Цагаан даль (*Rhododendron Adamsii*) ургамлаас ялган авсан биоидэвхт фракцын TLR4-ийн эсийн дотоод дохио дамжилт ба түүний эцсийн бүтээгдэхүүнд үзүүлэх нөлөөг судалсан дүн

Ч.Онон[1], Б.Бадмааараг[1], С.Хашчулуун[1], С.Цогтсайхан[1], С.Чимидцэрэн[1,4], О.Эрдэнэзаяа[2,3], Н.Золмөнх[1,4]

[1]АШУҮИС, Био-Анагаахын сургууль, Дархлаа судлалын тэнхим
[2]АШУҮИС, Био-Анагаахын хүрээлэн
[3]АШУҮИС, Био-Анагаахын сургууль, Анатомийн тэнхим
[4]АШУҮИС, МЯЭ, Эмнэлзүйн төв лаборатори
Цахим шуудан: Fbm23e008@gt.mnums.edu.mn, Утас: 80877080

Түлхүүр үг:

Rhododendron Adamsii
RAW264.7
NO
IFNβ
IRF3

Товч утга:

Үндэслэл: Макрофаг нь халдварын эсрэг хариу үзүүлдэг, шархны эдгэрэлт зэрэг эмгэг физиологийн нөхцлийг зохицуулдаг дархлааны үндсэн эс юм.[1] Үрэвслийн үед макрофаг эс антиген илчлэх, фагоцитоз, үрэвслийн урьдал цитокин болон өсөлтийн хүчин зүйлсийг ялгаруулах чухал үүргийг гүйцэтгэдэг.[2] Үрэвсэл нь эзэн биеийг харь эмгэгтөрөгчөөс хамгаалах урвал хэдий ч түүний хэт эрчимтэй урвал нь хэсэг газрын ба эрхтэн тогтолцооны гэмтлийг нөхцөлдүүлдэг.[3] *Rhododendron Adamsii (Rh.Adamsii*) нь Монгол, Буриад, Төвд, Якутын уламжлалт анагаах ухааны салбарт тайвшруулах, сэргээх зорилгоор хэрэглэдэг эмийн ургамал бөгөөд уламжлалт эмчилгээнд уг ургамлын навч хэсгийг хүч оруулах зорилгоор ашигладаг байна.[4] Судлаачид *Rh.Adamsii*-аас 150 гаруй биоидэвхт нэгдэл илрүүлсэн ба бидний судалгаанд ашигласан 7.46 дугаартай биоидэвхт фракц нь *Rh.Adamsii*-аас ялган авсан саванждаггүй нэгдлүүдийг метилтертбутил эфир ашиглан, баганан хроматографийн аргаар ялган авсан нэгдэл бөгөөд фриделан хэмээх биоидэвхт нэгдлийг агуулдаг байна.[5] Гэвч уг ургамлын макрофаг эсийн дохио дамжилтын эцсийн бүтээгдэхүүнд болон түүний идэвхжилд хэрхэн нөлөөлдөг болох судалгаа хомс байна. **Зорилго:** *Rhododendron Adamsii* (*Rh.Adamsii*)-ийн RAW264.7-ийн эсийн TLR4-ийн дохио дамжилт, түүний эцсийн бүтээгдэхүүний гарцад үзүүлэх нөлөөг тодорхойлох. **Арга, аргачлал:** ОХУ-ын Алтайн улсын их сургуулийн Биологийн факультетийн Био-Анагаахын хүрээлэнгийн лабораторид *Rh.Adamsii*-аас ялган авсан 7.46 дугаартай фракцыг RAW264.7 хулганы макрофаг төст эсийн өсгөвөрт туршиж, эсэд хоргүй тунг МТТ аргаар тодорхойлсон. Эсийн нитритын гарцад үзүүлэх нөлөөг Грейссийн аргаар, IFNβ-ийн гарцад нөлөөлөх нөлөөг фермент холбоот эсрэгбиеийн урвалын аргаар, фракцын эсийн IRF3 дотоод дохио дамжилтын уургийн идэвхжилд үзүүлэх нөлөөг иммуноблотын аргаар тус тус тодорхойлов. **Үр дүн:** 1. 7.46 фракцын 10.0, 1.0 мкг/мл тун эсэд хоргүй байна. 2. 7.46 фракцын 10.0 мкг/мл тун нь LPS-аар үйлчилсэн RAW264.7 эсийн нитрит, IFNβ-ийн гарцыг дарангуйлж байна. 3. 7.46 фракцын 10.0 мкг/мл тун нь RAW264.7 эсийн IRF3 дотоод дохио дамжилтын уургийн идэвхжлийг дарангуйлах нөлөө ажиглагдав. **Дүгнэлт:** 1. *Rh.Adamsii*-ийн 7.46 дугаартай фракцын 10 мкг/мл тун нь RAW264.7 эсэд хоргүй байна. ($p<0.001$) 2. Ургамлын дээрх тун нитрит болон IFNβ-ийн гарцыг дарангуйлж байгаа. ($p<0.05$) 3. IFNβ-ийн гарцыг дарангуйлах нөлөө нь эсийн IRF3 дохио дамжилтыг дарангуйлж буйтай холбоотой байх боломжтой.

