

C57BL/6 хулганад үүсгэсэн хавдрын эмгэг загварт “Өвсөн гурван халуун”-ы нөлөөг судалсан дүн

Р.Наранхүү¹, Ч.Гансүх², Л.Энхсайхан², Б.Уранбилэг³, Д.Энхмаа³, Г.Одонтуяа⁴, Ц.Чимгээ⁵, Б.Өлзийсайхан², Г.Энхтүшиг², Л.Сарантуяа², О.Сүед², Б.Амгалан², Д.Санжпүрэв⁶, Д.Цэрэндагва⁷, Д.Цэнд-Аюуш¹, Б.Цэрэнцоо¹

¹АШУУИС, МАУОУС, Уламжлалт жор судлалын тэнхим

²АШУУИС, Био-АС, Бичил амь, Дархлаа судлалын тэнхим

³АШУУИС, Био-АС, Анагаахын химийн тэнхим

⁴ЭЗШУИС, Суурь судалгааны лаборатори

⁵АШУУИС, Био-АС, Эм судлалын тэнхим

⁶АШУУИС, ЭЗС, Эмийн хими, ургамал судлалын тэнхим

⁷АШУУИС

Цахим шуудан: narankhuu.r@mnuu.edu.mn, Утас: 976+98118949

Түлхүүр үг:

Өвсөн гурван халуун, хавдрын эмгэг загвар, Чөдөр өвс, Мөлхөө (хахуун) холтсон цэцэг, Бунгийн яргуй.

Товч утга:

Үндэслэл: Дэлхий дахинд төдийгүй манай улсад хорт хавдрын өвчлөл, түүнээс шалтгаалсан нас баралт жил бүр өсөн нэмэгдэж байна. Хорт хавдрын тохиолдол жил бүр өсөн нэмэгдэж байгаа өнөө үед Монголын уламжлалт анагаах ухаанд ходоод ба улаан хоолойн хавдар, хавдрын урьдал өвчнийг анагаахад эмчилгээний туршлагат жор болгон хэрэглэж ирсэн Холтсон цэцэгтний овгийн (*Ranunculaceae*) *Atragene Sibirica* L, *Ranunculus Repens* L, *Pulsatilla Bungeana* L 3 зүйл ургамал орсон (Өвсөн гурван халуун) найрлагыг сонгон авч, туршилтын амьтанд үүсгэсэн хорт хавдрын эмгэг загварт үзүүлэх нөлөөллийг судлан, нотолгоожуулах нэн шаардлагатай байгаа нь энэхүү судалгааг хийх үндэслэл боллоо.

Зорилго: “Өвсөн гурван халуун”-д агуулагдах биологийн идэвхт бодисуудыг илрүүлж, туршилтын амьтанд үүсгэсэн хорт хавдрын эмгэг загварт үзүүлэх нөлөөг судлах.

Арга, аргачлал: “Өвсөн гурван халуун” болох Сибирь чөдөр өвс (*Atragene sibirica* L), Мөлхөө (хахуун) холтсон цэцэг (*Ranunculus repens* L), Бунгийн яргуй (*Pulsatilla Bungeana* L.)-г Булган аймгийн Хишиг-Өндөр сумын нутгаас 5-6 сард цэцэглэлтийн үед нь түүж, зохих журмын дагуу хатааж бэлтгэв.

Үр дүн: “Өвсөн гурван халуун”-ы ханданд нийт фенолт нэгдэл $2.98 \pm 0.04\%$, нийт флавоноид $2.16 \pm 0.05\%$ агуулагдаж байна. Туршилтын 6 бүлгийн хулганыг биеийн жин болон хавдрын эзлэхүүнийг 3 удаагийн давталттайгаар өдөр бүр хэмжихэд бүх бүлгийн хулганад биеийн жин хугацаа хамааралтай нэмэгдэж байв. Мөн эмчилгээний 1A, 1B бүлгийн хулганад ЭГХ-ны этанол хандыг 50 ба 100мг/кг тунгаар, 2A ба 2B бүлгийн хулганад ЭГХ-ны диэтилэтер хандыг 50 ба 100мг/кг тунгаар амаар уулгаад, сөрөг хяналтын бүлэгт PBS 0.5 мг/кг тунгаар амаар, харин эерэг хяналтын бүлэгт флуороурацил (5FU) 10 мг/кг тунгаар 7 хоногт 2 удаа хэвлийн хөндийд тарихад хавдрын ургалтын хэмжээ хугацаа хамааралтай нэмэгдэж байв. Сөрөг хяналтын бүлгийн хулганы хавдрын эзлэхүүнийг эмчилгээний бүлгүүдтэй харьцуулахад туршилтын 4 бүлэгт статистик ач холбогдол бүхий ялгаатай ($p < 0.05$) харин эерэг хяналтын бүлэгтэй харьцуулахад илэрхий ялгаа ажиглагдаагүй. ($p = 0.08$) Туршилтын хулганы хавдрын эдийн гистологийн шинжилгээгээр бүх бүлэгт үхжил ажиглагдсан ба үхжилийн хамрах талбайгаар ялгаатай байв.

Дүгнэлт: “Өвсөн гурван халуун”-ы этанол ханданд нийт фенолт нэгдэл болон флавоноидын агууламж дунд зэрэг байна. “Өвсөн гурван халуун”-ы ханд нь туршилтын хулганад үүсгэсэн хавдрын ургалтыг саатуулж, лимфоцит давамгайлсан үрэвслийг идэвхжүүлж байгаа нь хавдрын эсрэг идэвхтэй болохыг харуулж байна ($p < 0.05$)

Үндэслэл: Дэлхий дахинд төдийгүй манай улсад хорт хавдрын өвчлөл, түүнээс шалтгаалсан нас баралт жил бүр өсөн нэмэгдэж байна. Одоогийн байдлаар дэлхийд нийт хорт хавдрын 8.2 хувийг ходоодны хавдар эзэлж, хавдрын шалтгаант нас баралтын 3-рт, нийт тохиолдлын 5-рт бичигдэж байгаа бол улаан хоолойн хорт хавдрын 511,054 шинэ тохиолдол бүртгэгдсэн нь түгээмэл тохиолдох хорт хавдрын 11-рт, 456.000 хүн нас энэ өвчний шалтгаанаар нас барсан нь хорт хавдраас үүдэлтэй нас баралтын шалтгааны 7-рт бичигдэж байна.¹

Монгол улсын хүн амд зонхилон тохиолдож буй хорт хавдрын өвчлөлд элэг, ходоод, уушги, умайн хүзүү, бүдүүн шулуун гэдэсний хавдар орж байна. Хавдраар өвдсөн нийт иргэдийн 65 хувь нь хожуу шатандаа оношлогдож байна.²

Уламжлалт анагаах ухааны онолоор бие махбодод өвчний ямар нэгэн үүсгэвэр бий болдог өвчнүүд бол хамт төрсөн найман яр өвчний үр өвчин болон их архаг бэтэг өвчнүүд юм.³ Хорт хавдрын тохиолдол жил бүр өсөн нэмэгдэж байгаа үед Монголын уламжлалт анагаах ухаанд ходоод ба улаан хоолойн хавдар, хавдрын урьдал өвчнийг анагаахад эмчилгээний туршлагат жор болгон хэрэглэж ирсэн Холтсон цэцэгтний овгийн (*Ranunculaceae*) *Atragene Sibirica* L, *Ranunculus Repens* L, *Pulsatilla Bungeana* L 3 зүйл ургамал орсон (Өвсөн гурван халуун) найрлагыг сонгон авч, туршилтын амьтанд үүсгэсэн хорт хавдрын эмгэг загварт үзүүлэх нөлөөллийг судлан, нотолгоожуулах нэн шаардлагатай гэж үзэж байна.

