DOI: 10.4274/atfm.02886

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 2019

İnsan THP-1 Leukemia Hücrelerinin Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA) ile Hücresel Farklılaşması

Cellular Differentiation of Human THP-1 Leukemia Cells with Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA)

Derya Biriken

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Öz

Amaç: Bu çalışmada monositlerden makrofaja farklılaşmada Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA)'ın uygulama zamanı ve dozuna yönelik uygun bir model oluşturulması amaçlanmıştır. Bu amaçla insan leukemia monosit hücre hattı (THP-1) farklı doz ve uygulama sürelerinde PMA ile uyarılarak hücrelerin makrofaja farklılaşmaları morfolojik olarak gösterilmiş ve hücre canlılığı üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

Gereç ve Yöntem: Süspanse olarak üreyen THP-1 monosit hücreleri 6 kuyucuklu plaklarda 2x10⁵/ml hücre olacak şekilde, içerisinde 10 ng/ml, 20 ng/ml, 40 ng/ml, 60 ng/ml konsantrasyonlarda PMA bulunan %10 FCS içeren RPMI 1640 ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin farklılaşması, hücre kültürü flasklarına yapışma ve fenotipik değişikliklerin invert doku kültürü mikroskopunda gözlemlenerek doğrulanmıştır. Hücre canlılığı tripan mavisi ile boyanarak belirlenmiştir.

Bulgular: Bulgular ve **Sonuç:** THP-1 hücrelerinde en belirgin fenotipik değişiklikleri ve en iyi hücre canlılığını (92,2%) sağlayan optimum PMA konsantrasyonunu ve inkübasyon süresinin 20 ng/ml PMA ve 48 saat olduğu belirlenmiştir. 40 ng/ml PMA uygulaması 48. saatte 10 ve 20 ng/ml PMA uygulamasına göre hücre sayısında belirgin azalmaya neden olurken 72. saat uygulaması sonrası gruplar arasında fark görülmemiştir. Bu sonuçlar invitro makrofaj modellerinin gerçek fizyolojik şartları tam olarak yansıtmaları için THP-1 monositlerinin makrofaja farklılaşmasının optimize edilmesi gerekliliğini göstermektedir. Bu çalışmada THP-1 hücrelerinde 20 ng/ml PMA ilavesi ve 48 saat inkübasyonda en iyi farklılaşmanın olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Monosit, Makrofaj Farklılaşması, Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)

Abstract

Objectives: In this study, it was aimed to evaluate appropriate model of application time and dosage of PMA to get activated macrophages from monocytic cell line THP-1 cells. The differentiation of THP-1 cells into macrophages when stimulated with different dosage and application time of phorbol myristic acid (PMA) was shown morphologically and the effects on cell viability were evaluated.

Materials and Methods: THP-1 monocytic cells (2x10⁵ cells/ml) were treated with PMA of 10, 20, 40, 60 ng/ml concentrations and incubated for 24 h, 48 h and 72 h to induce differentiation into adherent macrophage-like cells. Differentiation was confirmed by observation of cell adherence and phenotypic changes using phase contrast microscopy. Cell viability was determined by trypan blue staining.

Results: Results and conclusion: The best results were obtained with 20 ng/ml PMA at 48 h incubation and the cell viability was 92.2 % at this concentration. The administration of 40 ng/ml PMA resulted in a significant decrease in cell count compared to 10 and 20 ng/ml PMA administration at the 48h, but no difference was observed between groups after 72 h application. These results indicate that the differentiation of THP-1 monocytes to macrophages requires optimization to ensure that this invitro macrophage model more precisely reflects real physiologic conditions. These findings suggests that THP-1 cells are well differentiated by 20 ng/ml PMA at 48 h incubation.

Key Words: Monocyte, Macrophage differentiation, Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Derya Biriken

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Tel.: +90 532 576 38 38 E-posta: deryabirik@hotmail.com

Geliş Tarihi/Received: 11.03.2019 Kabul Tarihi/Accepted: 11.03.2019

©Telif Hakkı 2019 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.

