

**Липополисахаридаар өдөөгдөх дархлааны хариу урвалд
вальпроатын хүчлийн нөлөөг судлах нь**

Ж.Өлзийсайхан¹, С.Цогтсайхан¹, Т.Ёокочи²,
Л.Энхсайхан¹, Ж.Жамбалдорж^{3,4}, Б.Жавхлан^{1,5}, Б.Байгалмаа⁵,
Н.Цэвэлмаа⁵, Б.Галиндэв⁵, Л.Содномцогт⁵, Н.Мөнхтүвшин⁴, Б.Мөнхбат⁵, Ц.Билэгтсайхан^{4,5}

¹Бичил Амь-Дархлаа Судлалын Тэнхим, БАС, АШУҮИС

²Бичил Амь-Дархлаа Судлалын Тэнхим, Айчи АУС

³Молекул Биологи-Удамзүйн Тэнхим, БАС, АШУҮИС

⁴Эрдэм Шинжилгээний Төв Лаборатори, АУХ

⁵Цөм Лаборатори, ШинжлэхУхаанТехнологийн Газар, АШУҮИС

Имейл: jamulzii2015@gmail.com, Утас: 9988-9916

Удиртгал: Вальпроатын хүчил нь мэдрэлийн өвчний эмчилгээнд тухайлбал уналт таталт, 2 туйлт эмгэгийн үед хэрэглэгддэг. Бид вальпроатын хүчлийн дархлааны шинэ идэвхийг тодорхойлох зорилго тавьж байна.

Арга зүй: Хулганы макрофаг RAW 264.7 эсийн загварт эсийн амьдрах чадвар тодорхойлох шинжилгээ, уургийн экспрессийг тодорхойлох иммуноблотинг шинжилгээ, эсийн гадаргуу дээрх ТТР4-ийн экспрессийг тодорхойлох шинжилгээг тус тус хийж гүйцэтгэсэн.

Үр дүн: RAW 264.7 макрофаг эсэд МТТ болон TUNEL аргачлалаар вальпроатын хүчил нь 2 млМ хүртэлх тунгаар эсийг хордуулахгүй байсан. Вальпроатын хүчил нь ЛПС-аар өдөөгдөх PI3K/Akt дохио дамжих замыг дарангуйлж байгааг тодорхойлсон. Харин вальпроатын хүчлийн 2 млМ тун нь NF-κB хамааралт уургуудын (IKKα/β, IκB-α, p65) фосфоржилт болон NF-κB-ийн ингибитор (IκB-α) уургийн задралыг нөхцөлдүүлэхгүй байв. Түүнчлэн вальпроатын хүчил дангаараа p38, ERK1/2, JNK уургуудыг идэвхжүүлдэггүй. Вальпроатын хүчлээр үйлчилсэн болон үйлчлээгүй эсүүдэд ТТР4-ийн экспресс ижилхэн тодорхойлогдсон. Вальпроатын хүчил нь ЛПС-аар өдөөгдөсн PI3K/Akt замын фосфоржилтыг хугацаа хамааралтайгаар бууруулж байсан.

Дүгнэлт: RAW 264.7 макрофаг эсэд вальпроатын хүчлийн 2 млМ хүртэлх тун нь эс хордуулах нөлөөгүй байна. RAW 264.7 макрофаг эсэд вальпроатын хүчил нь ЛПС-аар өдөөгдөх PI3K/Akt дохио дамжих замыг дарангуйлж байна.

Түлхүүр үг: Вальпроатын хүчил, липополисахарид, PI3K, Akt

Удиртгал

Өвөрмөц бус дархлааны хариу урвал нь ТТР-оор дамжин өрнөдөг. Одоогоор 10 гаруй бүлэг рецепторууд тодорхойлогдоод байна (Savva et al. 2013). Липополисахарид (ЛПС) нь грам сөрөг нянгийн гадна мембраны бүтцэд ордог уураг бөгөөд ТТР4 (TLR4)-тэй холбогдож бөөмийн фактор каппа Б (nuclear factor (NF)-κB), митогенээр идэвхжих киназа уургууд (mitogen-activated protein kinases, MAPKs), фосфатидилинозитол 3-киназа (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) зэрэг транскрипцийн факторуудыг идэвхжүүлдэг. Идэвхжсэн транскрипцийн факторууд нь хавдар үхжилийн фактор альфа (Tumor necrosis factor-α, TNF-α), интерлейкин-6 (interleikin-6, IL-6) зэрэг үрэвслийн урьдал цитокиний генийн транскрипцийг сэдээдэг (Kawai and Akira, 2010).

Вальпроатын хүчил нь мэдрэлийн өвчний эмчилгээнд тухайлбал уналт таталт, 2 туйлт эмгэгийн үед хэрэглэгддэг (Gerstner et al. 2008). Вальпроатын хүчил нь гистон уургийг ацетилгүйжүүлэх эсгэгийг дарангуйлагч уураг бөгөөд эдгээр бүлэг уургууд нь ТТР-ээр өдөөгдөх өвөрмөц бус дархлалын хариу урвалыг дарангуйлж үрэвслийг өдөөгч цитокиний ялгаралтыг дарангуйлдаг болохыг судлаачид тэмлэглэсээр байна (Roger et al. 2011). Гэсэн хэдий ч ЛПС-аар өдөөгдөх эсийн дохио дамжуулах механизмд вальпроатын хүчлийн нөлөөг тодорхойлсон судалгаа хараахан үгүй байна.

Судалгааны зорилго

RAW 264.7 макрофаг эсэд ЛПС-аар өдөөгдөх дохио дамжих замд вальпроатын хүчлийн нөлөөг судлах.

Судалгааны зорилт

1. RAW 264.7 макрофаг эсэд вальпроатын хүчлийн эсэд хоргүй тунг тодорхойлох.
2. ЛПС-аар өдөөгдөх PI3K/Akt, NF-κB, MAPKs дохио дамжих замд вальпроатын хүчлийн нөлөөг судлах.
3. ЛПС-аар өдөөгдөх MyD88/p85 уургуудын хоорондын харилцан үйлчлэлд вальпроатын хүчлийн нөлөөг судлах.

Судалгааны арга зүй

Эсийн өсгөвөр

Хулганы макрофаг RAW 264.7 эсийг идэвхгүйжүүлсэн 5 хувийн тугалын хээлийн ийлдэс (FBS), антибиотикын холимог (penicillin G, streptomycin, amphotericin B) агуулсан эсийн орчинд (MEM, RPMI 1640 medium) 5 хувийн CO₂-ийн чийгшилтэй 37°C хэмд өсгөвөрлөнө.

