Элэгний хавдрын эсийн өсгөвөрт их шүүдэргэнэ (chelidonium majus)-ий хандны нөлөөг судлах нь

Д.Дашхорол[1,5], Э.Уугангэрэл[2,3], Д.Энхмаа[2,3], Б.Сувдаа[2,4], М.Адилсайхан[5], О.Эрдэнэзаяа[2,6]

[1]АШУҮИС, Эрдмийн сургууль
[2]АШУҮИС, Био-Анагаахын хүрээлэн
[3]АШУҮИС, Био-АС, Анагаахын химийн тэнхим
[4]АШУҮИС, Био-АС, Гистологийн тэнхим
[5]АШУҮИС, Монгол-Японы эмнэлэг
[6]АШУҮИС, Био-АС, Анатомийн тэнхим
Цахим шуудан: Dashkhorol@mnums.edu.mn, Утас: 88116778

Түлхүүр үг:

HepG2
Хавдрын эсийн миграци
MTT шинжилгээ
IC50

Товч утга:

Үндэслэл: Их Шүүдэргэнэ (*Chelidonium majus*, ИШ) нь олон наст ургамал бөгөөд уламжлалт анагаах ухаанд ИШ-ий газрын дээрх хэсэг, үндэсний усан болон спиртэн хандыг эмчилгээнд хэрэглэж ирсэн. Аливаа ургамлын эмчилгээний шинж чанар нь ургамлын хэсэг, хандны төрөл мөн үйлчлэж буй эсээс ихээхэн хамаардаг. ИШ-ий ханд хөхний, төвөнхийн хавдрын эсийн нүүн шилжих хөдөлгөөнийг саатуулсан судалгааны баримт байгаа боловч элэгний хавдрын эсийн хөдөлгөөнд хэрхэн нөлөөлдөг мэдээлэл алга байгаа нь энэхүү судалгааны ажлын үндэслэл болсон. **Зорилго:** Иймд бид ИШ ургамлын хэсэг бүрээс бэлтгэсэн спиртэн хандны үйлдлийг элэгний HepG2 эсийн өсгөвөрт харьцуулан судлах зорилго тавьсан. **Зорилт:** 1. Ханд тус бүрийн элэгний хавдрын эсийн ургалтад үзүүлэх нөлөөг харьцуулан судлах. 2. Ханд тус бүрийн элэгний хавдрын нүүн шилжилтэд үзүүлэх нөлөөг харьцуулан судлах. 3. ИШ-ий хандны элэгний хавдрын эсэд үзүүлэх нөлөөллийн IC50-ийг тооцоолж харьцуулах зорилтуудыг тавьсан. **Арга, аргачлал:** Харьцуулсан туршилт судалгааны загварын дагуу in vitro орчинд элэгний хавдрын HepG2 эсийн өсгөвөрт ИШ ургамлын навч, иш тус бүрээс 70%, 45%-ийн этанолоор хандлан 5 (M45, F70, F45, S70, S45) төрлийн ханд бэлтгэн, ханд тус бүрийн үйлдлийг бүлэг бүрт харьцуулан судлав. **Үр дүн:** Ханднуудын хоргүй тунгаар 48, 72 цаг үйлчлэхэд эсийн ургалтыг 64.5-74.2%, 23.5-39.6% хүртэл тус тус бууруулсан байна ($p < 0.05$). HepG2 эсийн өсгөвөрт ИШ-ий хандны хоргүй тунгаар үйлчлэж эсийн нүүн шилжилтийг эсгүй зурвас үүсгэх аргаар 8 цагийн дараа зураг авч шинжлэхэд M45 ханд хамгийн ихээр саатуулж байлаа. Навчны хандны нь эс хордуулах IC50 ишний ханднаас бага байлаа. **Дүгнэлт:** 1. ИШ ургамлын 5 төрлийн хандны хавдрын эсийг хордуулах болон эсийн ургалтыг саатуулах нөлөө ханд бүрт өөр өөр байлаа. 2. ИШ ургамлын навчны ханд бага тунгаар, харин ишний ханд түүнээс 8 дахин их тунгаар үйлчлэхэд эсийг хордуулж байлаа. 3. ИШ-ий ханднуудын хоргүй тун HepG2 эсийн ургалтыг 48, 72 дахь цагуудад саатуулах үйлдэлтэй байна.

