



Европейски съюз

ЕВРОПЕЙСКИ СОЦИАЛЕН ФОНД 2007 – 2013
МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА
ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА „РАЗВИТИЕ НА ЧОВЕШКИТЕ РЕСУРСИ“

BG051PO001-3.3.06 -0059



Европейски социален фонд

**ФУНДАМЕНТАЛНО И ПРИЛОЖНО ОБУЧЕНИЕ
НА ДОКТОРАНТИ, ПОСТДОКТОРАНТИ,
СПЕЦИАЛИЗАНТИ И МЛАДИ УЧЕНИ
В ИНТЕРДИСЦИПЛИНАРНИ БИОЛОГИЧНИ НАПРАВЛЕНИЯ
И ИНОВАЦИОННИ БИОТЕХНОЛОГИИ.**

Проектът се осъществява с финансовата подкрепа на Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси“ 2007-2013, съфинансирана от Европейския съюз чрез “Европейския социален фонд“

ПРИЛОЖЕНИЕ № 18

Бенефициент:

Институт по биология и имунология на размножаването "Акад. Кирил Братанов"

Адрес: София 1113, бул. Цариградско шосе, № 73

Телефон: +359 2 971 13 95

Факс: +359 2 872 00 22

Мейл: doktoranti.biotech@gmail.com

Уеб адрес: www.esf.ibir.bas.bg

Партньори:

Софийски Университет „Св. Климент Охридски“, Биологически Факултет,

Химикотехнологичен и металургичен университет, катедра „Биотехнология“

Проген ООД

Индивидуална учебна програма/план за представителите на целевата група¹

Докторант Камелия Винкетова Петкова

Ръководител на дейност – доц. Цветелина Велева-Орешкова

1. Цели на учебната програма/план

Тема: Модулиране на т-клетъчното активиране от децидуални стромални клетки

¹ Учебната програма/план е индикативна и може да бъде променяна според целите на проекта

Въведение. Критичен момент в ранната бременност при човек е имплантирането на семиалогенния бластоцист в маточната лигавица (децидуа). Процесът се свързва с мигриране на трофобластни клетки с фетален произход в децидуата, която от своя страна е инфилтрирана и от имунни клетки с майчин произход. Успешното протичане на имплантацията зависи от: 1. Рецептивността на децидуата, обусловена от хормоналното въздействие и 2. Пренастройване на майчината имунна система и отключване и поддържане на имунологична толерантност.

Имунологичната толерантност по време на бременност се свързва с изменение в съотношението на Т-клетъчните субпопулации, както и с модулиране на Т-клетъчното активиране. Класическото антиген-зависимо активиране на Т-лимфоцити протича след взаимодействие на наивен Т-лимфоцит със зряла антиген представяща клетка (АПК), чиято роля е да представи разпознатия от нея и преработен антиген. В отговор на такъв клетъчен контакт, наивният Т-лимфоцит започва да експресира и секретира цитокина IL-2 и едновременно с това - рецептор за IL-2 (CD25). Автокринният ефект на IL-2 води до клонална пролиферация на Т-лимфоцита, а експресията на CD25 е маркер за активирането му.

Т-лимфоцити и АПК инфилтрират човешката децидуа. Освен това, в нея мигрират трофобласти, които са потенциален алогенен стимул. Класическото взаимодействие на тези три типа клетки би довело до активиране на клетъчен имуноен отговор и отхвърляне на бластоциста чрез отключване на аборт. При физиологично нормална бременност обаче това не се случва. Нашите интереси са насочени към децидуалните стромални клетки (ДСК), които изграждат децидуален матрикс, в който се осъществяват всички клетъчни взаимодействия. ДСК са източник на цитокини, хемокини, растежни фактори и хормони и имат потенциала локално да модулират Т-лимфоцитното активиране, както чрез разтворими фактори, така и чрез директни клетъчни контакти.

Резултати до момента. Разработена е *in vitro* система за изследване на модулиращият ефект на ДСК върху Т-клетъчния отговор. След подписано информирано съгласие от страна на пациентките, ДСК от абортивен материал са изолирани и характеризирани. Беше установено, че тези клетки експресират (мембранно и интрацелуларно) имуноглобулиновата молекула CD83. За нея е известно, че в разтворима форма упражнява инхибиращ ефект върху Т-лимфоцитната активация и пролиферация. В следваща стъпка ДСК бяха ко-култивирани с алогенни Т-лимфоцити, изолирани от периферна кръв на донори. След период на ко-култивиране, активацията и пролиферацията на Т-лимфоцитите бяха изследвани, с цел да се определи влиянието на ДСК върху лимфоцитната функция. Установено беше, че в условия на контактна ко-култура с ДСК, Т-лимфоцитите значително забавят пролиферацията си. Освен това дори пролифериращите Т-лимфоцити не експресират CD25, което показва липса на антиген-специфична активация. Засега механизмът на междуклетъчното взаимодействие, чрез който се постига този ефект остава неизяснен.

Бъдещи експерименти и необходими консумативи. Според възприетата от нас работна хипотеза се установява взаимно модулиращо взаимодействие/въздействие между двата типа клетки - ДСК и Т-лимфоцити при контактено култивиране.

