



Үнээний эхэсийн хандны үрэвслийн эсрэг идэвх болон дархлаанд үзүүлэх нөлөөг судласан дүн

Н.Лхагвасүрэн¹, Б.Баяр-Энх¹, Г.Сайнбилэг⁴, Э.Үен¹, Ч.Цэвгэдорж¹, П.Чимгээ²,
Б.Дэжидмаа³, **Б.Батсайхан¹**, Ц.Долгорсүрэн^{1*}

1-Мал эмнэлгийн хүрээлэн, ХААИС

2-Монгол-Хятадын хамтарсан молекул биологийн хэрэглээний лаборатори,

3-Уламжлалт анагаах ухаан, технологийн хүрээлэн,

4-Мал эмнэлгийн сургууль, ХААИС

*Холбоо баригч зохиогч: dolgorsuren.ivm@gmail.com

ХУРААНГУЙ

Эхэс гэх эмийн түүхий эдийг дэлхийн олон эрдэмтэд бүтэц, физиологи, найрлага, биологийн идэвхт пептид ялган авч тэдгээрийн эмчилгээний идэвхийг судлаж улмаар хүн, мал, амьтны эрүүл мэнд, гоо сайханд хэрэглэх эм, биобэлдмэл гарган авах чиглэлээр олон талаас нь судалгаа, туршилтын ажлыг хийж байна. Энэхүү судалгааны зорилго нь үнээний эхэсээс хагас цэвэршүүлсэн уураг ялган антиоксидант идэвх, дархлаанд үзүүлэх нөлөөг *in vitro* орчинд судлах, үрэвслийн эсрэг идэвхийг туршилтын амьтны эмгэг загварт туршихад оршино. Эхэсийн ханд бэлтгэхдээ фосфатын буфер, Трис-НСI, нэрмэл усаар жигдрүүлж (гомогенизаци), цаашид тус бүр нэрмэл ус, ацетон, этанол, сульфат аммоны давс ашиглан 4 аргаар тундасжуулж хандлан гель хроматографийн аргаар хагас цэвэршүүлсэн уураг ялган авав. Хагас цэвэршүүлсэн уургийн антиоксидант идэвхийг DPPH чөлөөт радикал саармагжуулах урвалаар, дархлаанд үзүүлэх нөлөөг MTT assay kit ашиглан, үрэвслийн эсрэг идэвхийг 1%-ийн Каррагининаар өдөөсөн хархны сарвуунд шүүдэст үрэвслийн эмгэг загвар үүсгэн тус тус судлав. Хагас цэвэршүүлсэн уургийн концентрацийг тодорхойлоход фосфатын буферээр жигдрүүлж, ацетаноор тундасжуулсан хувилбарт уургийн хэмжээ хамгийн их 6217.5 мкг/мл, фосфатын буферээр жигдрүүлж, сульфат аммоны давсаар тундасжуулахад уургийн хэмжээ хамгийн бага 1477.4 мкг/мл байв. Үнээний эхэсийн хандны DPPH чөлөөт радикал саармагжуулах идэвх 55.1±1.2%, стандарт бодис Рутин 67.1±1.2% байсан бол дархлаанд үзүүлэх нөлөө үнээний эхэсийн ханд нэмсэн бүлгийг хяналтын бүлэгтэй харьцуулхад эс хуваагдлын индекс 1.45 буюу 1.5 дахин их, митоген нэмсэн бүлэгтэй харьцуулахад эс хуваагдлын индекс 1.08 буюу 0.8 дахин их буюу бараг адил хэмжээнд байлаа. 1%-ийн Каррагининаар үүсгэсэн хархын сарвууны шүүдэст үрэвсэлд үнээний эхэсээс ялгасан хагас цэвэршүүлсэн уураг нь үрэвслийн хаванг бууруулах нөлөөтэй ба үнээний эхэсийн ханд нь үрэвслийн эсрэг идэвхтэй байгаа нь тогтоогдов.

ТҮЛХҮҮР ҮГ: Уураг, каррагинин, антиоксидантидэвх, шүүдэст үрэвсэл, хроматограф

ОРШИЛ

Linzer, Fisher, [1] нарын мэдээлснээр эхэс нь юуны өмнө эх ба ургийн цусны эргэлтийн хооронд бодис солилцооны болон хийн төлөвтэй бүтээгдэхүүнийг урагт дамжуулдаг. Энэ нь ургийг хүчилтөрөгч, шимт бодисуудаар хангах үүрэгтэй түр зуурын эрхтэн юм. Нөгөө талаар эхэс олон төрлийн даавар нийлэгжүүлэн ялгаруулдаг дотоод шүүрлийн булчирхайн үүрэг гүйцэтгэнэ. Эхэст нийлэгжиж, ялгарах дааврууд нь ургийн хэрэгцээг хангах, мөн төрсний дараа үр төлийн хэрэгцээг хангах, эхийн биед гарах физиологийн өөрчлөлтийг нөхцөлдүүлж өгдөг. Дээрх

өөрчлөлтүүд нь эхийн бие махбод дахь олон тогтолцоонд нийтлэг байх ба гол төлөв цусанд ялгарсан даавруудын нөлөөгөөр зохицуулагддаг. Эдгээр дааврын нэг хэсэг нь бие гүйцсэн хээлгүй эмэгчин амьтдын цусанд янз бүрийн хэмжээтэй агуулагдах нь элбэг байхаас гадна нөгөө хэсэг нь зөвхөн хээлтэй үед л нийлэгжин ялгардаг онцлогтой ажээ. Энэ нь хээл ургийн хөгжлийг бүрэн хангаж өгөхөд эхэсийг зайлшгүй шаардлагатай нэг чухал дотоод шүүрлийн эрхтэн болоход хүргэдэг байна[3-5][8][9][13-16][21][26].