Үндэслэл: Хавдрын эсрэг эмчилгээнд хэрэглэгдэж байгаа эмийн 60% орчим нь ургамлын гаралтай байдаг бөгөөд сүүлийн үеийн хавдрын эсрэг эмийн бодисын судалгаа уламжлалт анагаах ухаанд хэрэглэж ирсэн эмийн ургамлын судалгаа ихээхэн хийгдэж байна.[2,3] Их шүүдэргэнэ (ИШ) буюу Chelidonium majus L.–Papaveraceae нь дунд зэргийн уур амьсгалтай бүс нутагт ургадаг олон наст ургамал юм. Цэцэглэлтийн үеэр цуглуулсан их шүүдэргэний хатаасан хэсгүүдийг ардын анагаах ухаанд өргөн ашигладаг.[5] ИШ ургамлын алкалоидуудыг агуулсан хавдрын эсрэг үйлдэлтэй Украйн эмийн талаарх хэд хэдэн судалгаа байдаг ба хорт хавдрын эсүүдэд олон талт сонгомол нөлөө үзүүлдэг болох нь батлагдсан.[6] Гэвч ИШ-ий бүхэл ургамлын хандыг хэрэглэхэд изокүинолин алкалоидын агууламжаас хамаараад заримдаа хортой нөлөө

үзүүлдэг бөгөөд тунг нарийн тооцоолох шаардлагатай байдаг.[8] Уламжлалт аргаар ИШ-ийг хэрэглэхэд гардаг гол хүндрэл нь элэг-цөсний замын талаас гардаг бөгөөд Vigisearch олон улсын эмийн хордлогын талаарх мэдээллийн санд 95 тохиолдол бүртгэгдсэн байна.[9] Европын холбооны эмийн ургамлын бүтээгдэхүүний хорооноос (Committee on Herbal Medicinal Products) хийсэн дүн шинжилгээгээр амаар ууж хэрэглэхэд тохиромжтой тун тодорхойгүй бөгөөд хэрэглээнд нэвтрүүлэх хангалттай судалгааны баримт бүрдээгүй тул 2012 оноос энэхүү ургамлыг Европын холбооны улсад эмчилгээнд хэрэглэхээс татгалзсан бөгөөд хэрэв ач холбогдлын нарийвчилсан, батлагдсан судалгааны мэдээлэл гарвал энэ дахин дүн шинжилгээ хийж сэргээх хэрэглэх эсэхийг шийднэ гэжээ.[9]

Уламжлалт анагаах ухаанд ИШ-ий газрын дээрх хэсэг, үндэс, хажуугийн үндэсний усан болон спиртэн хандыг эмчилгээнд хэрэглэж ирсэн байна. Мөн аливаа ургамлын эмчилгээний шинж чанар, алкалоидын найрлага зэрэг нь ургалтын нөхцөл, ургамлын хэсэг, тун зэргээс ихээхэн хамаарна.[12] Иймд бид Монгол оронд тарималжуулсан ИШ ургамлын хэсэг бүрийн өөр өөр хандны хавдрын эсийн ургалтад үзүүлэх нөлөөг харьцуулан судлах үндэслэл болсон.

Зорилго: Их шүүдэргэнэ (Chelidonium majus)-ий хэсэг бүрээс бэлтгэсэн спиртэн хандны үйлдлийг элэгний HepG2 эсийн өсгөвөрт харьцуулан судлах.

