

Интерферон гаммагийн дохио дамжилтанд толл төст рецептор 9-ийн лигандын нөлөөг тодорхойлох нь

Ш.Эрхэмбаяр¹, Ц.Батцэцэг¹, Т.Балжинням¹, Э.Алтай², Э.Баасансүрэн¹, Б.Жавхлан³, М.Батхишиг¹, С.Долгорсүрэн¹, Ж.Өлзийсайхан¹, Л.Энхсайхан¹, Ц.Цэндмаа³, Б.Галиндэв³, Б.Хонгорзул³,

Б.Байгалмаа³, Д.Нямбаяр³, Б.Мөнхбат³, Ц.Билэгтсайхан³

¹Бичил амь, дархлаа судлалын тэнхим, ЭЗ-БАС, АШУУИС

²Биологийн тэнхим, БУС, ШУС, МУИС

³Цөм лаборатори, ШУТТ, АШУУИС

Удиртгал

Хүний бие махбодь гадаад орчны бактери, вирус, мөөгөнцөр зэрэг бичил биетэнтэй өвөрмөц болон өвөрмөц бус дархлааны хариу урвалуудыг ээлж дараалан идэвхжүүлдэг. Анхдагч дархлааны хариу урвалд захын цусан дахь дархлааны эсүүд (макрофаг, моноцит г.м) оролцож гадны бичил организмийг устгахын зэрэгцээ хоёрдогч урвалыг эхлүүлэх охь бодисуудыг ялгаруулснаар дархлааны үндсэн эсүүдийг (Т, В лимфоцит) сэрээдэг.¹

Толл төст рецептор, (Toll like receptor, TLR) нь 4 төрлийн PRR (pathogen recognition receptor)-ийн нэг төрөл бөгөөд эмгэг төрөгчийн PAMPs (pathogen associated molecular patterns)-ийг таньж идэвхэждэг өвөрмөц бус дархлааны хамгийн чухал бүтэц юм. Одоогийн байдлаар 11 төрлийн TLR мэдэгдээд байгаа бөгөөд эсийн мембран дээр болон эндосомд байрласан байдаг. TLR9-ийн лиганд CpG DNA нь бактерт өргөн тохиолдох ба TLR9-тэй харилцан үйлчлэлцэж үрэвслийн урьдал үеийн цитокинуудыг ялгаруулдаг.²

Интерферон гамма (interferon-gamma, IFN-γ) нь II хэвшинжийн интерферонд хамаарах, димер бүтэцтэй, уусамхай цитокин юм. IFN-γ нь вирусын эсрэг мөн зарим бактерийн эсрэг үйлдэлтэй өвөрмөц дархлааны хариу урвалын чухал цитокин юм. IFN-γ рецептортой харилцан үйлчилсний дараа эсийн дотор дохио дамжих үйл явц JAK-STAT (Janus kinase-Signal transducer and activator of transcription) замаар өрнөх ба энэ замаар

бусад 50 гаруй цитокин, өсөлтийн хүчин зүйлс, дааврын дохио дамжина. Ийнхүү дохио дамжих үйл явцад оролцож буй STAT уураг, улмаар iNOS (isoform nitric oxide synthase) уургийн нийлэгжилтийг нэмэгдүүлж азотын исэл ялгардаг байна.^{3,4}

TLR идэвхжихэд оролцдог адаптор уургууд интерферон гаммагийн дохио дамжилтанд оролцогч молекулуудтай харилцан үйлчлэлдэг. Тухайлбал STAT1 уургын 701 дэхь дараалалд тирозины фосфоржилт TLR2-ын MyD88 нь интерферон гаммагийн рецептортой харилцан үйлчлэлцсэнээр ихэсдэг. Ийнхүү идэвхэжсэн STAT1 молекул нь интерферон гаммагийн дохио дамжилтийг 2-5 дахин нэмэгдүүлдэг байна.^{5,6} Бактерийн ДНХ-д өргөн тохиолдох CpG DNA нь интерферон гаммагийн дохио дамжилтанд хэрхэн нөлөөлдөг болох нь одоогоор тодорхойгүй байна.

Судалгааны зорилго

Интерферон гаммагийн дохио дамжилтанд TLR9-ийн лигандын нөлөөг тодорхойлох

Зорилт

1. END-D эсэд интерферон гаммагаар өдөөгдөх азотын ислийн гарцад нөлөөлөх TLR9 лигандын нөлөөг тодорхойлох
2. Интерферон гаммагаар өдөөгдөх генийн экспрессд (iNOS mRNA) TLR9 лигандын нөлөөлөх нөлөөг тодорхойлох

3. Интерферон гаммагаар өдөөгдөх уургийн нийлэгжилтэд (iNOS, STAT1) TLR9 лигандын нөлөөлөх нөлөөг тодорхойлох

Судалгааны загвар арга

Эсийн өсгөвөр

Эндотель (ENDD) шугаман эсийг идэвхгүйжүүлсэн 5%-н тугалын хээлийн ийлдэс (FCS), антибиотикийн холимог (penicillin G, streptomycin, amphotericin B) агуулсан эсийн орчинд (MEM, RPMI 1640 medium) орчинд 5% CO₂-ийн чийгшилтэй 37°C хэмд өсгөвөрлөв. Өсгөврийг трипсин ба этилендиаминтетраацетатаар (ЭДТА) үйлчлүүлж эсийн хөвмөг бэлтгэв. Бэлтгэсэн эсийн хөвмөгт TLR9 лиганд болон интерферон гаммагаар үйлчилж цаашдын шинжилгээг гүйцэтгэв.

