DOI: 10.4274/atfm.galenos.2019.02886

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 2019;72(1):34-38

İnsan Lösemi Monosit Hücrelerinin Forbol-12-Miristat-13-Asetat ile Makrofaj Benzeri Hücrelere Farklılaşması

Differentiation of Human Leukemia Monocyte Cells to Macrophage-Like Cells with Phorbol-12-Myristate-13-Acetate

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)'nın uygulama zamanı ve dozuna yönelik uygun bir model oluşturulması amaçlanmıştır. Bu amaçla insan lösemi 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: THP-1 monosit hücreleri 6 kuyucuklu plaklarda 2×10^5 /mL hücre olacak şekilde süspanse olarak üretilmiştir. Daha sonra üzerlerine %10 FCS içeren RPMI 1640 ile 10, 20, 40 ve 60 ng/mL konsantrasyonlarda sulandırılan PMA ilave edilerek, 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Süspanse THP-1 monosit hücrelerin yapışan makrofaj benzeri hücrelere farklılaşması, doku kültürü mikroskopunda hücre kültürü plaklarına tutunma ve fenotipik değişikliklerin gözlenmesi ile doğrulanmıştır. Canlı hücreler tripan mavisi boyama yöntemi ile belirlenmiştir.

Bulgular ve Sonuç: THP-1 hücreleri için fenotipik değişiklikleri ve hücre canlılığı açısından elde edilen en iyi sonuçlar 20 ng/mL PMA konsantrasyonu ve 48 saat inkübasyon süresi olarak saptanmış, bu konsantrasyon ve inkübasyon süresinde hücre canlılığı %92,2 olduğu bulunmuştur. 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 *in vitro* makrofaj modellerinin gerçek fizyolojik şartları tam olarak yansıtmaması için THP-1 monositlerinin makrofaja farklılaşmasının optimize edilmesi gerekliliğini göstermektedir. Bu çalışmada en iyi hücre farklılaşmasının THP-1 hücrelerine 20 ng/mL PMA eklenmesi ve bu hücrelerin 48 saat inkübasyona bırakılması ile ortaya çıktığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Monosit, Makrofaj Farklılaşması, Forbol-12-Miristat-13-Asetat

Abstract

Objectives: In this study, it was aimed to evaluate appropriate model of application time and dosage of Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (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 cells were produced as suspension as 2×10^5 cells/mL in 6-well plates. Afterwards, THP-1 monocyte cells were treated with PMA of 10, 20, 40, 60 ng/mL concentrations and incubated for 24, 48 and 72 hours. Differentiation of suspended THP-1 cells into adherent macrophage-like cells was confirmed by tissue-culture microscope by observing cell adherence to cell culture flasks and phenotypic changes. Cell viability was determined by trypan blue staining.

Results and Conclusion: The best results for phenotypic changes and cell viability for THP-1 cells were obtained with 20 ng/mL PMA at 48h incubation time and the cell viability was detected as 92.2%. 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 72h application. These findings show that the differentiation of THP-1 monocytes into macrophages needs to be optimized in order to reflect the real physiologic conditions of macrophage models used in *in vitro* studies. These findings suggest that THP-1 cells are well differentiated by 20 ng/mL PMA at 48h incubation.

Key Words: Monocyte, Macrophage Differentiation, Phorbol-12-Myristate-13-Acetate

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Derya Biriken

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

Tel.: +90 532 576 38 58 E-posta: deryabiriken@hotmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0002-6254-4578

Geliş Tarihi/Received: 28.09.2017 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

Konağa mikroorganizma girdiğinde, enfeksiyondan önce var olan ve enfeksiyonun ilk dakikaları içinde etkinleşen doğal savunma mekanizmaları ile karşılaşır (1). Doğal immün/enflamatuvar cevabı başlatan ve vücuda giren patojen ile ilk temasta bulunan hücre makrofajdır (2-4).