Сүүлийн үед биоидэвхт пептидийн судалгаа эрчимтэй хөгжиж байгаа бөгөөд маш олон төрлийн биоидэвхит пептидийг сүү, сүүн бүтээгдэхүүн, амьтан, ургамлын уураг болон микробоос *in vitro* орчинд тэжээл боловсруулах замын фермент ашиглан уургийг задлах аргаар гарган авч байна. Төрөл бүрийн эх үүсвэрээс гарган авсан пептидийн бие махбодод үзүүлэх эмчилгээний идэвхийг *in vitro* болон *in vivo* орчинд туршиж олон төрлийн өвчний үед хэрэглэх боломжтойг тогтоосон байна. Биоидэвхт пептидийн эмчилгээ, сэргийлэлтийн идэвх нь пептидийн амин хүчлийн бүрэлдэхүүн, дараалал, пептидийн молекул жингээс хамааралтай гэж үздэг байна. Иймээс тэжээлийн нэмэлт пептидийг гарган авч амин хүчлийн дарааллыг тогтоож хэрэглэснээр хүн, амьтны байгалийн дархлааны

хамгаалалтыг нэмэгдүүлэх замаар эрүүл мэндийг дэмжиж, болзошгүй өвчний эрсдлийг бууруулах судалгаа сүүлийн жилүүдэд шинжлэх ухааны салбарын сонирхолыг маш их татах болсон. Нянгийн эсрэг, антиоксидант идэвх, цусны бүлэгнэлтийн эсрэг, артерийн даралт бууруулах болон дархлаа тэтгэх зэрэг эрүүл мэндэд үзүүлэх ашигтай нөлөө нь пептидийн нуклеотидийн дараалалтай холбоотой байж болох юм [20; 22; 24]. Судлаачдын үзэж байгаагаар идэвхтэй амин хүчлийн дарааллын хэмжээ 2-20 амин хүчлээс тогтсон байх магадлалтай нь олон судалгааны үр дүнгээс харагдаж байгаа юм [12].

Иймээс бид үнээний эхэсийн хагас цэвэршүүлсэн уургийн зарим биологийн идэвхийг судлах нь бидний судалгааны ажлын үндэслэл юм.

СУДЛАГААНЫ ХЭРЭГЛЭГДЭХҮҮН, АРГА ЗҮЙ

Үнээний эхэсийн ханд бэлтгэх арга

Бид 2016-2018 оны хооронд Улаанбаатар хот орчмын Налайх дүүрэг, Өлзийт хороолол, Төв аймгийн Архуст, Баяндэлгэр сумдын саалийн үнээний эрчимжсэн аж ахуйгаас тугалласан үнээний эхэсийн дээж цуглуулав.

Үнээний эхэсийг жижиглэн машиндаж нэрмэл ус, фосфатын буфер, Трис-НСI гэсэн 3 аргаар жигдрүүлэлт хийж, ацетон, этанол, сульфат аммоний давсаар тундасжуулах, нэрмэл усанд хандлах гэсэн 4 аргыг тус тус уураг ялгахад ашиглав. Жигдрүүлэхэд тус бүр 300 гр эхэс авсан бөгөөд эдгээр туршилтыг хэд хэдэн давталттай гүйцэтгэв[23].

Эхэсийн уургийн молекул жин тодорхойлох арга

Дээрх хувилбаруудаар хандлан, тундасжуулж гарган авсан дээжүүдэд агуулагдах уургуудын молекул жинг полиакриламид гель электрофорезийн урвалыг U.K.Laemmli (1970) нарын арга зүйн дагуу 15%-ийн доод гель, 5%-ийн дээд гель бэлтгэн уургийн дээжинд дээж ачаалагч буфер нэмж 95°C-т 5 минут буцалган үүр тус бүрт 25мкл дээж хийж 1.6кДа – 26.6 кДа молекул жинтэй уургийн маркер (SIGMA, Molecular Weight Marker, Saint Louis, Missouri, USA) ашиглан 80mA, 200В байхаар гүйдлийг тохируулж 1 цагийн турш гүйлгэв. Гелийг Кумасси Бриллиант Хөх R250 будгаар нийтэд хэрэглэгддэг арга зүйн будаж үр дүнг гаргав.

Үнээ, гүүний эхэсийн нийт уураг тодорхойлох арга

Үнээний эхэсийн дээжинд Pierce BCA Protein Assay kit ашиглан (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) үйлдвэрлэгчийн зааврыг баримтлан дээжинд агуулагдах нийт уургийн хэмжээг тодорхойлов.

Үнээний эхэсийн хандыг гель хроматографаар шүүж молекул жинг тодорхойлох арга

Дээжинд диализ явуулах: Гель фильтраци явуулахын өмнө давсаар тундасжуулж гарган авсан дээжинд диализ явуулж давснаас нь салгасан. Диализ мембран(WAKO 047-30941 Size 36) ашиглан нэрмэл усны эсрэг 48 цаг диализ явуулав.

Гель хроматограф: Үнээний эхэст агуулагдах уургийг хагас цэвэршүүлэн ялган авахын тулд нийтэд хэрэглэгддэг арга зүйн дагуу 90°C-т 5 цаг Трис-НСI (pH 9.0)-д хөөлгөсөн сефадекс Жи-100 (Sigma aldrich) орчинд хроматографийн 1.5/50 баганад (Econo-Column) үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу 30 мл эзэлхүүнтэй гель хроматографийн клонкийг бэлтгэв (Хүснэгт 1). Нийт 100 ширхэг тус бүр 2.0 мл эзэлхүүнтэй фракцуудыг цуглуулан харгалзах гэрлийн шингээлтийн утгыг 280 нм долгионы уртад хэмжиж хроматограмм байгуулав. Гарсан үр дүнг полиакриламид гель электрофорезийн аргаар молекул жинг тодорхойлов.

Хүснэгт 1

Гель хроматографийн баганын нөхцөл

Дээж	50 мг/мл
Дээжний эзэлхүүн	2 мл
Багана	Econo-Column- 1.5/50, сефадекс Жи-100
Буфер	Эхлэх буфер – 0.01М Трис/НСl рН=9 Угаах буфер- 0.02М NaCl, (0.45 мкм мембран фильтр)
Урсгалын хурд	0.25 мл/мин
Илрүүлэх	A ₂₈₀ нм

Хагас цэвэршүүлсэн уургийн антиоксидант идэвхийг тодорхойлох арга

Хагас цэвэршүүлсэн уургийн исэлдэлтийн эсрэг идэвхийг DPPH (2,2-diphenyl 2-picrylhydrazyl) чөлөөт (Sigma-Aldrich) радикал саармагжуулах урвалаар тодорхойлов. Эхэсийн ханднаас 0.1 мл-ийг авч дээр нь 0.4 мМ DPPH байхаар бодож найруулсан метанолын уусмалаас 0.4 мл нэмж холиод, холимгоо сайтар сэгсэрч, харанхуйд 37°C-д 30 минут дулаан тогтоогуурт байлгасны дараа, 0.4 мМ DPPH радикалын концентрацитай метанолын уусмалыг хяналт болгон 517 нм спектрофотометрт хэмжив.