Зорилт:

1. Ханд тус бүрийн элэгний хавдрын эсийн ургалтад үзүүлэх нөлөөг харьцуулан судлах
2. Ханд тус бүрийн элэгний хавдрын нүүн шилжилтэд үзүүлэх нөлөөг харьцуулан судлах
3. ИШ-ий хандны элэгний хавдрын эсэд үзүүлэх нөлөөллийн IC50-ийг тооцоолж харьцуулах

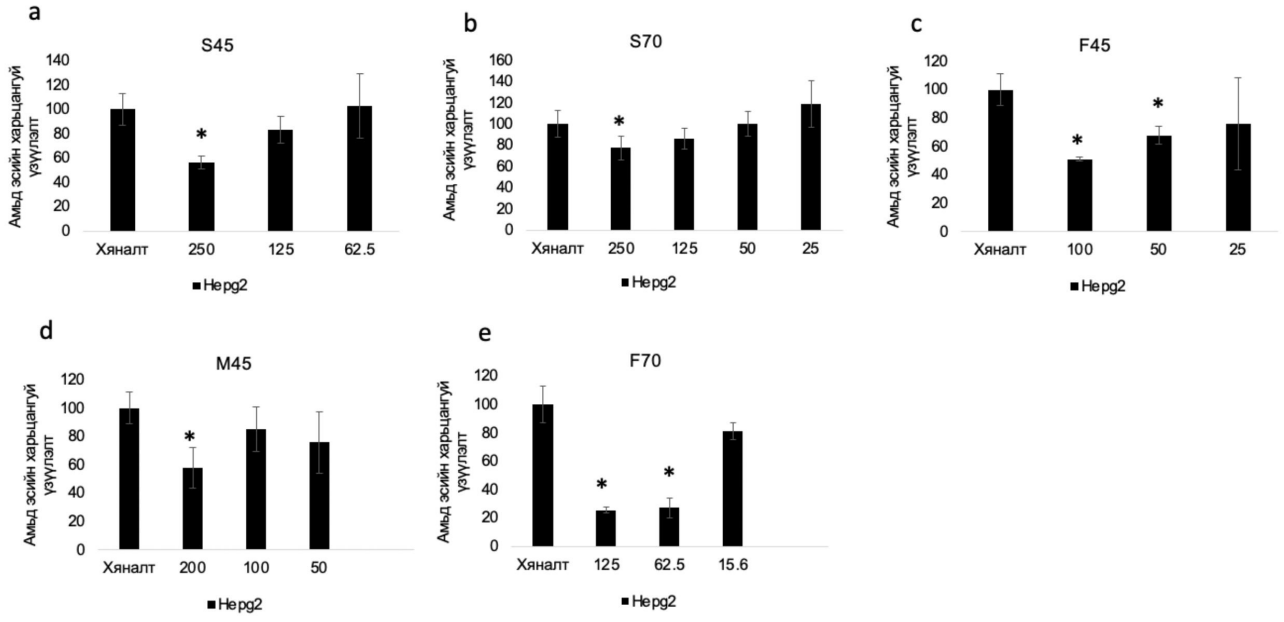
Ёс зүйн зөвшөөрөл: Бид энэхүү судалгааг хийхдээ АШУҮИС-ийн судалгааны ёс зүйн хяналтын хорооноос зохих зөвшөөрөл (№20/3-02) авсны үндсэн дээр хийж гүйцэтгэсэн болно.

Арга, аргачлал: Харьцуулсан туршилт судалгааны загварын дагуу in vitro орчинд элэгний хавдрын HepG2 эсийн өсгөвөрт ИШ ургамлын навч, иш тус бүрээс 70%, 45%-ийн этанолоор хандлан 5 (M45, F70, F45, S70, S45) төрлийн ханд бэлтгэн, ханд тус бүрийн үйлдлийг бүлэг бүрт харьцуулан судлав. Мөн хавдрын эсийн ургалтыг саатуулагч Доксорубицин эмийг эерэг хяналтаар ашигласан. ИШ-ий хандны хоргүй тунг МТТ шинжилгээгээр тодорхойлов.

