



FIȘĂ METODĂ

Procedeu experimental îmbunătățit: Obținerea unei linii de macrofage aderente, în vederea evaluării activității fagocitice a nanoparticulelor

Denumire metodă: Procedeu experimental îmbunătățit de obținere a unei linii de macrofage aderente, în vederea evaluării activității fagocitice a nanoparticulelor.

Scurtă descriere: *Procedeu se bazează pe efectul cunoscut al forbol 12-miristat 13-acetatului (PMA) de a induce un fenotip aderat, macrofagic, liniilor monocitare sau tumorale leucocitare în suspensie. Cele mai frecvente rapoarte din literatură folosesc o linie derivată de la un pacient cu leucemie monocitară acută, numită THP-1, dar protocoalele oferite variază de la un manuscris la altul în termeni de concentrația PMA folosită (exprimată fie în nM, fie în ng/mL) și durata tratamentului (Daigneault et al., 2010; Genin et al. 2015; Bosshart and Heinzelmann, 2016; Starr et al. 2018). În plus, există date conform cărora aceste variații de protocol induc variații de răspuns celular la același stimul (Lund et al., 2016).*

*Deoarece celulele maligne hematologice sunt conțin frecvent mutații fenotipic exprimate, cu impact asupra comportamentului celular, pentru prezentul protocol s-a decis folosirea unei **linii umane normale**, de celule monocitare circulante din sângele periferic.*

Procedeu presupune incubarea celulelor monocitare umane normale cu PMA în concentrație de 12.5 ng/mL, timp de minim 48 ore, recomandat 72 de h. După tratament, mediul cu PMA este eliminat și celulele pot fi incubate, fără timp de repaus, cu nanoparticule. Fenotipul aderent se poate obține și în 48h cu 25 ng/mL.

Utilitate: studiu în diverse tipuri de microscopie (contrast de fază, fluorescență, timp real) a fagocitozei de nanoparticule sau alt material particulat. Deoarece celulele sunt aderente, pot fi fixate și folosite mai departe pentru alte investigații – de exemplu expresia anumitor proteine prin imunofluorescență.

Echipamente/Materiale/Consumabile principale utilizate:

- Linie celulară: CRL-9855 (ATCC)';
- Reactivi: Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), suplimentat cu 10% ser fetal bovin, 0.05 mM 2-mercaptoetanol, 0.1 mM hypoxantină și 0.016 mM timidină; Forbol 12-miristat 13-acetat (PMA);
- Flakuri de culturi celulare T25, tuburi de centrifugă sterile de 15 și 50 ml, pipetoare automate, pipete și vârfuri de pipete pentru toate intervalele de volum, plăci de 12 și 24 de godeuri, sterile, cu capac.

Etape:

1. PMA este resuspendat în DMSO la o concentrație de 1 mg/mL și alicotat în alicoturi de 100 uL, stocate la -20°C;
2. 1 alicot va fi adus la o concentrație de 100μg/ml tot cu DMSO și alicotat mai departe în alicoturi de 10 μl, stocate la -20°C;
3. Un alicot se dezgheață o singură dată și nu se refoleşte;



4. PMA se va aduce la concentrația de 12.5/25 ng/mL cu mediu de cultură complet, suplimentat ca mai sus și se va adăuga peste celule, în volumul cerut de recipientul în care sunt cultivate celulele;
5. Celulele vor fi incubate timp de 48h în mediu cu PMA 25 ng/mL sau 72h cu PMA 12.5 ng/mL, în incubator, în condiții obișnuite de cultură (37°C, 5% CO₂), apoi mediul va fi înlocuit cu mediu fără PMA și pot fi incluse direct în experiment.

Pentru verificare, celulele pot fi inspectate la un microscop cu contrast de fază pentru culturi celulare.

Acest procedeu va fi preluat și folosit în continuare de către partenerul P1 IVB pentru implementarea proiectului PED-382, care va fi derulat în perioada 01.11.2020 - 31.10.2022.

Bibliografie:

Herbert Bosshart and Michael Heinzlmann, THP-1 cells as a model for human monocytes Ann Transl Med. 2016 Nov; 4(21): 438. doi: 10.21037/atm.2016.08.53

Marc Daigneault , Julie A Preston, Helen M Marriott, Moira K B Whyte, David H Dockrell. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages PLoS One. 2010 Jan 13;5(1):e8668. doi: 10.1371/journal.pone.0008668.

Marie Genin, Francois Clement, Antoine Fattaccioli, Martine Raes, and Carine Michiels M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide BMC Cancer. 2015; 15: 577. doi: 10.1186/s12885-015-1546-9

Maria E.Lund, Joyce ToBronwyn, A.O'Brien, Sheila Donnelly. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. Journal of Immunological Methods Volume 430, March 2016, Pages 64-70

Tregei Starr, Timothy J Bauler, Preeti Malik-Kale, Olivia Steele-Mortimer The phorbol 12-myristate-13-acetate differentiation protocol is critical to the interaction of THP-1 macrophages with Salmonella Typhimurium PLoS One. 2018 Mar 14;13(3):e0193601. doi: 10.1371/journal.pone.0193601. eCollection 2018.