Yayınlanan tüm içerik CC BY-NC-ND lisansı altındadır.

Giriş

Mikroorganizma vücuda girdiğinde, enfeksiyondan önce var olan ve enfeksiyonun ilk dakikaları içinde etkinleşen doğal savunma mekanizmaları ile karşılaşır (1). Makrofajlar; genellikle doğal immün/inflamatuvar cevabı başlatan ve vücuda giren patojenle ilk temasta bulunan hücre olarak kabul edilmektedir (2-4).

Makrofajların; yüzeylerindeki çok sayıdaki reseptörleri aracılığıyla patojenleri tanınması, patojenleri ortadan kaldırmak için hücre farklılaşmasını ve çoğalmasını düzenlemesi, enfeksiyon bölgesine etkili hücreleri ve enfeksiyon kontrol altındayken anti-inflamatuvar sitokinleri ortama çekmek için çeşitli çözünebilir pro-inflamatuvar kemokinlerin ve sitokinlerin üretilmesi ve salınması, patojenlerin yutulması yada içine alınması ve sindirilmesi yani fagositoz başlıca fonksiyonları arasındadır (2,5).

Makrofajların in vitro olarak fonksiyonlarını, mekanizmaları, sinyal yollarını araştırmak için primer periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) ve farklı derecelerde farklılaşma gösteren monosit hücre kültürleri kullanılmaktadır (6-8). PBMC'lerin invitro gelişmesi ve çoğalması zor olduğu için, özellikle invitro çalışmalarda süresiz çoğalabilme özelliğine sahip transformasyona uğramış primer hücreler olan ve daha stabil fenotipleri bulunan THP-1, U937, ML-2, HL-60 ve Mono Mac 6 gibi monosit hücre hatları yaygın olarak kullanılmaktadır (7,8).

İlk defa akut monositik lösemili bir yaşındaki erkeğin periferik kanından elde edilmiş olan THP-1, monosit/makrofaj farklılaşmasını ve fonksiyonunu incelemek için kullanılan en yaygın hücre hattıdır (6,7). Süspanse olarak üreyen THP-1 hücreleri phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), 1α , 25-dihydroxyvitamin D3 (ν D3) ve macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) ile uyarıldıklarında makrofaj benzeri hücrelere farklılaşır (9,10-12). İn vitro olarak THP-1 monosit hücrelerinden makrofaj hücrelerinin elde edilmesinde kullanılan uyarıların doz ve canlılık optimizasyonunun yapıldığı standart bir protokol bulunmamaktadır. PMA, makrofaj elde etmek için en etkili farklılaşma ajanıdır. Çeşitli çalışmalarda kullanılan PMA konsantrasyonunda, hücrelerin PMA'a maruz kalma süresinde ve başlangıçtaki hücre miktarında farklılıklar olduğu görülmektedir (7,9,13-17).

Bu çalışmada, in vitro sistemlerde araştırma modeli olarak kullanılmak üzere monositik hücre hattından makrofaj hücrelerinin elde edilmesinde PMA'nın uygulama zamanı ve dozuna yönelik uygun bir modelin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

THP-1 Monosit Hücre Kültürü

Bu çalışmada kullanılan THP-1 Avrupa Kültür Koleksiyonu Organizasyonuna bağlı olan Almanya Kültür Koleksiyonundan (DSMZ, ACC-16) sağlandı. Monosit hücreleri %10 FCS içeren RPMI 1640 ile sulandırılarak 800 rpm'de, 4°C'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde 25 cm² yüzeyli hücre kültür şişelerinde üretildi (6,10,12).