Эсийн амьдрах чадвар тодорхойлох шинжилгээ

Эндотель эсийг 96 нүхтэй эсийн тавганд нүх тус бүрт 2×10^4 эс байхаар тооцож 12 цагийн турш өсгөвөрлөв. Эсэд нийлэг интерферон гамма болон TLR9-ийн лиганд хийж 24 цагийн турш байлгасан. Эсийн амьдрах чадварыг 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2-H-tetrazolium (MTT) бодисын будагдалтаар тодорхойлов. Энэхүү туршилт нь амьд эсийн митохондроос ялгарах NADPH хамааралт редуктаза ферментийн идэвхээр тодорхойлогддог.

Азотын ислийн экспрессийг тодорхойлох шинжилгээ

Эсийн дээд шингэн дэх азотын ислийн (NO, Nitric oxide) концентрацийг Griess урвалж ашиглан тодорхойлсон. Энэ арга нь урвалын шингэн дэх нитрит (NO₂) сульфаниламид ба нафтилэтилендиамин холбогдох өрсөлдөөн дээр үндэслэсэн байдаг. Эсийн өвгөврийн шингэх дэх нитритийн хэмжээг тоон үзүүлэлтээр илэрхийлэх зорилгоор нитритийн мэдэгдэж буй агууламжтай уусмал

ашиглан, цуврал шингэрүүлэлтийн аргаар муруй зохиож ашигласан.

iNOS mRNA экспрессийг тодорхойлох RT-PCR

Эсийн өсгөвр дэх iNOS mRNA-ийн идэвхжлийг бодит хугацааны полимеразын гинжин урвал (RT-PCR) ашиглан тодорхойлов. NucleoSpin RNA plus kit-ийг ашиглан эсээс PHX ялгаж флуорометрын аргаар түүний концентрацийг тодорхойлсон. Ялгасан PHX-ээс кДНХ нийлэгжүүлэн RT-PCR явуулсан болно.

Уургийн нийлэгжилтийг тодорхойлох иммуноблотинг шинжилгээ

Эсийн өсгөвр дэх iNOS, STAT1 уургийн нийлэгжилтийг иммуноблотинг шинжилгээ ашиглан тодорхойлов. Иммуноблотингийн шинжилгээ нь аливаа уургийн нийлэгжилтийг тодорхойлоход өргөнөөр хэрэглэдэг. Ингэхдээ эсээс уургийг протеаза дарангуйлагч агуулсан задлагч уусмалын тусламжтайгаар 4°C-д ялган авна. Ялган авсан уургийн концентрацийг тодорхойлж, ижил концентрацитай уургуудыг гельд гүйлгэж хүндийн жингээр нь ялгадаг. Гель дээрх уургуудыг цахилгаан хүчдэлийн тусламжтайгаар нитроцеллюлоз мембран дээр шилжүүлж, мембраныг холбогдох анхдагч эсрэг биеээр будна. Үүссэн дархан бүрдэл дээр тунхуу (horseradish)-ны пероксидазтай зүүсэн хоёрдогч эсрэг биеийг нэмж, үүний дараа хемилюминесцент бодис нэмж толбо үүсгэдэг. Үүссэн толбыг гэрэл шингээгч системийн анализатор ашиглан тодруулж хардаг.

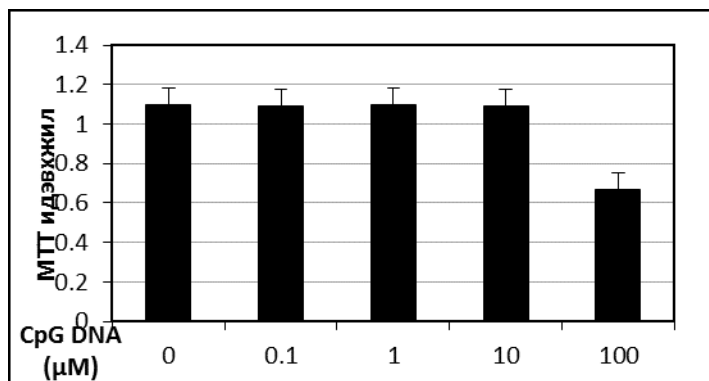
Үр дүн

END-D эсэд TLR9 лигандын хоргүй тунг тодорхойлсон дүн

Эндотель эсэд TLR9-ийн лигандын ямар тун хоргүй болохыг эсийн амьдрах чадвар тодорхойлох шинжилгээгээр (MTT assay) тодорхойлсон. Эндотель эсийн өсгөвөр дээр TLR9-ийн лигандын

дараах тунгуудаар (0, 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M) 24 цаг үйлчилсэний дараа эсийн амьдрах чадвар тодорхойлох шинжилгээг хийсэн. Эсийн амьдрах чадвар тодорхойлох шинжилгээгээр TLR9-ийн лигандын 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M тунгууд эндотель эсийг хордуулахгүй байсан.

