсийн амьдрах чадварын индекс 233,7 байгаа нь хяналтын бүлэгтэй ойролцоо дүн үзүүлсэн байна. Харин бэлдмэлийг митогентэй хамт хэрэглэхэд эсийн амьдрах чадварын индексийг хамгийн их нэмэгдүүлж байна.

Түлхүүр үг: птаквиклозид, дэлүүний эс, МТТ өнгөт урвалын арга, номхотгол

Оршил

Монголын уламжлалт анагаах ухаанд тамир тэнхээ дээшлүүлэх, хоол боловсруулах эрхтний үйл ажиллагааг сайжруулах, үрэвсэл болон шарх эдгэрүүлэх зэрэг зорилгоор Эгэл бавран (*Pteridium aquilinum (L.) Kuhn*)-г хэрэглэж ирсэн билээ [1, 2]. Энэхүү ургамалд норсесквитерпений бүлгийн гликозид болох птаквиклозид агуулагддаг бөгөөд энэ нь канцероген [3, 4, 5, 6] болохыг судлаачид тогтоосон байдаг. Гэсэн хэдий ч Монгол, Төвдийн уламжлалт эмийн жорын найрлаганд

ордог [2], Ази, Европын улс орнуудад Эгэл баврангийн залуу нахиаг хүнс болон эмийн зүйлд өргөн хэрэглэдэг [1, 2, 3] нь бидний сонирхлыг ихээр татсан юм. Тиймээс бид Эгэл бавранг уламжлалт аргаар номхотгож түүнд агуулагдах птаквиклозидын хэмжээг 0.41 мкг/г болтол нь бууруулсан юм. Энэхүү судалгаагаар номхотгосон эгэл баврангийн дархлаанд үзүүлэх нөлөөг *in vitro* орчинд дэлүүний эсийг олшруулах идэвхээр судлах зорилго тавин ажиллав.

Судалгааны хэрэглэгдэхүүн, арга зүй

Сэлэнгэ аймгийн Ерөө сумын нутгаас (49°27'25''N, 107°16'22''E) 2018 оны 6-р сард Эгэл баврангийн газрын дээд хэсгээс түүхий эд бэлтгэх фармакогнозын аргын дагуу түүсэн бөгөөд ургамлын зүйлийг МУБИС-ийн багш, профессор Ц. Дариймаа тодорхойлов (Ваучер № 20180610).

Туршилтанд Мал эмнэлгийн хүрээлэнгийн виварт нэг төрлийн хооллолт, арчилгаа маллагаанд маллаж байгаа Balb/c үүлдрийн цагаан хулганы дэлүүг ашигласан бөгөөд Туршилтанд амьтан хэрэглэх ёс зүйн журмын хяналтын зөвлөлийн зөвшөөрөл (Бүртгэлийн № МЭБУС-19/01/17)-өөр гүйцэтгэсэн болно.

Дээж боловсруулалт

Энэ ургамлын дээжийг хүнсний зориулалтаар бэлтгэх хугацаа маш богино бөгөөд цухуйж эхэлснээс хойш ердөө 3-4 хоногийн настай залуу нахиаг түүж (Дээж 1) авсан даруйдаа буцалж

Өндөр мэдрэмжит шингэний хроматографийн арга:

Эгэл баврангийн дээжинд агуулагдах птаквиклозидын хэмжээг (стандарт бодисоор Pterosin B (Phubchem, USA)-г ашиглан) Алонсо-Амелотын /1992/ аргаар өндөр мэдрэгт шингэний хроматографиар тодорхойлов. Үүнд: Хроматографийг C18 /4,6mm x 250mm/ баганаар 260 нм /UV detector/ долгионы уртад 40%

байгаа хүнсний сод (Na₂CO₃)-ыг 100 мл-д 10г байхаар тооцож усанд хийж, буцалгах аргаар номхотгол (Дээж 2) хийж, өндөр мэдрэмжит шингэний хроматографи [4]-аар номхотголын аргын мөн чанарыг баталгаажуулав.

