

***Rhododendron adamsii* ургамлын биоидэвхт фракцын TLR4-ийн дохио дамжилтын эцсийн бүтээгдэхүүнд үзүүлэх нөлөөг *in vitro* орчинд судалсан дүн**

Н.Отгонтуяа^{1,2,3}, Б.Бадмаараг^{1,2,3}, С.Хашчулуун¹, Ч.Онон³, С.Оюун^{1,3},
С.Цогтсайхан¹, О.Эрдэнэбаяр^{4,5}, С.Чимидцэрэн^{1,3}

¹АШУУИС, Био-АС, Дархлаа судлалын тэнхим

²АШУУИС, Эрдмийн сургууль

³"Прецилаб" лаборатори

⁴АШУУИС, Био-АС, Анатомийн тэнхим

⁵АШУУИС, Био-Анагаахын хүрээлэн

Цахим шуудан: fbm24e007@gt.mnms.edu.mn, Утас: 89291160

Түлхүүр үг:

Цагаан даль
Липополисахарид
iNOS
TNF α
IFN β

Товч утга:

Үндэслэл: *Rhododendron adamsii* (Цагаан даль) ургамал нь Алтайн бүс нутаг, Монгол улс ба ОХУ-ын нутаг дэвсгэрт тархан ургадаг, тамир тэнхээ сэргээх үйлчилгээтэй эмийн ургамал юм. Үрэвсэл нь бактер, вирус, мөөгөнцөр зэрэг эмгэг төрүүлэгчидтэй тэмцэх дархлааны хариу урвал бөгөөд үүнд макрофаг, фибробласт, шигүү мөхлөгт эс, нейтрофил зэрэг эсүүд азотын исэл, TNF- α , IL-1 β зэрэг цитокинуудыг ялгаруулан оролцдог. ОХУ-ын суурь судалгааны сантай хамтарсан төслийн хүрээнд *R. rosea* (L.) болон *Rh. adamsii* ургамлын биоидэвхт фракцын TLR4-ийн дохио дамжилтын эцсийн бүтээгдэхүүний гарц болон дохио дамжилтад оролцдог зарим уургийн идэвхжлийг судалж байна. Төслийн хүрээнд гүйцэтгэсэн өмнөх судалгааны үр дүнд зарим биоидэвхт фракцууд нь үрэвслийн эсрэг үйлдэл үзүүлж байгааг тогтоосон. Тодруулбал, 7.11 фракц нь ЛПС-аар өдөөгдсөн RAW 264.7 эсийн шугаман өсгөвөрт азотын исэл болон үрэвслийн дохио дамжилтын эцсийн бүтээгдэхүүний ялгаралтыг дарангуйлж байсан бол 7.46, 7.52 фракц нь ERK1/2, JNK, IRF3 зэрэг уургийн фосфоржилтод нөлөөлж байжээ. Эдгээр үр дүн нь *Rh. adamsii* ургамлын биоидэвхт фракцуудын үрэвслийн дохио дамжилтын эцсийн бүтээгдэхүүнд үзүүлэх нөлөөг илүү нарийвчлан судлах шаардлагатайг харуулж байна. **Зорилго:** *Rhododendron adamsii* ургамлаас гарган авсан 7.48, 7.55 биоидэвхт фракцуудын TLR4-ийн дохио дамжилтын эцсийн бүтээгдэхүүний гарцыг RAW264.7 эсийн өсгөвөрт туршин судлах. **Арга, аргачлал:** RAW264.7 эсийн шугаман өсгөвөр болон *Rh. adamsii* ургамлын биоидэвхт фракцыг ашиглан 3 бүлэгт хуваан энэхүү судалгааг хийж гүйцэтгэлээ. Тогтворжсон RAW264.7 эсийн шугаман өсгөврийг 100 нг/мл ЛПС-аар өдөөсний дараа, өмнөх судалгааны үр дүнд гарган авсан ургамлын биоидэвхт фракцын хоргүй тунд үндэслэн 10 мкг/мл тунгаар үйлчлэн азотын дан ислийн гарцыг Грейссийн аргаар тодорхойлсон. TNF α , IFN β цитокины гарцыг ФХЭБУ-