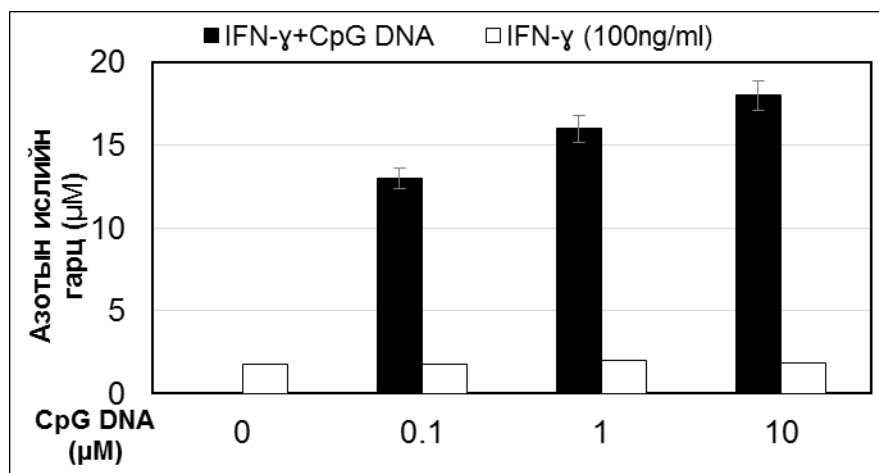
TLR9-ийн лигандын 100 μ M тун нь эсийг 40%-иар үхүүлж байв (Зураг 1). Эдгээр үр дүнгээс үзэхэд 10 μ M хүртэлх тун нь эндотель эсийн амьдрах чадварт нөлөөлөхгүй бөгөөд энэ тунг цаашдын судалгаанд ашигласан.



Зураг 1. Эндотель эсэд TLR9-ийн лигандын эс хордуулах нөлөөг тодорхойлсон дүн. TLR9-ийн лигандын 0; 0.1 μ M; 1 μ M; 10 μ M; 100 μ M тунгаар 24 цаг эндотель эсэд үйлчилж эсийн амьдрах чадвар тодорхойлох шинжилгээ хийсэн. Босоо тэнхлэгийн дагуу MTT-ийн идэвхжилийг, хэвтээ тэнхлэгийн дагуу TLR9-ийн лигандын тунг тус тус харуулав. $p < 0.01$ үед статистикийн ач холбогдол бүхий ялгаатай гэж үнэлсэн.

Интерферон гаммагаар өдөөгдсөн азотын ислийн гарцад TLR9-ийн лигандын тун хамааралт нөлөө
TLR9-ийн лигандын интерферон гаммагаар өдөөгдсөн азотын ислийн үүсэлтэнд нөлөөлөх нөлөөг

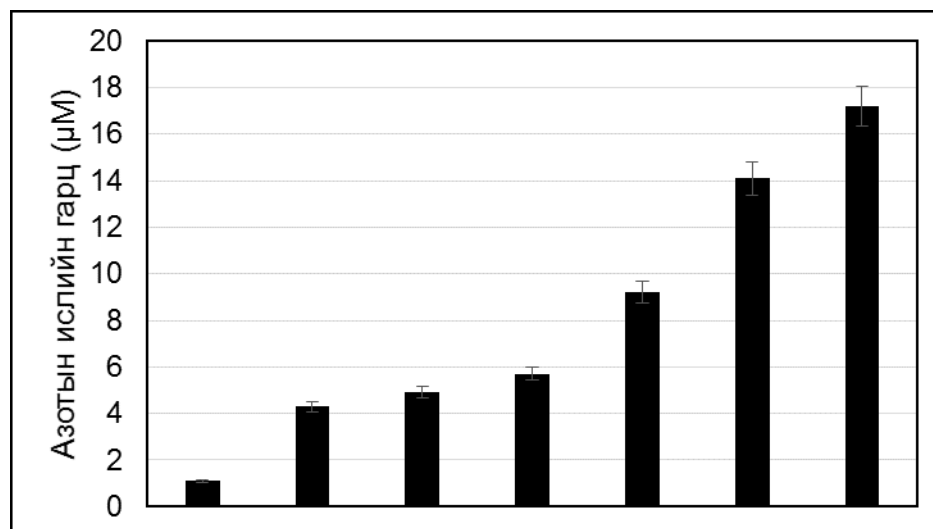
тодорхойлсон. Эндотель эсэд TLR9-ийн лигандын 10 дахин шингэлсэн тунгаар 1 цагийн турш үйлчилсэн. Үүний дараа 100 ng/ml IFN- γ -аар 24 цагийн турш үйлчилсэн. Griess урвалжыг ашиглан азотын ислийн гарцыг тодорхойлсон. Тайван байдалд байгаа эндотель эс азотын ислийг ялгаруулахгүй байсан. Харин интерферон гамма дангаараа азотын ислийн гарцыг 2 μ M хүртэл ялгаруулдаг бол TLR9-ийн лиганд 0.1 μ M тунгаар 12 μ M хүртэл, 1 μ M тунгаар 16 μ M хүртэл, 10 μ M тунгаар 17 μ M хүртэл тус тус азотын ислийн гарцыг ихэсгэж байсан (Зураг 2). Энэхүү үр дүнгээс үзэхэд CpG DNA нь интерферон гаммагаар өдөөгдсөн азотын ислийн гарцыг тун хамааралтайгаар ихэсгэж байна.