Makrofajların; yüzeylerindeki çok sayıdaki reseptörleri aracılığıyla patojenleri tanıması, patojenleri ortadan kaldırmak için hücre farklılaşmasını ve çoğalmasını düzenlemesi, enfeksiyon bölgesine etkili hücreleri ve enfeksiyon kontrol altındayken anti-enflamatuvar sitokinleri ortama çekmek için çeşitli çözünebilir pro-enflamatuvar kemokininlerin ve sitokinlerin üretilmesi ve salınması, patojenlerin yutulması yada içine alınması ve sindirilmesi yani fagositöz 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 *in vitro* gelişmesi ve çoğalması zor olduğu için, özellikle *in vitro* 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 forbol-12-miristat-13-asetat (PMA), 1α , 25-dihidroksivitamin D3 (ν D3) ve makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF) ile uyarıldıklarında makrofaj benzeri hücrelere farklılaşır (9,10-12). *In 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'ya 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

Hücre Kültürü; Bu çalışmada THP-1 (DSMZ, ACC-16) Avrupa Kültür Koleksiyonu Organizasyonu, Almanya Kültür

Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir. 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 kültürü şişelerinde üretildi (6,10,12).

Hücrel Farklılaşma; THP-1 monosit hücreleri adheran olmayan hücre olduğundan 6 kuyucuklu plaklarda 2×10^5 /mL hücre olacak şekilde süspanse olarak üretildi. Daha sonra üzerlerine %10 FCS içeren RPMI 1640 ile içerisinde 10, 20, 40 ve 60 ng/mL konsantrasyonlarda sulandırılan PMA ilave edilerek 24-72 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süreleri sonunda hücreler besiyeri ile yıkanıp, PMA'dan uzaklaştırıldı. Daha sonra hücrelerin üzerine taze besiyerleri eklendi. Süspanse THP-1 monosit hücrelerin yapışan makrofaj benzeri hücrelere farklılaşması, doku kültürü mikroskobunda hücre kültürü plaklarına tutunma ve fenotipik değişikliklerin gözlenmesi ile doğrulandı. Canlı hücreler tripan mavisi boyama yöntemi ile belirlendi (6,10,12). Bu amaçla hücreler Thoma lamında Hanks'in dengeli tuz çözeltisi içinde hazırlanan %0,4 (w/v) tripan mavisi boyası kullanılarak sayılmıştır. Mikroskobik incelemede tripan boyası ile cansız hücreler maviye boyanırken, canlı hücrelerde herhangi bir boyanma saptanmamıştır. Canlı hücrelerin oranı şu şekilde hesaplandı: Boyanmamış hücrelerin sayısı/toplam hücre sayısı x100 (18).

Bulgular

PMA ile muamele edilmemiş THP-1 hücreleri kültür plaklarının yüzeylerine yapışmadan yuvarlak ve süspanse şekilde üremiştir (Şekil 1).

Hücrel Farklılaşma

Süspanse olarak üreyen THP-1 monosit hücreleri, 10-60 ng/mL PMA konsantrasyonlarında ve 24-72 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda yapışan makrofaj benzeri hücrelere diferansiye olmuş ve hücre kültür plaklarının yüzeylerine yapışmıştır (Şekil 2-4). Kültür plaklarına yapışan hücrelerin yüzeyinde bulunan birçok çıkıntı kaybolmuş ve hücreler yassılaşarak ameboid bir özellik göstermişlerdir. THP-1 hücreleri

Şekil 1: THP-1 hücreleri (forbol-12-miristat-13-asetat ile uyarılmamış)

Şekil 2: THP-1 hücrelerinin (x200) 10-60 ng/mL forbol-12-miristat-13-asetat konsantrasyonunda 24. saat inkübasyonu ve kontrol hücrelerinin faz kontrast mikroskop görüntüsü

Şekil 3: THP-1 hücrelerinin (x200) 10-60 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 forbol-12-miristat-13-asetat konsantrasyonunda 72. saat inkübasyonu ve kontrol hücrelerinin faz kontrast mikroskop görüntüsü

için fenotipik değişiklikler ve hücre canlılığı açısından elde edilen en iyi sonuçlar 20 ng/mL PMA konsantrasyonu ve 48 saat inkübasyon süresi olarak saptanmış (Şekil 5), bu konsantrasyon ve inkübasyon süresinde hücre canlılığı (%92,2) (Şekil 6) olarak bulunmuştur.

