

Monitorowanie zmian metabolicznych w komórkach odpornościowych podczas różnicowania

Wstęp

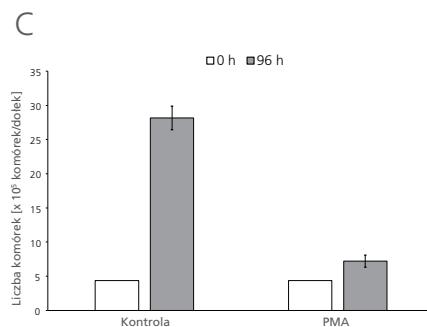
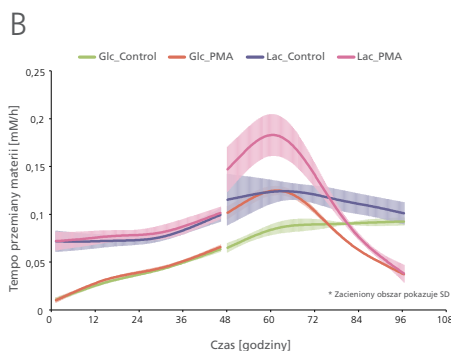
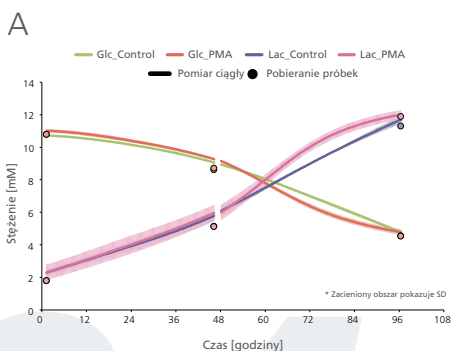
Monocyty i makrofagi odgrywają istotną rolę w naturalnym układzie odpornościowym organizmu. Monocyty są wytwarzane w szpiku kostnym i przemieszczają się po organizmie we krwi, różnicując się w makrofagi i infiltrując tkanki. Aktywowane makrofagi stają się zależne od szlaku glikolitycznego do produkcji energii nawet w obecności tlenu; ten profil metaboliczny, zwany efektem Warburga, jest dobrze znaną cechą komórek nowotworowych¹. Efekt Warburga był szeroko badany w komórkach odpornościowych, jednak donoszono, że służy on różnym celom w komórkach nowotworowych i komórkach odpornościowych. W komórkach nowotworowych efekt Warburga służy przetrwaniu i proliferacji, podczas gdy w komórkach odpornościowych jest oznaką starzenia się i śmierci komórek^{2,4}. W monocytach i innych komórkach odpornościowych, w przypadku których można zaobserwować efekt Warburga, profil metaboliczny różni się dla każdego stanu aktywności immunologicznej. Na przykład monocyty i makrofagi M2 wykazują zwiększone utlenianie kwasów tłuszczowych i fosforylację oksydacyjną, podczas gdy makrofagi M0 i M1 wykazują zwiększoną glikolizę. Ponadto wiadomo, że mikrośrodowisko i profil metaboliczny makrofagów M0 są zaangażowane w kontrolowanie polaryzacji makrofagów M1 i M2⁵. Oznacza to, że badanie profilu metabolicznego komórek odpornościowych może pozwolić na wyciągnięcie wniosków na temat ich stanu różnicowania^{6,7}. W tym badaniu przeprowadzono chronologiczne monitorowanie zmian metabolicznych w komórkach THP-1, linii komórkowej monocytów, gdy różnicowały się one w makrofagi M0 w wyniku ekspozycji na PMA.

Materiały i metody

Zostały użyte komórki THP-1 (JCRB0112.1, uzyskane z banku komórek Japanese Collection of Research Bioresources: JCRB), linii komórkowej ostrej białaczki monocytowej. Hodowlę prowadzono w pożywce RPMI 1640 z dodatkiem 10% FBS przez 96 godzin, podczas których stężenia glukozy i mleczanu w pożywce hodowlanej były stale mierzone przy użyciu analizatora metabolizmu żywych komórek. Ciągłe pomiary rozpoczęto natychmiast po wysianiu komórek, a PMA (forbol 12-mirystynian 13-octanu) dodano do końcowego stężenia 10 ng/ml (0,001% DMSO) 48 godzin po wysianiu. W grupie kontrolnej dodano sam nośnik (0,001% DMSO). Pożywkę hodowlaną zebrano w celu pomiaru stężenia glukozy i mleczanu po dodaniu odczynnika i pod koniec hodowli. Ponadto za pomocą mikroskopu z kontrastem fazowym zbadano morfologię komórek, a za pomocą cytometrii przepływowej zmierzono poziom ekspresji CD11b na powierzchni komórek.