Стандарт уусмал болгон исэлдэлтийн эсрэг идэвхтэй Рутин (кверцетин-3-рутинозид) 0.1 мл-ийг авч дээр нь 0.4 мМ DPPH байхаар бодож найруулсан метанолын уусмалаас 0.4 мл нэмж холиод, дээрхи арга зүйн дагуу спектрофотометрт хэмжив.

Үр дүнг дараах томъёогоор тооцов.
(AA%) = $\frac{(A_{\text{хяналт}} - A_{\text{дээж}})}{A} \times 100$

- AA% - исэлдэлтийн эсрэг идэвх буюу чөлөөт радикал саармагжуулах идэвх (%)

- A_{хяналт} – DPPH чөлөөт язгуурын шингээлт

- A_{дээж} – дээжний шингээлт

- A - хяналтын шингээлт

Хагас цэвэршүүлсэн уургийн дархлаанд үзүүлэх нөлөөг тодорхойлох арга

Дэлүүний эс олшруулах өнгөт урвалын аргаар Роше фермийн (Cell Proliferation Kit I (MTT)) кит

ашиглан үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу урвалыг явуулав.

Хагас цэвэршүүлсэн уургийн үрэвсэлд үзүүлэх нөлөөг судлах арга

Туршилтанд МЭХ-ийн виварт үржүүлж буй 200-220 грамм жинтэй 30 толгой Вистар үүлдрийн харх сонгон авч гэжээллэг, маллагааны хэвийн нөхцөлд туршилтыг ашиглав. Энэхүү туршилтыг Мал эмнэлэг, био-анагаах ухааны судалгаанд туршилтын амьтан хэрэглэх ёс зүйн хяналтын зөвлөлийн зөвшөөрлөөр (МЭБУС-19/01/03) гүйцэтгэв.

1%-ийн каррегининаар өдөөсөн хархны сарвууны шүүдэст үрэвслийн эмгэг загвар үүсгэж хяналт (1-р бүлэг), үнээний эхэсийн уураг 30 мг/кг (2-р бүлэг), үнээний эхэсийн уураг 60 мг/кг (3-р бүлэг), сөрөг хяналт буюу деклофенак бэлдмэл 10мг/кг (4-р бүлэг)-аар тус тус хархны сарвуунд тарьж эмгэг загвар үүсгэн үрэвслийн хавангийн хэмжээг UGO BASILE plytesmometer багажаар 0, 30, 60, 120, 180, 240, 300 минутын давталтайгаар хэмжиж үр дүнг тооцов.

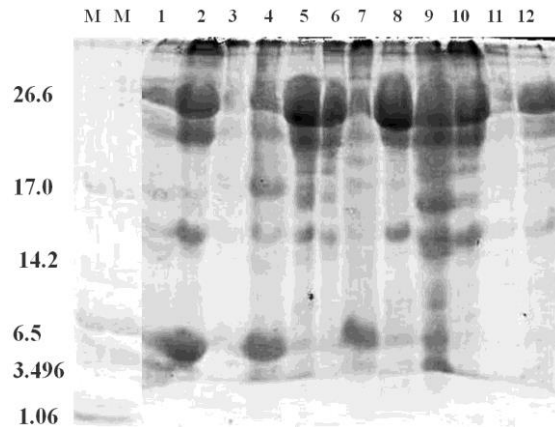
Статистик боловсруулалт

Судалгааны ажлын үр дүнг биостатистикийн үндсэн аргуудаар арифметик дундаж (M), стандарт хазайлт (δ), стандарт алдаа (m), дундаж тооны үнэн магадлалыг Стьюдентийн t шалгуураар шалган, боловсруулалтыг SPSS 16.0 программ ашиглан боловсруулалтыг хийв.

СУДАЛГААНЫ АЖЛЫН ҮР ДҮН**Үнээний эхэсийн хандуудад уураг тодорхойлсон дүн**

Арга зүйд заасны дагуу үнээний эхэсийг 3 аргаар жигдрүүлж, гарган авсан хэсэг тус бүрийг 4 өөр аргаар хандлан тундасжуулж уураг ялгах

туршилтыг хэд хэдэн давталттай гүйцэтгэж, гарсан дээжүүдэд полиакриламид гель электрофоррез явуулан уургийн молекул жинг тодорхойлов.



Зураг 1. Эхэсийн дээжний уургийн электрофореграмм. М- жишиг уураг, 1-12 уураг ялгасан хувилбарууд

Дээрхи зургаас харахад 1.06kDa-тай уургууд илрээгүй, 3.496 kDa-тай уургууд 2, 4, 7, 9-р дээжүүдэд тод, 5, 8-р дээжүүдэд бүдэг илэрсэн, 6.5kDa-тай уураг 9-р дээжинд илэрсэн, 14.2kDa-тай уургууд 4, 5, 6, 9 болон 10-р дээжинд илэрсэн бол 17.0 kDa болон 26.6 kDa жинтэй ойролцоо уургууд бүх дээжинд илэрч байв (Зураг 1).