Зураг 2. TLR9-ийн лигандын интерферон гаммагаар өдөөгдөх азотын ислийн гарцад нөлөөлөх нөлөөг тодорхойлсон дүн. Эндотель эсэд TLR9-ийн лигандын 10 дахин шингэлсэн тунгаар (0.1µM, 1.0µM, 10µM) 1 цагийн турш үйлчилсэн. Үүний дараа 100 ng/ml IFN-γ-аар 24 цагийн турш үйлчилж азотын ислийн гарцыг үнэлсэн. Босоо тэнхлэгийн дагуу азотын ислийн гарцийг, хэвтээ тэнхлэгийн дагуу TLR9-ийн лигандын тунг тус тус харуулав. $p < 0.01$ үед статистикийн ач холбогдол бүхий ялгаатай гэж үнэлсэн.

Азотын ислийн гарцад интерферон гаммагийн тун хамааралт нөлөө

Эндотель эсэд интерферон гаммагийн аль тун нь азотын ислийн гарцад хамгийн ихээр нөлөөлдгийг тодорхойлсон. Эндотель эсэд TLR9-ийн лигандын 1µM тунгаар 1 цагийн турш үйлчилсэн. Үүний дараа 10ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml IFN-γ-аар 24 цагийн турш үйлчилж Griess урвалжыг ашиглан азотын ислийн гарцыг тодорхойлсон. Интерферон гаммагийн 10ng/ml тунгаар үйлчлэхэд 4µM-оос 9µM хүртэл, 50ng/ml тунгаар үйлчлэхэд 5µM-оос 14µM хүртэл, 100ng/ml тунгаар үйлчлэхэд 5µM-оос 14µM хүртэл азотын ислийн гарцыг ихэсгэсэн (Зураг 3). Үүнээс үзэхэд интерферон гаммагийн тун хамааралтайгаар азотын ислийн гарц нэмэгдэж байна.



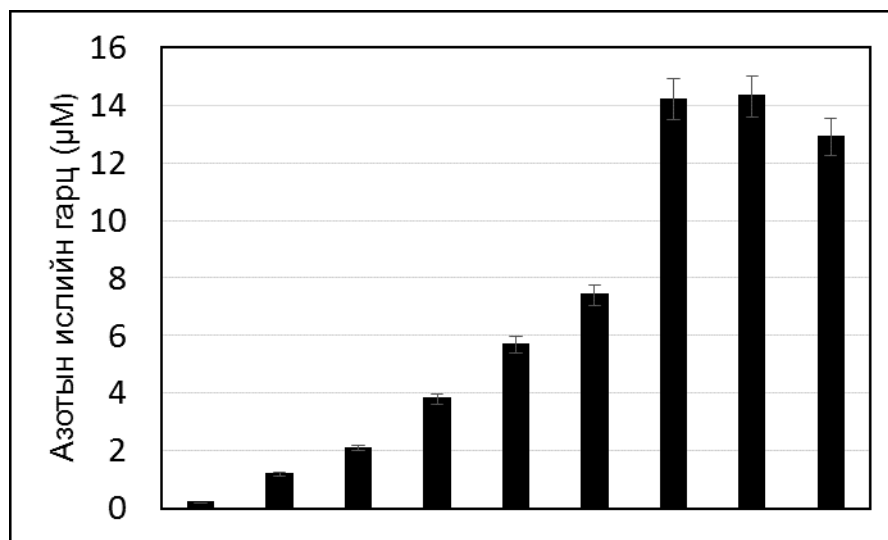
TLR9								
лиганд (1μM)	-	-	-	-	+	+	+	
IFN-γ (ng/ml)	-	10	50	100	10	50	100	