Hücreyel Farklılaşma

Bu amaçla süspanse olarak üreyen THP-1 monosit hücreleri 6 kuyucuklu plaklarda 2×10^5 /ml hücre olacak şekilde, içerisinde 10 ng/ml, 20 ng/ml, 40 ng/ml, 60 ng/ml konsantrasyonlarda PMA bulunan %10 FCS içeren RPMI 1640 ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakıldı. PMA ile muameleden sonra içerisindeki besiyerleri döküldü, 3 kez taze besiyeri ile yıkadıktan sonra üzerlerine besiyeri eklendi Farklılaşma, hücrelerde yapışma ve fenotipik değişiklikler invert doku kültürü mikroskopunda gözlemleyerek doğrulandı. Hücre canlılığı tripan mavisini ile boyanarak belirlendi (6,10,12). Bu amaçla hücreler Thoma lamında Hanks'in dengeli tuz çözeltisi (HBSS) içinde hazırlanan %0.4 (w/v) tripan mavisini boyası kullanılarak sayılmıştır. Cansız hücreler mikroskop altında maviye boyanırken canlı hücreler boyanmamış olarak görüntülenmiştir. Canlı hücreler yüzdesi aşağıdaki gibi hesaplanmıştır: Canlı hücre oranı (%) = Boya almamış hücrelerin sayısı/ Toplam hücre sayısı x 100 (18).

Bulgular

PMA ile uyarılmamış THP-1 hücreleri, yuvarlak şekilli ve kültür plaklarının plastik yüzeylerine yapışmadan süspanse şekilde üremiştir (Şekil 1)

Hücreyel Farklılaşma

Monosit hücre kültürü THP-1, PMA ile muamelesinde tüm konsantrasyonlarda farklılaşmış ve hücreler kültür plaklarının

Şekil 1: PMA ile uyarılmamış THP-1 hücreleri

Şekil 2: THP-1 hücrelerinin(x200) 10, 20, 40 ve 60 ng/ml PMA konsantrasyonunda 24. saat inkübasyonu ve kontrol hücrelerinin faz kontrast mikroskop görüntüsü

Şekil 3: THP-1 hücrelerinin(x200) 10, 20, 40 ve 60 ng/ml PMA konsantrasyonunda 48. saat inkübasyonu ve kontrol hücrelerinin faz kontrast mikroskop görüntüsü

Şekil 4: THP-1 hücrelerinin(x200) 10, 20, 40 ve 60 ng/ml PMA konsantrasyonunda 72. saat inkübasyonu ve kontrol hücrelerinin faz kontrast mikroskop görüntüsü

THP-1 hücrelerin 20 ng/ml PMA eklendiğinde ve 48 saat inkübasyondan sonra en belirgin fenotipik değişiklikler (Şekil 5) ve en iyi hücre canlılığı (92,2%) (Şekil 6) elde edilmiştir.

plastik yüzeylerine yapışmıştır (Şekil 2-4). Adhere olmuş hücreler, şekil olarak yassı ve amöboid bir hal almakta ve hücre yüzeyinde bulunan birçok mikrovillus kaybolmaktadır.

Sonuç

Monosit/makrofajların *in vivo* fonksiyonlarını araştırmak için hücre tabanlı *in vitro* deneyler kullanılmaktadır. Bunun için yapılacak ilk adım, primer hücreleri kullanmanın mümkün olmadığı durumlarda biyolojik olarak monosit/makrofajları temsil eden bir hücre hattının seçimidir. Uygun çalışma koşulları gerçek, güvenilir ve tekrarlanılabilen sonuçların oluşması için önemlidir. İnsan leukemia monosit hücre hattı, THP-1, *in vitro* ortamda primer makrofajların bir temsilcisi olarak en çok kullanılan hücredir (7,16,19).

1980'deki orijinal tanımından beri, THP-1 hücreleri, makrofajların aktivasyonunu ve farklılaşmasını, inflamasyondaki yanıtlarını, inflamatuvar hastalıkların mekanizmalarını anlamak için yapılan çok sayıda çalışmada monosit-makrofaj farklılaşması bir model olarak kullanılmıştır (6,8,10,11,20,21).