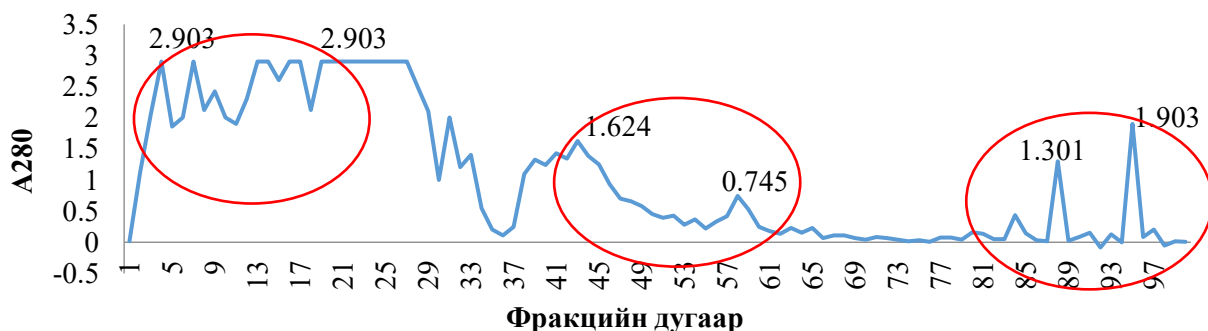
Хүснэгт 2

Үнээний эхэсийн уураг ялгаж, нийт уурагтодорхойлсон дүн

№	Хувилбарууд	Уураг (мкг/мл)
1	Нэрмэл ус-Нэрмэл ус	4916.9
2	Нэрмэл ус-Этанол	5410.9
3	Нэрмэл ус-Ацетон	3984.3
4	Нэрмэл ус-давс	3482.9
5	ФБ-Нэрмэл ус	5656.9
6	ФБ-Этанол	5905.2
7	ФБ-Ацетон	6217.5
8	ФБ-Давс	1477.4
9	Трис—Нэрмэл ус	4636.9
10	Трис-Этанол	5702.6
11	Трис-Ацетон	3515.3
12	Трис-Давс	2030.3

Дээрх хүснэгтээс үзэхэд уураг ялгасан бүх хувилбарт 1477.4-6217.5 мкг/мл хэмжээтэй уураг илэрчээ. Фосфатын буферт хандлан жигдрүүлж, ацетоноор тунадасжуулсан хувилбарт уургийн хэмжээ хамгийн их 6217.5 мкг/мл, фосфатын буферээр хандлан жигдрүүлж, давсаар уураг тунадасжуулахад уургийн хэмжээ бусдаасаа бага 1477.4 мкг/мл байв (Хүснэгт 2).

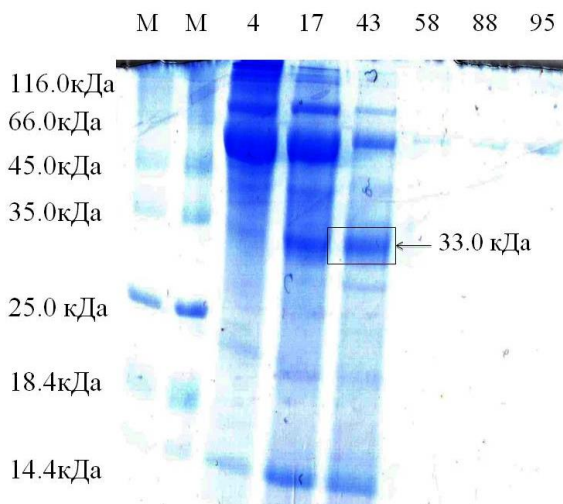
Үнээний эхэсийн хандыг гель хроматографаар шүүж молекул жинг тодорхойлсон дүн



Зураг 2. Үнээний эхэсийн хандны хроматограмм

Уургийн хольц клонкоор нэвтрэхдээ молекул жингийн дарааллаар урсан гардаг бөгөөд хамгийн түрүүнд өндөр молекул жинтэй уургууд урсан гардаг. Гель фильтрацийн хроматограммаас харахад 3 хэсэг пик өгсөн. Эхний пикд хамаарах хамгийн өндөр А280 шингээлт өгсөн 4, 17 дугаар фракц, 2-р пикийн 43, 58-р фракц, 3-р пикийн 88, 95-р фракцуудыг сонгож уургийн молекул жинг тогтоох зорилгоор гель электрофорез тавив. (Зураг 2).

Үнээний эхэсийн гель хроматографтаар шүүсэн дээжинд гель элетрофорез тавьсан дүн



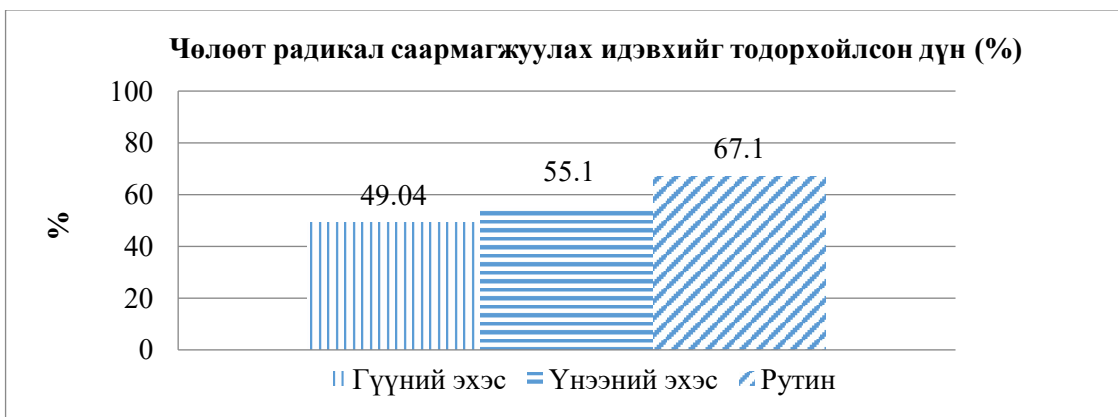
Зураг 3. Үнээний эхэсийн хагас цэвэрүүлсэн уургийн электрофорреграмм

Дээрхи электрофорреграммаас харахад 116.0 кДа-тай уургууд 4 ба 17-р дээжнээс бусдад илрээгүй, 66.0 кДа-тай уургууд 4-р дээжинд тод, 17 болон 43-р дээжүүдэд бүдэг илэрсэн, 45 кДа-тай ойролцоо буюу 50 кДа орчим молекул жинтэй уураг 4, 17-р дээжинд хамгийн их, 58-95-р дээжинд маш бүдэг илэрсэн, 35 кДа орчим молекул жинтэй уураг 17, 43-р дээжинд илэрсэн, 25 болон 18 кДа-тай уураг аль ч дээжинд илрээгүй бол 14.4 кДа-тай уураг 4, 17, 43-р дээжинд илэрсэн. Дээрх үр дүнгээс харахад 43-р дээж хамгийн цэвэршилт сайтай буюу уургийн толбууд нь салсан цөөн тооны толбо өгсөн байсан бөгөөд үнээний эхэст агуулагддаг 33.0 кДа жинтэй лактоген уургийг агуулж байж болох үндсэн дээр 43-р дээжийг сонгон авч идэвх шалгах туршилтанд ашиглав (Зураг 3).