Зорилго: Уламжлалт анагаах ухаан хэрэглэгдэж ирсэн “Өвсөн гурван халуун”-д агуулагдах биологийн идэвхт бодисуудыг илрүүлж, туршилтын амьтанд үүсгэсэн хорт хавдрын эмгэг загварт үзүүлэх нөлөөг судлах

Арга, аргачлал: Судалгааг АШУУИС-ийн МУАУХ, МАУОУС болон Био-Анагаахын Сургууль, Био-Анагаахын хүрээлэнгийн лабораторийг түшиглэн сорил туршилтын аргаар хийсэн. Сибирь чөдөр өвс өвс (*Clematis sibirica* (L.) Will.), Мөлхөө (хахуун) холтсон цэцэг (*Ranunculus repens* L), Бунгийн яргуй (*P.Bungeana* С.А.Мей)-г Булган аймгийн Хишиг-Өндөр сумын нутгаас 5-6 сард цэцэглэлтийн үед нь түүж, зохих журмын дагуу хатааж бэлтгэв. 1:10 харьцаатайгаар 96%-ийн этилийн спиртээр мацерацийн аргаар (МУҮФ) хандлав.⁴ Хандаа шүүж вакуум ууршуулагчаар нэрж өтгөрүүлээд гарган авсан өтгөн хандыг усанд суспензлэн (1:1) дихлорметан (*Dichloromethane*), этилацетат (*Ethyl acetate*), бутанол (*Butanol*), хлороформ (*Chloroform*), гексан (*n-Hexane*) зэрэг уусгагчуудаар дараалуулан бүлэглэн хандалж, “Өвсөн гурван халуун”-ы этанол болон усан ханданд агуулагдах биологийн идэвхт

бодисын нийт фенолт нэгдлийг тодорхойлохдоо Европын фармакопейн дагуу “Өвсөн гурван халуун”-танд агуулагдах нийт фенолт нэгдлийн тоо хэмжээг Фолин-Чикольтен урвалжийг ашиглан өнгөт урвал явуулж стандарт галлын хүчилтэй (*Sigma, Germany*) харьцуулсан бол нийт флавоноидын тоо хэмжээг түүний молекул дахь гидроксилын бүлгүүд хөнгөнцагааны хлоридтой хүчлийн орчинд харилцан үйлчлэлцэж тогтвортой комплекс үүсгэдэг урвалд үндэслэн стандарт рутинтэй (*TCI Co. Ltd., Japan*) харьцуулан спектрофотометрийн (*Shimadzu, Japan*) аргаар тодорхойлов.^{5,6} Бүх хэмжилтийг 3 давтан хийсэн.

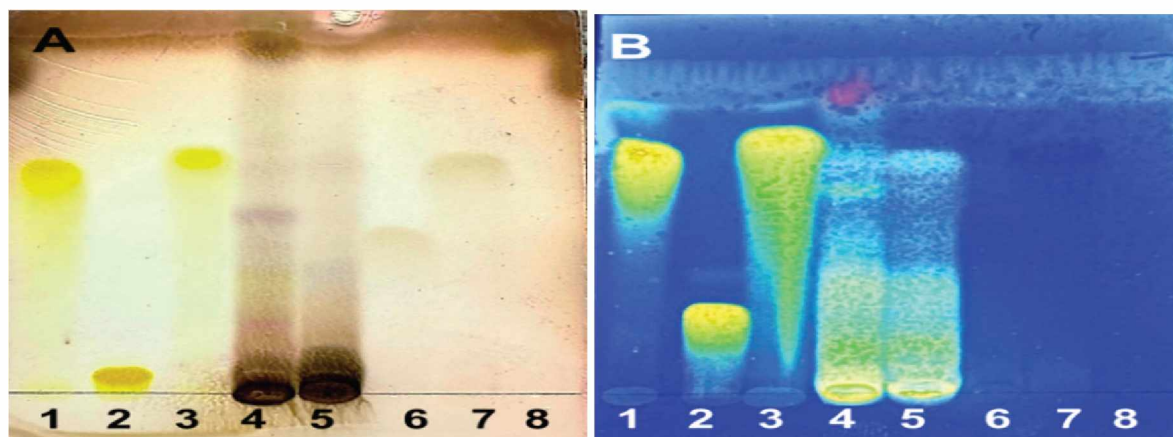
C57BL/6 хулганад хавдрын эмгэг загвар үүсгэхэд хулганын бүдүүн, шулуун гэдэсний хавдрын эс MC-38 (*Kerafast, USA*)-ийг ашигласан ба 10%-ийн тугалын хээлний ийлдэс (FBS), 0.5%-ийн антибиотик, мөөгөнцрийн эсрэг холимог (*Amphotericin B, Penicillin G, Streptomycin*) бүхий эсийн орчин (DMEM)-д 37°C хэмд 5%-ийн чийгшилтэй CO₂ инкубаторт өсгөвөрлөсөн. Хөлдөөсөн MC-38 эсийг 37°C хэмийн усан ваннд 1-2 минут гэсгээж, урьдчилан бэлтгэсэн эсийн орчин (DMEM) 15 мл-ийг нэмж, 1450 эргэлт/мин хурдаар центрфугт эргүүлсэний дараа супернатантыг соруулан авч, эсийн орчин нэмэн тавагт тарив. Хавдрын эмгэг загвар үүсгэхдээ 7-8 долоо хоногтой, эр хүйсийн 50 толгой C57BL/6 хулганыг сонгон авч, туршилтын хугацаанд 12 цаг гэрэлтэй, 12 цаг харанхуйд байлгасан. Хавдрын эмгэг загвар үүсгэхээс 24 цагийн өмнө хэвлийн баруун талын үсийг гуужуулан бэлтгэв. Туршилтын хулганад Изофлураныг (*Piramal Pharma, India*) хөвөнд шингээн 20 секундийн турш үнэртүүлэн унтуулж, хэвлийн баруун талын арьсан дор MC-38 эс (1*10⁶)-ийг тарьсан. 6 бүлгийн нийт 50 хулганы хавдрын эзлэхүүнийг дижитал калибр ашиглан хавдрын урт, өргөнийг хэмжиж, $V=W^2 \cdot L/2$ томьёогоор хавдрын эзлэхүүнийг тооцсон, хулганын биеийн жинг электрон жингээр хэмжив. Хэмжилт бүрийг 3 удаа давталттай хийв.^{7,8}