Эсийн ургалтанд нөлөөллөх үйлдлийг судлахдаа ИШ-ий хандны хоргүй тунгаар үйлчилж 48, 72 цаг өсгөвөрлөсний дараа эсийн ургалтыг харьцуулан судлав. Их шүүдэргэнэ (Chelidonium majus)-ий хандны дараалсан тун эсийн нүүх шилжих хөдөлгөөнийг саатуулах харьцангуй үзүүлэлтийг ашиглан эсийн нүүн шилжилтийг 50% саатуулах идэвх буюу IC50-ийг онлайн тооцоолуураар бодож гаргана. Туршилтын бүлэг бүрийг 3 дээжид хийж статистикийн үндсэн параметрүүдийг тооцоолж туршилтын бүлэг хооронд харьцуулалт хийсэн. Стюденты Т тестийг бодож $p<0.05$ үед статистикийн ач холбогдол бүхий ялгаатайд тооцов.

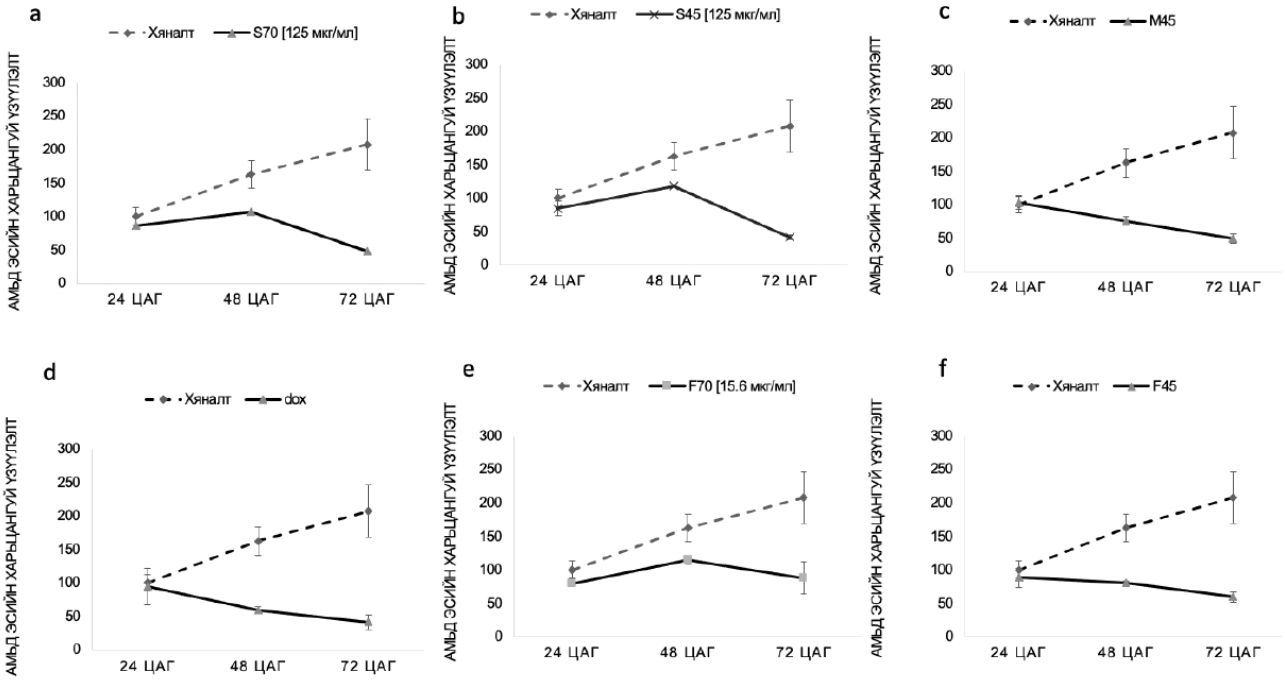
Үр дүн:

1. Эсийн ургалтыг саатуулах үйлдлийг тодорхойлсон нь: HepG2 эсийн өсгөвөрт ИШ-ий хандыг дарааллсан тунгаар нэмж өсгөвөрлөхөд 24 цагийн дараа ишнээс ялган авсан S70 ба S45 хандны 125 мкг/мл тун, навчнаас ялган авсан F70 хандны 15.6 мкг/мл тун, F45 хандны 25 мкг/мл тун, иш ба навчны холимгоос ялган авсан M45 хандны 100 мкг/мл тун тус бүр эс хордуулах нөлөөгүй цочмог хоргүй тун байгаа нь тус тус тодорхойлогдлоо.



Зураг 1. ИШ хандны хавдрын эс хордуулах байдал.
Ханд тус бүрийн дарааллсан тунгаар HepG2 эсийн 24 цаг үйлчилж МТТ шинжилгээгээр амьд эсийг илрүүлсэн. (*$p < 0.05$)

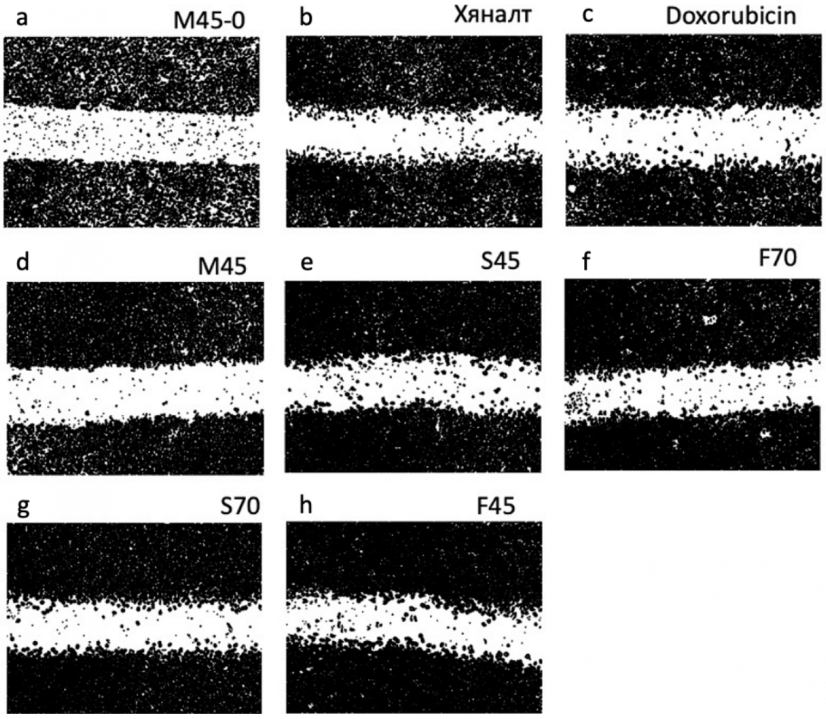
Ханднуудын хоргүй тунгаар 48, 72 цаг үйлчилэхэд эсийн ургалтыг 64.5-74.2%, 23.5-39.6% хүртэл тус тус бууруулсан байна ($p < 0.05$) (Зураг 2).



Зураг 2. ИШ-ий хандны хавдрын эсийн ургалтыг саатуулсан байдал.

