

МОНГОЛ УЛСЫН БОЛОВСРОЛ, ШИНЖЛЭХ УХААНЫ ЯАМ
АНАГААХЫН ШИНЖЛЭХ УХААНЫ ҮНДЭСНИЙ ИХ СУРГУУЛЬ

Гар бичмэлийн эрхтэй ©

ШАГДАРСҮРЭНГИЙН ГАНСУВД

**ХАВСАРГЫН C5a АНАФИЛАТОКСИНЫ C5aR БОЛОН C5L2
РЕЦЕПТОРУУДЫГ ХҮНИЙ АТЕРОСКЛЕРОЗЫН ТОВРУУНЫ ҮЕ
ШАТУУДАД ТОДОРХОЙЛСОН НЬ**

E720400 –Эмнэлзүйн шинжлэх ухаан судлал

Анагаах ухааны магистрын зэрэг горилсон нэг сэдэвт бүтээл

Улаанбаатар хот
2015 он

МОНГОЛ УЛСЫН БОЛОВСРОЛ, СОЁЛ, ШИНЖЛЭХ УХААНЫ ЯАМ
АНАГААХЫН ШИНЖЛЭХ УХААНЫ ҮНДЭСНИЙ ИХ СУРГУУЛЬ

ШАГДАРСҮРЭНГИЙН ГАНСУВД

**ХАВСАРГЫН C5a АНАФИЛАТОКСИНЫ C5aR БОЛОН C5L2
РЕЦЕПТОРУУДЫГ ХҮНИЙ АТЕРОСКЛЕРОЗЫН ТОВРУУНЫ ҮЕ
ШАТУУДАД ТОДОРХОЙЛСОН НЬ**

Эрдэм шинжилгээний ажлын удирдагч:

Анагаах ухааны доктор, профессор Т.Ариунаа

Эрдэм шинжилгээний ажлын зөвлөх:

Анагаах ухааны доктор, профессор С.Мөнхбаярлах

Эрдэм шинжилгээний ажлын шүүмжлэгч:

Анагаах ухааны доктор, профессор Л.Галцог

Улаанбаатар хот

2015 он

ТОВЧ ХУРААНГУЙ

Сэдэв: Хавсаргын C5a анафилатоксины C5aR болон C5L2 рецепторуудыг хүний атеросклерозын товрууны үе шатуудад тодорхойлсон нь

Зорилго: Хавсаргын C5a анафилатоксины сонгодог C5aR (CD88) болон харьцангуй шинээр нээгдсэн C5L2 (*C5a receptor-like 2*) рецепторуудын илрэлийг хүний атеросклерозын товрууны үе шатуудад тодорхойлох

Судалгааны арга зүй ба үр дүн: Эндартериозктомийн хагалгаагаар авсан атеросклерозын өөрчлөлт бүхий судас болон задлан шинжилгээний үед авсан эмгэг өөрчлөлтгүй судсыг атеросклерозын товрууны үе шатуудад ангилан, үе шат тус бүрд C5aR, C5L2 рецепторуудыг иммуногистохимийн болон ПГУ-ын аргаар илрүүлэн, дүн шинжилгээ хийсэн. Эдгээр рецепторууд нь хүний эмгэг өөрчлөлтгүй судсанд тодорхойлогдоогүй боловч товрууны бүх эмгэг үе шатуудад илэрсэн. C5aR рецептор нь товрууны эхний үе шатнаас (II үе шат) огцом ихэсч, цаашид товрууны даамжирсан үе шатуудад ихээр тодорхойлогдсон. Харин C5L2 рецептор нь аажим ихэсч сүүлийн үе шатуудад мөн ихээр тодорхойлогдож байсан. C5L2 рецепторын илрэх эсийг иммунофлуоресценцийн давхар будгийн аргаар будаж шинжлэхэд энэ нь ихэвчлэн макрофаг эс, цөөн тооны нейтрофил болон эндотель эсүүд байв. Исэлдсэн БНЛП (*oxLDL-oxidized low density lipoprotein*)- ээр будагдсан исэлдсэн өөх тос залгисан эсүүд C5aR, C5L2 рецепторуудыг зэрэг агуулсан байсныг иммунофлуоресценцийн давхар будгийн аргаар илрүүлсэн.