Туршилтын хулганын арьсан доор хавдрын эс тарьсан өдрөөс хойш 7 хоногийн дараа хавдрын хэмжээ ба биеийн жинг харгалзан 6 бүлэг болгов. Сөрөг хяналтын бүлэгт PBS 0.5 мг/кг-аар өдөр бүр уулгасан. Харин эерэг хяналтын бүлэгт флуорурацил (5FU) 10 мг/кг-аар 7 хоногт 2 удаа хэвлийн хөндийд тарьсан. Эмчилгээний 1А болон 1В бүлэгт ӨГХ-ны этанол хандыг 50 ба 100мг/кг-аар, 2А болон 2В бүлэгт ӨГХ-ны дихлорметан хандыг 50 ба 100мг/кг-аар өдөр бүр амаар уулгав. Туршилт 21 хоног үргэлжилсэн ба хулганы биеийн жин, арьс үс, хооллолтын байдал, хөдөлгөөний идэвх зэргийг өдөр бүр ажиглаж тэмдэглэл хөтлөв. Туршилтын 22 дахь хоногт хулганыг зохих журмын дагуу егүүтгэж, хавдрын эд болон 5 цул эрхтнийг гистологийн шинжилгээнд бэлтгэж

бэхжүүлэв. Туршилтын хулганы хавдрын эд, цуллаг эрхтнийг салган авч, 10%-ийн формалины уусмалд бэхжүүлсэн. Гистологийн шинжилгээнд бэлтгэхдээ угаах, бэхжүүлэх, усгүйжүүлэх (спиртэн дамжлага), тосгүйжүүлэх, тосон цутгалга буюу парафин бэлтгэх, бичил зүсмэг бэлтгэх, тунгалагжуулах зэрэг дамжлагаар гүйцэтгэсэн. Гистологийн бэлдмэлийг гемотоксиллин-эозин будгаар будаж эмгэг өөрчлөлтүүдийг үнэлсэн. Иммуногистохимийн шинжилгээнд бэлтгэхдээ бэхжүүлсэн парафиныг арилгах, ксилол болон этанолын дамжлага, угаах, антиген сэргээх, эсийн доторх өвөрмөц бус холбоог саатуулах, угаах, эсийн гаднах өвөрмөц бус холбоог саатуулах, анхдагч эсрэг биеийг хийх, хоёрдогч эсрэг биеийг холбох дамжлагуудыг дараалан гүйцэтгэв. Уг шинжилгээнд CK20, CDX2, Ki67, p53 зэрэг эсрэг

биеийг 1:100 харьцаатай шингэрүүлэн ашиглав.⁹

Үр дүн: “Өвсөн гурван халуун”-танд агуулагдах нийт фенолт нэгдлийн тоо хэмжээг Фолин-Чикольтен урвалжийг ашиглан өнгөт урвал явуулж стандарт Галлын хүчилтэй харьцуулсан бол нийт флавоноидын тоо хэмжээг түүний молекул дахь гидроксилын бүлгүүд хөнгөнцагааны хлоридтой хүчлийн орчинд харилцан үйлчлэлцэж тогтвортой комплекс үүсгэдэг урвалд үндэслэн стандарт рутинтэй харьцуулан спектрофотометрийн аргаар тодорхойлов. “Өвсөн гурван халуун”-ны ханданд нийт фенолт нэгдэл $2.98 \pm 0.04\%$, нийт флавоноид $2.16 \pm 0.05\%$ агуулагдаж байсан нь Өвсөн гурван халуун-д фенолт нэгдэл дунд зэргийн агууламжтай (P al. 2007), харин флавоноид өндөр (Смирнов, Л.П.Первих, Л.Н., 1998)^{10,11} агууламжтай байна. (Зураг 1)



Зураг 1. “Өвсөн гурван халуун”-ы найрлагын биологийн идэвхт бодисыг тодорхойлсон дүн.

Этанол ханд (4) усан (5) ханд, кверцетин (1), рутин (2), лютеолин (3), галлийн хүчил (6), метилгаллат (7), ба анемонин (8). Уусгагч систем: А. $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{CH}_3\text{COOH} - 6 : 1 : 0.5$; В. $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{COOH} - 7 : 3 : 0.4 : 0.5$; Оношлогооны урвалжууд: А. 1% ваниллин/5% H_2SO_4 харагдахуйц гэрэл; В. NP/PEG хэт ягаан туяа 365nm

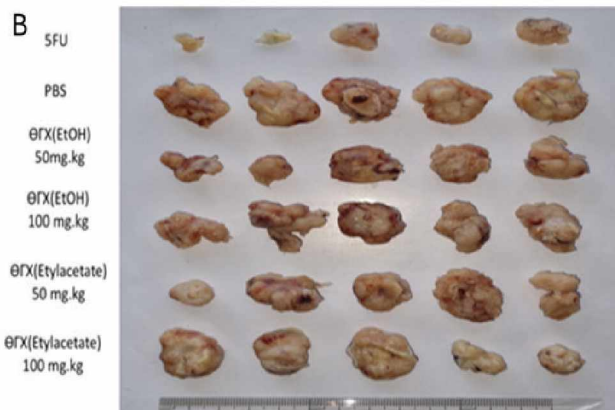
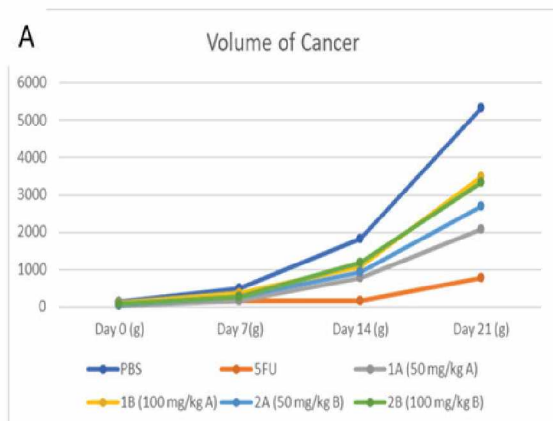
Хавдрын эмгэг загварт “Өвсөн гурван халуун”-ы хандны нөлөөг судалсан үр дүн. C57BL/6 хулганы хэвлийн баруун талын арьсан дор 1×10^6 мкл MC-38 эсийг тарьж, хавдрын эмгэг загвар үүсгэв. Туршилтын 6 бүлгийн хулганыг биеийн жин болон хавдрын эзлэхүүнийг 3 удаагийн давталттайгаар өдөр бүр хэмжсэн. (Зураг 2)



Зураг 2. Туршилтын хулганы биеийн жин, хавдрын эзлэхүүнийг хэмжсэн байдал.
Туршилтын хулганы хавдрын эзлэхүүнийг дижитал калипраар хэмжиж буй байдал

Туршилтын хулганы биеийн жин болон хавдрын эзлэхүүнийг 21 хоногийн турш хэмжихэд халууралт ажиглагдаагүй бөгөөд туршилтын бүх бүлгийн хулганад биеийн жин хугацаа хамааралтай нэмэгдэж байв. Бид туршилтын хулганад үүсгэсэн хавдрын эмгэг загварт ӨГХ-ны үзүүлэх нөлөөг судлахдаа 21 хоногийн турш эмчилгээний 1A, 1B бүлгийн хулганад ӨГХ-ны