аар үнэлсэн ба туршилтыг 3 удаа давтав. Судалгааны үр дүнг SPSS 25.0 программ ашиглан One way ANOVA болон Independent samples T-test ашиглан боловсруулав. **Үр дүн:** Эерэг хяналтын бүлгийн азотын ислийн гарцыг сөрөг хяналтын бүлэгтэй харьцуулан үзэхэд статистик ач холбогдол бүхий өндөр тодорхойлогдсон. Мөн туршилтын бүлгийг эерэг хяналтын бүлэгтэй харьцуулан судлахад азотын дан ислийн гарц статистик ач холбогдолтойгоор буурсан нь макрофаг эсийн TLR4-ийн дохио дамжилтыг саатуулдаг байж болохыг харуулж байна. 7.48 фракц TNF α -ийн гарцыг бууруулж, IFN β -ийн гарцыг нэмэгдүүлсэн ч статистик ач холбогдол илэрсэнгүй. 7.55 фракц нь TNF α , IFN β -ийн гарцыг бага зэрэг бууруулсан ч мөн статистикийн хувьд ач холбогдол илэрсэнгүй. **Дүгнэлт:** *Rh. Adamsii* ургамлын 7.48, 7.55 биоидэвхт фракц нь ЛПС-аар өдөөсөн макрофаг эсийн шугаман өсгөвөрт азотийн дан ислийн гарцыг бууруулсан нь TLR4 дохио дамжилтыг саатуулдаг байж болохийг харуулсан хэдий ч TNF α , IFN β -ийн гарцад бага нөлөөлсөн нь эдгээр цитокиноор дамжсан TLR4-ийн дохио дамжилтад нөлөөлөхгүй, бусад зам, үе шатанд нөлөөлөх замаар эцсийн бүтээгдэхүүний гарцад нөлөөлсөн байж болохыг харуулж байна.

Үндэслэл: *Rhododendron adamsii* (Цагаан даль) ургамал нь Алтайн бүс нутагт, Монгол улс ба ОХУ-ын нутаг дэвсгэрт тархан ургадаг, түгээмэл ашигладаг эмийн ургамал юм.¹ *R. adamsii*-ийг тайвшруулах, тамир тэнхээ сэргээх, дархлаа дэмжих дэмжих үйлчилгээтэй гэж тэмдэглэгдсэн байна.^{2,3}

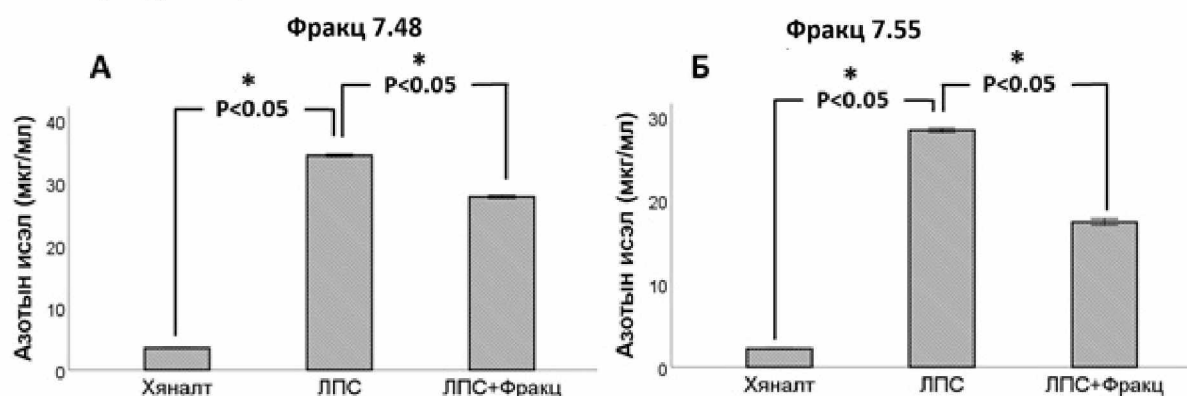
Бактер, вирус, мөөгөнцөр зэрэг эмгэг төрүүлэгчдийн улмаас бие махбодид халдварын эсрэг дархлааны цогц хариу урвал өрнөх бөгөөд макрофаг, фибробласт, шигүү мөхлөгт эс, нейтрофил зэрэг төрөлхийн дархлааны эсүүд идэвхждэг.^{4,5} Макрофаг нь азотын исэл (NO) болон хавдрын үхжилийн хүчин зүйл (TNF- α), интерферон β (IFN β) зэрэг үрэвслийн цитокинуудыг ялгаруулж, үрэвслийн үйл явцад нөлөөлдөг.^{6,7}