Үндэслэл: Макрофаг эс нь үрэвслийн урвалын үед загвар танигч рецептороор (PRRs, pattern recognition receptor) эмгэгтөрүүлэгч бичил биетний эмгэгтөрөгч холбоот молекулын загвар (PAMPs, pathogen-associated molecular patterns), гэмтэл холбоот молекулын загвар (DAMPs, damage-associated molecular patterns)-уудыг таниснаар эсийн доторх дохио дамжилтын уургууд фосфоржин идэвхжиж, эцсийн бүтээгдэхүүний

транскрипцийг генийн түвшинд өдөөдөг.[6,7] Эдгээр генүүд нь үрэвслийн эсрэг цитокин болох интерферон (IFN, Interferon), хемокин зэрэг нянгийн эсрэг үүраг болон бусад уургийг кодлодог.

Грам сөрөг нянгийн эсийн мембраны липополисахарид (LPS), флагеллин, вирусын хоёр утаслагт РНХ (dsRNA), нэг утаслагт РНХ (ssRNA), ДНХ зэрэг нуклейн хүчлүүд нь макрофаг эсийн идэвхжлийг өдөөдөг чухал PAMPs юм.[8] PRR нь эмгэгтөрөгч молекулыг зуучилдаг ба үүнд Толл төст рецептор (TLR, Toll like receptor), RIG-I-тэй төст рецептор (RLRs, Retinoic acid-inducible gene I like receptors), NOD төст рецептор (NLRs, Nucleotide oligomerization domain like receptors), С төрлийн лектин рецептор (CLRs,C-type lectin receptors) багтана.[8,9] Өнөөг хүртэл хүнд 10, хулганад 13 төрлийн TLR илэрсэн ба TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 нь эсийн мембран дээр, TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10 нь эсийн дотор илэрдэг.[10] Эдгээрээс TLR4 нь LPS-ыг өвөрмөцөөр таниснаар TLR4-ийн TIR (Toll-Interleukin receptor) домейн нь MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) болон TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β) адаптер уурагтай холбогдож эсийн дотоод дохио дамжилтыг идэвхжүүлдэг.[11-14] TRIF домейн идэвхжсэнээр TRAF холбоот NFκB идэвхжүүлэгч (TANK) холбогч киназа-1 (TBK1, TRAF family member associated NFκB activator (TANK) binding kinase-1) болон IκBε киназа (IKKε, IκB kinase ε)-ийн тусламжтай IRF3-ийг идэвхжүүлж, улмаар IFN-ы ялгаралтыг өдөөдөг.[15,16] IFNβ нь үрэвслийн урьдал цитокиныг дарангуйлж, үрэвслийн эсрэг цитокины нийлэгжлийг өдөөх, зарим эсийн апоптозыг идэвхжүүлэх, мөн дархлаа тогтолцооны бусад эсүүдийг идэвхжүүлэх үүрэгтэй байдаг.[17]