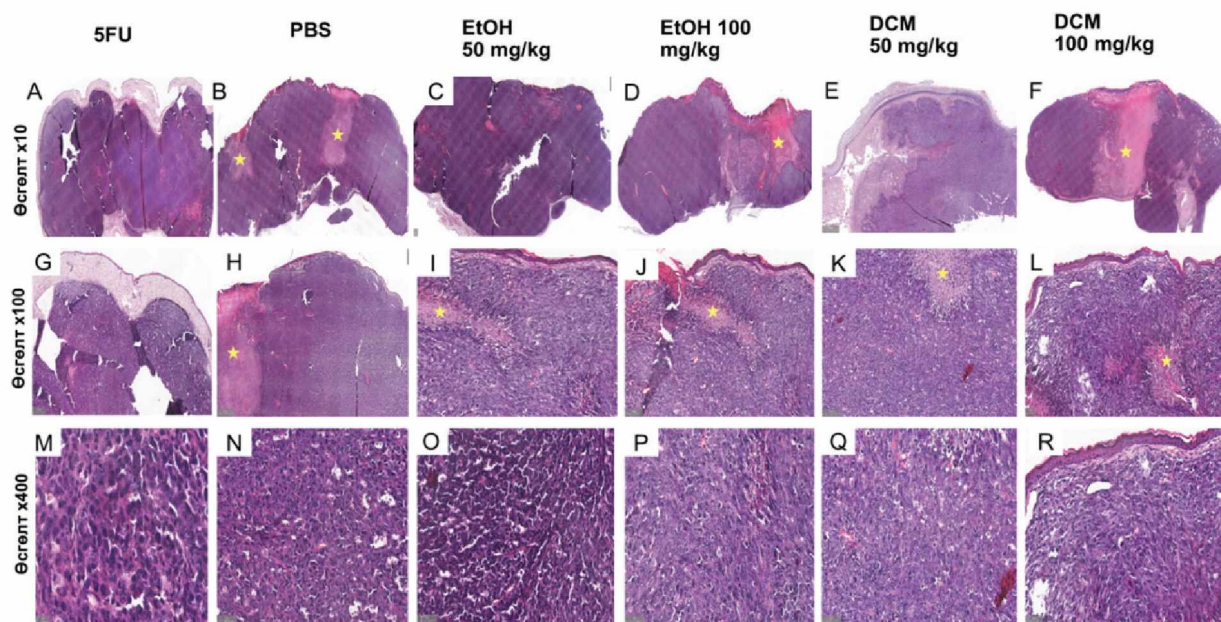
этанол хандыг 50 ба 100мг/кг тунгаар, 2A ба 2B бүлгийн хулганад ӨГХ-ны дихлорметан хандыг 50 ба 100мг/кг тунгаар уулгаад, сөрөг хяналтын бүлэгт PBS 0.5 мг/кг тунгаар амаар, харин эерэг хяналтын бүлэгт флуороурацил (5FU) 10 мг/кг тунгаар 7 хоногт 2 удаа хэвлийн хөндийд тарихад хавдрын ургалтын хэмжээ хугацаа хамааралтай нэмэгдэж байв. (Зураг 3)



Зураг 3. Хяналт болон туршилтын бүлгүүдийн хавдрын эзлэхүүнийг харьцуулсан байдал.
А, Туршилтын бүлгүүдийн хавдрын эзлэхүүний өсөлтийг шугаман графикаар харуулсан байдал. **В,** Туршилтын бүлгүүдийн хавдрын эдийн хэмжээг харьцуулан авсан байдал. МС-38 эсээр үүсгэсэн хавдрын эзлэхүүн туршилтын бүх бүлэгт хугацаа хамааралтай нэмэгдэж байв. Сөрөг хяналтын бүлгийн хулганы (PBS) хавдрын эзлэхүүнийг эмчилгээний бүлгүүдтэй харьцуулахад туршилтын 4 бүлэгт статистик ач холбогдол бүхий ялгаа ажиглагдав. (* $p < 0.05$, $p = 0.08$)

Туршилтын бүх бүлгийн амьтдын хавдрын эдийн гистологийн шинжилгээнд арьсан доор эпидерм болон дермийн хэсгийг эзэлсэн хавдрын үүсгэвэр байв. Эерэг хяналтын буюу флуороурацилаар (5FU) эмчилсэн бүлгийг амьтдын хавдрын хэмжээ туршилтын бусад бүлэгтэй харьцуулахад илэрхий багассан байв. Харин эмчилгээний 1В, 2В бүлгийн амьтны хавдрын эд эпидермийн хэсэг рүү түрж шархалсан, үхжилийн

голомт үүссэн бол сөрөг хяналтын бүлэг (PBS) бүлэгт хавдрын эсүүд илүү түрж ургасан, үхжилийн голомт нэмэгдсэн, эпидермийн хэсэгт илэрхий том хэмжээний шарх үүссэн, үрэвслийн эсүүдийн нэвчдэстэй болсон байв. Гэтэл эмчилгээний 1А, 2А бүлгийн амьтны хавдрын эдийн хэмжээ харьцангуй багасаж, эпидермийн хэсгийн шархлаа арилж, нөхөн төлжсөн байдал ажиглагдав. (Зураг 4)

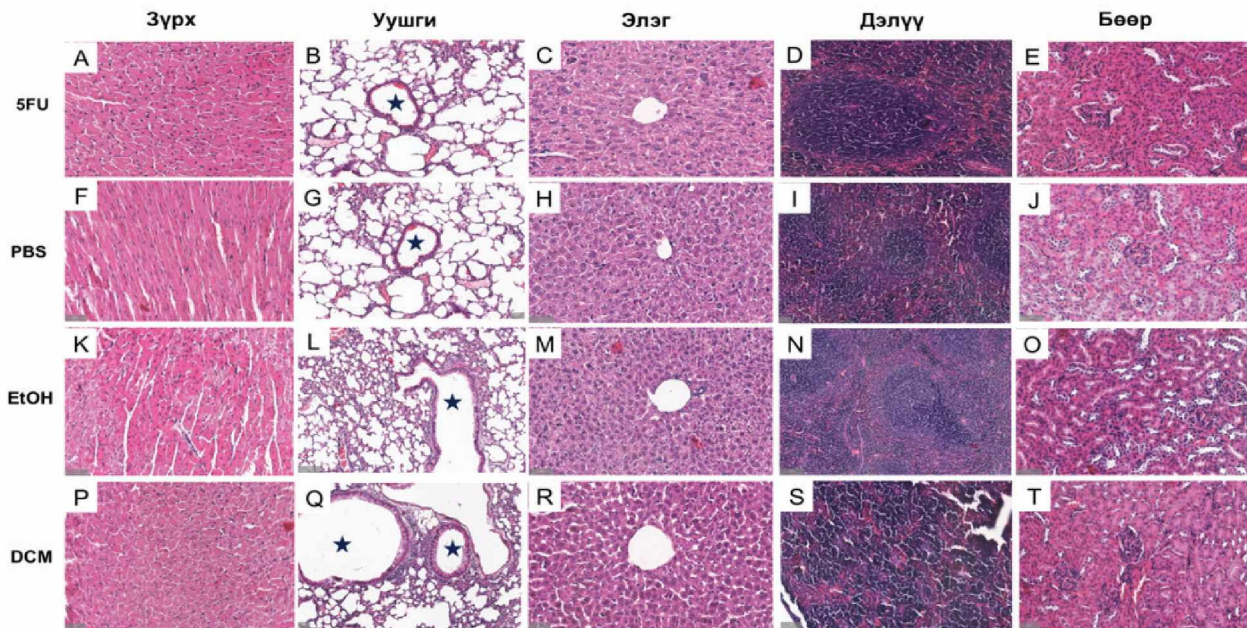


Зураг 4. Туршилтын хулганы хавдрын эдийн гистологи, иммуногистохимийн шинжилгээний дүн.