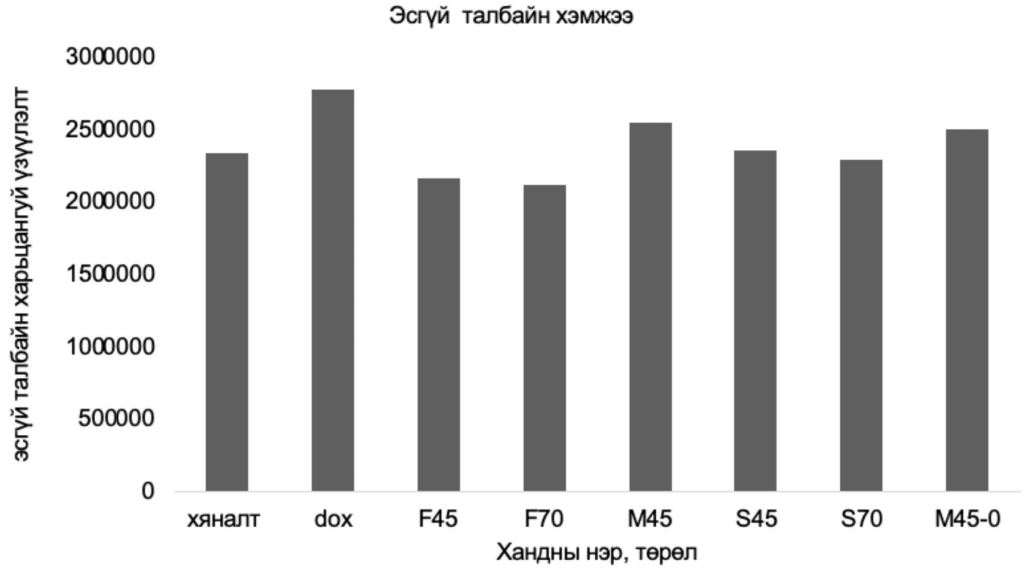
Ханд тус бүрийн хоргүй тунгаар HepG2 эсийг 24,48, 72 цаг үйлчилж МТТ шинжилгээгээр амьд эсийг илрүүлсэн.

2. Эсийн нүүн шилжилтийг саатуулах үйлдлийг тодорхойлсон нь: HepG2 эсийн өсгөвөрт ИШ-ий хандны хоргүй тунгаар үйлчилж эсийн нүүн шилжилтийг эсгүй зурвас үүсгэх аргаар 8, цагийн дараа зураг авч шинжлэхэд M45 ханд хамгийн ихээр саатуулж байлаа (Зураг 3).



Зураг 3. HepG2 эсийн нүүн шилжилтийг тодорхойлсон

Эсгүй зурвас үүсгэсний дараа хэмжилт хийж хяналтын бүлгийг 0 цагтай харьцуулахад талбайн хэмжээ багассан боловч 8 цагийн дараа доксорубицин саатуулах нөлөөө их тул 0 цагтай ойролцоо харин навч ишний холимог ханд саатуулах нөлөө хамгийн их байлаа (Зураг 4).



Зураг 4. Эсгүй талбайн хэмжээг тодорхойлсон нь

3. Эс хордуулах IC 50 тунг тодорхойлсон нь: ИШ-ий хандыг дараалласан тунгаар эсийн өсгөвөрт нэмж эсийн ургалтыг саатуулах IC50 тунг тодорхойлоход F70 ханд 37.88 мкг/мл, F45 ханд 85.0, S70 337.85, ба S45 ханд 278.1, M45 ханд 183.6 мкг/мл тус тус байлаа (Хүснэгт 1)

Хүснэгт 1. Эс хордуулах IC50 тун

Ханд	IC 50 [мкг/мл]
	HepG2
F70	37.9
F45	85.0
S70	337.9
S45	278.1
M45	183.6

Хэлцэмж: ИШ ургамлын спиртэн ханд хавдрын эсийн ургалтыг саатуулдаг тухай судалгаа бий боловч ИШ бүхэл ургамлын хандыг хэрэглэхэд изокүинолин алкалоидын агууламжаас хамааранд заримдаа хортой нөлөө үзүүлдэг бөгөөд тунг нарийн тооцоолох шаардлагатай байдаг.[8] Манай оронд ИШ ургамлын шүүс болон газрын дээд хэсгийн нунтагыг хандалж биологийн нэмэлт бүтээгдэхүүн байдлаар худалдаалагдаж байна. Иймд цаашид навч болон ишний хандны найрлага үйлдлийг судалсан судалгаа ховор байна. Аливаа ургамлын эмчилгээний шинж чанар, алкалоидын найрлага зэрэг нь ургалтын нөхцөл, ургамлын хэсэг, тун зэргээс ихээхэн хамаардаг тул бид энэхүү судалгаандаа ИШ-ий навч, ишний хандыг харьцуулан судалсан. [12]