Үнээний эхэсийн хандны антиоксидант идэвхийг шалгасан дүн

Хагас цэвэршүүлсэн уургийн исэлдэлтийн эсрэг идэвхийг *in vitro* нөхцөлд тодорхойлохдоо арга

зүйд заасны дагуу DPPH чөлөөт радикал саармагжуулах аргаар тодорхойлов. Туршилтын дүнг Зураг 4-өөр харуулав.



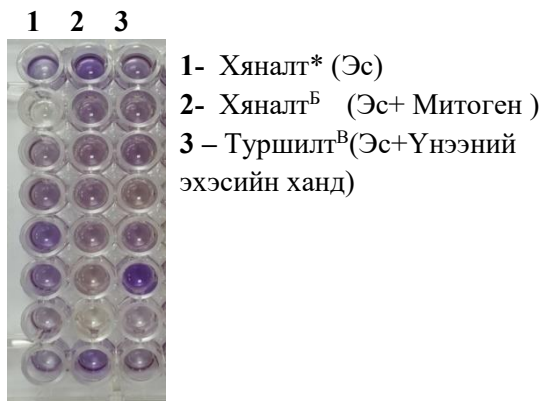
Зураг 4. Үнээний эхэсийн хандны антиоксидант идэвх тодорхойлсон дүн

Үнээний эхэсийн хандны DPPH чөлөөт радикал саармагжуулах идэвх $55.1 \pm 1.2\%$, стандарт бодис Рутин $67.1 \pm 1.2\%$ байв (Зураг 4).

Үнээний эхэсийн хандны дархлаанд үзүүлэх нөлөөг судалсан дүн

Арга зүйдзаасны дагуу бэлтгэсэн дэлүүний эсийг 96 үүртэй хавтанд RPMI орчинд 37°C-ийн 5%-ийн CO₂-той дулаан тогтоогуурт 72 цаг өсгөвөрлөсний дараа 10 мкл МТТ уусмал үүр тус бүрд хийж 37°C-д дахин 4 цаг

өсгөвөрлөсний дараа изопропоналын хүчил (0.1N HCLизопропоналын ангидрид) нэмж дулаан тогтоогуурт 37°C-т хонуулж 570 нм-т уншуулан үр дүнг тооцов.Эстэй үүр тус бүрд МТТ уусмал нэмэхэд хуваагдан олширсон эсүүд нь МТТ-тэй урвалд орж талсжилт явагдан формаган үүсэжягаан өнгө өгсөн байдал (Зураг 5).



Зураг 5. Үнээний эхэсийн хагас цэвэршүүлсэн уургийн дархлаанд үзүүлэх нөлөөг in vitro нөхцөлд туршсан дүн

Туршилтын бүлэг болох үнээний эхэсийн уураг нэмсэн бүлгүүдийг хяналтын болон митоген нэмсэн бүлгийн үзүүлэлтүүдтэй харьцуулан лимфоцит хуваагдлын индексийг гаргав (Хүснэгт 3).

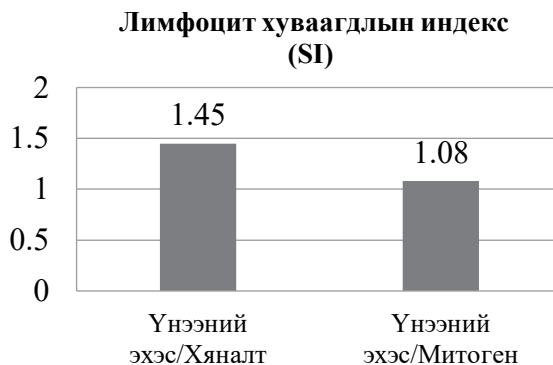
Хүснэгт 3.

Дэлүүний эс олшуурах идэвхийг ФХЭБУ-аар тодорхойлсон дүн

Хяналт* (Эс)	Туршилт** (Эс+ Митоген)	Туршилт ^A (Эс+ Үнээний эхэсийн ханд)
0.377±0.07	0.508±0.06	0.549±0.10
P<0.001	P<0.001*	P<0.001*

Бүлэг доторх дундаж үзүүлэлт, стандарт хазайлтыг ± (SD)-ээр илэрхийлэв.

Үнээний эхэсийн уураг нэмсэн бүлгийг хяналтын бүлэгтэй харьцуулхад эс хуваагдлын индекс 1.45 буюу 1.5 дахин илүү байсан бол митоген нэмсэн бүлэгтэй харьцуулахад эс хуваагдлын индекс 1.08 буюу 0.8 дахин илүү буюубараг адил хэмжээнд байв (Зураг 6).



Зураг 6. Үнээний эхэсийн хандны эсийн хуваагдалд үзүүлэх нөлөөг хяналт болон стандарт бүлэгтэй харьцуулсан дүн

Хурц үрэвслийн эмгэг загварт эхэсийн уургийн үзүүлэх нөлөөгтодорхойлсон дүн

Арга зүйд заасны дагуу хархны сарвууны шүүдэст үрэвслийн эмгэг загварыг туршилтын 4 бүлэгт үүсгэн үр дүн тооцов.

Хүснэгт 4

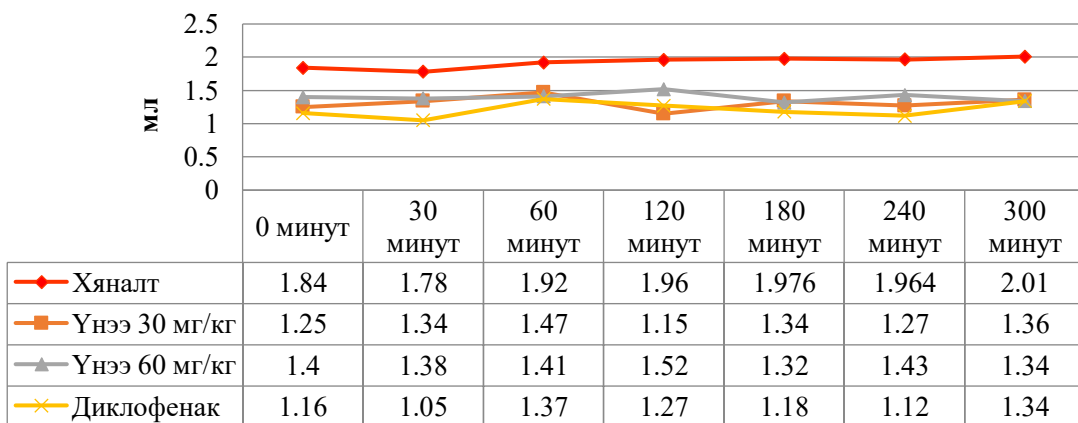
Шүүдэст үрэвслийн эмгэг загвартүнээний эхэсийн хандны үзүүлсэн нөлөө

