

Рецептор за крайно-гликирани продукти: механизъм на
сигнализация в модулиране на вродената имунна функция
на *ИН ВИТРО* култивирани човешки гранулозни клетки

*Гл. Асистент Ивайло Методиев Вангелов,
секция "Имунобиология на размножаването", ИБИР-БАН*

АКТУАЛНОСТ НА ПРОБЛЕМА

- Опасен (danger) модел за активиране на вродената имунна система: вродената имунна функция на дендритни клетки с рецептори за молекулни мотиви се активира от danger сигнали от патогени или "свои" умиращи/мъртви клетки; индуцираната сигнализация активира гени с роля в клетъчен растеж/смърт (апоптоза), възпаление, анти-възпаление/тъканна регенерация.
- Овулацията с образуване на жълто тяло е стерилно (неинфекциозно) възпаление под контрол на вродената имунна функция на гранулозни клетки (разпознаване/активиране от danger сигнали, представяне на антигени, "обучаване" на наивни Т-клетки).
- Овариални нарушения са свързвани с повишен оксидативен стрес и апоптоза на гранулозни клетки, с потисната или свръхактивирана вродена гранулозо-клетъчна имунна функция, и с нарушена комуникация между вродена и адаптивна имунна система.
- Резултатите от изпълнението на проекта ще помогнат за изясняване на фундаментални аспекти от механизми на модулиране на вродената имунна функция на човешки гранулозни клетки.

ВЪВЕДЕНИЕ В ПРОБЛЕМА

- Опасни сигнали/алармини се отделят/секретират при всяко тъканно/клетъчно увреждане и се акумулират в "стареещи" и предразположени към увреждане от оксидативен стрес тъканни/клетъчни структури (пример: преовулаторен фоликул).
- Опасни сигнали са идентифицирани във фоликуларна течност/фоликуларни клетки: остро-фазови протеини, IL-1 beta, оксидиран LDL (OxLDL), S100 протеини, HMG-b1, крайно-гликирани продукти. Те активират TOLL рецептор-4 (TLR-4), IL-1R, рецептор за OxLDL (LOX-1), рецептор за крайно-гликирани продукти (RAGE).
- Опасният сигнал OxLDL индуцира оксидативен стрес и авторегулира своя рецептор LOX-1. В този т. нар. "Торочен цикъл" се генерира повишено ниво на OxLDL, под което се активира вродената имунна функция на гранулозни клетки с TLR-4 за започване на овулация.

- Рецепторът за крайно-гликирани продукти RAGE е имуноглобулинов тип рецептор за S100 протеини, HMG-b1 и крайно-гликирани продукти.
- Крайно-гликираните продукти са продукти на неензимно гликиране/оксидиране на протеини и липиди.
- Образоването/акмулирането на крайно-гликирани продукти в клетки, тъкани и циркулацията е в пряка зависимост с: ниво на оксидативен стрес, хипергликемия, хипоксия; полиолен метаболизъм на глюкоза; процеси на естествено стареене; тип на консумирана храна.
- Данни от научната литература за активиране на RAGE от крайно-гликирани продукти са основно за ендотелни и гладко-мускулни клетки, и мононуклеарни фагоцити, при които активиране на RAGE индуцира NAD(P)H оксидаза, MAP кинази и GTPази, и редокс-сензитивни транскрипционни фактори (NF-каппа B, AP-1) за гени за адхезивни молекули, ангиогенни фактори, хемокини, цитокини, RAGE.

- Данните за RAGE и крайно-гликирани продукти в яйчник са ограничени.
- С имунохистохимичен подход RAGE е локализиран в ендотелните, гранулозните и лутеалните клетки в нормална и поликистозна овариална тъкан.
- Повишено е акумулирането на крайно-гликирани продукти в гранулозни клетки в поликистозна овариална тъкан.
- Съобщава се за отрицателна корелация на фоликуларните нива на крайно-гликирани продукти с качеството на яйцеклетките/ембрионите и с нивото на успешна бременност на жени участвали в програма за асистирана репродукция.

ЦЕЛ НА ПЛАНИРАНИТЕ ЕКСПЕРИМЕНТИ

Целта на планираните в настоящия научен проект експерименти, е молекулярно-биологичното характеризиране на сигнален път на рецептор за крайно-гликирани продукти и проследяване на включването му в механизъм на авторегулация на:

- RAGE
- в индуцирането на оксидативен/нитрооксидативен стрес
- в експресията на апоптичен/про-възпалителен фенотип
- в крос-сигнализация с LOX-1 (рецептор за danger сигнал) и TLR4 (вроден имунен рецептор) в ин витро култивирани човешки гранулозни клетки.

ЗАДАЧИ/ПЛАНИРАНИ ЕКСПЕРИМЕНТИ

ЗАДАЧА 1 Да се проследи включване на RAGE в индуциране на реактивни кислородни/азотни съединения (ROS/RNS) и в механизъм на авторегулация на RAGE.