Дүгнэлт: Хавсаргын C5aR, C5L2 рецепторууд нь хүний атеросклерозын товрууны бүх эмгэг үе шатуудад ихээр илэрч байна. C5aR рецептор илэрсэн эсүүд нь товрууны үе шат даамжрах явцад өөх тосыг залгисны улмаас хэвийн үед эсийн дотор байрлах C5L2 рецептор эсийн гадаргуу дээр гарч C5aR рецептортой зэрэг илэрч байгаа бөгөөд энэ нь исэлдсэн БНЛП нь рецепторуудын байрлалд нөлөөлж байгааг харуулж байна. Атеросклерозын товрууны эхний үе шатуудад үрэвслийн эсүүд C5aR рецептороор татагдан цугларахыг C5aR рецептор антагонистыг хэрэглэж хориглосноор товрууны үрэвслээс хамгаалах боломжтой гэж үзэх үндэслэл байна.

Түлхүүр үг: Атеросклероз, C5a анафилатоксин, C5aR, C5L2, Исэлдсэн өөх тос.

ABSTRACT

Expressions of both complement C5a receptors (C5aR and C5L2) in stages of human atherosclerotic plaques

Objective— The aim of this study is to elucidate the stage-dependent expression of the two functional complement anaphylatoxin C5a receptors, the classical proinflammatory receptor C5aR (CD88) and newly identified C5L2 (C5a receptor-like 2) receptor in human atherosclerosis.

Methods and Results – Human atherosclerotic plaques obtained by endarterectomy and plaques from autopsied specimens as healthy controls are staged in different atherosclerotic plaques and analysed for the expression of receptors C5aR and C5L2, by immunohistochemistry and quantitative PCR. Both receptors are expressed in all pathological plaque stages excluding healthy controls. C5aR increased suddenly from early stage II and the expression remains stable through plaque progression. C5L2 increases over time, expressed prominently in all late stages of pathological lesions. Using double-immunostaining for colocalization, C5L2-expressing cells were identified mainly as macrophages, less in neutrophils and some of endothelial cells. Interesting finding is that oxidized LDL (oxLDL)-positively stained cells were colocalized with C5L2- and C5aR-positive cells, as determined by double-immunofluorescence staining.

Conclusions— The important finding of this study is the identification of C5aR and C5L2 in all pathological stages of atherosclerotic plaque development. Early lesions significantly express more C5aR, may indicate that inflammatory cells are initially recruited to plaques through C5aR. During plaque development, C5aR-expressing cells are locally activated by uptaking oxidized-lipoproteins, express intracellular C5L2 on the cell surface and colocalise with C5aR. A therapeutic strategy that takes advantage of blocking the recruitment of C5aR-expressing cells in the early phase of atherosclerosis using C5aR antagonist might be protective against inflammation in atherosclerosis and may prevent from atherosclerotic plaques.

Key words: atherosclerosis, complement C5a receptors, C5aR, C5L2 and oxLDL.

