

## Monitoraggio del cambiamento metabolico delle cellule immunitarie durante la differenziazione

### Introduzione

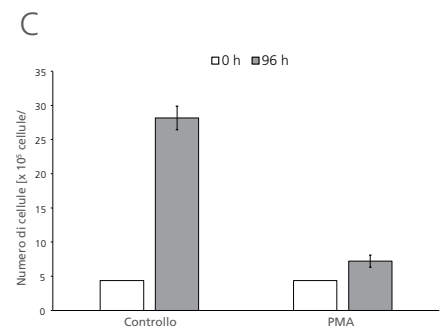
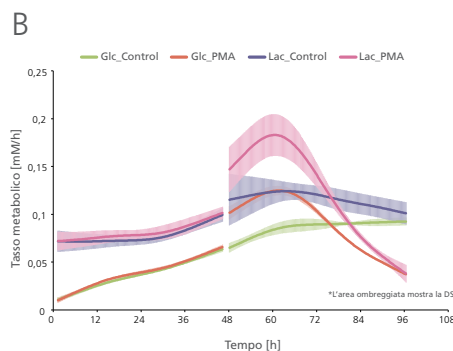
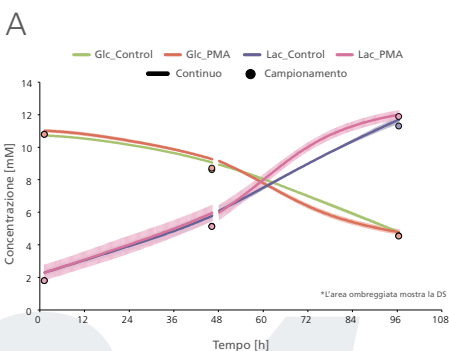
I monociti e i macrofagi svolgono un ruolo essenziale nel sistema immunitario naturale dell'organismo. I monociti sono prodotti nel midollo osseo e si spostano nel sangue, differenziandosi in macrofagi e infiltrandosi nei tessuti. I macrofagi attivati diventano dipendenti dalla via glicolitica per la produzione di energia, anche in presenza di ossigeno; questo profilo metabolico, chiamato effetto Warburg, è una caratteristica ben nota delle cellule tumorali.<sup>1</sup> L'effetto Warburg è stato ampiamente studiato nelle cellule immunitarie, ma è stato riportato che serve a scopi diversi nelle cellule tumorali e nelle cellule immunitarie. Nelle cellule tumorali, l'effetto Warburg favorisce la sopravvivenza e la proliferazione, mentre nelle cellule immunitarie è un segno di invecchiamento e morte cellulare.<sup>2-4</sup> Nei monociti e in altre cellule immunitarie in cui si può osservare l'effetto Warburg, il profilo metabolico differisce per ogni stato di attività immunitaria. Ad esempio, i monociti e i macrofagi M2 mostrano un aumento dell'ossidazione degli acidi grassi e della fosforilazione ossidativa, mentre i macrofagi M0 e M1 mostrano un aumento della glicolisi. Inoltre, è noto che il microambiente e il profilo metabolico dei macrofagi M0 sono coinvolti nel controllo della polarizzazione dei macrofagi M1 e M2.<sup>5</sup> Ciò significa che l'indagine del profilo metabolico delle cellule immunitarie può consentire di fare inferenze sul loro stato di differenziazione.<sup>6,7</sup> In questo studio, è stato effettuato un monitoraggio cronologico dei cambiamenti metabolici nelle cellule THP-1, una linea di cellule di monociti, quando si sono differenziate in macrofagi M0 in seguito all'esposizione al PMA.

### Materiali e metodi

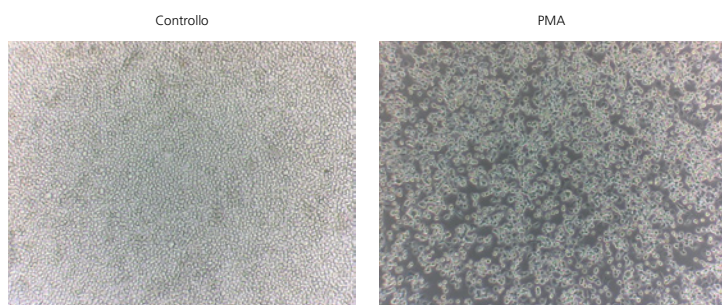
Sono state usate cellule THP-1 (JCRB0112.1, ottenute dalla Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank: JCRB), una linea di cellule per la leucemia monocitica acuta. La coltura è stata effettuata in terreno RPMI 1640 con aggiunta di FBS al 10% per 96 h, durante le quali le concentrazioni di glucosio e lattato nel terreno di coltura sono state misurate continuamente con un analizzatore metabolico per cellule vive. La misurazione continua è iniziata subito dopo la semina delle cellule e il PMA (Phorbol 12-miristato 13-acetato) è stato aggiunto a una concentrazione finale di 10 ng/mL (0,001% DMSO) 48 h dopo la semina. Nel gruppo di controllo è stato aggiunto il solo veicolo (0,001% DMSO). Il terreno di coltura è stato raccolto per misurare le concentrazioni di glucosio e lattato al momento dell'aggiunta del reagente e al termine della coltura. Inoltre, la morfologia cellulare è stata esaminata con un microscopio a contrasto di fase e il livello di espressione di CD11b sulla superficie cellulare è stato misurato con la citometria a flusso.