метанол 0-2 минут, 40-80% метанол 2-15 минут, 80-40% метанол 15-16 мин, 40% метанол 16-25 минут тус бүр хөдөлгөөнт фазыг ашиглан, 1 мл/мин урсгалын хурдтай гүйлгэсэн болно. Стандарт бодис Pterosin B-г 5, 20, 50, 100, 200 мкг/мл-ээр шингэрүүлэлт хийн гүйлгэж, пикийн талбайн хэмжээгээр жиших муруйг байгуулж дараах томьёонд орлуулан тоон утгыг бодож гаргав.

$$\frac{\left[\frac{\text{стандарт бодисын(мкг/мл)} \cdot 1.0\text{мл} \cdot 200\text{мл}}{25\text{мл}} \right]}{10\text{г}} = \text{мкг/г птерозин В} \cdot 1,83$$

$$= \text{мкг/г птаквиклозид}$$

МТТ өнгөт урвалын арга

Бэлдмэлийн дархлаанд үзүүлэх нөлөөг *in vitro* орчинд дэлүүний эсийг олшруулах идэвхээр судлав. Ингэхдээ МТТ өнгөт урвалын аргаар (Нон нар, 2012) Роше фермийн эс олшруулах кит (Cell Proliferation Kit (МТТ)) ашиглан гүйцэтгэв. Туршилтанд 60 хоногийн настай, эр, 25,3 г жинтэй Balb/c үүлдрийн цагаан хулганыг ашиглав. Хулганыг эвтанализаци хийж, дэлүүг ариун петрийн аяганд 1 мл RPMI шингэн тэжээлт орчинд хийж, дэлүүний эсийн суспенз бэлтгэж, 0,4%-ийн аммоны хлоридоор улаан эсийг задлав. 1200 эрг/минд 4⁰С-д 8 минут центрфугдэж, тунадасыг 10%-ийн тугалын хээлийн ийлдэс (FBS)-ээр баяжуулсан шингэн тэжээлт орчинд хийж 6 үүртэй эсийн өсгөврийн хавтанд хийж

5%-ийн CO₂ бүхий 37⁰С-т 2 цаг инкубацлана. Наалдаагүй эсийн өсгөврийг авч 24 үүртэй хавтанд хийж дээрээс нь RPMI бүхий дээжнүүд (бэлдмэлгүй эсийн үүр, стандарт Con A, туршилтын бэлдмэлтэй, Туршилтын бэлдмэл+ Con A)-ийг 0,71мкг/мл байхаар бодож хийгээд 5%-ийн CO₂, 37⁰С-т 1 цаг инкубацлав. Орчныг асгаж, угаагаад, үүр бүрт 5x10⁵ эс байхаар бодож хавтанд хийж, 5%-ийн CO₂ бүхий 37⁰С-т 24 цаг инкубацлаад, 21 дахь цагт МТТ уусмалаас үүр бүрт 10 мкл, 24 дахь цагт изопропаналын хүчил 100 мкл-ийг хийж тасалгааны температурт харанхуй орчинд 1 цаг тавиад 570 нм-т ФХЭБУ-ын хавтан уншигчид уншуулж, үр дүнг дараах томьёогоор тооцов [4].

$$\text{Эсийн амьдрах чадвар} = \frac{\text{Туршилтын бүлгийн гэрлийн шингээлт}}{\text{Хяналтын бүлгийн гэрлийн шингээлт}} \cdot 100$$

Судалгааны ажлын үр дүн

Бид судалгаанд ашиглах дээжээ ургалтын эхний шатанд буюу бундуулалтын үеийн дээж (Дээж 1)-ийг фармакогнозын нийтэд дэлгэрсэн аргаар болон номхотгол (дээж 2)-ын аргаар боловсруулан, номхотголын аргын мөн чанарыг Өндөр мэдрэмжит шингэний хроматографийн аргаар баталгаажуулав.