Туршилтын амьтанд хавдрын эмгэг загвар үүсгэсэн үр дүн (H&E, x10, x100, x400). **A-F.** **B,D,F** зурагт харуулсанчлан эпидермийн хэсэгт ил шархалсан, үхжилийн голомттой (шар одоор тэмдэглэв) байсан. **G.** Эерэг хяналтын (5FU) бүлгийн хавдрын эдийн хэмжээ илэрхий багассан. **H.** PBS-ээр эмчилсэн бүлэгт хавдрын эсүүд түрэмгий ургаж, үхжилийн голомт нэмэгдсэн, эпидермийн хэсэгт илэрхий шарх, үрэвслийн эсүүдийн нэвчдэстэй. **I-L.** “Өвсөн гурван халуун”-ы этанол болон дихлорметан хандаар эмчилсэн бүлгүүдэд хавдрын хэмжээ багасаж, эпидермийн хэсгийн шархлаа арилж, нөхөн төлжсөн. Гэвч дермийн давхарт хавдрын эсүүдийн үүсгэвэртэй. **M-R.** Их өгсөлтөөр хавдрын эсүүд илэрхий гажигшилтай, митоз хуваагдалтай, хавдрын эсүүдийн бөөм цитоплазмын харьцаа томорсон байна.

Туршилтын амьтны таван цул эрхтний эд судлалын шинжилгээний үр дүн. Эерэг хяналтын ба эмчилгээний 2-р бүлгийн амьтны зүрхний булчингийн хөндлөн зүслэгт булчингийн эсүүд хэвийн бүтцээ хадгалсан, төвдөө байрласан тод хүчиллэг дугуй бөөмтэй, сөрөг хяналтын болон эмчилгээний 1-р бүлгийн амьтдын зүрхний

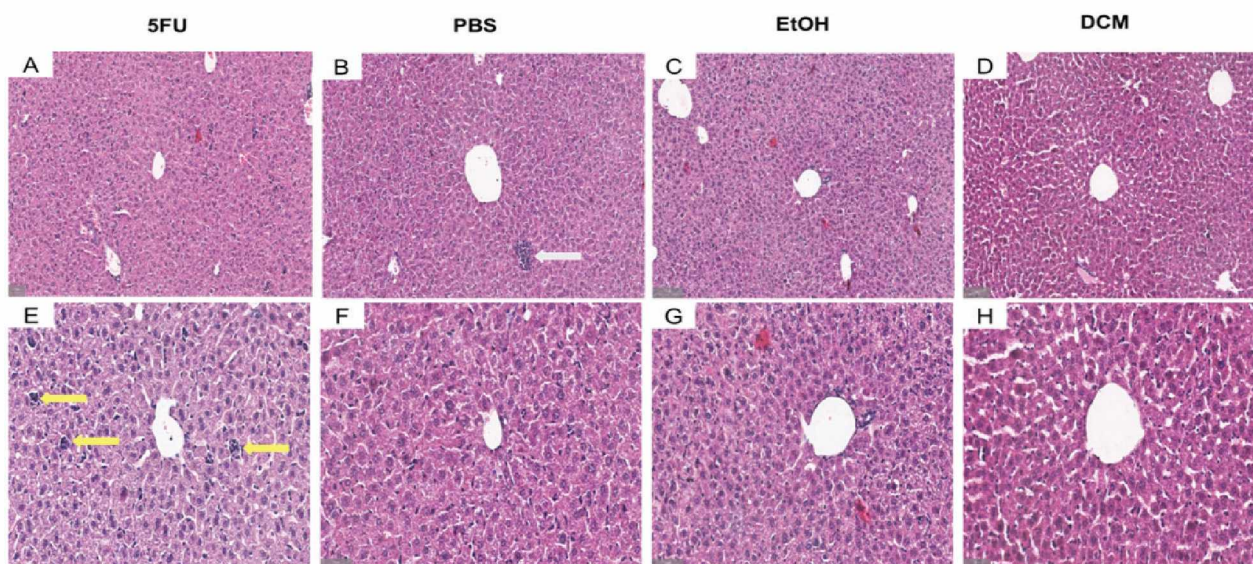
булчингийн дагуу зүслэгт булчингийн эсүүд хэвийн хадгалсан, тод будагдсан эрүүл хэлбэрийн бөөмтэй байв. Уушгины эдийн хөндлөн зүслэгт гуурсан хоолой төвдөө байрласан, агаараар дүүрсэн нимгэн ханатай цулцант бүтэц хэвийн хадгалагдсан ба гуурсан хоолой нь сормуустай бортгон хучуураар хучигдсан, эмгэг өөрчлөлт илрээгүй. Туршилтын бүх бүлгийн амьтдын элэгний эдэд төвийн вен, хэлтэнцэрт бүтэц хадгалагдсан, элэгний эсүүд баганан зураглалтай байв. Элэгний эсийн дотор эмгэг хуримтлал болон бусад сөнөрөлт өөрчлөлт илрээгүй. Дэлүүний улаан цагаан зөөлцийн зааг тод, цус дүүрэлтгүй, хэвийн бүтэц хадгалагдсан байв. Туршилтын бүх бүлэгт бөөрний түүдгэнцэр, сувганцарт эмгэг өөрчлөлтгүй, судас болон паренхимийн эдэд үрэвсэлт өөрчлөлтгүй байгаа нь MC-38 шугаман эсээр үүсгэсэн хавдар нь туршилтын амьтдын 5 цул эрхтэнд ямар нэг үсэрхийлэлт эмгэг үүсгээгүй ба ӨГХ-ы эмчилгээний бүлгийн амьтдын 5 цул эрхтэнд эрүүл бүтэц хадгалагдсан хэвээр байв. (Зураг 5)