Эсийн амьдрах чадвар тодорхойлох шинжилгээ

RAW 264.7 эсийг 96 нүхтэй эсийн тавганд нүх тус бүрт $2 \cdot 10^4$ эс байхаар тооцож 12 цагийн турш өсгөвөрлөнө. Эсэд липолисахарид, вальпроатын хүчил хийж 24 цагийн турш сэдээнэ. Эсийн амьдрах чадварыг 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2-H-tetrazolium (MTT) бодисын будагдалтаар тодорхойлно.

Уургийн экспрессийг тодорхойлох иммуноблотинг шинжилгээ

RAW 264.7 эсээс уургийг хайлуулагч уусмалын тусламжтай ялган авна. Уургийн концентрацийг тодорхойлж, ижил хэмжээний уургуудыг гель электрофорезоор гүйлгэж хүндийн жингээр нь ялгана. Гель дээрх уургуудыг цахилгаан хүчдэлийн тусламжтайгаар цаасан мембран дээр шилжүүлж, мембраныг холбогдох анхдагч эсрэгбиеээр будна. Холбогдсон дархан бүрдэлийг туяарагч бодис бүхий хоёрдогч эсрэгбиеээр илрүүлэх бөгөөд туяарагч бодисын эрчимээр нь дархан бүрдэл дэх бай уургийн экспрессийг тодорхойлно.

Эсийн гадаргуу дээрх TTP4-ийн экспрессийг тодорхойлох шинжилгээ

RAW 264.7 эсийг 35 мл-ийн эсийн өсгөврийн тавганд нүх тус бүрт $4 \cdot 10^5$ эс байхаар тооцож 12 цагийн турш өсгөвөрлөнө. Улмаар эсийг вальпроатын хүчлээр 12 цагийн турш үйлчлүүлнэ. Эсийг TTP4 (CD284)-ийн эсрэг эсрэгбиеээр 0.5 цагийн турш будаж, дархан туяарагч хоёрдогч эсрэгбиеээр 20 минутын турш будна. TTP4-ийн эсийн гадаргуу дээрх экспрессийг FACS анализатор ашиглан тодорхойлно.

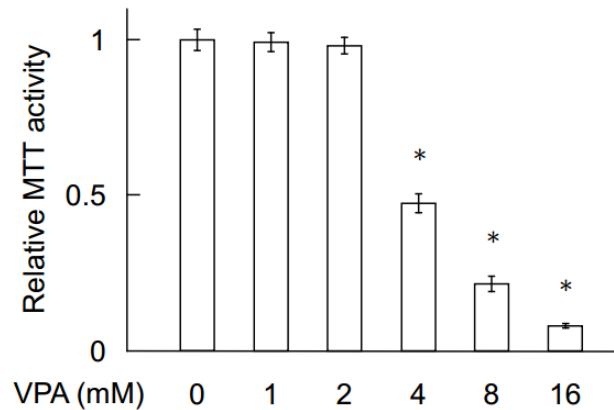
Статистик боловсруулалт

Туршилтын утгуудын стандарт хазайлтаар илэрхийлж, хамгийн багадаа 3 туршилтын үр дүнг төлөөлүүлэх утга болгон авна. Туршилтын болон хяналтын бүлгүүдийн хоорондын статистикийн үнэн магадтай ялгааг Студентийн Т тестээр тодорхойлно. $p < 0.01$ утгыг статистикийн үнэн магадтай ялгаатай гэж тооцно.

Үр дүн

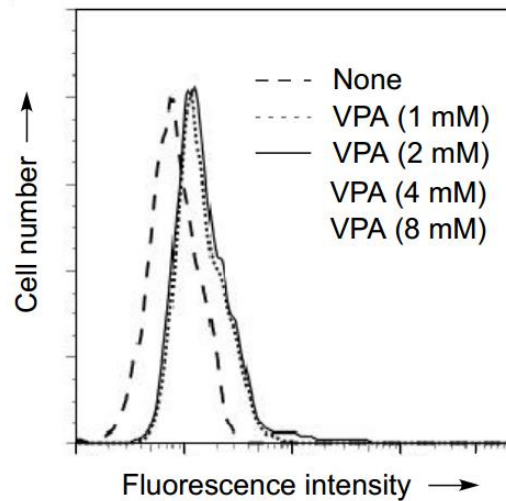
RAW 264.7 макрофаг эсэд вальпроатын хүчлийн эсэд хоргүй тунг тодорхойлох зорилгоор MTT шинжилгээг хийсэн. Вальпроатын хүчлийг 0-16 млМ тунгаар RAW 264.7 эсэд 24 цагийн

турш үйлчилж эсийн амьдрах чадварыг МТТ шинжилгээгээр үнэлсэн. Вальпроатын хүчил нь 2 млМ хүртэлх тунгаар эсийг хордуулахгүй байсан. Харин вальпроатын хүчил нь 4 млМ тунгаар 50 хувь, 8 млМ тунгаар 75 хувь, 16 млМ тунгаар 90 хувь тус тус эсийг хордуулж байв (Зураг 1).



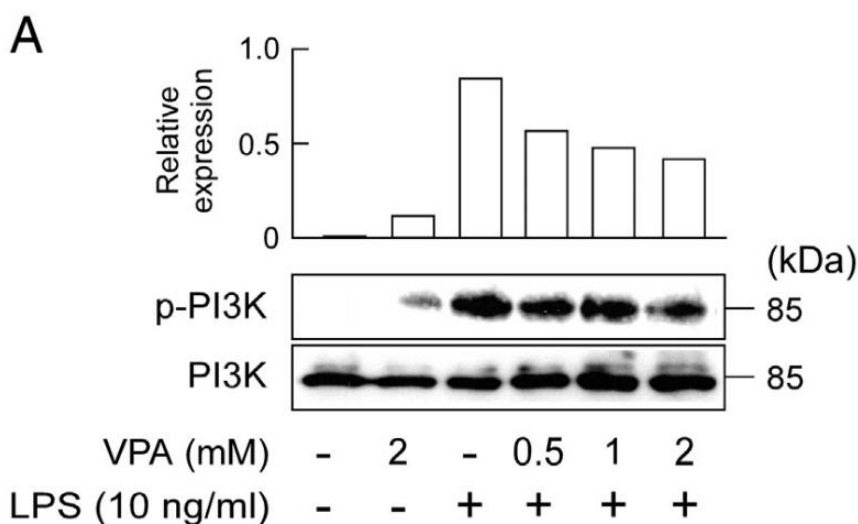
Зураг 1. Вальпроатын хүчлийн RAW 264.7 эсийг хордуулах тунг тодорхойлсон дүн. RAW 264.7 эсэд вальпроатын хүчлийн 1 млМ, 2 млМ, 4 млМ, 8 млМ, 16 млМ тунгаар 24 цаг үйлчилж эсийн амьдрах чадвар тодорхойлох шинжилгээ (МТТ) хийсэн. Туршилтыг хамгийн багадаа 3 удаа давтаж төлөөлүүлэх үр дүнг үзүүлэв. * $p < 0.01$ үед статистикийн ач холбогдол бүхий ялгаатай гэж үнэлсэн.