### Risultati

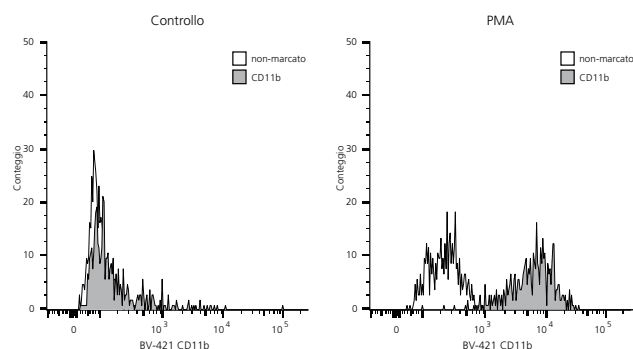
In primo luogo, l'accuratezza dei valori misurati dall'analizzatore metabolico per cellule vive è stata verificata confrontando i valori dell'analizzatore per le concentrazioni di glucosio e lattato nel terreno di coltura al momento dell'aggiunta del reagente e al termine della coltura con i valori del metodo colorimetrico. La deviazione massima è stata del 14% e si è quindi concluso che i valori misurati dall'analizzatore metabolico per cellule vive erano sufficientemente accurati (Fig. A). In seguito, il tasso di consumo di glucosio e il tasso di produzione di lattato sono stati calcolati in base alle variazioni continue delle concentrazioni di glucosio e lattato (Fig. B). Il confronto di questi valori ha mostrato che il tasso di consumo di glucosio e il tasso di produzione di lattato sono aumentati immediatamente dopo l'aggiunta di PMA. Il numero di cellule alla fine della coltura era più alto nel gruppo di controllo, suggerendo che il consumo di glucosio e la produzione di lattato per cellula sono aumentati in seguito all'aggiunta di PMA (Fig. C). Inoltre, le immagini al microscopio hanno confermato che i monociti, che sono cellule non aderenti, si sono trasformati in cellule aderenti in seguito all'aggiunta di PMA (Fig. D). Il livello di espressione di CD11b, un marcatore dei macrofagi, sulla superficie delle cellule è stato misurato mediante citometria a flusso e i risultati hanno mostrato che il livello di espressione di CD11b è aumentato in seguito all'aggiunta di PMA (Fig. E). Questi risultati confermano che i monociti si sono differenziati in macrofagi grazie all'aggiunta di PMA.



D



E



## Discussione

Confrontando i tassi metabolici analizzati da un analizzatore metabolico per cellule vive e il numero di cellule, è stato possibile dimostrare che i monociti, che presentano un'aumentata ossidazione degli acidi grassi e fosforilazione ossidativa, mostrano una via glicolitica potenziata durante la differenziazione in macrofagi. Tuttavia, a 60 h di coltura, 12 h dopo l'aggiunta di PMA, il tasso metabolico dei macrofagi ha iniziato a diminuire. La soppressione della glicolisi e la riduzione della funzione delle cellule immunitarie si verificano in risposta alla concentrazione di lattato nell'ambiente cellulare e questo è uno dei motivi della mancanza di risposta immunitaria nel microambiente tumorale.<sup>8</sup> Inoltre, è stato riferito che i macrofagi M1 coltivati in un terreno con 5-20 mM di lattato tendono a ridurre l'assorbimento del glucosio.<sup>2</sup> Nel presente esperimento, la concentrazione di lattato aveva raggiunto circa 8 mM nel momento in cui il tasso metabolico ha iniziato a diminuire, suggerendo che la soppressione della glicolisi dovuta all'aumento della concentrazione di lattato nel terreno si è riflessa nella riduzione del tasso metabolico.

## Conclusione

Utilizzando un analizzatore metabolico per cellule vive, è stata eseguita la misurazione cronologica del cambiamento metabolico durante il processo di differenziazione dei monociti in macrofagi. Il profilo metabolico delle cellule immunitarie è legato intimamente al loro stato di differenziazione e l'osservazione del profilo metabolico delle cellule immunitarie in diversi stati di differenziazione, come nel presente esperimento, contribuirà alla valutazione della differenziazione delle cellule immunitarie. L'analizzatore metabolico per cellule vive misura le concentrazioni di glucosio e lattato mentre le cellule sono in coltura, consentendo così di osservare cronologicamente il cambiamento metabolico durante il processo di differenziazione cellulare. L'uso di questa tecnica in studi in cui le cellule immunitarie vengono fatte differenziare in un'ampia varietà di fenotipi può portare a nuove intuizioni nella ricerca metabolica.

## Riferimento

1. Warburg O. On the origin of cancer. *Science*. 1956;123(3191):309-314.
2. Dietl K, Renner K, Dettmer K, et al. Lactic Acid and Acidification Inhibit TNF Secretion and Glycolysis of Human Monocytes. *J Immunol*. 2010;184(3):1200-1209.
3. Kempner W. THE NATURE OF LEUKEMIC BLOOD CELLS AS DETERMINED BY THEIR METABOLISM. *J Clin Invest*. 1939;18 (3):291-300.
4. Nagy C, Haschemi A. Time and demand are two critical dimensions of immunometabolism: The process of macrophage activation and the pentose phosphate pathway. *Front Immunol*. 2015;6(164):1-8.
5. Cao J, Zeng F, Liao S, Cao L, Zhou Y. Effects of glycolysis on the polarization and function of tumor-associated macrophages (Review). *Int J Oncol*. 2023;62(70):1-12.
6. Abuawad A, Mbadugha C, Ghaemmaghami AM, Kim DH. Metabolic characterisation of THP-1 macrophage polarisation using LC-MS-based metabolite profiling. *Metabolomics*. 2020;16(33):1-14.
7. Palmer CS, Cherry CL, Sada-Ovalle I, Singh A, Crowe SM. Glucose Metabolism in T Cells and Monocytes: New Perspectives in HIV Pathogenesis. *EBioMedicine*. 2016;6:31-41.
8. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*. 2007;109(9): 3812-3819.

\*I dati sono il risultato della verifica di PHC e non costituiscono una garanzia dei dati del cliente.