Зураг 5. Туршилтын амьтны таван цул эрхтний эд судлалын шинжилгээний үр дүн (H&E, x400). Зүрхний булчингийн хөндлөн зүслэгт булчингийн эсүүд хэвийн бүтцээ хадгалсан, төвдөө байрласан тод хүчиллэг дугуй бөөмтэй харагдана (A,P). Зүрхний булчингийн дагуу зүслэгт булчингийн эсүүд хэвийн хадгалсан, тод будагдсан эрүүл хэлбэрийн бөөмтэй (F,K). Уушгины хөндлөн зүслэгт төвдөө байрласан гуурсан хоолой (одоор тэмдэглэв), хоосон зай мэт агаараар дүүрсэн нимгэн ханатай цулцант бүтэц хэвийн харагдана. Гуурсан хоолой нь сормуустай бортгон хучуураар хучигдсан, эмгэг өөрчлөлт илрээгүй (B, G, L, Q). Туршилтын бүх бүлэгт элэгний төвийн вен (гурвалжин), хэлтэнцэрт бүтэц хадгалагдсан, элэгний эсүүд баганан зураглалтай байна. Элэгний эсийн дотор эмгэг хуримтлал болон бусад сөнөрөлт өөрчлөлт илрээгүй болно (C, H, M, R). Дэлүүний улаан цагаан зөөлцийн зааг тод, цус дүүрэлтгүй, хэвийн бүтэц хадгалагдсан байна (D, I, N, S). Туршилтын бүх бүлэгт бөөрний түүдгэнцэр, сувганцарт эмгэг өөрчлөлтгүй, судас болон паренхимийн эдэд үрэвсэлт өөрчлөлтгүй байв. (E, J, O, T).

Туршилтын амьтны элэгний эдийн гистологийн шинжилгээний дүн: Туршилтын амьтны элэг хэлтэнцэрт бүтцээ хадгалагдсан, зургийн төв хэсэгт төвийн вен байрлаж, элэгний эсүүд баганан бүтэцтэй харагдана. Туршилтын бүх бүлэгт хавдрын үсэрхийлэл тодорхойлогдоогүй. Харин флуороурацилаар (5FU) эмчилсэн буюу эерэг хяналтын бүлгийн амьтны элэгний эдийн бүтэц хадгалагдсан боловч элэгний эсүүдийн бөөм томорч, бөөм цитоплазмын харьцаа

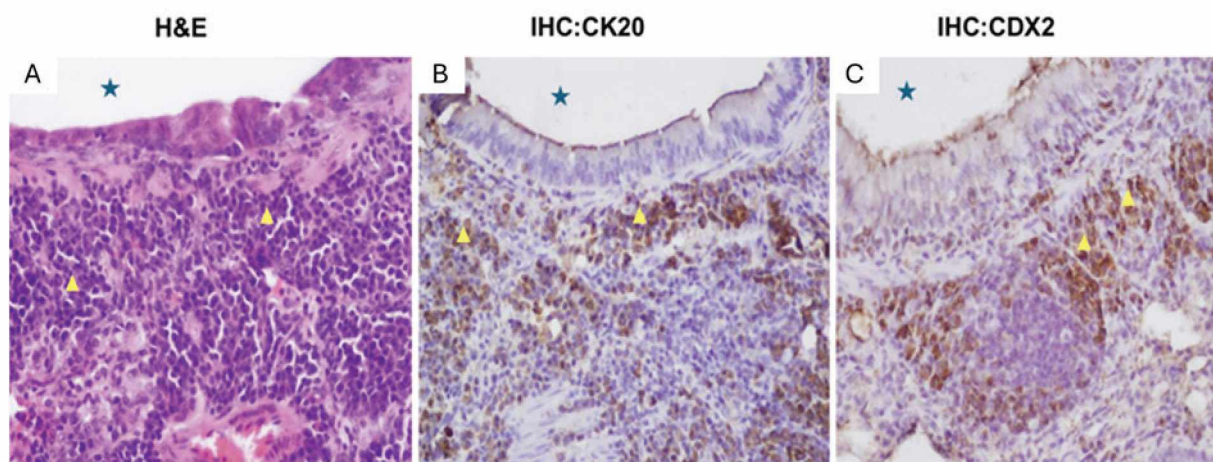
алдагдсан эмгэг өөрчлөлт тодорхойлогдсон нь элэгний эсийн гэмтлийг илэрхийлж байгаа байна. Гэтэл “Өвсөн гурван халуун”-ы этанол ханд болон дихлорметан хандаар эмчилсэн бүлэгт элэгний эсүүдийн баганан бүтэц бүрэн хадгалагдсан, элэгний эсийн өөхлөлт, үрэвсэл гэх мэт эмгэг өөрчлөлтгүй байгаа нь тухайн найрлага нь элэг хамгаалах нөлөөтэй байх боломжтой гэж үзэж болохоор байна. (Зураг 6)



Зураг 6. Элэгний эдийн гистологийн шинжилгээний дүн. A-D, Туршилтын амьтны элэг хэлтэнцэрт бүтцээ хадгалагдсан, зургийн төв хэсэгт төвийн вен байрлаж, элэгний эсүүд баганан бүтэцтэй харагдана. Туршилтын бүлгүүдэд хавдрын үсэрхийлэл тодорхойлогдоогүй. (H&E, $\times 100$) B ба F, PBS буюу сөрөг хяналтын бүлэгт үрэвслийн эсүүдийн нэвчдэстэй байсан боловч хавдрын эсийн үсэрхийлэл илрээгүй. (цагаан сумаар тэмдэглэв). E, Их өсгөлтөөр 5FU буюу эерэг хяналтын бүлгийн туршилтын амьтны элэгний бүтэц хадгалагдсан боловч цөөн тооны элэгний эсүүдийн бөөм томорч, бөөм цитоплазмын харьцаа алдагдсан эмгэг өөрчлөлт тодорхойлогдсон тул элэгний эсийн гажигшилт өөрчлөлт гэж үнэлсэн (шар сумаар тэмдэглэв) (H&E, $\times 400$). F-H. “Өвсөн гурван халуун”-ы этанол ханд болон дихлорметан хандаар эмчилсэн бүлэгт элэгний эсүүдийн баганан бүтэц бүрэн хадгалагдсан, элэгний эсийн өөхлөлт, үрэвсэл гэх мэт эмгэг өөрчлөлт илрээгүй (H&E, $\times 400$).

Уушгины эдийн иммуногистохимийн шинжилгээний үр дүн: Туршилтын 6 бүлэг дэх амьтны уушгины эдэд гистологийн шинжилгээ хийхэд сөрөг хяналтын бүлэг ба “Өвсөн гурван халуун”-ы этанол ханд болон дихлорметан хандаар эмчилсэн бүлэг тус бүрт 1-2 сорьцонд уушгины эдийн гуурсан хоолойн эргэн тойронд үрэвслийн эсийн нэвчдэстэй, мөн тод будагдсан, том эсүүд цөөнгүй илэрсэн ба MC-38 хавдрын эсийн үсэрхийлэл байх магадлалтай гэж сэжиглэсэн

тул тухайн сорьц бүрт иммуногистохимийн шинжилгээ хийв. Сорьцийг CK-20 ба CDX-2 эсрэг биеэр будахад цитоплазмын бор шаргал өнгөөр будагдаж, бүдүүн шулуун гэдэсний хорт хавдрын эсүүд мөн болохыг батлав. MC-38 шугаман эсээр үүсгэсэн хавдрын эмгэг загварын үед хавдар эхлээд уушгины эдэд үсэрхийлэл өгсөн шалтгаан ба эмгэг жамын онцлогийг бид цаашид илүү нарийвчлан судлах шаардлагатай гэж үзэж байна. (Зураг 7)