МТТ шинжилгээний үр дүнг баталгаажуулах зорилгоор RAW 264.7 эсэд ДНХ-ийн задралыг TUNEL шинжилгээгээр илрүүлсэн. Вальпроатын хүчлийг 0-8 млМ тунгаар RAW 264.7 эсэд 24 цагийн турш үйлчилж эсийн үхлийг TUNEL аргачлалаар үнэлсэн. Вальпроатын хүчлийн 2 млМ хүртэлх тунгаар үйлчилсэн эс нь хяналтын бүлгийн эстэй адил эсийг хордуулаагүй бол 4 млМ-оос дээш тунгаар эсэд ДНХ-ийн задралыг үүсгэж байсан (Зураг 2). Энэхүү үр дүн нь МТТ шинжилгээний үр дүнг баталгаажуулж байгаа бөгөөд RAW 264.7 макрофаг эсэд вальпроатын хүчлийн 2 млМ хүртэлх тун нь эс хордуулах нөлөөгүй байна. Бид цаашид судалгаандаа вальпроатын хүчлийн 2 млМ тунг туршилтандаа ашиглахаар сонгосон.



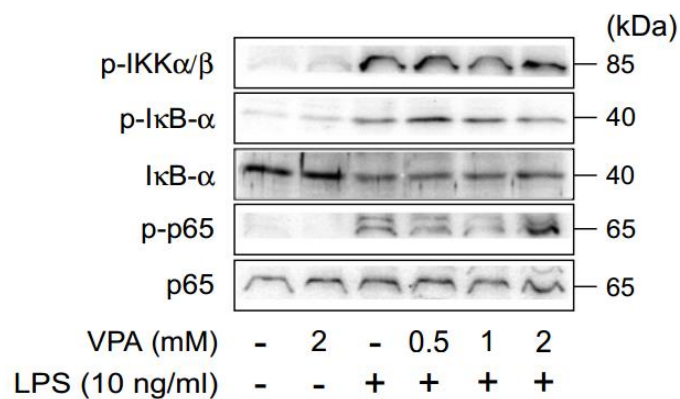
Зураг 2. Вальпроатын хүчлийн RAW 264.7 эсийг үхүүлэх тунг тодорхойлсон дүн. RAW 264.7 эсэд вальпроатын хүчлийн 1 мМ, 2 мМ, 4 мМ, 8 мМ тунгаар 24 цаг үйлчилж эсийн апоптозыг тодорхойлох TUNEL шинжилгээг хийсэн. Туршилтыг хамгийн багадаа 3 удаа давтаж төлөөлүүлэх үр дүнг үзүүлэв.

Толл төст рецептор 4 (ТТР4) нь өөрийн лиганд липополисахаридтай (ЛПС) холбогдсоноор NF-κB, MAPKs болон PI3K зэрэг транскрипцийн факторуудыг идэвхжүүлдэг (Kawai and Akira, 2010). Бид ЛПС-аар өдөөгдөх NF-κB, MAPKs болон PI3K уургуудын идэвхжилд вальпроатын хүчлийн нөлөөг тогтоох зорилгоор уургийн экспрессийг иммуноблоттингийн аргаар тодорхойлсон. Хамгийн түрүүнд PI3K уургийн идэвхжилийг үнэлсэн. RAW 264.7 эсэд вальпроатын хүчлийн 0.5-2 мМ тунгаар 12 цагийн турш үйлчилсэний дараагаар ЛПС-ыг 10 нг/мл тунгаар 2 цагийн турш өдөөсөн. Эс тайван үед PI3K уургийн идэвхжил буюу фосфоржилт тодорхойлогдоогүй. Дан ЛПС-аар үйлчилсэн эсэд PI3K уураг идэвхжиж фосфоржсон. Харин вальпроатын хүчил нь ЛПС-аар өдөөгдөх PI3K уургийн фосфоржилтыг тун хамааралтайгаар бууруулсан (Зураг 3). Вальпроатын хүчил нь дангаараа PI3K уургийн фосфоржилтыг бага хэмжээгээр нэмэгдүүлсэн. Дээрх үр дүнгээс үзэхэд вальпроатын хүчил нь ЛПС-аар өдөөгдсөн PI3K уургийн идэвхжилийг дарангуйлж байна.



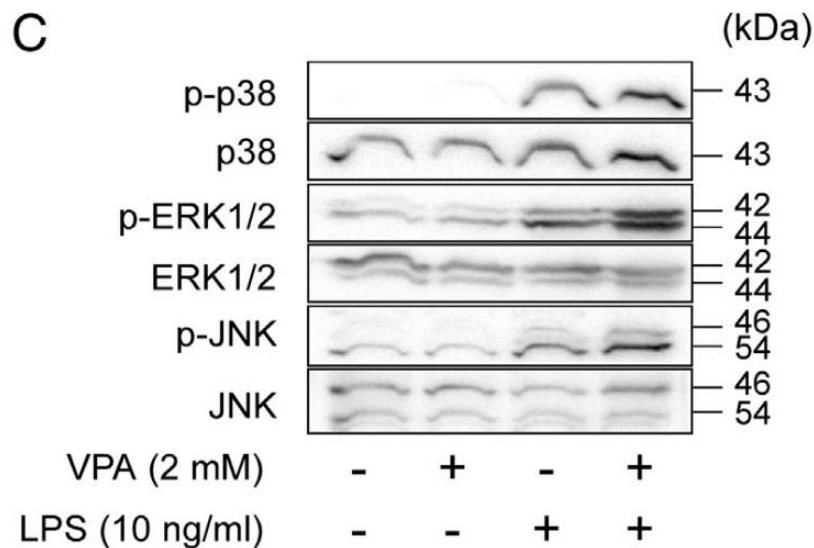
Зураг 3. ЛПС-аар өдөөгдөх PI3K уургийн идэвхжилд вальпроатын хүчлийн нөлөөг тодорхойлсон дүн. RAW 264.7 эсийг 0.5 млМ, 1 млМ, 2 млМ вальпроатын хүчлээр 12 цаг үйлчилсэний дараа 10 нг/мл ЛПС-аар 2 цаг өдөөсөн. Нийт PI3K болон фосфоржсон PI3K (p-PI3K) уургийн экспрессийг иммуноблотингийн шинжилгээгээр үнэлсэн. Туршилтыг хамгийн багадаа 3 удаа давтаж төлөөлүүлэх үр дүнг үзүүлэв.