ОХУ-ын суурь судалгааны сантай хамтарсан “Эмийн ургамлаас ялгасан биологийн идэвхтэй фракцуудыг *in vitro* орчинд шинжлэн судлах иж бүрэн аргачлал боловсруулах судалгаа” сэдэвт төслийн хүрээнд *R. rosea* (L.) болон *Rh. adamsii* ургамлаас ялган авсан биоидэвхт фракцын TLR4-ийн дохио дамжилтын эцсийн бүтээгдэхүүний гарцад үзүүлэх үйлдэл болон дохио дамжилтад оролцдог зарим уургийн идэвхжлийг судалж байна. Энэхүү судалгааны үр дүнд *Rh. adamsii* ургамлаас гарган авсан зарим биоидэвхт фракцууд нь үрэвслийн эсрэг үйлчлэл үзүүлж байгааг тогтоосон байна. Тодруулбал, фракц 7.11 нь ЛПС-аар өдөөгдсөн RAW 264.7 эсийн шугаманд азотын дан исэл болон үрэвслийн дохио дамжилтын бүтээгдэхүүний ялгаралтыг дарангуйлж байсан бол 7.46 болон 7.52 фракц нь ERK1/2, JNK, IRF3 зэрэг дохио дамжилтын замын зохицуулгын уургийн фосфоржилтод нөлөөлж байжээ.^{8,9} Мөн *Rh. adamsii* эмийн ургамлын нийт 47 фракцын биологийн үйлдлийг *in vitro* орчинд судлах шаардлагатай байсан бөгөөд бид цаашдын судалгаанд уг ургамлаас МТБЭ уусгагч ашиглан хийн хроматографын аргаар ялган авсан, эс хордуулах нөлөө үзүүлээгүй биоидэвхт фракцуудын үрэвслийн дохио дамжилтад үзүүлэх нөлөөг үргэлжлүүлэн судлах шаардлагатай болсон.

Зорилго: *Rhododendron adamsii* ургамлаас гарган авсан 7.48, 7.55 биоидэвхт фракцуудын TLR4-ийн дохио дамжилтын эцсийн бүтээгдэхүүний гарцыг RAW264.7 эсийн өсгөвөрт туршин судлах

Арга, аргачлал: АШУҮИС-ийн Судалгааны ёс зүйн хяналтын хорооны 2024 оны 4-р сарын 19-ний өдрийн хурлаар судалгааны ажлын ёс зүйн зөвшөөрөл авсны үндсэн дээр уг судалгааг хийж гүйцэтгэв (протокол №2024/3-04). АШУҮИС-ийн Био-Анагаахын Хүрээлэнгийн Эсийн өсгөврийн лабораторид хадгалагдаж буй RAW264.7 эсийн шугаман өсгөвөр болон ОХУ-ын Алтайн Улсын Их Сургуулийн Биологийн факультетийн Био-Анагаахын Хүрээлэнд бэлтгэсэн *Rh. adamsii* ургамлын био идэвхт фракцыг ашигласан. RAW264.7 эсийг 5% үнээний хээлийн ийлдэс, 1% антибиотикийн холимог агуулсан DMEM эс өсгөврийн орчинд 5% CO₂ бүхий, 37°C хэмийн эсийн өсгөврийн инкубаторт өсгөвөрлөсөн ба RAW264.7 эсийн шугаман өсгөврийг 5 удаа сэлгүүлж, тогтворжсоны дараа туршилт судалгаанд ашигласан.¹⁰ Туршилтыг сөрөг хяналтын бүлэг, ЛПС-аар өдөөсөн эерэг хяналтын бүлэг, ЛПС-аар өдөөсний дараа фракцаар үйлчилсэн туршилтын бүлэг гэсэн 3 бүлэгт хуваан хийж гүйцэтгэв. Тогтворжсон RAW264.7 эсийн шугаман өсгөврийг 100 нг/мл ЛПС-аар өдөөсний дараа, өмнөх судалгааны үр дүнд гарган авсан ургамлын биоидэвхт фракцын хоргүй тунд үндэслэн 10 мкг/мл тунгаар үйлчилж, Грейссийн аргаар азотын дан ислийн гарцыг тодорхойлсон.¹¹ TNF α , IFN β цитокины гарцыг ФХЭБУ (Фермент холбоот эсрэг биеийн урвал)-аар тодорхойлсон ба туршилт бүрийг 3 удаа давтан шинжилж, үр дүнг тооцоолон гаргасан.¹² A lack of consensus exists on how best to perform and interpret quantitative real-time PCR (qPCR Судалгааны үр дүнг SPSS 25.0 программ ашиглан One way ANOVA, Independent samples T-test-ийн аргаар статистик боловсруулалт хийж гүйцэтгэв.