THP-1 gibi hücre kültürlerinin kullanımı, primer kültürlerle kıyasla çok sayıda avantaja sahiptir. Bunlar arasında homojen genetik zemin oluşturmaları, hücre fenotipindeki değişkenliği en aza indirmesi, gen transfeksiyonu ile genetik modifikasyona izin vermesi sayılabilir. Bununla birlikte, hücre kültürü modelinde olumsuz kültür koşulları, optimum fonksiyon ve sayıda hücre kullanılmaması araştırmanın sonucunu etkilemektedir (16).

Monositlerin makrofajlara farklılaşması, hücrelerin morfolojik değişimlerine göre belirlenir. Çalışmamızda, monosit hücre kültürü THP-1, PMA ile muamelesinde tüm konsantrasyonlarda farklılaşmış ve hücreler kültür plaklarının plastik yüzeylerine yapışmıştır. PMA'nın 20 ng/ml konsantrasyonunda ve 48 saat inkübasyonda en belirgin fenotipik değişiklikleri ve en iyi hücre canlılığını (92,2%) (Şekil 6) uyardığı, dolayısıyla bu koşulların optimum PMA konsantrasyonu ve inkübasyon süresi olduğu saptanmıştır (Şekil 5). PMA'nın 40 ng/ml konsantrasyonunda uygulaması 10 ve 20 ng/ml PMA uygulamasına göre 48. saatte hücre sayısında belirgin azalmaya neden olmuştur. PMA'nın tüm konsantrasyonlarında hücre farklılaşması ve canlılığı açısından 72. saatten sonra gruplar arasında anlamlı fark görülmemiştir.

Şekil 5: THP-1 hücrelerinin(x200) 20 ng/ml PMA konsantrasyonunda 48 saat inkübasyonu ve kontrol hücrelerinin faz kontrast mikroskop görüntüsü

Şekil 6: 10 ng/ml, 20 ng/ml, 40 ng/ml, 60 ng/ml PMA konsantrasyonlarda ve 24, 48 ve 72 saat inkübasyonlarda THP-1 hücre canlılık oranı

Bu optimize ettiğimiz sonuçlara göre uyardığımız makrofajlarla yaptığımız bir çalışmada, epitel hücresi ile temasının olduğu kokültürlerde etkileşimleri araştırılmıştır. Bakterisidal etkinin ve nitrik oksit (NO) yanıtının arttığı, epitel hücresi ile temasın makrofaj yanıtında güçlendirici bir etki yaptığı ve ayrıca bakterisidal etkide makrofaj hücresinin epitel hücresinden daha büyük rol oynadığı sonucuna varılmıştır (22).

Yaptığımız başka bir çalışmada bulunan optimum PMA ile farklılaştırılan hücrelerde bazal midkin, TNF- α ve IL-10 salınımının kontrollere göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Diğer PMA konsantrasyonları ile karşılaştırıldığında, TNF- α ve IL-10 salınımının en yüksek seviyesi 20 ng/ml de 48.saatte gözlenmiş ve bu dozdan sonraki cevaplarda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir (23).

Çalışmamızda farklı doz ve zamanlarda PMA uyarımı sonrası farklılaşma sürecinde başlangıç monosit hücre sayısı eşit olmasına rağmen makrofaj hücre sayısının da belirlenmesinin önemli olabileceği düşünülmüştür. Başlangıçta PMA ile uyarılan THP-1 monositleri makrofajlara farklılaştıktan sonra, in vitro çalışmalarda kullanılmadan önce PMA'ı uzaklaştırmak ve hücrel iyileşmeyi sağlamak için PMA'ın olmadığı bir kültür ortamında bırakılması gerektiği düşünülmektedir.

Bu çalışma sonucunda THP-1 makrofaj fonksiyonunun araştırılmasında tek bir PMA farklılaşma protokolünü önermektedir. Böyle bir standardın benimsenmesi, in vitro deneysel verilerin in vivo olarak uygunluğunu arttıracak ve THP-1 hücrelerinin kullanıldığı in vitro çalışmalar arasındaki tutarlılığı sağlayacaktır.

