

## ЭЛЕКТРОПОРАЦИЯ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ДНК-ПЛАЗМИДОЙ, КОДИРУЮЩЕЙ ИЛ-10

© 2019 г. В. П. Терещенко<sup>1\*</sup>, Ю. Н. Хантакова<sup>1</sup>, В. В. Курилин<sup>1</sup>,  
А. Н. Силков<sup>1</sup>, Р. А. Максютков<sup>2</sup>

\*E-mail: [tervp@ngs.ru](mailto:tervp@ngs.ru)

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной  
и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

<sup>2</sup>ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 28.03.2019

На данный момент дендритные клетки (ДК) широко используют для получения вакцин для лечения различных видов заболеваний, таких как злокачественные новообразования, аутоиммунные расстройства, реакция отторжения и РТПХ. Для управления функциональными свойствами ДК их трансфицируют различными иммунорегуляторными белками, в т.ч. ИЛ-10. В данной работе выполнена оптимизация метода электрической трансфекции (электропорации) ДК ДНК-плазмидой, кодирующей ИЛ-10. Эффективность электропорации (ЭП) ДК достигает 45–72% при клеточной смерти ниже 7%. Показана активная экспрессия ИЛ-10 трансфицированными ДК в течение 3 суток после ЭП. По результатам работы ЭП признана эффективным методом для получения трансфицированных ДК для производства клеточных вакцин.

**Ключевые слова:** дендритные клетки, электропорация, ИЛ-10

DOI: 10.31857/S102872210006533-1

Адрес: 630099 Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14. ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Терещенко Валерий Павлович. Тел.: +7 953 906 63 55.

E-mail: [tervp@ngs.ru](mailto:tervp@ngs.ru)

Авторы:

**Терещенко В. П.**, аспирант лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ, Новосибирск Россия;

**Хантакова Ю. Н.**, к.м.н., н.с. лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ, Новосибирск Россия;

**Курилин В. В.**, к.м.н., н.с. лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ, Новосибирск Россия;

**Силков А. Н.**, д.б.н., с.н.с. лаборатории молекулярной иммунологии, вр.и.о. директора НИИФКИ, Новосибирск Россия;

**Максютков Р. А.**, к.б.н., с.н.с. ГНЦ ВБ «ВЕКТОР», Кольцово, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Дендритные клетки (ДК) обладают способностью к индукции толерантности и подавлению иммунных реакций [1]. Одним из механизмов, который используют ДК для поддержания толерогенного состояния, является продукция ИЛ-10 [2]. ДК, обработанные ИЛ-10, приобретают толерогенный фенотип, индуцируют Трег

и подавляют воспалительные реакции. Кроме того, ИЛ-10 снижает продукцию провоспалительных цитокинов Т-клетками, моноцитами и макрофагами [3] и способствует развитию анергии эффекторных Т-клеток [4]. Таким образом, активная секреция ИЛ-10 дендритными клетками способствует индукции толерантного состояния клеток иммунной системы на антигены и может быть использована для получения дендритно-клеточных вакцин, предназначенных для подавления иммунного ответа, например, при лечении аутоиммунных заболеваний, а также при коррекции реакции отторжения или реакции трансплантат против хозяина (РТПХ).

Для нагрузки ДК различными иммунорегуляторными белками, в т.ч. ИЛ-10, используют методы вирусной, химической, магнитной и электрической трансфекции. Однако, использование первых трех методов предполагает использование искусственных или вирусных частиц, которые требуют дополнительных исследований их безопасности [5]. В связи с этим, использование электрической трансфекции (электропорации), основанной на подаче вы-

соковольтного разряда в суспензию клеток, представляется наиболее перспективным и безопасным подходом для трансфекции экспрессирующих векторов.

**Целью** данной работы была оптимизация протокола электропорации (ЭП) ДК ДНК-плазмидой, кодирующей ИЛ-10, для их последующего применения в качестве дендритноклеточных вакцин.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали самок мышей линии C57Bl/6, в возрасте от 2 до 6 месяцев. Дендритные клетки получали из клеток костного мозга мышей линии C57Bl/6 в присутствии 20 нг/мл GM-CSF и 20 нг/мл IL-4.

В работе использовались ДНК-плазмиды, кодирующие белок GFP и мышинный ИЛ-10.

Для проведения ЭП к 100 мкл клеток, в концентрации 10–20 млн/мл, добавляли ДНК-плазмиду, и помещали в кювету для ЭП. ЭП клеток осуществлялась на электропораторе ВТХ 830 square-wave в 2 мм кюветах (ВТХ).

Оценка эффективности ЭП проводилась по определению GFP-позитивных клеток на проточном цитофлуориметре BDFacsVersa. Жизнеспособность культуры оценивалась по включению пропидия йодида (PI) в трансфицированные клетки. Для оценки фенотипических показателей культура ДК окрашивалась моноклональными антителами: CD11c-FITC, H2b-PE, CD86-APC-Cy7, CD80-Brilliant Violet 421. Также производили внутриклеточное окрашивание ИЛ-10.

Оценку содержания ИЛ-10 в кондиционных средах культур проводили методом иммуноферментного анализа.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Оптимизация условий электропорации дендритных клеток*

Была проведена оценка эффективности ЭП на разных сроках культивирования ДК (0, 3 и 6 сутки). Иммунофенотипирование показало увеличение количества CD11c<sup>+</sup>H2b<sup>+</sup> дендритных клеток с низким уровнем экспрессии костимуляторных молекул (CD80, CD86) в течение 6 суток. В день 0 клетки костного мозга, несмотря на самую низкую гибель после ЭП (3,29%), менее всего подвергаются процедуре трансфекции в сравнении с ДК на 3 и 6 день культивирования (клеток позитивных по GFP – 12,99% против 32,17% и 27,62%, соответственно). Кроме того,

к 6 суткам достоверно увеличивается гибель клеток после проведенной ЭП (10,95%) в сравнении с ДК на 3 сутки (5,005%).