Rhododendron Adamsii (*Rh.Adamsii*) нь Монгол, Буриад, Төвд, Якутын уламжлалт эмчилгээнд хэрэглэгддэг ургамал ба далайн төвшнөөс дээш 1200-2500 метрийн өндөрлөгт хөвд, нарсан ойн хэсэг, хад ихтэй ууланд ургадаг. Уламжлалт анагаах ухаанд Анар-8, Даль-3, 6, 7, 8, 9, 11, 16, 18, Дошун-12 болон Тэрэлж-16 зэрэг тангийн найрлагад *Rh.Adamsii* агуулагдаж, ханиалга, хоолойн үрэвсэл зэрэг амьсгалын замын эмгэгүүд, хоол боловсруулах замын эмгэгүүд түүнчлэн дасан зохицох, тамиржуулах зорилгоор хэрэглэгддэг.[18,19]

Зорилго: *Rhododendron Adamsii* (*Rh.Adamsii*)-ийн RAW264.7-ийн эсийн TLR4-ийн дохио дамжилт, түүний эцсийн бүтээгдэхүүний гарцад үзүүлэх нөлөөг тодорхойлох.

Зорилт:

1. *Rh.Adamsii*-ийн фракцын RAW264.7 эсэд хоргүй тунг тодорхойлох.
2. RAW264.7 эсийг LPS-ээр өдөөж, *Rh.Adamsii*-ийн фракцын нитрит (NO) болон IFNβ-гийн гарцад үзүүлэх нөлөөг тодорхойлох.
3. *Rh.Adamsii*-ийн эсийн IRF3 дотоод дохио дамжилтын идэвхжилд үзүүлэх нөлөөг тодорхойлох.

Арга, аргачлал: Бид *Rh.Adamsii*-ийн эсийн дохио дамжилтын үрэвслийн урьдал бүтээгдэхүүний гарц ба түүний идэвхжилд үзүүлэх нөлөөг хулганы макрофаг төст RAW264.7 эсэд турших зорилгоор лабораторийн туршилтыг АШУҮИС-ийн Био-Анагаахын хүрээлэнг түшиглэн дараах үе шатаар гүйцэтгэв.

I. RAW264.7 эс хордуулах тунг тодорхойлсон арга зүй: *Rh.Adamsii*-ийн 7.46 фракцыг DMSO ашиглан шингэлсэн ба 1.0 мкг/мл, 10.0 мкг/мл болон 100.0 мкг/мл тунгийн эсийн амьдрах чадварт нөлөөлөх нөлөөг МТТ аргаар тодорхойлов.

II. RAW264.7 эсийн дохио дамжилтын эцсийн бүтээгдэхүүний гарцад үзүүлэх нөлөөг тодорхойлсон арга зүй: *Rh.Adamsii*-ийн 7.46 фракцын эсэд хоргүй тунг сонгон авч, нитритын агууламжийг Грейссийн аргаар, IFNβ-гийн гарцад нөлөөлөх нөлөөг ФХЭБУ-ын аргаар тус тус тодорхойлов.

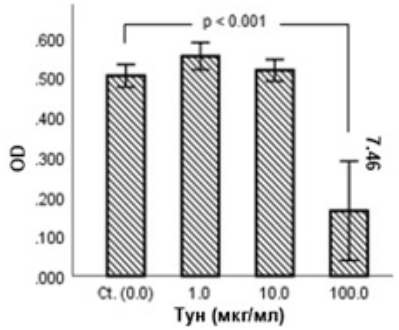
III. *Rh.Adamsii*-ийн 7.46 фракцын эсийн дотоод дохио дамжилтын идэвхжилд үзүүлэх нөлөөг тодорхойлсон арга зүй: RAW264.7 эсийн шугаман өсгөврийг биоидэвхт фракцын эсэд хоргүй тунгаар үйлчилснээс хойш 1 цагийн дараа LPS-ээр үйлчлэн, эсийг задлан уургийг ялган авсан. Уургийн гарцыг BCA цомог ашиглан хэмжсэн ба IRF3 эсийн дохио дамжилтын идэвхжлийг иммуноблотын аргаар тодорхойлов.

Үр дүнгийн статистик боловсруулалтыг One way ANOVA (SPSS 25.0) болон ImageJ программ ашиглан боловсруулав.