Цөөнгүй судлаачид ИШ ургамлын навчны 80% спиртэн ханд ашиглажээ.[13,16] Мөн навчны хандны үйлдлийг судалж фенологын үе шатаас хамаарч навчны хандны антиоксидант чадварын хэмжилтээр ялгаатай байдлыг тогтоосон байна.

Бидний судалгаагаар эсийн ургалтыг саатуулах IC50 эсийн төрөл хандны төрлөөс хамааран ялгаатай байлаа (Хүснэгт 1).

Д.Баатар, О.Сүхбаатар (2020) нарын судлаачдынхаар ИШ-ий 80% этанол ханд SKHep1 эсийн ургалтыг саатуулах IC50 нь 369.35мкг/мл байв.[16]

Дүгнэлт:

1. ИШ ургамлын навчнаас ялгасан ханд (F70, F45) бага тунгаар, харин ишний ханд (S70, S45) түүнээс 8 дахин их тунгаар үйлчлэхэд эсийг хордуулж байлаа. ИШ-ий ханднуудын хоргүй тун HepG2 эсийн ургалтыг 48, 72 дахь цагуудад саатуулах үйлдэлтэй байна.
2. ИШ-ий ханд тус бүр их тунгаар эсийг үхүүлэх, бага тунгаар ялангуяа иш навчны холимог ханд HepG2 эсийн нүүн шилжилтийг саатуулах нөлөөтэй болох нь тогтоогдлоо.
3. Элэгний хавдрын эсийн ургалтыг саатуулах IC50 хандны төрлөөс хамааран ялгаатай байлаа. Навчны ханднууд /F70, F45/ эсийн нүүн шилжилтийг 50% саатуулах идэвх буюу IC50 нь бага тунгаар эсийн нүүн шилжилтийг саатуулж байлаа.

Ном зүй

1. *Хорт хавдрын өвчлөл 2010-2019 он. Монгол Улсын Үндэсний статистикийн хороо; 2020. https://www.1212.mn/. 2020;*
2. *Gordaliza M. Natural products as leads to anticancer drugs. Clinical and Translational Oncology. 2007;9(12):767-776.*
3. *Solowey E, Lichtenstein M, Sallon S, Paavilainen H, Solowey E, Lorberboum-Galski H. Evaluating Medicinal Plants for Anticancer Activity. The Scientific World Journal. 2014;2014:721402.*
4. *Greater Celandine Flowers and Leaf. 2021. https://www.urgamal.com/en/product/greater-celandine.html. Accessed 2021.04.25.*
5. *Xie YJ, Gao WN, Wu QB, et al. Chelidonine selectively inhibits the growth of gefitinib-resistant non-small cell lung cancer cells through the EGFR-AMPK pathway. Pharmacol Res. 2020;159:104934.*
6. *Herrmann R, Skaf J, Roller J, Polednik C, Holzgrabe U, Schmidt M. Anticancer effects of NSC-631570 (Ukrain) in head and neck cancer cells: In vitro analysis of growth, invasion, angiogenesis and gene expression. Oncol Rep. 2020;43(1):282-295.*
7. *Pantano F, Mannocchi G, Marinelli E, et al. Hepatotoxicity induced by greater celandine (Chelidonium majus L.): a review of the literature. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2017;21(1 Suppl):46-52.*
8. *Products CoHM. Assessment report on Chelidonium majus L.,*