1. Т - лимфоцити – установено бе, че в условия на ко-култивирането им с ДСК, се потиска пролиферацията им, а дори тези, които пролиферират, не експресират CD25. Липсата на рецептор за IL-2 може да означава, че ДСК потискат секрецията на цитокина. За да се потвърди този ефект е необходим IL-2 ELISA Kit.
2. ДСК – установено бе, че ДСК експресират CD83, която молекула (по литературни данни) в разтворима форма инхибира Т-лимфоцитната

пролиферация и активация. Необходимо е да се провери, дали в условия на ко-култура между ДСК и Т-лимфоцити, се индуцира отделянето на секреторен CD83 от ДСК. За тази цел е необходим CD83 ELISA Kit. Освен това е възможно експресията на CD83 в ДСК да се изменя под действието на Т-лимфоцитите. За да се изследва дали Т-лимфоцитите повлияват експресията на гена на CD83 в ДСК е необходимо провеждането на qPCR в реално време. Възможността да се модулира генната и белтъчната експресия на CD83 от ДСК ще бъде изследвана. Ролята на CD83 за инхибирането на Т-лимфоцитната пролиферация ще бъде изследвана посредством инхибиране на CD83 молекулата чрез блокиране на сигналния път NF- κ B. За целта е необходим фармакологичният агент PDTС (Pyrrolidinedithio-carbamate ammonium).

2. Теоретична подготовка

2.1. Тема 1 „Получаване на ембриони за експериментални цели”

Съдържание брой часове/занятия - лекции 5, упражнения 10

2.2. Тема 2 ”Биосензори и имуносензори”

Съдържание брой часове/занятия - лекции 10, упражнения 10

2.3. Тема 3 ”Приложение на имунологията в биотехнологиите”

Съдържание брой часове/занятия - лекции 10, упражнения 10

2.4. Тема 4 ”Обучение за извършване на секвенционен анализ и генотипиране с автоматичен ДНК секвенатор”

Съдържание брой часове/занятия - лекции 10, упражнения 39

2.5. Тема 5 ”Обща и репродуктивна имунология”

Съдържание брой часове/занятия - лекции 10, упражнения 15

2.6. Тема 2 ”Адаптивен имунитет”

Съдържание брой часове/занятия - лекции 6, упражнения 15

2.7. Тема 7 ”Инфекциозен имунитет. Имунни терапии”

Съдържание брой часове/занятия - лекции 10, упражнения 6

2.8. Тема 8 ”Андрология на животните”

Съдържание брой часове/занятия - лекции 10, упражнения 15

2.9. Тема 9 ”Дигитални изображения – получаване, обработка, съхранение”

Съдържание брой часове/занятия - лекции 5, упражнения 10

2.10. Тема 10 ”Невроимунология и имуноендокринология. Междуклетъчни сигнални взаимодействия през ембрионалното и постнаталното развитие”

Съдържание брой часове/занятия - лекции 15

2.11. Тема 11 ”Животински модели в репродуктивната биология и ендокринология”

Съдържание брой часове/занятия - лекции 15

2.12. Тема 12 ”Идентифициране на биомаркери в перитонеална течност чрез DIGE”

Съдържание брой часове/занятия - лекции 6, упражнения 12

2.13. Тема 13 "Туморна имунология"

Съдържание брой часове/занятия - лекции 15

2.14. Тема 14 "Ендокрин-зависими тумори и подходи на алтернативната медицина"

Съдържание брой часове/занятия - лекции 15

2.15. Тема 15 "Синтез на противотуморни препарати"

Съдържание брой часове/занятия - лекции 10, упражнения 10

2.16. Тема 16 "Пролиферация и апоптоза на туморни клетки"

Съдържание брой часове/занятия - лекции 6, упражнения 10

2.17. Тема 17 "Физиологичен контрол върху „Нишите“ със стволови клетки през постнаталното развитие"

Съдържание брой часове/занятия - лекции 16

2.18. Тема 18 "Стволови клетки във възрастния организъм и възможности на тяхното приложение"

Съдържание брой часове/занятия – заедно с 2.16

2.19. Тема 19 "Човешки ембрионални стволови клетки – биология и приложение"

Съдържание брой часове/занятия - лекции 10

2.20. Тема 20 „Изследване на пролиферацията в ин витро клетъчна моделна система"

Съдържание брой часове/занятия – упражнения 10

2.21. Тема 21 "Конфокална характеристика на ин витро култура след флуоресцентно белязване"

Съдържание брой часове/занятия – упражнения 10

2.22. Тема 22 "Мезенхимни стволови клетки"

Съдържание брой часове/занятия - лекции 8, упражнения 10

3. Практическа подготовка/изследвания

3.1. Култивиране на децидуални стромални клетки (първична клетъчна култура)

3.2. Изолиране на мононуклеарни клетки от периферна кръв

3.3. Изолиране на Т-лимфоцити от периферните мононуклеарни клетки чрез MACS

3.4. Кокултивиране на децидуални стромални клетки с алогенни Т-лимфоцити

3.5. Проследяване секрецията на IL-2 и CD83 в културалната среда

3.6. Проследяване транскрипционната активност на CD83-гена

3.7. Блокиране на NF-κB сигналния път с PDTC

4. Очаквани резултати (целите да са съобразени с целите на ОП РЧР)

1. Повишаване теоретичната подготовка и образователно ниво в резултат на посетените лекции и семинари, организирани в рамките на проекта.

2. Повишаване на презентационните умения и уменията за обсъждане и дискутиране на експериментални резултати чрез провеждането на семинари на Целевата група и възможността за представяне на резултатите на специализирани конференции и конгреси.
3. Подобряване уменията за изготвяне на научен проект.
4. Осъществяване на контакт със специалисти от партньорите по проекта и възможни бъдещи колаборативни отношения.

Съгласувал: доц. Цветелина Велева-Орешкова

Изготвил: Камелия Винкетова Петкова