Төслийн хүрээнд судалгаа эхлүүлэх ёс зүйн зөвшөөрлийг 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 Эрүүл Мэндийн Яамны Анагаах Ухааны Ёс Зүйн Хорооны 2022 оны 09-р сарын 07-ны өдрийн 08 дугаар тогтоол бүхий хурлаар мөн АШУҮИС-ийн Судалгааны Ёс зүйн хяналтын хорооны 2023 оны 04-р сарын 21-ний өдрийн 2023/3-04 тоот дугаар бүхий хурлаар тус тус хэлэлцүүлсэн.

Үр дүн:

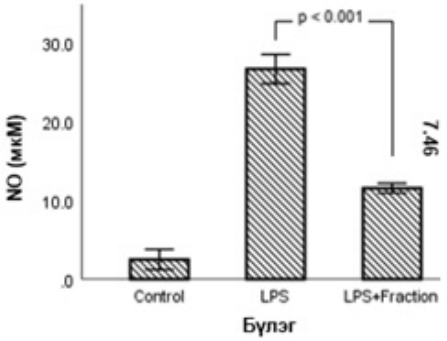
1. Rh.Adamsii-гийн биоидэвхт фракцын RAW264.7 эсэд хоргүй тунг тодорхойлсон дүн; Бид *Rh.Adamsii*-ийн 7.46 дугаартай фракцын эсэд хоргүй тунг МТТ аргаар тодорхойлохдоо уг ургамлын 1.0 ба 10.0 болон 100 мкг/мл тунгийн амьд эсэд үзүүлэх нөлөөг тодорхойлоход 7.46 дугаартай фракцын 1.0 ба 10.0 мкг/мл тун хяналтын бүлэгтэй харьцуулахад эсэд хоргүй, харин 100 мкг/мл тун амьд эсийн тоог мэдэгдэхүйц бууруулж байгаа нь ($p<0.001$) тухайн эсэд хортой болохыг илтгэж байна. Иймд бид цаашдын туршилтанд ургамлын 7.46 фракцын 10 мкг/мл тунг ашиглан, судалгааг үргэлжлүүлсэн болно. (Зураг 1)



Зураг 1. *Rh.Adamsii*-ийн эсэд хоргүй тунг MTT аргаар тодорхойлсон үр дүн.

Хэвтээ тэнхлэгт 7.46 дугаартай фракцын ялгаатай тунг, босоо тэнхлэгт гэрлийн шингээлтийг үзүүлэв.

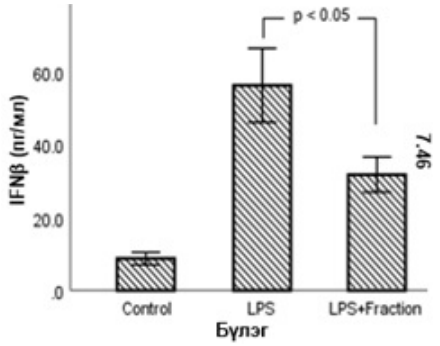
2. Rh.Adamsii-гийн биоидэвхт фракцын RAW264.7 эсийн дохио дамжилтын эцсийн бүтээгдэхүүний гарцад нөлөөлөх нөлөөг тодорхойлсон дүн: Rh.Adamsii-ийн 7.46 дугаартай фракцын нитритын гарцад нөлөөлөх нөлөөг Грейссийн аргаар тодорхойлсон ба ингэхдээ сөрөг хяналтын бүлэг, дан LPS-аар үйлчилсэн эерэг хяналтын бүлэг болон туршилтын буюу биоидэвхт фракцаар үйлчлэн LPS-аар өдөөсөн гэх 3 бүлэг тус бүрт гэрлийн шингээлтийг хэмжин үзэхэд *Rh.Adamsii*-ийн 7.46 дугаартай фракцын 10 мкг/мл тунгаар үйлчлэн LPS-аар өдөөсөн бүлгийг дан LPS-аар өдөөсөн бүлэгтэй харьцуулахад нитритын гарцыг дарангуйлж байна. ($p<0.001$) (Зураг 2)



Зураг 2. *Rh.Adamsii*-ийн нитритын гарцад нөлөөлөх нөлөөг Грейссийн аргаар тодорхойлсон үр дүн.