Өндөр мэдрэмжит шингэний хроматографийн дүн

Стандарт бодисын шингэрүүлэлтүүдэд илэрсэн пикийн дундаж хугацаа Rf=16,116 минут байлаа. Дээжнүүдийг арга зүйн дагуу бэлдэж гүйлгэхэд Rf буюу илэрсэн хугацаа нь стандарт бодисынхтой ижил байсан бөгөөд, пикийн талбайн хэмжээгээр концентрацийг олж, тоон утгыг бодож гаргав (хүснэгт 1).

Table 1.

The content of ptaquiloside in samples

№	Дээжний нэр	Дээжний боловсруулалт	Птаквиклозидын хэмжээ (мкг/г)
1	Дээж 1	Фармакогнозын аргаар түүхий эдийг боловсруулсан	10.06±0.01
2	Дээж 2	Номхотгосон	0.41±0.02
3	Р		***

p<0.001

Дээрх хүснэгтээс харахад бидний сонирхож буй номхотгосон дээжинд агуулагдах птаквиклозидын хэмжээ номхотгоогүй дээжнээс 24.5 дахин багассан байна. Тиймээс номхотгосон дээжний дэлүүний эсийг олшруулах идэвхийг МТТ өнгөт урвалын аргаар судлав.

МТТ өнгөт урвалын үр дүн Бэлдмэлийн дэлүүний эсийг олшруулах идэвхийг МТТ өнгөт урвалын арга (Hou нар, 2012) аар судлав. Ингэхдээ Роше фермийн эс олшруулах кит (Cell Proliferation Kit (МТТ)) ашиглан гүйцэтгэв (Хүснэгт 2). Митогенээр стандарт Con A буюу Т лимфоцитын хуваагдлыг өдөөгч (Sigma Aldrich) –г ашиглав.

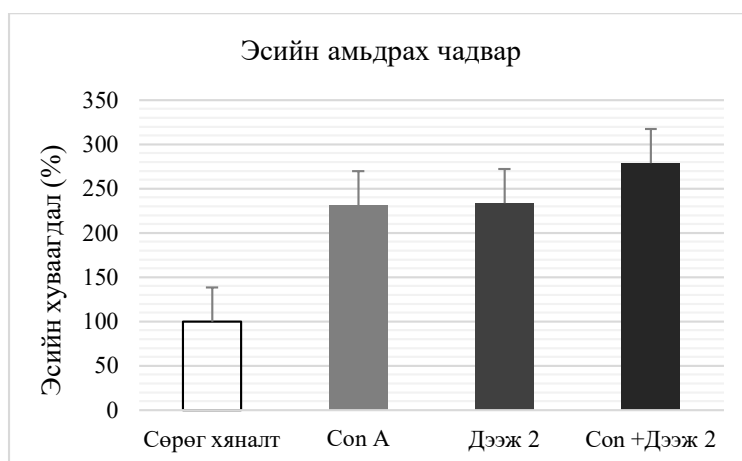


Figure 1. Cell viability results

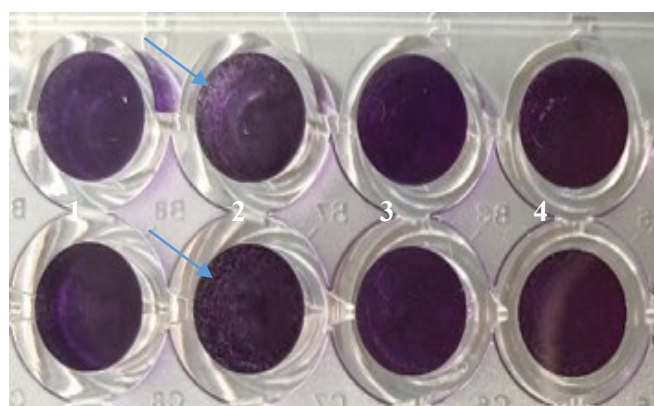


Figure 2. Formation of formazan

(1. Сөрөг хяналт, 2. Con A, 3. Дээж 2, 4. Con A+Дээж 2)

Митоген буюу Con A-тэй үүрний эсийн амьдрах чадварын индекс нь 231,4, загвар бэлдмэлтэй үүрний эсийн амьдрах чадварын индекс 233,7 байгаа нь хяналтын бүлэгтэй ойролцоо дүн

үзүүлсэн байна. Харин бэлдмэлийг митогентэй хамт хэрэглэхэд эсийн амьдрах чадварын индексийг 278,6 буюу хамгийн их нэмэгдүүлж байна.