Зураг 3. Интерферон гаммагийн тун хамааралт азотын ислийн гарцад нөлөөлөх нөлөөг тодорхойлсон дүн. Эндотель эсэд TLR9-ийн лигандын 1μM тунгаар 1 цагийн турш үйлчилсэн үүний дараа 10ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml IFN-γ-аар 24 цагийн турш үйлчилсэн. Үүний дараа Griess урвалж ашиглан азотын ислийн гарцыг тодорхойлсон. Босоо тэнхлэгийн дагуу азотын ислийн концентрацийг хэвтээ тэнхлэгийн дагуу IFN-γ-ийн гурван тунг харуулав. $p < 0.01$ үед статистикийн ач холбогдол бүхий ялгаатай гэж үнэлсэн.

Азотын ислийн гарцад интерферон гаммагийн хугацаа хамааралт нөлөө

Эндотель эсэд интерферон гаммагаар үйлчилсэн хугацаанаас хамаарч азотын

ислийн гарцад хэрхэн нөлөөлдгийг тодорхойлсон. Эндотель эсэд TLR9-ийн лигандын 1μM тунгаар 1 цагийн турш үйлчилсэн. Үүний дараа 100 ng/ml интерферон гаммагаар 18, 24, 36 болон 48 цагийн турш үйлчилж азотын ислийн гарцыг Griess урвалж ашиглан тодорхойлсон. Интерферон гаммагаар 18 цаг үйлчилсний дараа азотын ислийн гарц 1μM-оос 7μM хүртэл, 24 цаг үйлчилсний дараа азотын ислийн гарц 2μM-оос 14μM хүртэл, 36 цаг үйлчилсний дараа азотын ислийн гарц 5μM-оос 14μM хүртэл, 48 цаг үйлчилсний дараа азотын ислийн гарц 6μM-оос 13μM хүртэл ихэсгэсэн үр дүн гарсан. Энэхүү үр дүнгээс үзэхэд интерферон гаммагаар 36 цаг хүртэл үйлчлэхэд азотын ислийн гарц хангалттай хэмжээнд нэмэгдэж байна (Зураг 4).



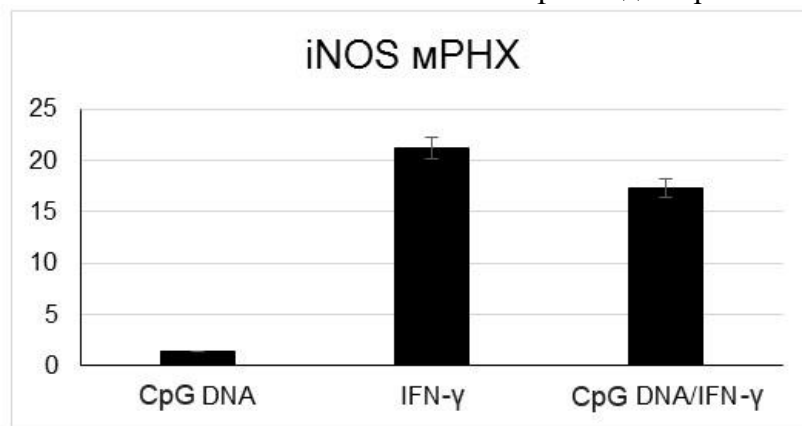
TLR9									
лиганд (1μM)	-					+	+	+	+
IFN-γ (100ng/ml)	-	+	+	+	+	+	+	+	+
IFN-γ-гаар үйлчилсэн хугацаа		18	24	36	48	18	24	36	48

Зураг 4. Эндотель эсэд интерферон гаммагаар үйлчилсэн хугацаанаас хамааран азотын ислийн гарцад нөлөөлөх нөлөөг тодорхойлсон дүн. TLR9-ийн лигандын $1\mu\text{M}$ тунгаар 1 цагийн турш үйлчилж үүний дараа 100 ng/ml интерферон гаммагаар 18, 24, 36 болон 48 цагийн турш үйлчилсэн. Үүний дараа Griess урвалж ашиглан азотын ислийн гарцыг тодорхойлсон. Босоо тэнхлэгийн дагуу азотын ислийн концентрацийг хэвтээ тэнхлэгийн дагуу IFN- γ -ийн үйлчилсэн хугацааг тус тус үзүүлэв. $p < 0.01$ үед статистикийн ач холбогдол бүхий ялгаатай гэж үнэлсэн.