Хэвтээ тэнхлэгт туршилтын бүлгүүдийг, босоо тэнхлэгт гэрлийн шингээлтийг үзүүлэв.

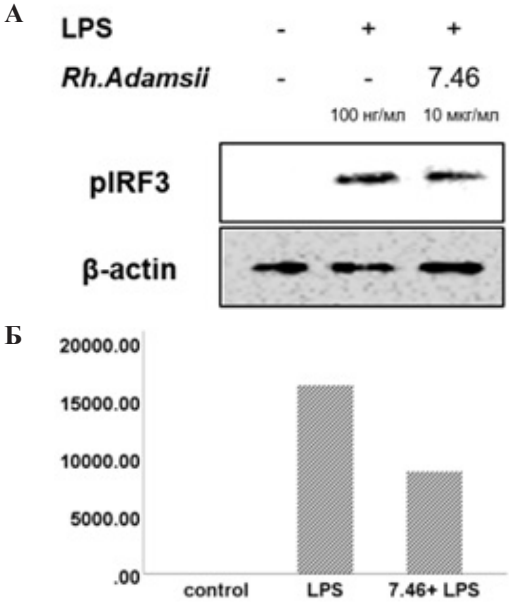
Харин *Rh.Adamsii*-ийн 7.46 фракцын IFNβ-ийн гарцад нөлөөлөх нөлөөг ФХЭБУ-ын аргаар бүлэг тус бүрт тодорхойлон үр дүнг тодорхойлоход *Rh.Adamsii*-ийн 7.46 дугаартай фракцын 10 мкг/мл тунгаар үйлчлэн LPS-аар өдөөсөн бүлгийг дан LPS-аар өдөөсөн бүлэгтэй харьцуулахад IFNβ-ийн гарцыг статистикийн хувьд үнэн магадтай дарангуйлж байлаа. (Зураг 3)



Зураг 3. *Rh.Adamsii*-гийн IFNβ-гийн гарцад нөлөөлөх нөлөөг ФХЭБУ-ын аргаар тодорхойлсон үр дүн.

Хэвтээ тэнхлэгт туршилтын бүлгүүдийг, босоо тэнхлэгт IFNβ-гийн агууламжийг үзүүлэв.

3. Rh.Adamsii-гийн биоидэвхт фракцын RAW264.7 эсийн IRF3 дохио дамжилтын уургийн идэвхжилд нөлөөлөх нөлөөг тодорхойлсон дүн: Rh.Adamsii-ийн 7.46 дугаартай фракцын эсийн IRF3 дотоод дохио дамжилтын уургийн идэвхжилд үзүүлэх нөлөөг иммуноблотын аргаар тодорхойлоход 7.46 дугаартай фракцаар үйлчлэн LPS-аар өдөөсөн бүлгийг дан LPS-аар өдөөсөн бүлэгтэй харьцуулахад IRF3-ийн идэвхжлийг дарангуйлах нөлөө ажиглагдлаа. (Зураг 4)



Зураг 4. *Rh.Adamsii*-ийн IRF3 эсийн дохио дамжилтын уургийн идэвхжилд үзүүлэх нөлөөг иммуноблотын аргаар тодорхойлсон дүн.

А - *Rh.Adamsii*-ийн 7.46 дугаартай фракцын эсийн pIRF3, β-actin-ий иммуноблотын үр дүн; Б - Иммуноблотын дүнг ImageJ программ ашиглан боловсруулсан байдал

Хэлцэмж: Хятад улсын судлаач Yi Zhang (2019) нарын уламжлалт анагаах ухаанд уушгины хатгалгаа, үрэвслийн үед хэрэглэдэг Re-Du-Ning (RIS) танг RAW264.7 эсэд туршсан судалгаанаас үзэхэд тангийн эс хордуулах тунг тодорхойлохдоо MTT аргаар туршин үзэж, эсэд хоргүй гэж тодорхойлогдсон 25, 50, 100, 200 мкг/мл тунг сонгон авч цаашдын судалгаанд оролцуулжээ. Эдгээр тунгуудын нитритын гарцад нөлөөлөх нөлөөг Грейссийн аргаар, эсийн эцсийн бүтээгдэхүүн болох простагландин E2 (PGE2), IL-1β, IL-6, TNF-α-г ФХЭБУ-ын аргаар хэмжжээ. Үр дүнгээс харахад 100 болон 200 мкг/мл тун нь дан LPS-ээр үйлчилсэн бүлэгтэй харьцуулахад хүчтэй ялгаа бүхий дарангуйлах нөлөө ($p<0.01$) үзүүлж байсан тул дээрх 2 тунгын IRF3 болон бусад дохио дамжилтын уургийн идэвхжилд үзүүлэх нөлөөг иммуноблотын аргаар туршжээ.