ЛПС нь NF-κB-ийн идэвхжилд оролцохдоо хамгийн түрүүнд IKKα/β, IκB-α уургуудыг ээлж дараалан фосфоржуулдаг. NF-κB-ийн ингибитор молекул болох IκB-α фосфоржсоноор нийт IκB-α уургийн задралыг нөхцөлдүүлдэг. Нэгэнт дарангуйлагч уураг нь задарсан нөхцөлд NF-κB-ийн дэд нэгжүүд болох p65, p50 уургууд нь цитопlasмаас бөөмрүү шилжин ЛПС/ТТР4 хамааралт генийн транскрипцийг эхлүүлдэг (Kawai and Akira, 2010). Бид дараагийн шатанд ЛПС-аар өдөөгдөх NF-κB, түүний зохицуулгад оролцогч бүлэг уургийн идэвхжилд вальпроатын хүчлийн нөлөөг тодорхойлсон. RAW 264.7 эсэд вальпроатын хүчлийн 3 төрлийн тунгаар (0.5 млМ, 1 млМ, 2 млМ) 12 цагийн турш үйлчилж улмаар ЛПС-ыг 10 нг/мл тунгаар 0.5 цагийн турш сэдээсэн. Эсийг ямар нэгэн бодисоор үйлчлээгүй үед NF-κB хамааралт IKKα/β, IκB-α, p65 уургуудын фосфоржилт илрээгүй. Эсийг ЛПС-аар өдөөхөд NF-κB хамааралт IKKα/β, IκB-α, p65 уургуудын фосфоржилт ихэссэн бөгөөд энэхүү ЛПС хамааралт уургуудын идэвхжилд вальпроатын хүчлийн 3 төрлийн тун нөлөөлөхгүй байсан. Түүнчлэн NF-κB-ийн ингибитор молекул болох IκB-α нь эс тайван үед суурь идэвхжилтэй байсан. ЛПС дангаар үйлчилсэн эсэд IκB-α-ийн задрал нэмэгдсэн, харин вальпроатын хүчил нь энэхүү ЛПС хамааралт задралаас сэргийлж чадаагүй (Зураг 4). Сонирхолтой нь вальпроатын хүчлийн 2 млМ тун нь NF-κB хамааралт уургуудын (IKKα/β, IκB-α, p65) фосфоржилт болон NF-κB-ийн ингибитор (IκB-α) уургийн задралыг нөхцөлдүүлэхгүй байв. Эдгээр үр дүнгээс харахад RAW 264.7 макрофаг эсэд вальпроатын хүчил нь ЛПС-аар өдөөгдөх NF-κB-ийн идэвхжилд нөлөөлөхгүй байна.



Зураг 4. ЛПС-аар өдөөгдөх NF-κB уургийн идэвхжилд вальпроатын хүчлийн нөлөөг тодорхойлсон дүн. RAW 264.7 эсийг 0.5 млМ, 1 млМ, 2 млМ вальпроатын хүчлээр 12 цаг үйлчилсэний дараа 10 нг/мл ЛПС-аар 2 цаг үйлчилсэн. Нийт IκB-α болон p65, фосфоржсон IKKα/β (p-IKKα/β), фосфоржсон IκB-α (p-IκB-α), фосфоржсон p65 (p-p65) уургийн экспрессийг иммуноблотингийн шинжилгээгээр үнэлсэн. Туршилтыг хамгийн багадаа 3 удаа давтаж төлөөлүүлэх үр дүнг үзүүлэв.

ЛПС/ТТР4 нь MyD88 хамааралт замаар MAPKs транскрипцийн факторыг идэвхжүүлдэг. MAPKs транскрипцийн факторуудад p38, ERK1/2, JNK уургууд багтдаг бөгөөд эдгээр уургийн фосфоржилт нь идэвхжлийг илэрхийлдэг (Kawai and Akira, 2010). Бид ЛПС-аар өдөөгдөх p38, ERK1/2, JNK уургуудын идэвхжилд вальпроатын хүчлийн нөлөөг имунноблоттингийн шинжилгээгээр тодорхойлсон. RAW 264.7 эсэд вальпроатын хүчлийн 2 млМ тунгаар 12 цагийн турш үйлчилж улмаар ЛПС-ыг 10 нг/мл тунгаар 0.5 цагийн турш өдөөсөн. Хяналтын бүлгийн эсэд p38, ERK1/2, JNK уургуудын фосфоржилт буюу идэвхжил илрээгүй. ЛПС-ын 10 нг/мл тун нь макрофагт p38, ERK1/2, JNK уургуудын фосфоржилтыг нэмэгдүүлсэн. Харин вальпроатын хүчлийг ЛПС-тай хамт үйлчилсэн эсэд дан ЛПС-аар үйлчилсэн эстэй харьцуулахад ялгаатай MAPKs-ийн идэвхжил илрээгүй (Зураг 5). Вальпроатын хүчил дангаараа p38, ERK1/2, JNK уургуудыг идэвхжүүлдэггүй. RAW 264.7 макрофаг эсэд вальпроатын хүчил нь ЛПС-аар өдөөгдөх MAPKs транскрипцийн факторуудын идэвхжилд нөлөөлөхгүй байна.