TLR9 лигандын интерферон гаммагаар өдөөгдөх генийн экспрессд (iNOS

mRNA) нөлөөлөх нөлөөг тодорхойлсон дүн

Эндотель эсийг TLR9-ийн лигандаар ($10\mu\text{M}$) 1 цаг сэдээсний дараа, 100 ng/ml IFN- γ -гаар 6 цаг үйлчилж iNOS мРНХ-ийн экспрессийг үнэлсэн. qRT-PCR-ийн үр дүнгээс үзэхэд хяналтын бүлэгт iNOS-ийн мРНХ экспресслэгдээгүй байсан. IFN- γ дангаараа iNOS мРНХ-ийн экспрессийг хяналтын бүлэгтэй харьцуулахад 21 дахин нэмэгдүүлж байсан. Харин TLR9-ийн лиганд болон IFN- γ цуг үйлчилсэн бүлэгт 14 дахин тус тус нэмэгдсэн. TLR9-ийн лиганд дангаараа iNOS мРНХ-ийн экспрессийг өдөөдөггүй. TLR9 болон IFN- γ -гийн дохио дамжуулах замын синергист холбоо нь генийн экспрессийн буюу iNOS мРНХ-ийн түвшинд илэрч байна (Зураг 5).

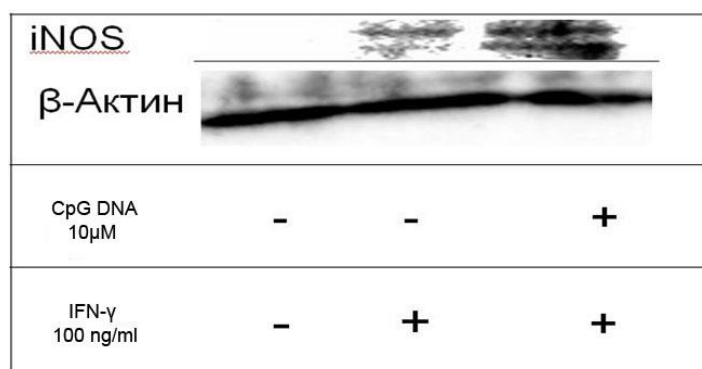


Зураг 5. Интерферон гаммагаар өдөөгдсөн iNOS уургийн нийлэгжилтэд TLR9 лигандын нөлөөг тодорхойлсон дүн. Эндотель эсийг CpG DNA ($10\mu\text{M}$) 1 цаг сэдээсний дараа, 100 ng/ml IFN- γ -гаар 6 цаг үйлчилж iNOS мРНХ-ийн экспрессийг үнэлсэн. Дотоод хяналт болох GAPDH мРНХ-ийн экспресстэй харьцуулсан болно.

TLR9 лигандын интерферон гаммагаар өдөөгдөх уургийн нийлэгжилтэд (iNOS, STAT1) нөлөөлөх нөлөөг тодорхойлсон дүн

Интерферон гаммагаар өдөөгдсөн iNOS уургийн нийлэгжилтэд TLR9 лиганд нь

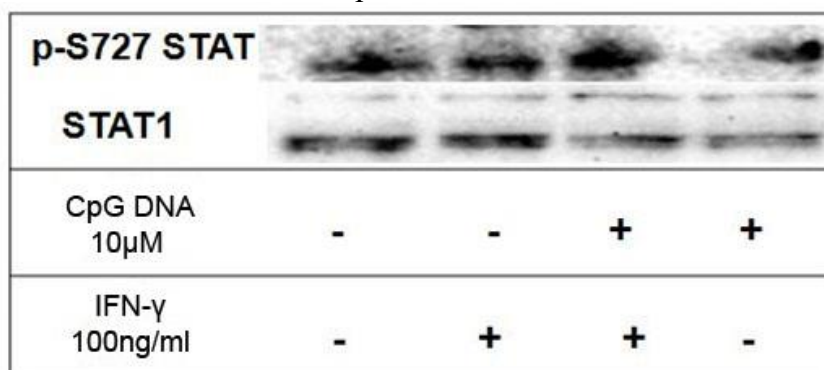
хэрхэн нөлөөлж байгааг иммуноблотингийн шинжилгээгээр тодорхойлсон. Эндотель эсийг $10\mu\text{M}$ CpG DNA-ээр 1 цаг үйлчилсэний дараа 100 ng/ml IFN- γ -аар 24 цаг үйлчилж iNOS уургийн нийлэгжилтийг үнэлсэн. Иммуноблотинг шинжилгээний үр дүнгээс харахад эс тайван, гадны ямар нэгэн нөлөөгүй байхад iNOS уураг идэвхижээгүй байсан. IFN- γ дангаараа iNOS уургийн нийлэгжилтийг ихэсгэж чадсан, харин CpG DNA-ээр нэмж үйлчлэхэд IFN- γ -аар өдөөгдөх iNOS уургийн нийлэгжилт нэмэгдэж байна (Зураг 6).



Зураг 6. Интерферон гаммагаар өдөөгдсөн iNOS уургийн нийлэгжилтэд CpG DNA-ийн нөлөөг тодорхойлсон дүн. Эндотель эсийг 10μM TLR9-ийн лигандаар 1 цаг үйлчилсэний дараа 100ng/ml IFN-γ-аар 24 цаг үйлчилж iNOS уургийн нийлэгжилтийг иммуноблотингийн шинжилгээгээр үнэлсэн. Актин уургийн нийлэгжилтийг дотоод хяналт болгон ашигласан.