Третиране на групи от клетъчни култури с: GlycALB; нативен човешки албумин (контрола/ефект на гликиране); GlycALB+анти-оксидант/NF-каппа В инхибитор [caffeic acid phenethyl ester, C₁₇H₁₆O₄] (контрола/ефект на ROS); GlycALB+ азотен оксид синтетазен инхибитор [L-NAME] (контрола/ефект на RNS).

Визуализиране/измерване: ROS (флуоресцентен H₂DCFDA тест); RNS (флуоресцентен DAF-FM DA тест); Активиране на NF-каппа В (индиректен имунофлуоресцентен [IIF] и/или western blot [WB] тест); експресия на RAGE (IIF и/или WB тест).

ЗАДАЧА 2 Да се характеризира протеин киназен модул от сигнален път на RAGE.

Третиране на групи от клетъчни култури с: GlycALB; GlycALB + C₁₇H₁₆O₄; GlycALB+ ERK 1/2 MAPK инхибитор [PD 98059] (контрола/изключване на ERK 1/2); GlycALB+ P38 MAPK инхибитор [SB203580] (контрола/изключване на P38 MAPK).

Визуализиране/измерване: Активиране на NF-каппа В (IIF и/или WB тест).

ЗАДАЧА3 Да се проследи включване на активиран от RAGE оксидативен/нитрооксидативен стрес в експресия на апоптичен гранулозо-клетъчен фенотип.

Третиране на групи от клетъчни култури с: *GlycALB*; *GlycALB*+ *C17H16O4*; *GlycALB*+ *L-NAME*.

Визуализиране/измерване: ROS/RNS; оксидативен стрес (TBARS тест за липидна пероксидация); апоптотични клетки (флуоресцентен DAPI тест и/или TUNEL); експресия на проапоптотичен/антиапоптотичен маркер [p53, bcl-2] (IIF и/или WB тест).

ЗАДАЧА4 Да се проследи включване на активиран от RAGE сигнален път в експресия на про-възпалителен гранулозо-клетъчен фенотип.

Третиране на групи от клетъчни култури с: *GlycALB*; *GlycALB*+ *C17H16O4*.

Визуализиране/измерване: активиране на NF-κappa B (IIF и/или WB тест); експресия на адхезивна ICAM-1 молекула (IIF и/или WB тест); секреция на про-възпалителни цитокини [TNF-alpha, IL-6] (ELISA).

ЗАДАЧА 5 Да се проследи потенциална крос-сигнализация RAGE:LOX-1 и RAGE:TLR-4 .

Третиране на групи от клетъчни култури с: GlucALB; човешки OxLDL (активиране на LOX-1); липополизахарид [LPS] (активиране на TLR-4).

Визуализиране/измерване: активиране на NF-каппа B (IIF и/или WB тест); експресия на RAGE, LOX-1, TLR-4 (IIF и/или WB тест); секреция на про-възпалителни цитокини (TNF-alpha, IL-6) (ELISA).

ОЧАКВАНИ РЕЗУЛТАТИ

- ❖ От изпълнение на **ЗАДАЧА 1 и 2** ще бъдат получени данни за:
 - основни звена (вторичен [second] посредник, киназен модул, транскрипционен фактор) от активиран от крайно-гликирани продукти сигнален път на RAGE в човешки гранулозни клетки
 - данни за механизъм за авторегулация на RAGE от RAGE (посредством транскрипционен фактор NF- κ B).
- ❖ Получените данни от изпълнение на **ЗАДАЧА 3** ще са за активиран от RAGE оксидативен/нитрооксидативен стрес във връзка с експресия на апоптична гранулозо-клетъчна морфология и молекулни маркери за апоптоза

- ❖ от **ЗАДАЧА4**- за експресия на про-възпалителни молекулни маркери (адхезивни молекули и цитокини).
- ❖ От изпълнение на **ЗАДАЧА5** ще бъдат получени данни за потенциална крос-сигнализация между рецепторите RAGE, LOX-1 и TLR-4 (посредством транскрипционен фактор NF-каппа B). Те ще помогнат за изясняване на ролята на RAGE в модуляция на: ниво на danger сигнали за активиране на вродена гранулозо-клетъчна имунна функция (RAGE:LOX-1); ниво на активиране на вродена гранулозо-клетъчна имунна функция (RAGE:TLR-4).
- Резултати от изпълнение на настоящия проект могат да бъдат докладвани на научни форуми и публикувани в научни списания с насока молекулярна и клетъчна биология, биохимия, имунология и биология на репродукцията.

ПЛАНИРАНИ КОНСУМАТИВИ

За реализиране на настоящия проект е планирано закупуване на следните консумативи:

- човешка гранулозо-клетъчна линия COV434;
- флуоресцентни индикатори за ROS/RNS H2DCFDA/DAF-FM DA;
- протеин Киназни инхибитори SB203580 и PD 98059;
- поликлонални антитела rabbit anti-human LOX-1 IgG и rabbit anti-human TLR-4 IgG.