Хугацаа	Хяналт	Үнээ 30 мг/кг	Үнээ 60 мг/кг	Диклофенак
0 минут	1.84±0.2	1.25±0.06**	1.4±0.1*	1.16±0.2***
30 минут	1.78±0.1	1.34±0.07*	1.38±0.1	1.05±0.02***
60 минут	1.92±0.05	1.47±0.1*	1.41±0.1**	1.37±0.1**
120 минут	1.96±0.04	1.15±0.04***	1.52±0.1*	1.27±0.1***
180 минут	1.976±0.04	1.34±0.2***	1.32±0.2***	1.18±0.1***
240 минут	1.964±0.1	1.27±0.1***	1.43±0.1**	1.12±0.1***
300 минут	2.01±0.05	1.36±0.1***	1.34±0.1***	1.34±0.1***

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Үнээний эхэсийн хагас цэвэршүүлсэн уураг нь туршилтын бүх хугацаанд 30 мг/кг, 60 мг/кг тунгууддаа хяналтын бүлэгтэй харьцуулахад статистикийн үнэн магадлалтайгаар туршилтын амьтны сарвуунд үүссэн хаванг бууруулах нөлөөтэй байв.

Сарвууны хавангийн хэмжээ



Зураг 7. Үнээний эхэсийн хандны шүүдэст үрэвсэлд үзүүлсэн нөлөөг судласан дүн

Туршилтын 240 дэх минутанд хэмжсэн үр дүнгээр үнээний эхэсийн уураг нь 30 мг/кг тун (1.27±0.1)-даа хяналтын бүлэг- (1.964±0.1)-тэй харьцуулахад сарвуунд үүссэн хавангийн хэмжээ нь 1.5 дахин, 60 мг/кг тун (1.43±0.1) 1.4 дахин бага байна (p<0.001) (Зураг 7).

Судалгааны дүнгээс харахад үнээний эхэсээс ялгасан хагас цэвэршүүлсэн уураг нь үзэхэд шүүдэст үрэвслийн хаванг бууруулах нөлөөтэй ба үнээний эхэсийн уураг нь үрэвслийн эсрэг илүү идэвхтэй байна.

ШҮҮН ХЭЛЭЛЦЭХҮЙ

Шинжлэх ухааны хурдацтай хөгжлийг дагаад эхэст агуулагдах идэвхт бодисуудын талаарх мэдээлэл улам дэлгэрэнгүй болж байна. Эхэс нь маш олон төрлийн бодис агуулдаг бөгөөд эдгээр нь зөвхөн эхэст агуулагддаг болох нь тогтоогдсон. Тийм ч учраас эхэсийг ашиглан янз бүрийн өвчнийг анагаах, сэргийлэх эм

бэлдмэлүүдийн үйлчилгээний хамрах хүрээ өргөн байна. Үүнд:

- Мэдрэлийн гаралтай өвчнүүдийг эмчлэх
- Дотоод шүүрэл, дааврын зохицуулга
- Элэгний үйл ажиллагааг сайжруулж, хоргуйжүүлэх
- Үндсэн бодисын солилцоог сайжруулах
- Дархлааны тогтолцоог идэвхжүүлэх

- Бие махбодын ерөнхий байдлыг сайжруулах
- Цус багадалтыг анагаах
- Ядаргаа, сульдааг арилгах

Тиймээс бид үнээний эхэсээс биоидэвхт ханд бэлтгэн исэлдэлтийн эсрэг идэвх, үрэвслийн эсрэг идэвх, дархлаа дэмжих идэвхийн судалгааг хийв. Эхэсийн нэг чухал үүрэг нь ургийг хэт исэлдэлтээс хамгаалах явдал юм [19]. Эхэсийн хандны исэлдэлтийн эсрэг шинж чанарын 59 орчим хувийг урацил, тирозин, фенилаланин, болон триптофан гэсэн амин хүчлүүд бүрдүүлж байна гэж судлаачид үздэг бөгөөд үүсмэл аспаратик хүчил болон глутамин хүчил нь өөхний хэт исэлдэлтийг бууруулах болон чөлөөт язгууруудыг саармагжуулах идэвхтэй нь судалгаагаар тогтоогдсон байна [25].

Бид үнээний эхэсийн хандны исэлдэлтийн эсрэг идэвхийг *in vitro* нөхцөлд тодорхойлох туршилтыг DPPH чөлөөт радикал саармагжуулах урвалаар тодорхойлов. Үнээний эхэсийн уургийн чөлөөт радикал саармагжуулах идэвх $55.1 \pm 1.2\%$ байсан нь Ноу нарын судлаачдын үр дүнтэй бидний судалгааны үр дүн тохирч байна. Энэ нь гидролизын аргаар гарган авсан ямааны эхэсийн хандны антиоксидант идэвх концентрациас хамааран харилцан адилгүй байсан бөгөөд DPPH чөлөөт радикалыг 85.43% хүртэл бууруулж байсантай [17; 18] бидний судалгааны үр дүн тохирч буйг харуулж байна.

Хятадын судлаачид үнээний эхэсийн усан ханднаас иммуномодулятор пептид ялган авч лимфоцит олшруулах урвал MTT assay-г ашиглан *in vitro* нөхцөлд туршилт явуулахад лимфоцит олшруулах идэвхтэй хэд хэдэн задрагууд ялгасан байна [11]. Бид эхэсийн уургийн лимфоцит олшруулах идэвхийг дээрхтэй адил нөхцөлд туршиж тогтооход дэлүүний эсийн өсгөвөрт эхэсийн уураг нэмэхэд дэлүүний эсийн хуваагдлыг хяналтын бүлэгтэй харьцуулахад 1.5-2.8 дахин, митоген (Конканавалин-А) нэмсэн бүлэгтэй харьцуулахад 0.8-1.2 дахин нэмэгдүүлж эхэсийн ханд дэлүүний хуваагдлыг нэмэгдүүлэх нөлөө үзүүлж байлаа.