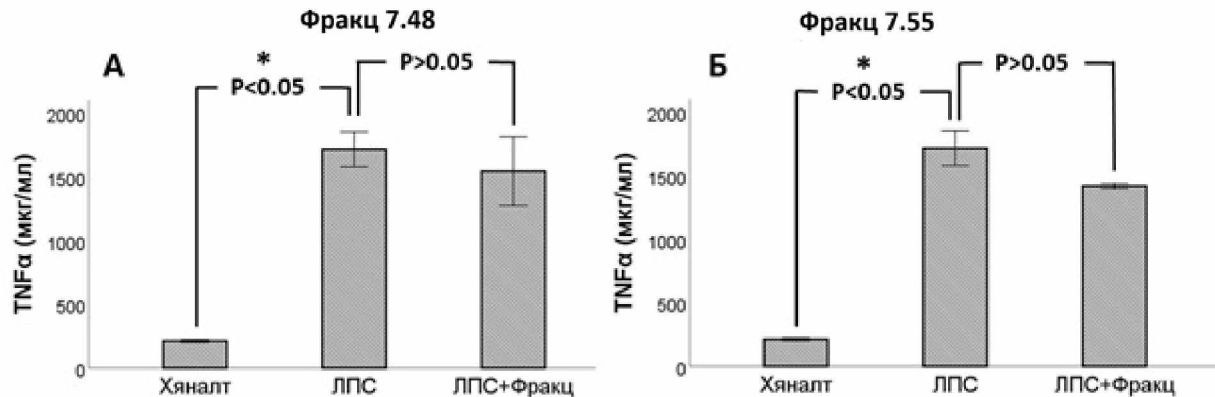
Үр дүн: *Rh. adamsii* ургамлын 7.48, 7.55 дугаартай фракцаар үйлчилсэн азотын дан ислийн гарцад нөлөөлөх нөлөөг Грейссийн аргаар арифметик дундаж, стандарт хазайлтыг тодорхойлоход сөрөг хяналтын бүлэгт 3.5 ± 0.6 мкМ, 2.1 ± 1.3 мкМ, эерэг хяналтын бүлэгт 34.0 ± 1.3 мкМ, 27.2 ± 1.5 мкМ, туршилтын бүлэгт 28.8 ± 0.6 мкМ, 17.3 ± 3.6 мкМ тодорхойлогдсон (Зураг 1).



Зураг 1. *Rh. adamsii* ургамлын биоидэвхт фракцын азотын ислийн гарцад нөлөөлөх нөлөөг Грейссийн аргаар тодорхойлсон үр дүн. А-7.48, Б-7.55 дугаартай фракцын азотын ислийн гарцыг тодорхойлсон дүн.

ЛПС-аар өдөөсөн эерэг хяналтын бүлгийн азотын ислийн гарцыг сөрөг хяналтын бүлгийн азотын ислийн гарцтай харьцуулан судлахад статистик ач холбогдол бүхий ялгаа илэрсэн ($p < 0.05$). Энэ нь ЛПС-ийн нөлөөгөөр макрофаг эс идэвхжсэн болохыг харуулж байна. Мөн ЛПС-аар өдөөж, фракцаар үйлчилсэн туршилтын бүлгийг ЛПС-аар өдөөсөн эерэг хяналтын бүлэгтэй харьцуулахад азотын дан ислийн гарцыг статистик ач холбогдол бүхий бууруулсан нь макрофаг эсийн TLR4-ийн дохио дамжилтыг саатуулдаг байж болохыг харуулж байна.