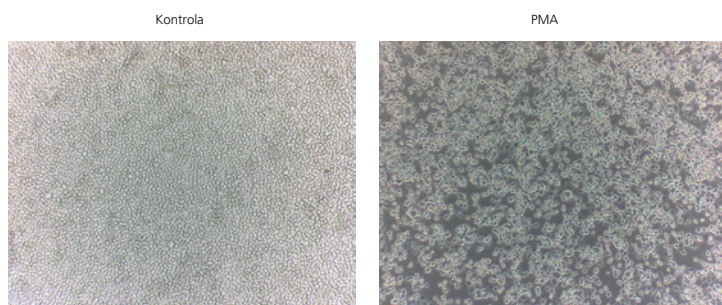
Wyniki

Po pierwsze, sprawdzono dokładność zmierzonych wartości z analizatora metabolizmu żywych komórek poprzez porównanie wartości analizatora dla stężeń glukozy i mleczanu w pożywce hodowlanej w momencie dodania odczynnika i pod koniec hodowli z wartościami z metody kolorymetrycznej. Maksymalne odchylenie wyniosło 14% i stwierdzono, że zmierzone wartości z analizatora metabolizmu żywych komórek były wystarczająco dokładne (ryc. A). Następnie obliczono szybkość zużycia glukozy i szybkość produkcji mleczanu na podstawie ciągłych zmian stężeń glukozy i mleczanu (ryc. B). Porównanie tych wartości wykazało, że szybkość zużycia glukozy i szybkość produkcji mleczanu wzrosły natychmiast po dodaniu PMA. Liczba komórek pod koniec hodowli była wyższa w grupie kontrolnej, co sugeruje, że zużycie glukozy na komórkę i produkcja mleczanu wzrosły w wyniku dodania PMA (ryc. C). Ponadto obrazy mikroskopowe potwierdziły, że w wyniku dodania PMA monocyty, które są komórkami nieprzylegającymi, zmieniły się w komórki przylegające (ryc. D). Poziom ekspresji CD11b, markera makrofagów, na powierzchni komórek mierzono za pomocą cytometrii przepływowej, a wyniki wykazały, że poziom ekspresji CD11b wzrósł wskutek dodania PMA (ryc. E). Wyniki te potwierdzają, że monocyty różnicowały się w makrofagi dzięki dodaniu PMA.

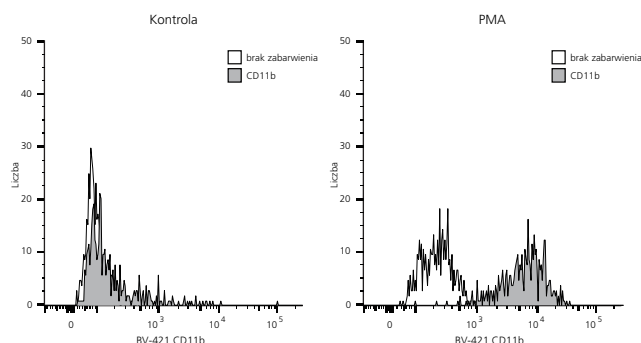


04

D



E



Dyskusja

Porównując tempo metabolizmu analizowane przez analizator metaboliczny żywych komórek z liczbą komórek, można było wykazać, że monocyty, które mają zwiększone utlenianie kwasów tłuszczowych i fosforylację oksydacyjną, wykazują wzmocniony szlak glikolityczny podczas różnicowania się w makrofagi. Jednak po 60 godzinach hodowli, 12 godzin po dodaniu PMA, tempo metabolizmu makrofagów zaczęło spadać. Tłumienie glikolizy i zmniejszenie funkcji komórek odpornościowych występuje w odpowiedzi na stężenie mleczanu w środowisku komórkowym, co według doniesień jest jedną z przyczyn braku odpowiedzi immunologicznej w mikrośrodkowisku guza⁸. Ponadto makrofagi M1 hodowane w pożywce z 5–20 mM mleczanu mają tendencję do zmniejszonego wychwytu glukozy². W obecnym eksperymencie stężenie mleczanu osiągnęło około 8 mM w punkcie, w którym tempo metabolizmu zaczęło spadać, co sugeruje, że tłumienie glikolizy z powodu zwiększonego stężenia mleczanu w pożywce znalazło odzwierciedlenie w zmniejszeniu tempa metabolizmu.

Wniosek

Przy użyciu analizatora metabolizmu żywych komórek przeprowadzono chronologiczny pomiar zmian metabolicznych podczas procesu różnicowania monocytów w makrofagi. Profil metaboliczny komórek odpornościowych jest ściśle związany z ich stanem różnicowania, a obserwacja profilu metabolicznego komórek odpornościowych w różnych stanach różnicowania, jak w niniejszym eksperymencie, przyczyni się do oceny różnicowania komórek odpornościowych. Analizator metabolizmu żywych komórek mierzy stężenie glukozy i mleczanu podczas hodowli komórek, umożliwiając chronologiczną obserwację zmian metabolicznych podczas procesu różnicowania komórek. Oczekuje się, że wykorzystanie tej techniki w badaniach, w których komórki odpornościowe są różnicowane do szerokiej gamy fenotypów, przyniesie nowe spostrzeżenia w badaniach metabolicznych.

Informacje dodatkowe

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.

* Dane są wynikiem weryfikacji przez PHC i nie stanowią gwarancji danych klienta.