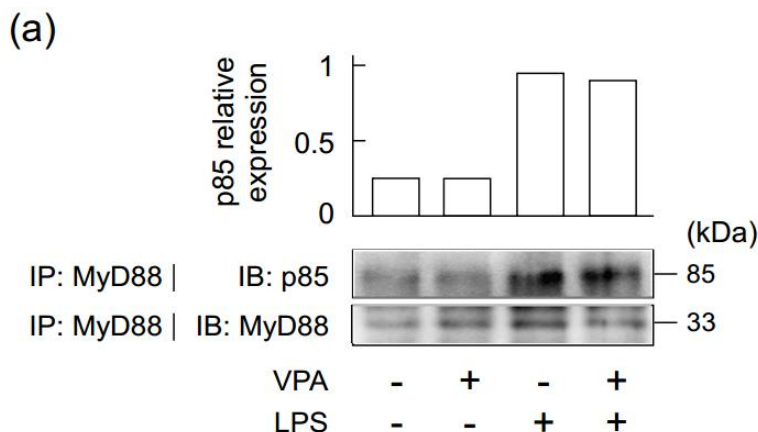
Зураг 5. ЛПС-аар өдөөгдөх MAPK уургуудын идэвхжилд вальпроатын хүчлийн нөлөөг тодорхойлсон дүн. RAW 264.7 эсийг 2 млМ вальпроатын хүчлээр 12 цаг үйлчилсэний дараа 10 нг/мл ЛПС-аар 0.5 цаг үйлчилсэн. Нийт p38, ERK1/2, JNK болон фосфоржсон p38 (p-p38), фосфоржсон ERK1/2 (p-ERK1/2), фосфоржсон JNK (p-JNK) уургуудын экспрессийг иммуноблотингийн шинжилгээгээр үнэлсэн. Туршилтыг хамгийн багадаа 3 удаа давтаж төлөөлүүлэх үр дүнг үзүүлэв.

Эдгээр бүлэг үр дүнгээс харахад вальпроатын хүчил нь ЛПС/ТТР4-өөр өдөөгдөх транскрипцийн факторуудад харилцан адилгүй үйлчилж байна. Тодруулбал, вальпроатын хүчил нь ЛПС-аар өдөөгдөх PI3K транскрипцийн факторын идэвхжилийг дарангуйлж байгаа бол бусад транскрипцийн факторуудад ямар нэгэн нөлөө үзүүлж чадахгүй байна. Иймд PI3K уургийн дээд болон доод замын дохио дамжуулах молекулыг нарийвчлан судлах үндэслэл урган гарч байна.

Дараагийн ээлжинд бид PI3K уургийн дээд дохио дамжуулах замыг бай болгон судалсан. ЛПС нь ТТР4-тэй холбогдсоноор адаптор уураг MyD88 болон PI3K молекулын дэд нэгж болох p85 уурагтай нэгдэж уургийн бүрдэлийг үүсгэдэг (Laird нар, 2009). ЛПС-аар өдөөгдөх MyD88/p85 уургийн бүрдэлийн идэвхжилд вальпроатын хүчлийн нөлөөг иммунопреципитацийн аргаар судалсан. RAW 264.7 эсэд вальпроатын хүчлийн 2 млМ тунгаар 12 цагийн турш үйлчилж улмаар ЛПС-ыг 100 нг/мл тунгаар 0.5 цагийн турш өдөөсөн.

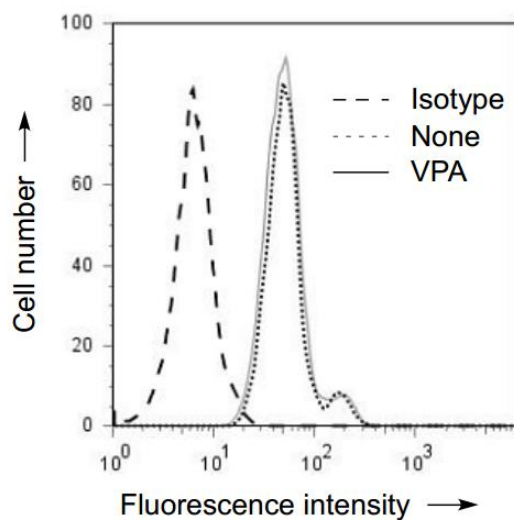
Эс тайван үед MyD88/p85 уургууд харилцан холбогдож уургийн бүрдэлийг үүсгэсэн байв. Эсийг дан ЛПС-аар сэдээхэд энэхүү MyD88/p85 уургийн бүрдэлийн идэвхжил ихэссэн. Харин вальпроатын хүчил нь ЛПС-аар сэдээгдэх MyD88/p85 уургийн бүрдэлийн идэвхжилд нөлөөлөөгүй (Зураг 6). Түүнчлэн вальпроатын хүчил дангаараа MyD88/p85 уургийн

бүрдэлийн суурь идэвхжилд нөлөөлөөгүй. Уургуудын харилцан үйлчлэлийг тодорхойлох иммунопреципитацийн үр дүнгээс харахад вальпроатын хүчил нь ЛПС/ТТР4 хамааралт PI3K болон адаптор уургуудын хоорондын харилцан үйлчлэлд нөлөөлж чадахгүй байна.



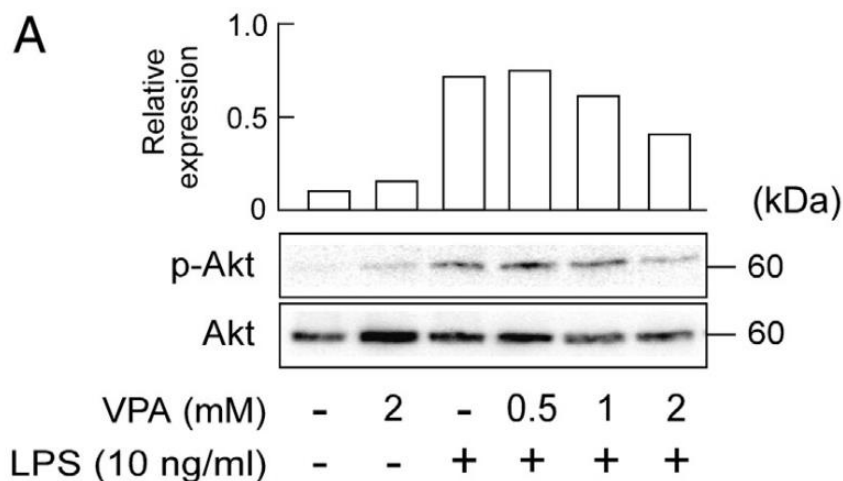
Зураг 6. MyD88 болон p85 уургийн харилцан үйлчлэлд вальпроатын хүчил ба ЛПС-ын нөлөөг тодорхойлсон дүн. RAW 264.7 эсийг 2 млМ вальпроатын хүчлээр 12 цаг үйлчилсэний дараа 10 нг/мл ЛПС-аар 0.5 цаг үйлчилсэн. Эсгэгээр задалсан эсийн уургийг MyD88-ийн анхдагч эсрэгбиеэр тунадасжуулж (immunoprecipitation, IP), улмаар тунадаст PI3K- болон MyD88-ийн анхдагч эсрэгбиеэр будаж (immunoblotting, IB) уургийн экспрессийг тодорхойлсон. Туршилтыг хамгийн багадаа 3 удаа давтаж төлөөлүүлэх үр дүнг үзүүлэв.