ГАРЧИГ

ГАРЧИГ	3
ТОВЧИЛСОН ҮГИЙН ЖАГСААЛТ	5
ЗУРГИЙН ЖАГСААЛТ	6
ХҮСНЭГТИЙН ЖАГСААЛТ	8
БҮЛЭГ 1. УДИРТГАЛ	9
1.1. Судалгааны ажлын үндэслэл	9
1.2. Судалгааны ажлын зорилго, зорилт	10
1.3. Судалгааны ажлын шинэлэг тал	10
1.4. Судалгааны ажлын практик ач холбогдол	10
1.5. Судалгааны ажлыг хэлэлцүүлсэн байдал	10
1.6. Судалгааны ажлыг хэвлүүлсэн байдал	11
1.7. Судалгааны ажлын ёс зүй	12
1.8. Судалгааны ажлын бүтэц хэмжээ	12
БҮЛЭГ 2. ХЭВЛЭЛИЙН ТОЙМ	13
2.1. Атеросклерозын тухай ерөнхий ойлголт	13
2.2. Дархлаа тогтолцооны тухай ерөнхий ойлголт	16
2.2.1. Хавсаргын тогтолцооны тухай ерөнхий ойлголт	17
2.2.2. Анафилатоксин C5a, үрэвслийн хариу урвал	19
2.2.3. C5a анафилатоксины рецепторууд	19
БҮЛЭГ 3. СУДАЛГААНЫ ХЭРЭГЛЭГДЭХҮҮН БА АРГА ЗҮЙ	23
3.1. Судалгааны загвар ба хамрах хүрээ	23
3.2. Судалгааны материал цуглуулсан аргууд	23
3.3. Судалгааг хийсэн аргачлал	23
3.3.1. Хүний атеросклерозын товрууг эмгэг гистологийн аргаар будсан аргачлал	23
3.3.2. Атеросклерозын товруунд хавсаргын рецепторуудыг будаж илрүүлсэн аргачлал	25
3.3.3. Атеросклерозын товрууны үе шатуудад рецепторуудын мРНХ-г тодорхойлсон аргачлал	30
3.4. Үр дүнгийн статистик боловсруулалт	31

БҮЛЭГ 4. СУДАЛГААНЫ АЖЛЫН ҮР ДҮН	32
4.1. Хүний атеросклерозын товрууны үе шатуудыг тогтоосон нь	32
4.2. Атеросклерозын товрууны үе шатуудад C5aR рецепторын илрэлийг тодорхойлсон нь	33
4.3. Атеросклерозын товрууны үе шатуудад C5L2 рецепторын илрэлийг тодорхойлсон нь	35
4.4. Атеросклерозын товруунд C5aR, C5L2 рецепторуудын байрлалыг тодорхойлсон нь	37
4.5. Атеросклерозын товруунд C5aR, C5L2 рецепторуудын эсэд зэрэг илрэх байдлыг (<i>colocalisation</i>) тодорхойлсон нь	38
4.6. Атеросклерозын товруунд C5L2 рецепторын илрэх эсийг тодорхойлсон нь	39
4.7. Атеросклерозын товруун дахь исэлдсэн БНЛП нь (oxLDL) C5aR, C5L2 рецепторуудын байрлалд нөлөөлдөг болохыг тодорхойлсон нь	43
БҮЛЭГ 5. ХЭЛЦЭМЖ	45
БҮЛЭГ 6. СУДАЛГААНЫ АЖЛЫН ДҮГНЭЛТ БА ЗӨВЛӨМЖ	51
6.1. Судалгааны ажлын дүгнэлт	51
6.2. Судалгааны ажлын зөвлөмж	51
НОМ ЗҮЙ	
ТАЛАРХАЛ	
ХАВСРАЛТ	

НОМ ЗҮЙ

1. Эрүүл мэндийн мэдээлэл. Эрүүл мэндийн яам, Эрүүл Мэндийн Хөгжлийн Үндэсний Төв. 2012. III улирал№4.
2. Эрүүл мэндийн мэдээлэл. Эрүүл мэндийн яам, Эрүүл Мэндийн Хөгжлийн Үндэсний Төв. 2013. IV улирал№4.
3. Эрүүл мэндийн статистик мэдээлэл. Эрүүл мэндийн яам, Эрүүл Мэндийн Хөгжлийн Үндэсний Төв. 2009, 2010, 2011, 2012, 2013.
4. Shagdarsuren E, Weber C, Zernecke. Complement activation in vascular remodeling and organ damage. Drug Discovery Today: Disease Mechanisms. 2008; 5:299-306.
5. Weber C and NoelsH, Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. Nat Med. 2011; 17(11):1410-1422.
6. Hansson GK and Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. Nat Immunol. 2013;12(3):204-212.
7. Binder CJ, et al. Innate and acquired immunity in atherogenesis. Nat Med. 2002; 8(11):1218-1226.
8. HanssonGK. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis. J Thromb Haemost, 2009; 7 Suppl 1:328-331.
9. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med, 1999; 340(2):115-126.
10. GalkinaE and LeyK. Leukocyte influx in atherosclerosis. Curr Drug Targets. 2007; 8(12):1239-1248.
11. Packard RR, LichtmanAH, and LibbyP. Innate and adaptive immunity in atherosclerosis. Semin Immunopathol. 2009; 31(1):5-22.
12. Libby P,RidkerPM, and MaseriA. Inflammation and atherosclerosis. Circulation. 2002; 105(9):1135-1143.
13. SaryHC, et al. A definition of initial fatty streak and intermediate lesions of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis. American Heart Association. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1994; 14(5):840-856.