Зураг 7. Уушгины эдийн иммуногистохимийн шинжилгээний үр дүн. A, Туршилтын амьтны уушгины гуурсан хоолойн эргэн тойронд үрэвслийн эсүүдийн нэвчдэстэй, мөн тод будагдсан, том эсүүд цөөнгүй илэрсэн (H&E, $\times 100$). B, Иммуногистохимийн CK-20 эсрэг биеэр будагдахад цитоплазмын бор шаргал өнгөөр будагдаж, бүдүүн шулуун гэдэсний хорт хавдрын эсүүд мөн болохыг батлав. (IHC, $\times 400$). C, Иммуногистохимийн CDX-2 эсрэг биеэр мөн адил цитоплазмын эерэг будагдсан ба түүний эргэн тойронд будагдаагүй үрэвслийн эсүүдийн нэвчдэс харагдана (IHC, $\times 400$). Шар гурвалжингаар хавдрын эсүүдийг тэмдэглэв.

Хэлцэмж: Сүүлийн жилүүдэд манай улс төдийгүй дэлхий нийтээрээ уламжлалт анагаах ухааныг тал бүрээс нь сонирхон судалж, байгаль дээрх эмт ургамлуудаас бүтсэн гэж нөлөө, хор аюул багатай шинэ эм бэлдмэлүүдийг гарган авч практикт нэвтрүүлэх хандлага маш хурдацтай өсөн нэмэгдэж байна. Манай орны хувьд эмт ургамлын судалгааг их эрдэмтэн Ц.Хайдав тэргүүтэй судлаачид 1950-иад оноос үндэслэн эхлүүлсэн бол сүүлийн үеийн судлаач, эрдэмтэд өргөн хэрэглээний ихэнх жор найралтуудын фармакологийн судалгааг явуулж, цаашлаад эмнэлзүйн судалгаануудыг амжилттай явуулсаар байна. Ялангуяа хавдрын нас баралтаар дэлхийд тэргүүлж байгаа манай улсын хувьд хорт хавдрын эсрэг нөлөөтэй эмт ургамлууд дээрх судалгаа онцгой анхаарал татаж байна. Бид энэхүү судалгааг ходоодны үр өвчний жор найрлагад хавсарч ордог “Өвсөн гурван халуун” гэгдэх Сибирь чөдөр өвс (*Atragene sibirica* L), Мөлхөө (хахуун) холтсон цэцэг (*Ranunculus repens* L), Бунгийн яргуй (*Pulsatilla Bungeana* L.) зэргийн сурвалж зохиолуудад тэмдэглэгдсэн байдал, хэрэглээ, ургамлын ангилал зүйг тодруулж, эдгээр ургамалд агуулагдах зарим биологийн идэвхт бодисыг илрүүлэх, ходоодны хорт хавдрын эсэд үзүүлэх нөлөөг судлан тогтоох зорилго тавьсан юм. Монгол оронд Охотын чөдөр өвс (*Atragene ochotensis* L), Сибирь чөдөр өвс (*Atragene sibirica* L) гэсэн хоёр зүйл ургадаг. Эмт бодис: флавоноид (кемпферол, кверцетин, изокверцетин), витамин С, кумарин (эскулетин, эскулин, умбеллоферон скиммин зэрэг оксикумарин), дульцит, спирастенолын эгнээний стероид 4 гликозид, сапонин, дэлфинин, аконитин зэрэг нийлбэр алкалоид, уг ургамал бүх эрхтэндээ зүрхний гликозидтэй, үрэнд линолын хүчил зонхилсон линолеины болон олеины хүчил оролцсон с-линолеины болон 17 тосны хүчил агуулдаг гэж тодорхойлсон.¹² (Цэвэгсүрэн 1998) Мөлхөө (хахуун) холтсон цэцэг (*Ranunculus repens* L). Эмт бодис: гамма-лактон (ранункулин, протоанемонин), циант нэгдэл (триглохин, дуррин), сапонин, алкалоид, флавоноид (витексин, неовитексин, сапонаретин), кумарин, умбеллоферон, скополетин, идээлгийн бодис, хинон, С витамин, өөх тос, линолын болон линолеины хүчил зонхилсон олеины хүчил нэлээд орсон тосны хүчлүүд. Энэ ургамлыг Монгол Төвөд эмнэлэгт газар дээрх хэсгийг хавдар, усан хаван, ходоод гэдэсний архаг үрэвсэл, толгой өвдөх, эмэгтэйчүүдийн өвчинд дотуур, булчирхайн сүрьеэ, буглааг боловсруулах, идээг татахад гадуур хэрэглэх ба навчийг шарх хатиг

анагаахаар олгодог байна. Газар дээрх хэсэг навч нь нянгийн эсрэг үйлдэлтэй. Бунгийн яргуй (*Pulsatilla Bungeana* L.) Эмт бодис: протоанемонин, үрэнд линолын хүчил зонхилсон олеины хүчил, 18 өөхөн хүчил бүхий тостой. Монгол Төвөд эмнэлэгт ногоог бие ядарч хөрөх үед дулаацуулан тамир тэнхээ оруулахаар дотуур, хоолойн бах, гүйлсэн булчирхайн үрэвслийн үед шинэ түүсэн цэцэг ногоог няцлан, хүйтэн усанд хийж ам хоолойг зайлах ба хэрлэг тулай зэрэг үе мөчний өвчний үед шаваас шавшлага маягаар хэрэглэдэг. Бид “Өвсөн гурван халуун”-ы спиртэн болон усан ханданд агуулагдах биологийн идэвхт бодисыг хроматографийн аргаар судлахад фенолт нэгдэл кверцитин, рутин, атегинин зэрэг флавоноидын төрлийн бодисууд илэрсэн бол Chang Y, Zhang P (2017) нар *Clematis aethusifolia Turcz.*-с баганан болон өндөр идэвхт шингэний хроматографийн аргаар 11 төрлийн флавоноидыг ялган авч хүний өндгөвчний хавдрын шугаман эс (SK-OV-3), уушгины хавдрын (A-549), шулуун гэдэсний хавдрын (HCT-15) зэрэг 5 төрлийн эсийн өсгөвөрт *in vitro* судлахад *Clematis aethusifolia Turcz.*-н флавоноидууд нь эс хордуулах өндөр идэвхтэй болохыг тогтоосон байна.¹³ Манай улсад төрөл бүрийн хавдрын эс дээр эмийн ургамлын судалгаа амжилттай хийгдсээр байна.

Дүгнэлт: Өвсөн гурван халуун-д фенолт нэгдэл дунд зэргийн, харин флавоноид өндөр агууламжтай байна. Туршилтын хулганы зарим цуллаг эрхтэнд хавдрын үсэрхийлэл илэрсэнгүй. ӨГХ-ны ханд нь туршилтын хулганын бүдүүн шулуун гэдэсний хавдрын ургалтыг саатуулж, лимфоцит давамгайлсан үрэвслийг идэвхжүүлж байгаа нь хавдрын эсрэг идэвхтэй болохыг харуулж байна. Мөн “Өвсөн гурван халуун”-ы этанол ханд болон дихлорметан ханд нь элэг хамгаалах нөлөө үзүүлдэг болохыг гистологийн шинжилгээний үр дүн харуулж байна.