Цаашлаад, ТТР4-ийн эсийн гадаргуу дээрх экспресст вальпроатын хүчлийн нөлөөг урсгал эс тоолуурын аргаар тодруулахыг зорилоо. RAW 264.7 эсэд вальпроатын хүчлийн 2 млМ тунгаар 12 цагийн турш үйлчилж улмаар ТТР4-ийн анхдагч эсрэгбиеэр 0.5 цаг, флуоресцент нэгдэл бүхий хоёрдогч эсрэгбиеэр 20 минутын турш будсан. Вальпроатын хүчлээр үйлчилсэн болон үйлчлээгүй эсүүдэд ТТР4-ийн экспресс ижилхэн тодорхойлогдсон (Зураг 7). Энэхүү урсгал эс тоолуурын шинжилгээний үр дүнгээс харахад вальпроатын хүчил нь макрофаг эсийн гадаргуу дээрх ТТР4-ийн экспресст нөлөөлөхгүй байна. Дээрх үр дүнгүүдээс дүгнэхэд PI3K уургийн дээд дохио дамжуулах замд вальпроатын хүчил нөлөөлөхгүй байна. Иймд PI3K уургийн доод дохио дамжуулах замд вальпроатын хүчлийн нөлөөг лавшруулан судлах шаардлага урган гарч байна.



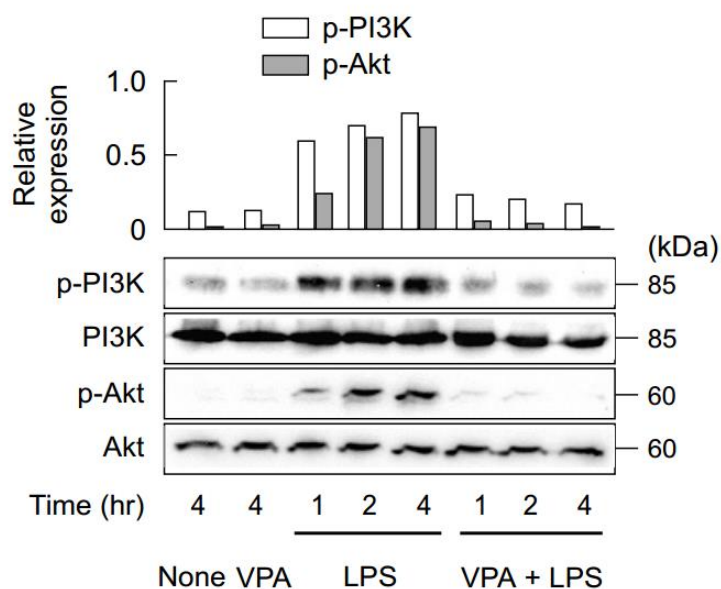
Зураг 7. Эсийн гадаргуу дээрх TTP4-ийн экспрессд вальпроатын хүчлийн нөлөөг тодорхойлсон дүн. RAW 264.7 эсийг 2 млМ вальпроатын хүчлээр 12 цаг үйлчилсэний дараа TLR4/MD2-ийн анхдагч эсрэгбиеэр 0.5 цаг үйлчилж, FITC бүхий хоёрдогч эсрэгбиеэр 20 минут будсан. Эсийн гадаргуу дээрх TTP4-ийн экспрессийг урсгал эс тоолуур ашиглан тодорхойлсон. Цацаргалтын идэвхийг муруйгаар илэрхийлэв. Туршилтыг хамгийн багадаа 3 удаа давтаж төлөөлүүлэх үр дүнг үзүүлэв.

Бид цаашид PI3K уургийн дохио дамжуулах доод замыг сонгон судалсан. ЛПС-ын нөлөөгөөр PI3K болон Akt нь ээлж дараалан фосфорждог (Ojaniemi нар, 2003, Monick нар, 2001). Бид ЛПС-аар өдөөгдөх Akt уургийн фосфоржилтонд вальпроатын хүчлийн нөлөөг тодорхойлох зорилгоор иммуноблотинг шинжилгээгээг хийсэн. RAW 264.7 эсэд вальпроатын хүчлийг 3 төрлийн тунгаар (0.5 млМ, 1 млМ, 2 млМ) 12 цагийн турш үйлчилж, улмаар ЛПС-ыг 10 нг/мл тунгаар 2 цагийн турш сэдээсэн. Хяналтын эсэд Akt уургийн идэвхжил буюу фосфоржилт тодорхойлогдоогүй. Дан ЛПС нь эсэд Akt уургийг фосфоржуулдаг бол вальпроатын хүчил нь ЛПС-аар өдөөгдөх энэхүү Akt уургийн фосфоржилтыг тун хамааралтайгаар бууруулсан (Зураг 8). Вальпроатын хүчил нь дангаараа Akt уургийг идэвхжүүлдэггүй.



Зураг 8. ЛПС-аар өдөөгдөх Akt уургийн идэвхжилд вальпроатын хүчлийн нөлөөг тодорхойлсон дүн. RAW 264.7 эсийг 0.5 млМ, 1 млМ, 2 млМ вальпроатын хүчлээр 12 цаг үйлчилсэний дараа 10 нг/мл ЛПС-аар 2 цаг үйлчилсэн. Нийт Akt болон фосфоржсон Akt (p-Akt) уургийн экспрессийг иммуноблотингийн шинжилгээгээр үнэлсэн. Туршилтыг хамгийн багадаа 3 удаа давтаж төлөөлүүлэх үр дүнг үзүүлэв.