Судлаачдын дүгнэснээр RIS тангийн үрэвслийн медиаторуудыг дарангуйлах чадвар нь эсийн IRF3 болон бусад дохионы замуудыг дарангуйлдагтай холбоотой хэмээжээ.[20] Харин бидний судалгааны дүнд MTT аргаар эсэд хоргүй хэмээн батлагдсан биоидэвхт фракцын 10 мкг/мл тун нь IFNβ-гийн гарцыг дарангуйлж байгаа нь TLR4-ийн MyD88 үл хамааралт зам буюу TRIF хамааралт дохио дамжилтын замын тодорхой шатыг саатуулдаг байж болох юм хэмээн таамаглалаа. Мөн IRF3 транскрипцийн хүчин зүйлийн идэвхжлийг бууруулсан нь дээрх таамгийг нотлох боломжтой хэмээн үзэж байна.

Харин судлаач Yalda Karimi (2020) нарын судалгаагаар IFNβ нь үрэвслийн урьдал цитокинуудын үүсэлтийг нэмэгдүүлсэн үр дүн гарсан. Үүнээс үзэхэд IFNβ-г дарангуйлснаар бусад үрэвслийн урьдал цитокины ялгаралтыг мөн дарангуйлах боломжтой хэмээн бид үзлээ.

Судлаач Yuan Cao (2019) нарын LPS-аар өдөөгдсөн RAW264.7 эсэд анар жимсний шүүсний Punicalagin (PU) нэгдлийн үзүүлэх нөлөөг судалсан судалгаанаас үзэхэд эс хордуулах тун, нитритын гарцад нөлөөлөх нөлөөг бидний судалгаатай ижил аргаар туршжээ. TNFα, IL-1β, IL-6 цитокиныг ФХЭБУ-аар туршин судлахад үрэвслийн эсрэг хүчтэй дарангуйлах нөлөө үзүүлдэг нь тодорхойлогджээ. Иймээс энэхүү үйлдлийн механизмыг нарийвчлан судлах үүднээс PU-ийн эсийн MAPKs болон NFκB дохио дамжилтын уургийн идэвхжилд үзүүлэх нөлөөг судлахаас гадна эсийн аутофаг нь үрэвслийн эсрэг үйлдэлд нөлөөлдөг эсэхийг судлах зорилгоор аутофагийн зохицуулагч FoxO3a-ийн идэвхжлийг иммуноблотын аргаар туршин судалжээ. Энэхүү судалгааны дүгнэлтээс үзэхэд PU нэгдэл нь үрэвслийн урьдал цитокиныг дарангуйлж буй нь TLR4 хамааралт NFκB, MAPKs дохио дамжилт болон FoxO3a-г дарангуйлж байв.[21]

Харин бидний судалгаагаар нитритын гарцыг бууруулсан нь тухайн биоидэвхт фракц MyD88 хамааралт дохио дамжилтын зам болох MAPKs болон NFκB-г дарангуйлсан байж болох юм хэмээн таамаглалаа. Учир нь MyD88 хамааралт дохио дамжилтын зам идэвхэжсэнээр NFκB транскрипцийн хүчин зүйл идэвхжин, үрэвслийн урьдал цитокин, хемокин түүнчлэн iNOS-ын транскрипцийг идэвхжүүлдэгийг баталсан судалгаанууд цөөнгүй бий.[22,23]

Дүгнэлт:

1. *Rh.Adamsii*-ийн 7.46 дугаартай фракцын 10 мкг/мл тун нь RAW264.7 эсэд хоргүй байна ($p<0.001$).
2. Ургамлын энэхүү тун нитрит болон IFNβ-гийн гарцыг дарангуйлж байна ($p<0.05$).
3. IFNβ-ийн гарцыг дарангуйлах нөлөө нь эсийн IRF3 дохио дамжилтыг дарангуйлдагтай холбоотой байх боломжтой.