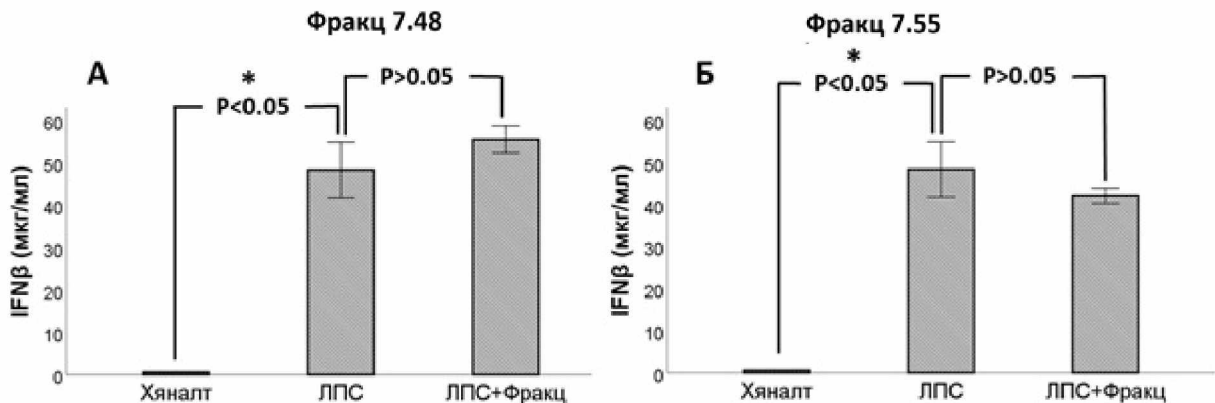
Харин 7.48, 7.55 дугаартай фракцаар үйлчилсэн TNF α цитокины гарц сөрөг хяналтын бүлэгт 214.8 ± 16.8 пг/мл, ЛПС-аар өдөөсөн эерэг хяналтын бүлэгт 1718.7 ± 237.6 пг/мл, туршилтын бүлэгт тус тус 1545.8 ± 468.6 пг/мл, 1419.5 ± 36.5 пг/мл байсан бол IFN β цитокины гарц сөрөг хяналтын бүлэгт 2.6 ± 0.1 пг/мл, эерэг бүлэгт 48.4 ± 11.5 пг/мл, туршилтын бүлэгт тус тус 55.6 ± 5.6 пг/мл, 42.1 ± 3.1 пг/мл тодорхойлогдлоо (Зураг 2, 3).



Зураг 2. *Rh. Adamsii* ургамлын биоидэвхт фракцын TNF α цитокины гарцад нөлөөлөх нөлөөг ФХЭБУ-ын аргаар тодорхойлсон үр дүн. А-7.48, Б-7.55 дугаартай фракцын TNF α цитокины гарцыг тодорхойлсон дүн.

Туршилтын бүлэгт 7.48 фракц TNF α -ийн гарцыг бууруулж, IFN β -гийн гарцыг нэмэгдүүлсэн ч статистик ач холбогдол илрээгүй ($p > 0.05$). Мөн

7.55 фракц нь TNF α , IFN β -гийн гарцыг бага зэрэг бууруулсан хэдий ч статистик ач холбогдол ($p > 0.05$) илэрсэнгүй.



Зураг 3. *Rh. Adamsii* ургамлын биоидэвхт фракцын IFN β цитокины гарцад нөлөөлөх нөлөөг ФХЭБУ-ын аргаар тодорхойлсон үр дүн. А-7.48, Б-7.55 дугаартай фракцын IFN β цитокины гарцыг тодорхойлсон дүн.

Энэ нь *Rh. adamsii* ургамлын 7.48, 7.55 дугаартай биоидэвхт фракцууд нь макрофаг эсийн TLR4-ийн TNF α , IFN β цитокиноор дамжсан дохио дамжилтад статистик ач холбогдол бүхий нөлөө үзүүлээгүй ч дохио дамжилтын бусад зам, үе шатанд нөлөөлөх замаар эцсийн бүтээгдэхүүн болох азотын дан ислийн гарцад нөлөөлсөн байж болохыг харуулж байна.

Хэлцэмж: *Rhododendron adamsii* ургамлын үрэвслийн эсрэг үйлчлэлийг судалсан олон улсын судалгаанууд хийгдсээр байна.^{13,14} Тухайлбал, *Rhododendron album* Blume-ийн метанолын ханд нь ЛПС-аар өдөөгдсөн RAW264.7 эсийн шугамд iNOS болон COX-2-ийн

илэрхийллийг дарангуйлж, үрэвслийн эсрэг үйлчлэл үзүүлсэн байна.¹⁵ Мөн *Rh. adamsii* ургамлын липофил хэсгүүдийн найрлагыг судалж, зарим фракцууд нь SARS-CoV-2 вирусын гол протеазыг дарангуйлах идэвхтэй болохыг тогтоожээ.¹⁶ Эдгээр үр дүн нь *Rhododendron* төрлийн ургамлуудын биоидэвхт нэгдлүүд нь үрэвслийн эсрэг болон дархлааны хариу урвалд нөлөөлөх үйлчлэлтэй байж болохыг харуулж байна.