Түүнчлэн ЛПС-аар өдөөгдөх PI3K/Akt дохио дамжилтанд вальпроатын хүчлийн хугацаа хамааралт нөлөөг судалсан. RAW 264.7 эсэд вальпроатын хүчлийн 2 млМ тунгаар 12 цагийн турш үйлчилсэний дараагаар ЛПС-ын 10 нг/мл тунгаар 1, 2, 4 цагаар сэдээсэн. Хяналтын эсэд PI3K/Akt замын идэвхжил илрээгүй. ЛПС-аар 1, 2, 4 цаг үйлчилэхэд PI3K/Akt уургууд зэрэгцэн фосфоржсон. Харин вальпроатын хүчил нь ЛПС-аар өдөөгдсөн PI3K/Akt замын фосфоржилтыг хугацаа хамааралтайгаар бууруулж байсан (Зураг 9). Дээрх үр дүнгээс үзэхэд вальпроатын хүчил нь ЛПС-аар өдөөгдсөн Akt уургийн идэвхжилийг тун болон хугацаа хамааралтай дарангуйлж байна. Өөрөөр хэлбэл PI3K уургийн дараагийн молекул болох Akt уургийн түвшинд нөлөөлж байна.



Зураг 9. ЛПС-аар өдөөгдөх PI3K/Akt замд вальпроатын хүчлийн нөлөөг тодорхойлсон дүн. RAW 264.7 эсийг 2 млМ вальпроатын хүчлээр 12 цаг үйлчилсэний дараа 10 нг/мл ЛПС-аар 1-4 цаг үйлчилсэн. Нийт PI3K, Akt болон фосфоржсон PI3K (p-PI3K), фосфоржсон Akt (p-Akt) уургийн экспрессийг иммуноблотингийн шинжилгээгээр үнэлсэн. Туршилтыг хамгийн багадаа 3 удаа давтаж төлөөлүүлэх үр дүнг үзүүлэв.

Хэлэлцүүлэг

Бидний судалгаагаар грам сөрөг нянгийн эсрэг анхдагч болон хоёрдогч дархлааны хариу урвалын механизмийг зохицуулах, тэдгээрийн хоорондын харилцан үйлчлэлийг нээн илрүүлсэн билээ. Тухайлбал, энэ удаагийн судалгаанд грам сөрөг нянгаар өдөөгдөх TTP4-ийн дохио дамжуулах механизмд вальпроатын хүчил нь дарангуйлах нөлөө үзүүлж байгааг тогтоосон. Вальпроатын хүчил нь ЛПС-аар өдөөгдөх PI3K/Akt дохио дамжих замын фосфоржих идэвхийг саатуулж байна.

Бидний цуврал бүтээлд грам сөрөг нян, мөөгөнцөрийн эсрэг эмчилгээний үр дүнг сайжруулах онолын үндэслэлийг нарийвчлан тодорхойлсон билээ (Tsolmongyn et al., 2013). Тухайлбал, грам эрэг нян, мөөгөнцөрийн халдварын үед идэвхждэг анхдагч (TTP2-ийн дохио дамжуулалт) болон хоёрдогч (интерферон гаммагийн дохио дамжуулалт) дархлааны хариу урвалуудын харилцан үйлчлэлийг илрүүлсэн. TTP2 болон интерферон гаммагийн систем нь өөр хоорондоо хоёр цэгээр огтлолцож байсан бөгөөд энэхүү синергист харилцан үйлчлэл нь STAT1 молекулын фосфоржих байршилудаар тайлбарлагддаг. STAT1 уургийн 701 дэх дараалалд тирозины фосфоржилт нь интерферон гаммагийн рецептор нь TTP2-ийн MyD88 адаптор уурагтай шууд харилцан үйлчилсэнээр ихэсдэг. Харин STAT1 уургийн 727 дахь дараалалд сериний фосфоржилт нь нэг талаас интерферон гаммагийн JAK1/2 уургууд,

нөгөө талаас TTP2-ийн p38 уургийн нөлөөгөөр идэвхждэг байна. Ийнхүү 2 байршилд идэвхжсэн STAT1 молекул нь анхдагч (TTP2-ын дохио дамжуулалт) болон хоёрдогч (интерферон гаммагийн дохио дамжуулалт) дархлааны хариу урвалын хүчийг 2-5 дахин нэмэгдүүлдэг байна. Үүнээс үзэхэд грам эерэг нян, мөөгөнцөрийн эмчилгээнд STAT1 молекулыг дарангуйлах эм, эмчилгээний тактик илүү үр дүнтэй болохыг харуулж байна.

Бидний саяхны бүтээлд давхар утаслаг PHX агуулсан вирүсийн эсрэг өрнөх анхдагч (TTP3-ийн дохио дамжуулалт) болон хоёрдогч (интерферон гаммагийн дохио дамжуулалт) дархлааны механизмийг тайлбарласан билээ (Mori et al., 2015). TTP3 болон интерферон гаммагийн системүүдийг холбогч молекул нь IRF7 бөгөөд дархлааны эсийн доторх нийт IRF7-ийн экспресс өөрчлөгдөхгүйгээр зөвхөн фосфоржилт ихсэж байгаа нь ихээхэн сонирхол татаж байгаа юм. Үүнээс үзэхэд давхар утаслаг PHX агуулсан вирүсийн эсрэг эмчилгээнд IRF7 уургийн фосфоржилтийг дарангуйлах эмийн бэлдмэлийг хэрэглэх онолын үндэслэл урган гарч байна.

Бид өмнөх судалгаанд ДНХ агуулсан бактерийн эсрэг өрнөх анхдагч (TTP9-ийн дохио дамжуулалт) болон хоёрдогч (интерферон гаммагийн дохио дамжуулалт) дархлааны хариу урвалын механизмыг тодорхойллоо. TTP9-ийн лиганд нь интерферон гаммагийн дохио дамжуулалтыг эсийн доторх бүхий л шатанд буюу iNOS/IRF1/STAT1/JAK1/JAK2 дохио дамжилтыг идэвхжүүлсэнээр дархлааны хариу урвалын хүчийг нэмэгдүүлж байна. Энэхүү TTP9 болон интерфероны харилцан дэмжих үйлчлэлд SOCS1, SHP2 сөрөг зохицуулагчаас гадна идэвхжсэн p38 (p-p38) t-ээрэг зохицуулагч молекул оролцоотой болохыг тодорхойлоод байна (Балжинням нар., 2018). Уг судалгааны үр дүнгээс үзэхэд CPG ДНХ агуулсан бактерийн эмчилгээнд эерэг, сөрөг зохицуулагч молекулыг ашиглах бололцоотой нь харагдаж байна.