Талархал: Энэхүү судалгааг 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 хийж гүйцэтгэв. Уг судалгааг хийж гүйцэтгэхэд туслалцаа үзүүлж дэмжиж тусалсан АШУҮИС-ийн Био Анагаахын сургуулийн Дархлаа судлалын тэнхимийн багш, хамт олон болон АШУҮИС-ийн Био Анагаахын хүрээлэнгийн хамт олонд талархал илэрхийлье.

Ном зүй:

1. *Hassanshahi A, Moradzad M, Ghalamkari S, Fadaei M, Cowin AJ, Hassanshahi M. Macrophage-Mediated Inflammation in Skin Wound Healing. Cells. 2022;11(19).*
2. *Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. Current drug targets Inflammation and allergy. 2005;4(3):281-286.*
3. *Panigrahy D, Gilligan MM, Serhan CN, Kashfi K. Resolution of inflammation: An organizing principle in biology and medicine. Pharmacology & therapeutics. 2021;227:107879.*
4. *Batorova S, Yakovlev G, Aseeva T. Reference-Book of Traditional Tibetan Medicine Herbs. Nauka: Novosibirsk, Russia; 2013.*
5. *Kukina Ty, Yelshin I, Sal'nikova Og, et al. Composition of lipophilic components of rhododendron adamsay ether extract and ac-tivity against sars-cov-2 main protease. Chemistry of plant raw material. 2022:153-162.*
6. *Singh N, Baby D, Rajguru JP, Patil PB, Thakkannavar SS, Pujari VB. Inflammation and cancer. Annals of African medicine. 2019;18(3):121-126.*
7. *Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. Immunity. 2016;44(3):450-462.*
8. *Sun H, Hu W, Yan Y, et al. Using pamps and damps as adjuvants in cancer vaccines. Human vaccines & immunotherapeutics. 2021;17(12):5546-5557.*
9. *Liu CH, Liu H, Ge B. Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion. Cellular & molecular immunology. 2017;14(12):963-975.*
10. *Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. Annual review of immunology. 2003;21:335-376.*
11. *Sameer AS, Nissar S. Toll-Like Receptors (tlrs): Structure, Functions, Signaling, and Role of Their Polymorphisms in Colorectal Cancer Susceptibility. Biomed research international. 2021;2021:1157023.*
12. *Olona A, Hateley C, Muralidharan S, Wenk MR, Torta F, Behmoaras J. Sphingolipid metabolism during Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated macrophage activation. British journal of pharmacology. 2021;178(23):4575-4587.*
13. *Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. The Journal of experimental medicine. 2001;194(6):863-869.*
14. *Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2021;78(4):1233-1261.*
15. *Doyle S, Vaidya S, O'Connell R, et al. IRF3 mediates a TLR3/*

TLR4-specific antiviral gene program. Immunity. 2002;17(3):251-263.
16. *Al Hamrashdi M, Brady G. Regulation of IRF3 activation in human antiviral signaling pathways. Biochemical pharmacology. 2022;200:115026.*
17. *Daman AW, Josefowicz SZ. Epigenetic and transcriptional control of interferon-β. The Journal of experimental medicine. 2021;218(9).*
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 (Basel, Switzerland). 2021;10(6).*
19. *Hubich A, Puchkova K, Zalesskaya N, Kryuchkova N. The investigation of the adaptogenic properties of Rhododendron adamsii Rehder. On experimental models in vivo. Journal of the Belarusian State University Biology. 2018;1:60-68.*
20. *Zhang Y, Chi-Yan Cheng B, Xie R, Xu B, Gao XY, Luo G. Re-Du-Ning inhalation solution exerts suppressive effect on the secretion of inflammatory mediators via inhibiting ikkα/β/ikbα/NF-κB, mapks/AP-1, and TBK1/IRF3 signaling pathways in lipopolysaccharide stimulated RAW 264.7 macrophages. RSC advances. 2019;9(16):8912-8925.*
21. *Cao Y, Chen J, Ren G, Zhang Y, Tan X, Yang L. Punicalagin Prevents Inflammation in LPS-Induced RAW264.7 Macrophages by Inhibiting foxo3a/Autophagy Signaling Pathway. Nutrients. 2019;11(11).*
22. *Gargiulo S, Gamba P, Testa G, et al. Relation between TLR4/NF-κB signaling pathway activation by 27-hydroxycholesterol and 4-hydroxynonenal, and atherosclerotic plaque instability. Aging cell. 2015;14(4):569-581.*
23. *Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C. NF-κB signaling in inflammation. Signal Transduction and Targeted Therapy. 2017;2(1):17023.*