Для определения оптимальной концентрации клеток для ЭП, было проведено сравнение эффективности трансфекции и жизнеспособности 6-суточных ДК. Результаты не выявили зависимости эффективности трансфекции и клеточной гибели от концентрации клеток.

Так же было протестировано несколько вариантов сред для использования после процедуры электропорации. Показано, что изолированное добавление цитокинов (ГМ-КСФ и ИЛ-4) или ЛПС к свежей среде для культивирования после электропорации не влияет на относительное количество клеток и эффективность электропорации. При использовании кондиционной среды совместно с цитокинами наблюдается увеличение количества целевых клеток на 25% (с 35% до 44%), по сравнению с другими вариантами культивирования. При всех исследованных вариантах культивирования, наблюдаемая гибель клеток после электропорации была в пределах 7% и значимо не различалась между группами.

### *Экспрессия ИЛ-10 трансфицированными клетками*

Анализ внутриклеточного содержания ИЛ-10 показал, что спустя 3 часа после ЭП ДК ДНК-плазмидой, кодирующей ИЛ-10, наблюдается двукратное увеличение количества IL-10-продуцирующих CD11c<sup>+</sup> ДК по сравнению с контрольной группой (36,6% против 19,6%). Спустя 24 часа после электропорации, сохраняется разница между трансфицированными и контрольными группами по количеству ИЛ-10-продуцирующих CD11c<sup>+</sup> клеток (9,4% против 2,3%).

Методом ИФА показана дозозависимая продукция ИЛ-10 в культуральную среду. Так, по сравнению с ДК без ЭП, которые продуцируют IL-10 в очень низких концентрациях (4 пг/мл), даже минимальное количество плазмидной ДНК (1 мкг/мл) способствует увеличению продукции IL-10 в 220 раз (до 896 пг/мл), а использование больших концентраций плазмиды приводит к гиперпродукции ИЛ-10 до 45 нг/мл. В течение 3 дней после ЭП концентрация ИЛ-10 оставалась неизменной.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данное исследование выполнялось с целью оптимизации условий трансфекции клеток моноцитарного происхождения плазмидными

конструкциями для модуляции собственной биологической активности. Установлено, что электropорация является эффективным способом трансфекции ИЛ-10 в ДК и может быть использована для дальнейшего получения дендритно-клеточных вакцин.

Работа выполнена в рамках проекта РНФ 16-15-00086.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Legge K. L., Gregg R. K., Maldonado-Lopez R., Li L., Caprio J. C., Moser M., Moser M., Zaghouni H. (2002) On the role of dendritic cells in peripheral T cell tolerance and modulation of autoimmunity. *J Exp Med* 196: 217–227.
2. Akbari O., DeKruyff R. H. & Umetsu D. T. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. (2001) *Nature Immunol* 2: 725–731.
3. Fiorentino D. F., Zlotnik A., Mosmann T. R., Howard M. & O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol.* 147, 3815–3822 (1991).
4. Roncarolo M.G., and Battaglia, M. (2007). Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 585–598.
5. Yin H., Kanasty R. L., Eltoukhy A. A., Vegas A. J., Dorkin J. R., Anderson D. G. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet.* 2014 Aug;15(8):541–55.

### DENDRITIC CELLS ELECTROPORATION WITH DNA-PLASMID ENCODING IL-10

© 2019 V. P. Tereshchenko<sup>1\*</sup>, J. N. Khantakova<sup>1,2</sup>, V. V. Kurilin<sup>1</sup>, A. N. Silkov<sup>1</sup>, R. A. Maksyutov<sup>3</sup>

\*E-mail: [tervp@ngs.ru](mailto:tervp@ngs.ru)

<sup>1</sup>FSBSI Research institute of fundamental and clinical immunology, Novosibirsk, Russia;

<sup>2</sup>SRC of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia

Received: 15.03.2019. Accepted: 28.03.2019

Dendritic cells (DC) are widely used to produce vaccines for the treatment of various types of diseases, such as malignant neoplasms, autoimmune disorders, rejection and GVHD. To control the functional properties of DCs, they are transfected with various immunoregulatory proteins, including IL-10. In this paper, the optimization of the method of electrical transfection (electroporation) of DCs with a DNA plasmid encoding IL-10 was performed. The efficiency of DC electroporation (EP) reaches 45–72% with cell death below 7%. The active expression of IL-10 in transfected DC was shown within 3 days after EP. According to the results of the work, EP was recognized as an effective method for obtaining transfected DCs for the production of cellular vaccines.

*Key words:* dendritic cells, electroporation, IL-10

#### Authors:

**Tereshchenko V. P.**, ✉ Ph.D student in laboratory of molecular immunology RIFCI, Novosibirsk, Russia. **E-mail:** [tervp@ngs.ru](mailto:tervp@ngs.ru);

**Khantakova J. N.**, Ph.D, researcher in laboratory of molecular immunology RIFCI, Novosibirsk, Russia;

**Kurilin V. V.**, Ph.D, researcher in laboratory of molecular immunology RIFCI, Novosibirsk, Russia;

**Silkov A. N.**, Ph.D, researcher in laboratory of molecular immunology, head of RIFCI, Novosibirsk, Russia;

**Maksyutov R. A.**, Ph.D, researcher in State Research Center of Virology and Biotechnology, Koltsovo, Russia.