Бидний судалгааны үр дүнгээр *Rh. adamsii* ургамлын 7.48 болон 7.55 фракцууд нь азотын дан ислийн гарцыг бууруулж, TLR4-ийн дохио дамжилтыг саатуулж болохыг харуулсан ч TNF α болон IFN β -ийн гарцад харьцангуй багаар нөлөөлсөн. Эдгээр үр дүнг бусад *Rhododendron* зүйлийн судалгааны үр дүнтэй

харьцуулахад, үрэвслийн эсрэг үйлчлэл нь ургамлын төрөл зүйл, ашигласан фракц, туршилтын нөхцлөөс хамаарч өөр өөр байж болохыг харуулж байна.¹⁷ Мөн *Rh. adamsii* ургамалд агуулагдах биоидэвхт нэгдлүүд болон тэдгээрийн химийн найрлагыг тодорхойлсон хэд хэдэн судалгаа байгаа хэдий ч түүний үрэвслийн эсрэг нөлөөг судалсан судалгаа хомс байна. Тухайлбал, Daniil N. Olennikov болон бусад судлаачид (2021) *Rh. adamsii* ургамлын навчны ханданд 170 гаруй нэгдлийг илрүүлсэн. Үүнд нүүрс ус, органик хүчил, энгийн фенолын гликозид, тритерпений гликозид, флавоноид, пренилжсэн фенол зэрэг нэгдлүүд багтдаг болохыг судлан тогтоожээ.¹⁸ Эдгээр нэгдлүүдийн зарим нь үрэвслийн эсрэг болон антиоксидант үйлчлэлтэй болохыг тэмдэглэсэн байна. Мөн Т.Р.Кукина нар *Rh. adamsii* ургамлын липофил хэсгийн найрлагыг судалж, тритерпений хүчил, фенолкарбоны хүчил, ханасан болон ханаагүй тосны хүчил зэрэг 150 гаруй нэгдлийг илрүүлсэн бөгөөд эдгээр нэгдлүүдийн зарим нь үрэвслийн эсрэг үйлчлэлтэй байж болохыг тогтоожээ.¹⁶ Бидний судалгааны хамтганажиллагааны хүрээнд ОХУ-ын судлаачид *Rh. adamsii* ургамлаас 4-фенилбутанол, β -парнезин, транс-неролидол зэрэг 30 гаруй нэгдэл илрүүлсэн. Эдгээр нэгдлүүд нь IL-6, TNF α , азотын давхар ислийн гарцыг дарангуйлж, өвдөлт намдаах болон үрэвслийн эсрэг нөлөөтэй болохыг судлан тогтоосон.¹⁹ Харин бидний судалгаандаа ашигласан 7.48 болон 7.55 фракцын химийн найрлага бүрэн мэдээлэгдээгүй байсан бөгөөд эдгээр фракцаар үйлчлэхэд TLR4-ийн TNF α , IFN β цитокины гарцад харьцангуй бага нөлөөлсөн нь фракцуудын химийн нэгдлүүдийн агууламж, хэмжээтэй хамааралтай байж болох юм.

Цаашид *Rh. adamsii* болон бусад *Rhododendron* зүйлийн биоидэвхт фракцуудын эсийн дохио дамжилтын молекулууд болон тэдгээрийн эцсийн бүтээгдэхүүдүүдийн идэвхжлийг МРНХ-гийн түвшинд илүү нарийвчлан судлах шаардлагатай байна.

Дүгнэлт: *Rh. Adamsii* ургамлын 7.48, 7.55 биоидэвхт фракц нь ЛПС-аар өдөөсөн макрофаг эсийн шугаман өсгөөрт азотийн дан ислийн гарцыг бууруулсан нь TLR4 дохио дамжилтыг саатуулдаг байж болохийг харуулсан хэдий ч TNF α , IFN β -ийн гарцад бага нөлөөлсөн нь эдгээр цитокиноор дамжсан TLR4-ийн дохио дамжилтад бус бусад зам, үе шатанд нөлөөлөх замаар эцсийн бүтээгдэхүүний гарцад нөлөөлдөг байж болохыг харуулж байна.