Интерферон гаммагаар өдөөгдсөн p-S727 STAT1 уургийн нийлэгжилтэд TLR9 лиганд нь хэрхэн нөлөөлж байгааг иммуноблотингийн шинжилгээгээр

тодорхойлсон. Эндотель эсийг 10μM CpG DNA-ээр 1 цаг үйлчилсэний дараа 100 ng/ml IFN-γ-аар 2 цаг үйлчилж p-S727 STAT1 уургийн нийлэгжилтийг үнэлсэн. Иммуноблотинг шинжилгээний үр дүнгээр эс тайван байхад болон TLR9 лигандаар үйлчлэхэд p-S727 STAT1 уургийн нийлэгжилтийг идэвхжүүлж байсан. IFN-γ дангаараа өдөөх p-S727 STAT1 уургийн нийлэгжилтийг ихэсгэж чадсан, харин CpG DNA-ээр нэмж үйлчлэхэд IFN-γ-аар өдөөгдөх p-S727 STAT1 уургийн нийлэгжилт нэмэгдэж байна (Зураг 7).



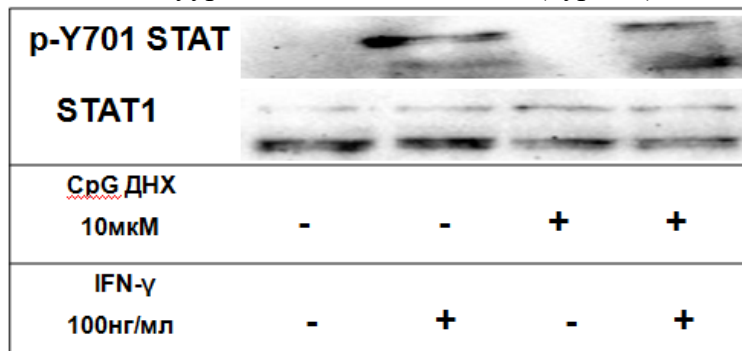
Зураг 7. p-S727 STAT-ын нийлэгжилт өдөөгдөөгүй END-D эс болон дан CpG DNA-ийн 10μM тунгаар өдөөсөн эсүүд дээр ажиглагдаж байсан. 10μM CpG DNA болон 100ng/ml IFN-γ-аар үйлчлэхэд p-S727 STAT-ын нийлэгжилт дан 100ng/ml IFN-γ-тай харьцуулахад ихэссэн байна. STAT1 уургийн нийлэгжилтийг дотоод хяналт болгон ашигласан.

Интерферон гаммагаар өдөөгдсөн pY701-STAT1 уургийн нийлэгжилтэд TLR9

лиганд нь хэрхэн нөлөөлж байгааг иммуноблотингийн шинжилгээгээр тодорхойлсон. p-Y727 STAT1 уураг нь гель электрофорезд 91kD болон 84kD масстай 2 банд үүсдэг. Эндотель эсийг 10μM CpG DNA-ээр 1 цаг үйлчилсэний дараа 100ng/ml IFN-γ-аар 2 цаг үйлчилж pY701-STAT1 уургийн нийлэгжилтийг үнэлсэн. Иммуноблотинг шинжилгээний үр дүнгээр эс тайван байхад болон TLR9 лигандаар үйлчлэхэд pY701-STAT1 уургийн нийлэгжилтийг өдөөхгүй байна.

IFN-γ дангаараа pY701-STAT1 уургийн нийлэгжилтийг ихэсгэж чадсан. CpG DNA-ээр нэмж үйлчлэхэд IFN-γ-аар өдөөгдөх p-S701-STAT1 уургийн

нийлэгжилт дан IFN-γ-тай харьцуулахад ихэсгэж байна. Бид STAT1 уургийн нийлэгжилтийг дотоод хяналт болгон ашигласан (Зураг 8).



Зураг 8. Хэвийн байдалд байгаа END-D эс болон дан CpG DNA-ийн 10μM тунгаар өдөөсөн эсүүд p-Y701 STAT-ын нийлэгжилт өдөөгдөөгүй. 10μM CpG DNA болон 100ng/ml IFN-γ-аар нэмж үйлчлэхэд p-Y701 STAT-ын нийлэгжилт дан 100 ng/ml IFN-γ-тай харьцуулахад ихэссэн байна. STAT1 уургийн нийлэгжилтийг дотоод хяналт болгон ашигласан.