The effect of the bioactive fraction extracted from *Rhododendron Adamsii* on the of TLR4-signaling and its end products

Onon Ch[1], Badmaarag B[1], Khashchuluun S[1], Tsogtsaikhan S[1], Chimidtseren S[1,4], Erdenezaya O[2,3], Zolmunkh N[1,4]

[1]Department of Immunology, School of Biomedicine, MNUMS
[2]Institute of Biomedical Science, MNUMS
[3]Department of Anatomy, School of Biomedicine, MNUMS
[4]Department of Clinical Laboratory, MJH, MNUMS
E-mail: Fbm23e008@gt.mnums.edu.mn, Tel: +976-80877080

Background: Macrophages are key immune cells that respond to infections and regulate pathophysiological conditions such as wound healing. During inflammation, macrophages play important roles in antigen presentation, phagocytosis, and the release of pro-inflammatory cytokines and growth factors. Although inflammation is a defense response of the host against foreign pathogens, an excessive inflammatory response can lead to tissue and organ damage.
Rhododendron Adamsii (*Rh.Adamsii*) is a medicinal plant used in traditional medicine of Mongolia, Buryatia, Tibet and Yakut for soothing and revitalizing purposes. In the pharmacology of traditional medicine, the leaves of the plant are used to induce strength. Researchers have isolated a bioactive fraction from Rh.Adamsii more than 150 bioactive compounds. fraction 7.46 in our study, obtained using methyl tert-butyl ether in chromatographic separation from Rh.Adamsii.
Aim: In our investigation, we focused on studying the macrophage immune response influenced by the bioactive fraction obtained from Rh. Adamsii. Specifically, we examined the toll-like receptor 4 (TLR4) signaling pathway in macrophages and explored its impact on the production of pro-inflammatory mediators. Additionally, we investigated how this bioactive fraction might modulate the expression of immune-related genes and affect the overall immune response.
Materials and Methods: Fraction No. 7.46 extracted from *Rh.Adamsii* in the laboratory of the Institute of Biomedicine, Faculty of Biology, Altai University Russia. The cytotoxic effect of bioactive fraction tested on the RAW264.7 mouse macrophage-like cell culture in and the non-toxic dose was determined by the MTT method. The effect on cellular nitric oxide output was determined by the Griess method, the effect on IFNβ output was determined by enzyme-linked immunosorbent assay, and the effect of the fraction on the activation of IRF3 intracellular signaling protein was determined by immunoblotting.
Results:
1. Doses of 10.0 and 1.0 μg/mL of fraction 7.46 are not toxic to cells.
2. A dose of 10.0 μg/mL of fraction 7.46 significantly inhibited the production of nitric oxide and IFNβ in RAW264.7 cells.
3. A dose of 10.0 μg/mL of fraction 7.46 has a small inhibitory effect on the activation of IRF3 internal signaling protein in RAW264.7 cells.

Conclusions:
1. A dose of 10 μg/mL of *Rh.Adamsii* fraction No 7.46 was not toxic to RAW264.7 cells ($p<0.001$).
2. This dose also inhibited the output of nitric oxide and IFNβ ($p<0.05$).
3. The inhibitory effect of IFNβ may indeed be attributed to its ability to suppress cellular IRF3 signaling.

Keywords: *Rhododendron Adamsii,* RAW264.7, NO, IFNβ, IRF3