Бидний сүүлийн судалгаанд дан утаслаг PHX агуулсан вирүсийн эсрэг өрнөх анхдагч (TTP7-ийн дохио дамжуулалт) болон хоёрдогч (интерферон гаммагийн дохио дамжуулалт) дархлааны хариу урвалын механизмийг тодорхойлсон. TTP7 болон интерфероны харилцан дэмжих үйлчлэлд SOCS1, SHP2, PIAS1 сөрөг зохицуулагч молекулууд дарангуйлагдсанаар дархлааны хариу урвалын идэвхийг нэмэгдүүлж байсан (Баасансүрэн нар., 2018). Үүнээс үзэхэд эдгээр сөрөг зохицуулагч молекулыг дарангуйлах эмчилгээ нь дан утаслаг PHX агуулсан вирүсийн эсрэг эмчилгээнд ач холбогдолтой болохыг харуулж байна.

Дүгнэлт

1. RAW 264.7 макрофаг эсэд вальпроатын хүчлийн 2 мМ хүртэлх тун нь эс хордуулах нөлөөгүй байна.

2. RAW 264.7 макрофаг эсэд вальпроатын хүчил нь ЛПС-аар өдөөгдөх PI3K/Akt дохио дамжих замыг дарангуйлж байна. Харин ЛПС-аар өдөөгдөх NF-κB, MAPKs дохио дамжих замд вальпроатын хүчил нөлөөлөхгүй байна.
3. ЛПС-аар өдөөгдөх MyD88/p85 уургуудын хоорондын харилцан үйлчлэлд нөлөөлөхгүй байна.

Ном зүй

1. Gerstner T, Bell N, König S. Oral valproic acid for epilepsy-long-term experience in therapy and side effects. *Expert OpinPharmacother* 2008; 9(2):285-92.
2. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11(5):373-84.
3. Laird MH, Rhee SH, Perkins DJ, Medvedev AE, Piao W, Fenton MJ, et al. TLR4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR4 signaling. *J Leukoc Biol* 2009; 85(6):966-77.
4. Monick MM, Carter AB, Robeff PK, Flaherty DM, Peterson MW, Hunninghake GW. Lipopolysaccharide activates Akt in human alveolar macrophages resulting in nuclear accumulation and transcriptional activity of beta-catenin. *J Immunol* 2001; 166(7):4713-20.
5. Mori D, Koide N, Tsolmongyn B, Nagata H, Sano T, Nonami T, Yokochi T. Poly I:C enhances production of nitric oxide in response to interferon-γ via upregulation of interferon regulatory factor 7 in vascular endothelial cells. *Microvasc Res.* 2015 Mar;98:68-73.
6. Ojaniemi M, Glumoff V, Harju K, Liljeroos M, Vuori K, Hallman M. Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in Toll-like receptor 4-mediated cytokine expression in mouse macrophages. *Eur J Immunol* 2003; 33(3):597-605.
7. Roger T, Lugrin J, Le Roy D, Goy G, Mombelli M, Koessler T, et al. Histone deacetylase inhibitors impair innate immune responses to Toll-like receptor agonists and to infection. *Blood* 2011; 117(4):1205-17.
8. Savva A, Roger T. Targeting Toll-Like Receptors: Promising Therapeutic Strategies for the Management of Sepsis-Associated Pathology and Infectious Diseases. *Front Immunol* 2013; 4:387.
9. Tsolmongyn B, Koide N, Jambalganiin U, Odkhuu E, Naiki Y, Komatsu T, Yoshida T, Yokochi T. A Toll-like receptor 2 ligand, Pam3CSK4, augments interferon-γ-induced nitric oxide production via a physical association between MyD88 and interferon-γ receptor in vascular endothelial cells. *Immunology.* 2013 Nov;140(3):352-61.
10. Т.Балжинням, Ө.Хулан, Ш.Эрхэмбаяр, Э.Баасансүрэн, Ц.Билэгтсайхан, нар. IFN-γ/TLR9-ийн харилцан дэмжих үйлчлэлд эерэг болон сөрөг зохицуулагч молекулын нөлөө. *Эрүүл мэндийн лаборатори.* 2018; №8: х8-13
11. Э.Баасансүрэн, Б.Жавхлан, Т.Балжинням, Ө.Хулан, Ц.Билэгтсайхан, нар. TLR7-ийн лиганд болон IFN-γ-ийн дохио дамжилтын хоорондын харилцан үйлчлэлд сөрөг

зохицуулагч молекулын нөлөөг тодорхойлох нь. *Эрүүл мэндийн лаборатори*. 2018; №8:
х14-18

Inhibitory action of Lipopolysaccharide-induced signal transductions by Valproic acid

J.Ulziisaikhan¹, S.Tsogtsaikhan¹, T.Yokochi²,
L.Enkhsaikhan¹, J.Jambaldorj^{3,4}, B.Javkhlan^{1,5}, B.Baigalmaa⁵,
N.Tsevelmaa⁵, B.Galindev⁵, L.Sodnomtsogt⁵, N.Munkhtuvshin⁴, B.Munkhbat⁵, Ts.Bilegtsaikhan^{4,5}

¹Department of Microbiology and Immunology, School of Biomedical Sciences, MNUMS

²Department of Microbiology and Immunology, Aichi Medical University School of Medicine

³Department of Molecular Biology and Genetics, School of Biomedical Sciences, MNUMS

⁴Central Scientific Research Laboratory, IMS

⁵Core Laboratory, Science and Technology Center, MNUMS

E-mail address: jamulzii2015@gmail.com, Tel: 9988-9916

Introduction:

Valproic acid (VPA) has been used in the treatment of seizures and bipolar disorders. In the present study, we examined how VPA affected PI3K-Akt pathway in response to LPS by using mouse RAW 264.7 macrophage cells.

Material and methods: Mouse RAW 264.7 macrophage-like cells cultured and the cell viability checked by MTT and TUNEL assay. In addition, protein expression and protein interaction were detected by immune blotting and immune precipitation, respectively. TLR4 expression on cell surface studied by FACS analysis.

Results: The MTT and TUNEL assays demonstrated no significant difference between VPA at 2 mM treated and untreated control cells. VPA attenuated LPS-induced phosphorylation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and Akt, but not nuclear factor (NF)- κ B and mitogen-activated protein kinases (MAPKs). There was no significant difference in the TLR4 expression on the cell surface between cells treated with or without VPA. VPA inhibited LPS-induced PI3K/Akt signal transduction in a dose dependent manner.

Conclusion: VPA at 2mM exhibits nontoxic effect in the RAW 264.7 cells. VPA down regulates LPS-induced phosphorylation of Akt via inhibition of PI3K activation.

Keywords: Valproic acid, Lipopolysaccharide, PI3K, Akt

Танилцаж санал өгсөн АУ-ны доктор В.ХАДХҮҮ