14. StaryHC, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis. American Heart Association. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995;15(9):1512-1531.
15. ZerneckeA, ShagdarsurenE, and WeberC. Chemokines in atherosclerosis: an update. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008; 28(11):1897-1908.
16. Лхагвасүрэн Ц, Сүмбэрзул Н, Дүнгэрдорж Днар. Монголын Анагаах Ухааны Үндэсний Нэвтэрхий Толь. I боть. Улаанбаатар. 2012. х.130.
17. Окоороков А.Н. Диагностика болезней внутренних органов. 2004.с59-85
18. Верещагин Н.В,Брагина Л.К, Мусатова И.В. Ангioneврология гетерогенность ишемических нарушений мозгового кровообращения 1990. с 69-71
19. Колтовер А.Н, Верещагин Н.В, Людковская И.Г, Моргунов В.А.Патологическая анатомия нарушений мозгового кровообращения.1975.с 6-9
20. ОдгэрэлБ. Артерийн анхдагч гипертензитай хүмүүсийн гүрээний артериудын цус хөдлөл зүйг доплеросонографи болон хүндрэлээр нь судлах нь. АУ-ны магистрын зэрэг горилсон нэг сэдэвт бүтээл. Улаанбаатар: Эрүүл Мэндийн Шинжлэх Ухааны Их Сургууль; 2004.
21. Walport MJ. Complement. Second of two parts. N Engl J Med, 2001; 344(15): 1140-1144.
22. WalportMJ. Complement. First of two parts. N Engl J Med, 2001; 344(14):1058-1066.
23. RicklinD and. LambrisJD. Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms. J Immunol. 2012;190(8):3831-3838.
24. LambrisJD, RicklinD, and GeisbrechtBV. Complement evasion by human pathogens. Nat Rev Microbiol. 2008; 6(2):132-142.
25. Klos A, Wende E, Wareham KJ, Monk PN..Pharmacol Rev. 2013 Jan;65(1):500-43.
26. NiculescuF and RusH, The role of complement activation in atherosclerosis. Immunol Res. 2004; 30(1):73-80.
27. Jacob A, Alexander JJ.Complement and blood-brain barrier integrity.Mol Immunol. 2014 Oct;61(2):149-52.

28. Huber-Lang M, et al. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med.* 2006; 12(6):682-687.
29. Shagdarsuren E, Weber C, Zerneck A., Complement activation in vascular remodeling and organ damage. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms.* 2008;299-306.
30. БатбаатарГ, ЧимидцэрэнС, БаттогтохЧ, Дархлаа судлал. Улаанбаатар. АДМОН ХХК, 2013. х.63.
31. Torzewski M, et al. Immunohistochemical colocalization of the terminal complex of human complement and smooth muscle cell alpha-actin in early atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17(11):2448-2452.
32. Huber-Lang M, et al. Changes in the novel orphan, C5a receptor (C5L2), during experimental sepsis and sepsis in humans. *J Immunol.* 2005; 174(2):1104-1110.
33. Tsuboi N, et al. Rapidly progressive cryoglobulinemic glomerulonephritis. *Clin Exp Nephrol.* 14(5):492-495.
34. Dimayuga PC, et al. Natural antibodies and complement modulate intimal thickening after arterial injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009; 297(5):1593-1600.
35. Speidl WS, et al. Complement in atherosclerosis: friend or foe? *J Thromb Haemost.* 2010; 9(3):428-440.
36. Speidl WS, et al. The complement component C5a is present in human coronary lesions in vivo and induces the expression of MMP-1 and MMP-9 in human macrophages in vitro. *FASEB J.* 2010; 25(1):35-44.
37. Speidl WS, et al. Complement component C5a predicts future cardiovascular events in patients with advanced atherosclerosis. *Eur Heart J.* 2005; 26(21):2294-2299.
38. Speidl WS, et al. The complement component C5a is present in human coronary lesions in vivo and induces the expression of MMP-1 and MMP-9 in human macrophages in vitro. *Faseb J.* 2011; 25(1):35-44.
39. Monk PN, et al. Function structure and therapeutic potential of complement C5a receptors. *Br J Pharmacol.* 2007; 152(4):429-448.
40. Sarma JV and Ward PA. The complement system. *Cell Tissue Res.* 2011; 343(1):227-235.