Талархал: Уг судалгааг хийхэд бүх талаар дэмжин ажилласан АШУҮИС-ийн МАУОУСургууль, МУАУ-ны Хүрээлэн, АШУҮИС-ийн Био-Анагаахын Хүрээлэнгийн эсийн биологи, тархи судлал, эмгэг судлалын лаборатори, АШУҮИС-ийн Био-Анагаахын Сургуулийн Анагаахын Химийн тэнхим, АШУҮИС-ийн Био-Анагаахын Сургуулийн Бичил Амь Дархлаа судлалын тэнхим, Япон Монголын Сургалтын Эмнэлгийн Эмгэг судлалын лабораторийн хамт олон, эрдэмтэн багш нартаа гүн талархал илэрхийлье.

Ном зүй:

1. World Health Organization (WHO)'s cancer agency and International Agency for Research on Cancer (IARC) Report 2024
2. Үндэсний статистикийн хорооны мэдээ-2023
3. С.Сээрсэгдорж, Ч.Чимэдрагчаа, С.Хишигжаргал. Монголын Уламжлалт Анагаах Ухааны Өвчнийг анагаах увидас. УБ 2005; 101,106.
4. Монгол улсын үндэсний фармакопей. Анхдугаар хэвлэл. УБ 2011 х.451, 464, 538.
5. Wagner, H.; Bladt, S. *Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas*; Germany, 1996, pp 195–244.
6. 20. Maurya, S.; Singh, D. Quantitative analysis of total phenolic content on *Ahatoda vasica nees* extracts. *Int. J. Pharmtech. Res.* 2010, 2(4), 2403-2406.
7. Cao Z, Zhang Z, Huang Z, Wang R, Yang A, Liao L, DU J. Antitumor and immunomodulatory effects of low-dose 5-FU on hepatoma 22 tumor-bearing mice. *Oncol Lett.* 2014 Apr;7(4):1260-1264. doi: 10.3892/ol.2014.1856. Epub 2014 Feb 6. PMID: 24660037; PMCID: PMC3961200.
8. 25. Dielh KH, Morton R, Morton D, et al (2001). "A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes." *Journal of Applied Toxicology.* 21: 15–23.
9. Shi, S. R., Cote, R. J., & Taylor, C. R. (1997). Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 45(3), 327–343.
10. Smirnov, L.P.; Pervikh, L.N. Quantitative determination of total flavonoids in flowers of *Helichrysum arenarium*. *Pharm. Chem. J.* 1998, 6, 35-38.
11. Christ, B. Muller, K.H. Zur serienmaessigen Bestimmung des Gehaltes an Flavonol-Derivaten in Drogen. *Arch. Pharm.* 1960, 293, 1033-1042.
12. Лигаа У. Монголын уламжлалт эмнэлэгт эмийн ургамлыг хэрэглэх арга ба жор. УБ 2005; х.160-167
13. Chang Y, Zhang P, Zhang X, Chen J, Rausch WD, Gula A, Bao B. Cytotoxic activities of flavonoids from a traditional Mongolian medicinal herb *Clematis aethusifolia* Turcz. *Natural Product Research Journal.* 2017 May;31(10):1223-1227.

The Effect of “Hot Natured 3 Herbs” in a Tumor-Induced Model in C57BL/6 Mice

Narankhuu R¹, Gansukh Ch², Enkhsaikhan L², Uranbileg B³, Enkhmaa D³, Odontuya G⁴, Chingee Ts⁵, Ulziisaikhan B², Enkhtushig G², Sarantuya L², Suvd O², Amgalan B², Sanjpurev D⁶, Tserendagva D⁷, Tsend-Ayush D¹, Tserentsoo B¹

¹ Department of Traditional Prescriptionology, ISMM, MNUMS

² Department of Microbiology and Immunology, School of Pharmacy and Biomedicine, MNUMS

³ Department of Medical Chemistry, School of Bio-Medicine, MNUMS

⁴ Basic Research Laboratory, Mongolian University of Pharmaceutical Sciences

⁵ Department of Pharmacology, School of Bio-Medicine, MNUMS

⁶ Department of Medicinal Chemistry and Botany, School of Pharmacy, MNUMS

⁷ MNUMS

E-mail: narankhuu.r@mnums.edu.mn, Tel: 976+98118949

Keywords:

Hot Natured 3 Herbs,
tumor model

Background: Cancer incidence and mortality are steadily increasing both globally and in Mongolia. As these rates rise, traditional Mongolian medicine has long utilized herbal formulas for the treatment of gastric and esophageal cancers and precancerous conditions. One such formulation—Hot Natured 3 Herbs (HN3H)—comprises three species from the Ranunculaceae family: *Atragene sibirica* L., *Ranunculus repens* L., and *Pulsatilla bungeana* L.. However, scientific validation of its anti-tumor effects is essential. This study aimed to investigate the effect of HN3H in a tumor-induced animal model.

Aim: To identify the biologically active compounds of HN3H and evaluate their effect in an experimentally induced tumor model in animals.

Materials and Methods: The three herbs comprising HN3H—*Atragene sibirica* L., *Ranunculus repens* L., and *Pulsatilla bungeana* L.—were collected during their flowering stage (May–June) in Khishig-Undur, Bulgan province, and dried according to official procedures. Extraction was carried out by maceration in 96% ethanol at a 1:10 ratio. The concentrated extract was suspended in water (1:1) and successively fractionated with dichloromethane, ethyl acetate, butanol, chloroform, and n-hexane. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Mongolian National University of Medical Sciences (Protocol №2020/03-04). A colorectal cancer model was established by subcutaneous injection of MC-38 cells (Kerafast, USA) into C57BL/6 mice. Immunohistochemistry was performed using CK20, CDX2, Ki67, and p53 antibodies at 1:100 and 1:200 dilutions.

Results: The ethanol extract of HN3H contained 2.98±0.04% total phenolics and 2.16±0.05% total flavonoids. Body weight and tumor volume were measured daily with three repetitions. All groups showed a time-dependent increase in body weight. Mice in groups 1A and 1B received ethanol extract at 50 and 100 mg/kg doses; groups 2A and 2B received dichloromethane extract at the same doses. The negative control group was administered 0.5 mg/kg PBS orally, while the positive control group received intraperitoneal injections of 5-fluorouracil (5FU) at 10 mg/kg twice a week. Tumor growth increased in a time-dependent manner across groups. Compared to the negative control, tumor volumes in four treatment groups showed statistically significant reduction ($p<0.05$), while no significant difference was observed when compared to the positive control ($p=0.08$). Histological analysis revealed necrosis in all groups, with variation in extent.

Conclusion: The ethanol extract of HN3H exhibited moderate levels of phenolic compounds and a high concentration of flavonoids. HN3H extract inhibited tumor progression and activated lymphocyte-predominant inflammation in tumor tissues, indicating potential anti-tumor activity ($p<0.05$).