Талархал: Уг судалгааг хийж гүйцэтгэхэд гүн туслалцаа үзүүлсэн ОХУ-ын суурь судалгааны сантай хамтарсан “Эмийн ургамлаас ялгасан биологийн идэвхтэй фракцуудыг *in vitro* орчинд шинжлэн судлах иж бүрэн аргачлал боловсруулах судалгаа” сэдэвт төслийн баг, АШУҮИС-ийн Био Анагаахын сургуулийн Дархлаа судлалын тэнхим, АШУҮИС-ийн Био Анагаахын хүрээлэнгийн хамт олонд талархал илэрхийлье.

Ном зүй:

1. Tao H, Wu X, Cao J, et al. *Rhodiola species: A comprehensive review of traditional use, phytochemistry, pharmacology, toxicity, and clinical study.* Med Res Rev. 2019;39(5):1779-1850. doi:10.1002/med.21564
2. Olennikov DN, Nikolaev VM, Chirikova NK. *Sagan Dalya Tea, a New “Old” Probable Adaptogenic Drug: Metabolic Characterization and Bioactivity Potentials of Rhododendron adamsii Leaves.* Antioxidants. 2021;10(6):863.
3. Belousov MV, Berezovskaya TP, Komissarenko NF, Tikhonova LA. *Flavonoids of Siberian-Far-Eastern species of rhododendrons of the subspecies Rhodorastrum.* Chem Nat Compd. 1998;34(4):510-511. doi:10.1007/BF02329610
4. Newton K, Dixit VM. *Signaling in Innate Immunity and Inflammation.* ColdSpringHarbPerspectBiol. 2012;4(3):a006049-a006049. doi:10.1101/cshperspect.a006049
5. Hannoodee S, Nasuruddin DN. *Acute Inflammatory Response. StatPearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Dian Nasuruddin declares no relevant financial relationships with ineligible companies.* StatPearls Publishing.
6. Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. *Mechanisms of the inflammatory response.* Best Pract Res Clin Anaesthesiol. 2004;18(3):385-405. doi:10.1016/j.bpa.2003.12.002
7. Punchard NA, Whelan CJ, Adcock I. *The Journal of Inflammation.* J Inflamm. 2004;1(1):1. doi:10.1186/1476-9255-1-1
8. Ч.Онон. Цагаан даль (*Rhododendron Adamsii*) ургамлаас ялган авсан биоидэвхт фракцуудын эсийн үрэвслийн зарим урьдал медиаторуудын гарц болон дохио дамжилтын уургийн идэвхжилтэнд үзүүлэх нөлөөг судалсан дүн. ЭМШҮС. 2024;20, №2:109-113.
9. С.Хашчулуун. Эмийн ургамлаас ялган авсан биоидэвхт фракцын макрофагийн идэвхжлийн бүтээгдэхүүнд үзүүлэх адаптоген нөлөөг судалсан дүн. ЭМШҮС. 2023;19, №5:147-152.
10. Guo Q, Bi D, Wu M, et al. *Immune activation of murine RAW264.7 macrophages by sonicated and alkalinized paramylon from Euglena gracilis.* BMC Microbiol. 2020;20(1):171. doi:10.1186/s12866-020-01782-y
11. Promega Corporation. *Griess Reagent System Protocol.* Accessed January 31, 2025. <https://www.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/griess-reagent-system-protocol>
12. Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. *The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments.* Clin Chem. 2009;55(4):611-622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
13. Rodriguez-Yoldi MJ. *Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Plant Extracts.* Antioxidants. 2021;10(6):921. doi:10.3390/antiox10060921
14. Merez-Sadowska A, Sitarek P, Śliwiński T, Zajdel R. *Anti-Inflammatory Activity of Extracts and Pure Compounds Derived from Plants via Modulation of Signaling Pathways, Especially PI3K/AKT in Macrophages.* Int J Mol Sci. 2020;21(24):9605. doi:10.3390/ijms21249605
15. Park JW, Kwon OK, Kim JH, et al. *Rhododendron album Blume inhibits iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW264.7 cells through the downregulation of NF- κ B signaling.* Int J Mol Med. 2015;35(4):987-994. doi:10.3892/ijmm.2015.2107
16. T. P. Kukina IAE. *Composition of Lipophilic Components of Rhododendron adamsii Rehd. Ether Extract and Activity against SARS-CoV-2 Main Protease.* Russ J Bioorganic Chem. 2023;49:1730-1739.
17. Hussain A, Azam S, Maqsood R, et al. *Chemistry, biosynthesis, and therapeutics of antioxidant flavonoids and polyphenolics of genus Rhododendron: an overview.* Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol. Published online September 14, 2024. doi:10.1007/s00210-024-03428-6
18. Olennikov DN, Nikolaev VM, Chirikova NK. *Sagan Dalya Tea, a New “Old” Probable Adaptogenic Drug: Metabolic Characterization and Bioactivity Potentials of Rhododendron adamsii Leaves.* Antioxidants. 2021;10(6):863. doi:10.3390/antiox10060863
19. Liu R, Hao D, Xu W, et al. *β -Sitosterol modulates macrophage polarization and attenuates rheumatoid inflammation in mice.* Pharm Biol. 2019;57(1):161-168. doi:10.1080/13880209.2019.1577461