Үрэвслийн шалтгаан нь нэн түгээмэл бөгөөд дурын хүчин зүйл (вирүс, бактери, мөөгөнцөр зэрэг биологийн хүчин зүйл, халуун хүйтэн зэрэг физикийн хүчин зүйл, хүчил, шүлт зэрэг химийн хүчин зүйл, нийгэм, байгаль, экологийн хүчин зүйл) эд эсийг гэмтээж үрэвслийн шалтгаан болдог. Үрэвсэл нь альтераци, экссудаци, пролифераци гэсэн харилцан уялдаат эмгэг жамтай [1].

Бид үнээний эхэсийн хандны үрэвслийн эсрэг нөлөөг туршилтын амьтны сарвуунд каррагининаар хурц үрэвсэл үүсгэн судлав.

Каррагининыг туршилтын амьтанд сарвуунд тарихад хэсэг газрын хурц үрэвсэл үүсдэг бөгөөд энэ үед экссудаци давамгайлан явагддаг. Үрэвслийн медиаторуудын үйлчлэлээр венийн цус дүүрэлт болж венийн судасны хананд үзүүлэх гидростатик даралт нэмэгдэн судас өргөсч нэвчимтгий чанар ихэссэний үр дүнд цусны шингэн хэсэг болох сийвэн нь гадагш шүүрэн гарна. Түүнчлэн үрэвслийн голомтод гиперонки буюу уургийн задрал нэмэгдсэнээр чөлөөт уураг ихсэн онкос даралт ихсэн мөн гиперосми буюу чөлөөт ион ихэссэнээр осмос даралт нэмэгдэж цусны шингэн хэсэг нь онкос, осмос даралт багатай цусны сийвэнгээс үрэвслийн голомт руу шилжин хуримтлагдаж цусны дүрст элементүүд ялангуяа лейкоцитүүд судаснаас гадагшлан экссудаци үүснэ [2].

A.L.Wills (1969), B. Bhukya, R. N. R. Anreddy, C. M. William, K. M. Gottumukkala (2009), P. M. Brooks, R. O. Day (1991) зэрэг олон судлаачид туршилтын амьтны сарвуунд каррагенан тарихад гистамин, простагландин, брадикинин зэрэг үрэвслийн медиаторуудын нөлөөгөөр сарвуунд хаван үүсдэгийг тогтоосон байдаг [6; 10; 27].

Бидний туршилтаар үнээний эхэсийн уургийг 30 мг/кг, 60 мг/кг тунгуудаар каррагининаар өдөөсөн хурц үрэвслийн үед гуяны булчинд тарихад бүх тундаа сарвууны хаванг бууруулж байсан бөгөөд ялангуяа үнээний эхэсийн ханд 30 мг/кг тундаа харьцуулах бүлэгт авсан Диклофенак натри (10 мг/кг)-тай ижил үр дүнтэй байна.

Диклофенак натрийн үйлдлийн гол механизм нь циклооксигенеза ферментэд хориг үүсгэснээр простогландиний нийлэгжилтийг саатуулж байгаатай холбоотой. Учир нь өвдөх, үрэвсэх, халуурах бүх үзэгдэл нь простогландин ихээр нийлэгжсэнтэй холбоотой байдаг бол Chioma A Anosike, Onyechi Obidoa, Lawrence US Ezeanyika (2012) [7] нар *Solanum aethiopicum* ургамлын спиртэн ханданд агуулагдаж байгаа алкалоид, флавноидууд нь хялгасан судасны нэвчимхий чанарыг бууруулж байгаатай холбоотой хэмээсэн байдаг.

Тиймээс бидний ялган авсан үнээний эхэсийн хагас цэвэршүүлсэн уураг нь простогландиний нийлэгжилтийг саатуулах, цусны судасны нэвчимтгий чанарыг багасгах замаар шүүдэст үрэвслийн эсрэг үйлдэл үзүүлж байж болох юм.

ДУГНЭЛТ

1. Үнээний эхэсээс лактоген уураг ялган, цэвэршүүлэхэд нэрмэл усаар жигдрүүлж, сульфат аммонийн давсаар тунадасжуулах аргыг ашиглах нь тохиромжтой юм.
2. Гель хроматографаар хагас цэвэршүүлж гарган авсан үнээний эхэсийн лактоген уургийн антиоксидант болон үрэвслийн эсрэг идэвх, лимфоцит олшруулах идэвх өндөр байв.