Шүүн хэлэлцэхүй

Эгэл бавранд норсесквитерпений бүлгийн гликозид болох птаквиклозид (канцероген) агуулдагддаг болохыг анх 1983 онд Япон улсын эрдэмтэн Ямада нарын судлаачид [3] илрүүлж, шинж чанарыг нь тодорхойлсон байдаг. Хэвлэлийн тоймоос харахад птаквиклозид нь дархлаа дарангуйлах үйлдэлтэй [3, 4, 5, 6] гэдэг нь тогтоогдсон хэдий ч Ази (Япон, Солонгос, Хятад) болон Европ (Болгар, Герман, Шинэ Зеланд)-ын улс орнуудад Эгэл баврангийн залуу нахиаг түүсэн даруйдаа шүлтлэг халуун усанд хийж буцалгах, түүнийгээ огцом хөргөх, сойх, хатаах юмуу нойтноор, мөн давсаар даршилах зэргээр боловсруулан хүнсэндээ хэрэглэдэг [3,]. Энэ боловсруулалт нь эмийн түүхий эдийг номхотгох манай уламжлалт аргын мөн чанартай [7] адилхан байна. Харин номхотгол хийсэн дээжний дархлаанд үзүүлэх нөлөөг судалсан судалгаа хараахан олдоогүй байна. Бидний номхотгосон дээжин дэх птаквиклозидын хэмжээ 24,5 дахин буурсан мөн эсийн амьдрах чадварын индекс стандарт бүлэгтэй ойролцоо

дүн үзүүлсэн зэргийг номхотголын аргын мөн чанартай холбон ойлгож байна. Номхотголыг Монгол эмийн судар, номонд “Эмийн түүхий эдэд номхотгол хийхийн гол зорилго нь эмийн эрдэм, чадлыг сайжруулах, хортой бодисыг номхруулах ба бие махбодод үзүүлэх сөрөг үйлдлийг дарахад чиглэгдсэн, эмчилгээний идэвхийг нэмэглүүлэх” гэсэн байдаг [7]. Байгалийн тодорхой бодисууд нь лимфоцитын хуваагдан олшрох үйлийг өдөөдөг ба эдгээрээс хамгийн чухал нь ургамлаас гаргаж авсан лектин уураг бөгөөд Конканавалин (Con A) нь лектин уургийн гол төлөөлөгч юм. Con A нь Т лимфоцит эсийн хуваагдлын өдөөдөг бөгөөд лимфоцитын мембрантай холбогдсоноор нуклейн хүчил, фосфолипид, ДНХ-ийн нийлэгжилтийг өдөөдөг болохыг судлаачид тогтоосон байдаг [8, 9, 10]. Эгэл баврангийн бэлдмэл нь хяналтын бүлэг буюу Con A-тэй ойролцоо дүн үзүүлсэн нь Т лимфоцитын хуваагдлыг дээрх механизмтай адил үйлчлэлээр нэмэгдүүлж байж болох юм гэж үзлээ.

Дүгнэлт

1. Эгэл бавран (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn)-гийн түүхий эдийг бэлтгэх явцад номхотгол хийсэн дээжинд агуулагдах птаквиклозидын хэмжээ номхотгол хийгээгүй дээжтэй харьцуулахад 24.5 дахин багассан байна.
2. Эгэл баврангийн бэлдмэл стандарт Конканавалин (Con A)-тэй ижил дүн үзүүлсэн нь дэлүүний эсийг олшруулах идэвхитэй байгааг харуулж байна.