herba. European Medicines Agency; 2012-01-20 2012. EMA/HMPC/369801/2009.
9. Rosel D, Fernandes M, Sanz-Moreno V, Brábek J. Migrastatics: Redirecting R&D in Solid Cancer Towards Metastasis? Trends Cancer. 2019;5(12):755-756.
10. Deljanin M, Nikolic M, Baskic D, et al. Chelidonium majus crude extract inhibits migration and induces cell cycle arrest and apoptosis in tumor cell lines. J Ethnopharmacol. 2016; 190:362-371.
11. Jargalsaikhan G, Wu JY, Chen YC, Yang LL, Wu MS. Comparison of the Phytochemical Properties, Antioxidant Activity and Cytotoxic Effect on HepG2 Cells in Mongolian and Taiwanese Rhubarb Species. Molecules. 2021;26(5).
12. Tserendagva D, lt, sup, et al. Effects of Hepaclin-4 on Hepatocellular Carcinoma (Hep G2). CAJMS. 2018;4(1):48-54.
13. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. Nat Protoc. 2007;2(2):329-333.
14. Sebaugh JL. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. Pharm Stat. 2011;10(2):128-134.
15. Hong H, Baatar D, Sukhbaatar O. Mongolian Chelidonium majus Suppresses Metastatic Potential of Hepatocellular Carcinoma Cells through TIMP Up-regulation and MMP Down-regulation. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2020;82(3):456-464

The study of the effects of Chelidonium majus on the growth of cancer cells

Dashkhorol D[1,5], Uugangerel E[2,3], Enkhmaa D[2,3], Suvdaa B[2,4], Adilsaikhan M[5], Erdenezaya O[2,6]

[1]Graduate school, MNUMS
[2]Institute of Biomedical Science, MNUMS
[3]Department of Chemistry, School of Biomedical Science, MNUMS
[4]Department of Histology, MNUMS
[5]Mongolia-Japan Hospital, MNUMS
[6]Department of Anatomy, School of Biomedical Science, MNUMS
E-mail: Dashkhorol@mnums.edu.mn, Tel: 88116778

Background: Chelidonium majus (CM) is a perennial plant and its above ground part and aqueous and alcoholic extract have been used in traditional medicine for the treatment of wide variety of illnesses. The therapeutic properties of any herb depend largely on the type of plant, the type of extract, and the cells involved. Although there is evidence that the CM extract inhibits the migration of breast and laryngeal cancer cells, there is no information on how it affects the migration of liver cancer cells. Therefore, we aimed to compare the action of alcohol extracts from each part of CM plant with HepG2 cell culture of the liver. The following objectives have been set for this purpose.

1. To compare the effect of each extract on the growth of liver cancer cells
2. To compare the effect of each extract on HepG2 cell migration
3. To compare the effect of each extract on HepG2 cell using IC50 calculation

Materials and Methods: According to the comparative experimental study model, the action of CM plant extracts on HepG2 cell line in vitro was compared in each group. 5 types of extracts (F70, F45, S70, S45, M45) diluted with 70% and 45% ethanol from each leaf and stem of the plant in the biological chemistry laboratory.

Results: After 24 hours of sequential dosing of the HepG2 cell culture, non-toxic doses of the extracts reduced cell growth to 64.5-74.2% and 23.5-39.6%, respectively, at 48 and 72 hours ($p < 0.05$). Cell migration was conducted using scratch assay method and ImageJ program after treatment of nontoxic dose of CM extract in cell culture for 8 hours and M45 extract inhibited the migration the most compared to other extracts. Leaf extract cell toxicity IC 50 dose was significantly less than stem extracts.

Conclusion:

1. The effects of 5 types of plant extracts on cancer cell toxicity and inhibition of cell growth were different for each extract.
2. Plant leaves has toxic effect in low doses, while stem extract in 8 times higher doses is toxic on HepG2 cell.
3. Non-toxic dose of CM extracts inhibits cell growth at 48- and 72-hours treatment.

Keywords: Hepg2, MTT analysis, IC50, cancer cell migration