Хэлцэмж

Энэхүү судалгааны ажлаар анхдагч дархлаа тогтолцооны үндсэн рецепторуудын нэг болох TLR9 нь интерферон гаммагийн дохио дамжилтанд хэрхэн нөлөөлж буйг урвалын эцсийн бүтээгдэхүүн болох азотын исэл, түүнийг хариуцсан ферментийн mPHE-ийн экспресс болон уургийн идэвхжлийн түвшинд авч судаллаа. Бидний судалгаа нь шугаман эсийн өсгөвөр ашиглан анхдагч болон хоёрдогч дархлааны хариу урвалын загварыг лабораторийн нөхцөлд үүсгэж байгаагаараа онцлог бөгөөд цаашид вирусын болон бактерийн эсрэг эмчилгээний шинэ технологи боловсруулахад онолын үндэслэл болох боломжтой. TLR9 нь CpG DNA-г таньж холбогдсоноор анхдагч дархлааг тогтолцоог идэвхжүүлэхээс гадна үрэвслийн урьтал үеийн цитокин болон дархлаа чадамжит эсүүдийг идэвхжүүлэх

цитокиныг ялгаруулах замаар бактери, вирусын эсрэг өвөрмөц дархлаа тогтолцоог идэвхжүүлж өгдөг. Иймээс TLR9-ийн дохио дамжилтыг судлах нь олон талын ач холбогдолтой юм.

Дүгнэлт

1. Эндотель эсэд IFN-γ-аар өдөөгдөх азотын ислийн гарцыг TLR9-ийн лиганд тун хамааралтай ихэсгэж байна.
2. IFN-γ-аар өдөөгдөх iNOS уургийн генийн экспрессийг TLR9-ийн лиганд ихэсгэж байна.
3. IFN-γ-аар өдөөгдөх iNOS, S727-STAT1, Y701-STAT1 уургуудын нийлэгжилтийг TLR9-ийн лиганд ихэсгэж байна.

Ном зүй

1. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*. May 2010;11(5):373-384.
2. Frazao JB, Errante PR, Condino-Neto A. Toll-like receptors' pathway disturbances are associated with increased susceptibility to infections in humans. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. Dec 2013;61(6):427-443.

3. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology*. Feb 2004;75(2):163-189.
4. Ramana CV, Chatterjee-Kishore M, Nguyen H, Stark GR. Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene*. May 15 2000;19(21):2619-2627.
5. Greenlund AC, Farrar MA, Viviano BL, Schreiber RD. Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *The EMBO journal*. Apr 1 1994;13(7):1591-1600.
6. He H, MacKinnon KM, Genovese KJ, Kogut MH. CpG oligodeoxynucleotide and double-stranded RNA synergize to enhance nitric oxide production and mRNA expression of inducible nitric oxide synthase, pro-inflammatory cytokines and chemokines in chicken monocytes. *Innate immunity*. Apr 2011;17(2):137-144.

The effect of TLR9 ligand on IFN- γ signaling

Erkhembayar. Sh¹, Battsetseg. Ts¹, Baljinnyam. T¹, Altai. E², Baasansuren. E¹, Javkhlan. B³, Batkhisig. M¹, Dolgorsuren. S¹, Ulziisaikhan. J¹, Enkhsaikhan. L¹, Tsendmaa. Ts³, Galindev. B³, Khongorzul. B³, Baigalmaa. B³, Nyambayar. D³, Munkhbat. B³, Bilegtsaikhan. Ts³

¹Microbiology and Immunology department, School of Pharmacy and Biomedicine, MNUMS

²Biology department, NUM

³Core laboratory, MNUMS

Introduction. The aim of this research project is to elucidate the crosstalk of innate and adaptive immune reactions against the DNA containing bacteria.

Material and methods. This study held in the Core laboratory, Science Technology Center, Mongolian National University of Medical Sciences (MNUMS). Murine aortal endothelial cells, END-D cultured and the cell viability checked by MTT assay. In addition, the NO production, protein and gene expression studied by Griess Reagent assay, R.T-PCR and immunoblotting, respectively.

Results 0.1 μ M, 1 μ M and 10 μ M of TLR9 ligand exhibited no cytotoxic action against the cells by MTT assay. IFN- γ alone induced NO production in END-D cells. In the other hand, TLR9 ligand at 0.1 μ M, 1 μ M and 10 μ M up-regulated IFN- γ induced NO

production in dose dependent manner. RT-PCR results exhibit that TLR9 ligand up regulates iNOS mRNA. Immunoblotting analysis showed the enhanced iNOS protein expression and phosphorylation of STAT1 in cells pre-treated with TLR9 ligand.

Discussion

We have demonstrated CpG DNA, TLR9 ligand, up-regulates IFN- γ induced NO via enhanced IFN- γ signaling. The result of Western Blotting and RT-PCR support the up-regulation of NO. CpG DNA can be used as agent against virus and bacteria. Further research need to be conducted.

Conclusion. TLR9 ligand, CpG DNA up-regulates IFN- γ induced NO production in time and dose dependent manner. TLR9 ligand augments the expression of iNOS mRNA and STAT1 phosphorylation in response to IFN- γ .

Бүтээлтэй танилцан, санал өгсөн
АУ-ны доктор, профессор В. Хадхүү