The In vitro study on the effect of the bioactive fraction of *Rhododendron adamsii* on the end products of TLR4 signaling

Otgontuya N^{1,2,3}, Badmaarag B^{1,2,3}, Khashchuluun S¹ Onon Ch³, Oyun S^{1,3},
Tsogtsaikhan S¹, Erdenezaya O^{4,5} Chimidtseren S^{1,3}

¹Department of Immunology, School of Biomedicine, MNUMS

²Graduate School, MNUMS

³"Precilab" laboratory

⁴Department of Anatomy, School of Biomedicine, MNUMS

⁵Institute of Biomedical Science, MNUMS

E-mail: fbm24e007@gt.mnms.edu.mn Tel: +976-89291160

Background: *Rhododendron adamsii* (Sagean Dala) is a medical plant widely distributed in the Altai region, Mongolia, and Russia. It is traditionally used for its calming, restorative, and immune-boosting properties. Inflammation is a complex immune response against pathogens such as bacteria, viruses, and fungi, involving macrophages, fibroblasts, mast cells, and neutrophils. These cells release inflammatory mediators such as nitric oxide (NO), TNF- α , and IL-1 β .

In collaboration with the Russian Foundation for Basic Research, a project was initiated to investigate the bioactive fractions of *Rh. rosea* (L.) and *Rh. adamsii* and their effects on the production of TLR4 signaling end products and associated protein activation. Previous studies within this project have shown that certain bioactive fractions exhibit anti-inflammatory activity. Specifically, fraction 7.11 suppressed NO production and inflammatory signaling molecules in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages, while fractions 7.46 and 7.52 influenced the phosphorylation of proteins such as ERK1/2, JNK, and IRF3. These findings suggest the need for further investigation into the effects of *Rh. adamsii* bioactive fractions on inflammatory signaling pathways.

Aim: This study aims to evaluate the effects of bioactive fractions derived from *Rhododendron adamsii* on the production of TLR4 signaling end products in RAW264.7 macrophage cell cultures.

Materials and Methods: The study was conducted using RAW264.7 macrophage cell cultures and bioactive fractions extracted from *Rh. adamsii*, dividing the experiments into three groups. After stabilization, RAW264.7 cells were stimulated with 100 ng/mL LPS. Based on previous studies, non-toxic concentrations of bioactive fractions (10 μ g/mL) were applied. NO production was measured using the Griess assay, while TNF- α and IFN- β cytokine levels were evaluated using ELISA. Each experiment were repeated three times, and data were statistically analyzed using SPSS 25.0, applying One-way ANOVA and Independent Samples T-test.

Results: The NO production in the positive control group was significantly higher compared to the negative control. In contrast, the experimental groups showed a statistically significant reduction in NO production, suggesting a potential inhibitory effect on TLR4 signaling in macrophages. However, fraction 7.48 reduced TNF- α levels while increasing IFN- β production, but these changes were not statistically significant. Similarly, fraction 7.55 slightly reduced TNF- α and IFN- β levels, but the effect was also statistically insignificant.

Conclusion: The bioactive fractions 7.48 and 7.55 of *Rh. Adamsii* reduced nitric oxide (NO) production in LPS-stimulated macrophage cell line cultures, suggesting that they may inhibit TLR4 signaling. However, their lack of effect on TNF- α and IFN- β production indicates that they do not influence TLR4 signaling mediated by these cytokines. Instead, they may affect the final product output through other pathways or different stages of signal transduction.

Keywords: Rhododendron Adamsii, Lipopolysaccharide, iNOS, TNF- α , IFN β