АШИГЛАСАН БҮТЭЭЛИЙН ЖАГСААЛТ

1. Ahmed H. (2005). Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification and Characterization, CRC Press, 387 pp
2. Allen W. R., A. M. Carter, P. Chavatte-Palmer, V. Dantzer, A. C. Enders, C. Freyer, R. Leiser and M. A. Miglino. (2003). Comparative Placentation—A Workshop Report Placenta, 24, Supplement A, Trophoblast Research, Vol. 17, p 100–103
3. Aye I.L.M.H., T.L. Powell and T. Jansson, (2013). Adiponectin - The missing link between maternal adiposity, placental transport and fetal growth? Placenta 34, Supplement A, Trophoblast Research, Vol. 27, p 40-45
4. Conrad K.P., Benyo D.F., Westernhausen – Larsen A., and Miles T.M., (1996). Expression of human erythropoietin by the human placenta. The FASEB Journal, Vol. 10, p 760-766
5. Cotor G., Pop A., and Ghita M., (2011) The effect of ovine placenta extract on mammatogenesis, lactogenesis, and galactopoiesis in sheep. Turk. J. Vet. Anim. Sci.; 35(3): p 137-142
6. Forsyth I.A. (1986). Variation among species in the endocrine control of mammary growth and function; the roles of prolactin, growth hormone and placental lactogen. J. Dairy Sci., 69: 886
7. Gootwine E., (2004). Placental hormones and fetal–placental development, Animal Reproduction Science, 82–83, p 551–556
8. Griffiths S.K. and J.P.Kampbell. (2014). Placental structure, function and drug transfer. Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain Advance Access, 6 pp
9. Haig, D. 2008. Placental growth hormone-related proteins and prolactin-related proteins. Placenta 29: p 36-41
10. Lacroix M.C., P. Bolifraud, D.Durieux, A.Pauloin, M.Vidaud and G. Kann. (2002). Placental Growth Hormone and Lactogen Production by Perfused Ovine Placental Explants: Regulation by Growth Hormone-Releasing Hormone and Glucose. Biology of Reproduction 66, p 555–561
11. Weyer K. and S.Glerup. (2011). Placental regulation of peptide hormone and growth factor activity by proMBP. Biology of Reproduction 84, p 1077–1086
12. Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003a). Food-derived bioactive peptides— opportunities for designing future foods. Current Pharmaceutical Design, 9, 1297–1308.
13. Meisel, H., & FitzGerald, R. J. (2003). Bio functional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulatory effects. Current Pharmaceutical Design, 9, 1289–1295.
14. Shimizu, M. (2004). Food-derived peptides and intestinal functions. Bio Factors, 21, 43–47.
15. FitzGerald, R. J., Meisel, H. (2003). Milk protein hydrolysates and bioactive peptides. In: P.F. Fox, & P.L.H. Mc Sweeney (Eds.), Advanced dairy chemistry, Vol. 1: Proteins (3rd ed.) (pp. 675–698). New York, NY, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
16. Roe S. (2001). Protein Purification Techniques, Second Edition: A Practical Approach, Oxford University press, 262 pp
17. Kankofer M. Antioxidative defence mechanisms against reactive oxygen species in bovine retained and not-retained placenta: activity of glutathione peroxidase, glutathione transferase, catalase and superoxide dismutase. Placenta 2001;22:466-72.
18. Watanabe, S., Togashi, S., Takahashi, N., Fukui, T. L-tryptophan as an antioxidant in human placenta extract. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 2002; 48:36-9.
19. Hou, H., Fan, Y., Li, B., Xue, C., Yu, G., Zhang, Z., & Zhao, X. (2012). Purification and identification of immunomodulating peptides from enzymatic hydrolysates of Alaska pollock frame. Food Chemistry, 134(2), 821-828.)
20. Hou Y., J.Zhou, W.Liu, Y.Cheng, L.Wu, and G.Yang. (2014). Preparation and characterization of antioxidant peptides from fermented goat placenta. Korean J. Food Sci. An., Vol. 34, No. 6
21. Fang, X.P., Xia, W.S., Sheng, Q.H., Yu-Liang Wang, Y.L. 2007. Purification and Characterization of an Immunomodulatory Peptide from Bovine Placenta Water-Soluble Extract, Preparative Biochemistry and Biotechnology, 37:3, 173-184).

22. Ёндондорж, А, Шийлэгдамба А., Цэрэннадмид, А. 2008. Мал эмнэлгийн дархлаа судлалын үндэс. х-84-85
23. Ууганбаяр Б, Ариунаа З, Олдох С, Чимэдрагчаа Ч, Мөнхзул Г, Сугаржав Э, Молор-Эрдэнэ П, Уламжлалт гарьд-5 эмийн үрэвслийн эсрэг нөлөөг судалсан дүн, Монголын анагаах ухаан, 2013, 3(165)
24. Bhukya B., Anreddy R. N. R., William C. M., and Gottumukkala K. M., “Analgesic and anti-inflammatory activities of leaf extract of *Kydia calycina* Roxb,” *Bangladesh Journal of Pharmacology*, vol. 4, no. 2, pp. 101–104, 2009.].
25. DivyaG., Gajalakshmi S., Mythili S., & Sathivelu A., *Pharmacological Activities of Acorus calamus: A Review*. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research Issue 4 (Vol. 1) 2011. p. 57-64*
26. Wills A.L., “Release of histamin,kinin and prostaglandins during carrageenin induced inflammation of the rats,” in *Prostaglandins, Peptides and Amins*, pp. 31–48, Academic Press, London, UK, 1969.
27. Chioma A Anosike, Onyechi Obidoa, Lawrence US Ezeanyika. Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of methanol extract of garden egg (*Solanum aethiopicum*). Anosike et al. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012, 20:76.<http://www.darujps.com/content/20/1/76>

Study of the anti-inflammatory and immunomodulatory activity of bovine placental extract

Lkhagvasuren N.¹, Bayar-Enkh B.¹, Sainbileg G.⁴, Uyen E.¹, Tsevgedorj Ch.¹, Chimgee P.², Dejidmaa B.³, Batsaikhan B.¹, Dolgorsuren Ts.^{1*}

1-Institute of Veterinary Medicine, Mongolian University of Life Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia

2-Mongolia-China Joint Laboratory of Applied Molecular Biology, Ulaanbaatar, Mongolia

3-Institute of Traditional Medicine and Technology, Ulaanbaatar, Mongolia

4-School of Veterinary Medicine, Mongolian University of Life Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia

*Corresponding author: dolgorsuren.ivm@gmail.com

ABSTRACT

Many scientists study structure and characterization of placenta and experimenting on their biological activity, due to develop new drugs and biopreparation for human and animal health. The present study aimed to isolate bovine placental lactogen from placenta by semi purification method and determine antioxidant, anti-inflammatory activity and effect on immune responses was also investigation.

Semi purified protein was separated by gel-chromatographic method using 3 methods of tissue homogenizations of placental tissue using distilled water, phosphate buffer saline and Tris-HCl, by use of 4 methods of protein extraction and precipitation with distilled water, sulfate ammonium salt and organic solvents, such as ethanol and acetone. Antioxidant activity of semi purified protein was measured by DPPH method, effect on immunity was investigated by using MTT assay kit, and anti-inflammatory activity was measured by using 1 % carrageenan-induced rat paw edema models. Measurements of total proteins which were homogenized in PBS, followed by acetone precipitation is 6217.5 µg/ml is the highest and homogenized in PBS, followed by sulfate ammonium salt precipitation is 1477.4 µg/ml is the lowest concentration.

Bovine placental extract DPPH radical scavenging activity was 55.1±1.2% and rutin was 67.1±1.2% but results of immunity experiment demonstrated splenocyte division in placental extract added medium for stimulation index 1.45 or splenocyte culture increased by 1.5 times than as compared to those in medium not added placental extract, as well as placental extract added in the medium stimulation index increased 1.08 or splenocyte division by 0.8 times or almost the same than those wells with culture treated with mitogen only. Semi-purification placental protein was inhibition on 1% carrageenan induced rat paw edema and it means bovine placental extract effectively reduce acute inflammation.

KEY WORDS: protein, carrageenan, antioxidant activity, edema, chromatography