Kaynaklar

1. Janeway CA, Travers P, Walport M, et al. Immunobiology, The Immune System In Health and Disease. 5th Edition, Elsevier Science Ltd/Gardland; 2001.
2. Gordon S. Mononuclear phagocytes in immune defence. In: Immunology, Seventh Edition, Ed.: Male D, Brostoff J, Roth DB. Roitt, USA: Mosby Elsevier 2006; 181-202.

3. Smythies LE, Sellers M, Clements RH, et al. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. J Clin Invest 2005; 115(1): 66-75.
4. Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM. Innate immunity, In: Roitt's Essential Immunology. 11th ed. Blackwell Publishing, USA 2006; 1-20.
5. Si-Tahar M, Touqui L, Chignard M. Innate immunity and inflammation-two facets of the same anti-infectious reaction. Clin Exp Immunol 2009; 156(2): 194-8.
6. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, et al. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1 cells). Int J Cancer 1980; 26: 171-176.
7. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. Int Immunopharmacol 2014; 23(1): 37-45.
8. Qin Z. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. Atherosclerosis 2012; 221(1): 2-11.
9. Solberg R, Smith R, Almlof M, et al. Legumain expression, activity and secretion are increased during monocyte-to-macrophage differentiation and inhibited by atorvastatin. Biol Chem 2015; 396 (1): 71-80.
10. Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte--macrophage differentiation. Experientia 1991;47: 22-31.
11. Tominaga T, Suzuki M, Saeki H, et al. Establishment of an activated macrophage cell line, A-THP-1, and its properties. Tohoku J Exp Med 1998; 186: 99-119.
12. Schwende H, Fitzke E, Ambs P, et al. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. J Leukoc Biol 1996; 59: 555-61.
13. Bodet C, Chandad F, Greiner D. Modulation of cytokine production by Porphyromonas gingivalis in a macrophage and epithelial cell co-culture model. Microbes Infect 2005; 7: 448-56.
14. Shiratori H, Feinweber C, Luckhardt S, et al. THP-1 and human peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages differ in their capacity to polarize in vitro. Mol Immunol 2017; (88): 58-68.
15. Kohro T, Tanaka T, Murakami T, Wada Y, et al. A Comparison of Differences in the Gene Expression Profiles of Phorbol 12-myristate 13-acetate Differentiated THP-1 Cells and Human Monocyte-derived Macrophage. J Atheroscler Thromb 2004; 11, 88-97.
16. Zhao W, Sun Z, Wang, S, et al. Wnt1 participates in inflammation induced by lipopolysaccharide through upregulating scavenger receptor A and NFkB. Inflammation 2015; 38 (4): 1700-1706.
17. Park EK, Jung HS, Yang HI, et al. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. Inflamm Res 2007; 56: 45-50.
18. Freshney RI. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. 3rd edition; Wiley-Liss, New York., 2000.19. Hjort MR, Brenyo AJ, Finkelstein JN, et al. Alveolar Epithelial Cell-Macrophage Interactions Affect Oxygen-Stimulated Interleukin-8 Release. Inflammation 2003; 27 (3): 137-145
19. Lund ME, To J, O'Brien BA, et al. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. J Immunol Methods 2016; 430: 64-70.
20. Aldo PB, Craveiro V, Guller S. Effect of culture conditions on the phenotype of THP-1 monocyte cell line Am J Reprod Immunol 2013; 70(1): 80-86.
21. Biriken D, Albayrak N, Yıldız S, Özenci H. Caco-2 epitel hücresi ve THP-1 makrofaj hücrelerinin streptococcus pyogenes ve escheria coli'ye karşı bakterisidal etki ve Nitrik oksit yanıtlarının araştırılması. Mikrobiyol Bul 2009; 43: 373-381.
22. Biriken D, Yazıhan N, Yılmaz Ş. Değişik Konsantrasyonlarda ve Sürelerde Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA) ile Uyarılan İnsan THP-1 Lösemi Hücrelerinin Sitokin ve Midkin Yanıtlarının Araştırılması. Mikrobiyol Bul 2018; 52(2): 147-155.