Ашигласан бүтээлийн жагсаалт:

- [1] Бадамханд Ж “Монгол орны зонхилох ургамлын лавлагаа” УБ, 2014. 312-319х
- [2] Лигаа У, Даваасүрэн Б, Нинжил Н “Монгол орны эмийн ургамлыг өрнө, дорнын анагаах ухаанд хэрэглэхүй” УБ, 2005. 66-67х
- [3] Marie Geary “Bracken” 1995. 10-15р
- [4] Latorre A.O, Caniceiro B.D, H.L.Wysocki Jr, M.Haraguchi, D.R. Gardner, S.L.Gorniak “Selenium reverses *Pteridium aquilinum*-induced immunotoxic effect” Food and Chemical Toxicology 49 (2011) 464-470
- [5] Andréia Oliveira Latorre1, Maria Stella Furlan2, Mônica Sakai1, Heidge Fukumasu, Isis Machado Hueza1, Mitsue Haraguchi3, and Silvana Lima Gorniak1. Immunomodulatory effects of *Pteridium aquilinum* on natural killer cell activity and select aspects of the cellular immune response of mice. Journal of Immunotoxicology, 2009; 6(2): 104–114
- [6] Lars Holm Rasmussen, Bjorn Schmidt, Elizabeth Sheffield “Ptaquiloside in bracken spores from Britain” Chemosphere 90 (2013) 2539-2541
- [7] Лувсан, “Монгол эмийн номхотгол судлал” 1989. 11-13х
- [8] Ёндондорж А, Шийлэгдамба А, Цэрэннадмид А “Мал эмнэлгийн дархлаа судлалын үндэс” Улаанбаатар, 2008. 84-85х
- [9] Болормаа П “Шинэсэрхүү бударгана (*Salsola laricifolia* Turcz.ex.Litu), Хуурмаг булчирхайт ортууз (*Oxytropis pseudoglandulosa* Gontsch) –ын иммуотроп үйлдлийн фармакологи судалгаа” Мал эмнэлгийн ухааны дэд

- докторын зэрэг горилсон нэг сэдэвт зохиол. Улаанбаатар, 1996.
- [10] Долгорсүрэн Ц “Саалийн үнээний үргүйдэл, сувайралтаас сэргийлэх
- [11] биоидэвхит эхэсийн бэлдмэлийн технологи” Мал эмнэлгийн ухааны докторын зэрэг горилсон бүтээл УБ, 2017. 42-44х

Result of splenocyte proliferation assay of preparation of *Pteridium aquilinum*

Otgonsugar Punsantsogvoo[✉], Undrakhbayar Tserendorj, Otgonjargal Ulziibaatar, Selenge Khishig, Undarmaa Tumbaa, Byambajav Tseesuren

Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Institute of Veterinary Medicine, Mongolian University of Life Sciences, Zaisan 17024, Ulaanbaatar, Mongolia

*Corresponding author: Sugaraa.p@gmail.com

 - <https://orcid.org/0000-0001-7108-2208>

Хүлээн авсан: 14.10.2020

Хянасан: 16.01.2021

Хэвлэлтэд орсон: 15.02.2021

Abstract

Bracken (*Pteridium aquilinum*, *L. Kuhn*), which is used widely in the Eastern and Western medicine and food, has attracted researchers interest. It is related with norsesquiterpene glucoside ptaquiloside, which is carcinogen, contained in the bracken. We quantitatively determined ptaquiloside in the subdued bracken, which is a way of decreasing or inactivating toxic effect and increasing the treatment activity in raw material of drug. The results showed the ptaquiloside was present in both samples, with sample 1 of 10.06 ug/g and with a minimum of 0,41ug/g in subdued sample 2. Therefore, the aim of the present study was to evaluate subdued sample 2 splenocyte proliferation assay using by MTT kit and splenocyte from Balb/c mice. MTT assay showed cell viability index of group of Con A was 231,4 and cell viability index of preparation group was 233,7. Also, the group of Preparation with Con A was showed the high ability stimulate.

Keywords: Ptaquiloside, splenocyte, MTT colorimetric assay, subdue