41. LaudesIJ, et al. Expression and function of C5a receptor in mouse microvascular endothelial cells. *J Immunol.* 2002; 169(10):5962-5970.
42. ShagdarsurenE, et al. C5a receptor targeting in neointima formation after arterial injury in atherosclerosis-prone mice. *Circulation.* 2010; 122(10):1026-36.
43. Lee H, WhitfeldPL, and CR. Mackay, Receptors for complement C5a. The importance of C5aR and the enigmatic role of C5L2. *Immunol Cell Biol.* 2008; 86(2):153-160.
44. GerardC and GerardNP, C5A anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor. *Annu Rev Immunol.* 1994; 12:775-808.
45. GaoH, et al. Evidence for a functional role of the second C5a receptor C5L2. *FASEB J.* 2005;19(8):1003-1005.
46. LiR, et al. C5L2: a controversial receptor of complement anaphylatoxin, C5a. *Faseb J.* 2012; 27(3):855-864.
47. OkinagaS, et al. C5L2 a nonsignaling C5A binding protein. *Biochemistry.* 2003; 42(31):9406-9415.
48. CainSAand MonkPN. The orphan receptor C5L2 has high affinity binding sites for complement fragments C5a and C5a des-Arg(74). *J Biol Chem.* 2002; 277(9):7165-7169.
49. Chen NJ, et al. C5L2 is critical for the biological activities of the anaphylatoxins C5a and C3a. *Nature.* 2007;446(7132):203-207.
50. HawlischH, et al. C5a negatively regulates toll-like receptor 4-induced immune responses. *Immunity.* 2005; 22(4):415-426.
51. GerardNP, et al. An anti-inflammatory function for the complement anaphylatoxin C5a-binding protein, C5L2. *J Biol Chem.* 2005; 280(48):39677-39680.
52. RittirschD, et al, Functional roles for C5a receptors in sepsis. *Nat Med.* 2008; 14(5):551-557.
53. SpeidlWS, et al. Complement component C5a predicts restenosis after superficial femoral artery balloon angioplasty. *J Endovasc Ther.* 2007; 14(1):62-69.
54. Ohno M, et al. A putative chemoattractant receptor, C5L2, is expressed in granulocyte and immature dendritic cells, but not in mature dendritic cells. *Mol Immunol.* 2000; 37(8):407-412.

55. ScolaAM, et al. The human complement fragment receptor, C5L2, is a recycling decoy receptor. *Mol Immunol*. 2009;46(6):1149-1162.
56. ScolaAM, et al. The role of the N-terminal domain of the complement fragment receptor C5L2 in ligand binding. *J Biol Chem*. 2007; 282(6):3664-3671.
57. KunjathoorVV, et al, Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem*. 2002; 277(51):49982-49988.
58. MantheyHD, et al. Complement C5a inhibition reduces atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. *FASEB J*. 2011; 25(7):2447-2455.
59. BambergCE, et al. The C5a receptor (C5aR) C5L2 is a modulator of C5aR-mediated signal transduction. *J Biol Chem*. 2010; 285(10):7633-7644.
60. Ross R, Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med*.1999;340(2):115-125
61. National Institutes of Health (NIH),Explore Carotid Artery Disease, Website: <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/cu/>
62. Ward PA.Functions of C5a receptors. *J Mol Med (Berl)*. 2009; 87(4):375–378.