Tartışma

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, enflamasyondaki yanıtlarını, enflamatuvar 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, THP-1 monosit hücre kültürünün PMA ile uyarılmasında, kullanılan tüm konsantrasyonlarda hücreler diferansiye olmuş ve kültür plaklarının yüzeylerine yapışmışlardır. Hücreler fenotipik değişiklikler ve hücre canlılığı açısından değerlendirildiğinde, en optimal PMA konsantrasyonunun 20 ng/mL ve inkübasyon süresinin 48 saat olduğu saptanmıştır (Şekil 5). 20 ng/mL PMA konsantrasyonunda ve 48 saatlik inkübasyon süresinde hücre canlılığı en yüksek oran olan %92,2'ye ulaşmıştır (Şekil 6). PMA'nın 40 ng/mL konsantrasyonda 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 forbol-12-miristat-13-asetat konsantrasyonunda 48 saat inkübasyonu ve kontrol hücrelerinin faz kontrast mikroskop görüntüsü

Şekil 6: 10-60 ng/mL forbol-12-miristat-13-asetat konsantrasyonları ve 24-72 saatlik inkübasyonlarda THP-1 hücre canlılık oranları

Bu optimize ettiğimiz sonuçlara göre uyardığımız makrofajlarla yaptığımız bir çalışmada, epitel hücresi ile temasının olduğu kokültürlerde etkileşimleri araştırılmıştır. Bakterisidal etkinin, epitel ve makrofaj hücrelerinin birlikte olduğu kültürlerde hücrelerin tek başına olduğu kültürlerle göre arttığı ve *in vitro* enflamatuvar yanıtın hücre-hücre teması ile yükseldiği sonucuna varılmıştır (22).

Yaptığımız başka bir çalışmada bulunan optimum PMA ile farklılaştırılan hücrelerde bazal midkin, tümör nekroz faktör-alfa (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'yı uzaklaştırmak ve hücrel iyileşmeyi sağlamak için PMA'nın olmadığı bir kültür ortamında bırakılması gerektiği düşünülmektedir.

Sonuç

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.

Etik

Etik Kurul Onayı: Hücre kültürü kullanıldığından etik kurul onayı alınmamıştır.

Hasta Onayı: Hasta onayı alınmamıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Finansal Destek: Yazar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

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;115:66-75.
4. Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, et al. 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;156:194-198.
6. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, et al. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). 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;23:37-45.
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;221:2-11.
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: 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;59:555-561.
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;7:448-456.
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, 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 NF- κ B. Inflammation. 2015;38:1700-1706.
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;27:137-145.

20. 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.
21. Aldo PB, Craveiro V, Guller S, et al. Effect of culture conditions on the phenotype of THP-1 monocyte cell line. *Am J Reprod Immunol*. 2013;70:80-86.
22. Salin DB, Albayrak N, Yıldız S, et al. [Investigation of bactericidal effect and nitric oxide responses of Caco-2 epithelial cells and THP-1 macrophage cells against *Streptococcus pyogenes* and *Escherichia coli*]. *Mikrobiyol Bul*. 2009;43:373-381.
23. Biriken D, Yazıhan N, Yılmaz Ş. [Investigation of cytokine and midkine responses of human THP-1 leukemia cells induced by phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA) at different concentrations and times]. *Mikrobiyol Bul*. 2018;52:147-155.