



Metodický postup přípravy myších dendritických vakcín z kostní dřeně

Mgr. Barbora Vavrušáková

Mgr. Kamila Součková, Ph.D.

Mgr. Lukáš Moráň, Ph.D.

Brno 2024

Tato metodika byla vypracována v rámci řešení projektu AZV ČR NU21-03-00539
„Vliv stresu endoplazmatického retikula na imunitní stav nádorů a účinnost
imunoterapie při léčbě ovariálního a renálního karcinomu“.

1. Jména oponentů

- a) Jméno a příjmení: doc. RNDr. Sabina Ševčíková, PhD
Pracoviště: Ústav patologické fyziologie, LF MUNI
Adresa pracoviště: Kamenice 5, 625 00 Brno
- b) Jméno a příjmení: doc. Mgr. Jiří Šána, PhD
Pracoviště: Fakultní nemocnice Brno
Adresa pracoviště: Jihlavská 20, 625 00 Brno

2. Úvod

Imunoterapie v posledních letech představuje čím dál atraktivnější přístup v léčbě nádorových onemocnění a vedle chirurgie, chemoterapie, radioterapie a cílené léčby se stává jedním z pilířů onkologické terapie. Vedle tzv. checkpoint inhibitorů a CAR-T terapie jsou dendritické vakcíny další slibnou léčebnou modalitou, která by mohla přispět k uzdravení pacientů s onkologickým onemocněním. Současný výzkum poskytuje řadu důkazů o tom, že podávání autologních vakcín na bázi dendritických buněk může zásadním způsobem posílit imunitní reakci vůči přítomné malignitě. Nicméně vývoj takových metod je v současné době stále velmi nákladný a její zavedení mimo klinické studie fáze I/II zatím nepřichází v úvahu. K zajištění minimalizace nákladů a snížení rizika neúspěchu při vývoji inovativních metod je na místě obrátit pozornost k preklinickým modelům. Příprava myších dendritických vakcín a jejich následné použití ke studiu efektivity výše zmíněné imunoterapie na myších modelech představuje ve srovnání s klinickými studiemi rychlý, levný a efektivní způsob, jak vyvinout co nejlepší léčebný přístup, ze kterého by v budoucnu mohli onkologičtí pacienti profitovat.

3. Vlastní popis metodiky

3.1. Princip metodiky

Myším je z dlouhých kostí izolována kostní dřeň, která je následně přenesena do *in vitro* kultury. Buňky kostní dřeně jsou v kultuře stimulovány růstovými faktory a maturovány tak, aby se vyvinuly ve zralé dendritické buňky, které mohou být následně myším aplikovány coby imunoterapie v podobě dendritických vakcín.

3.2. Bezpečnostní rizika a doporučení

Při laboratorních pracích musí být učiněna opatření odpovídající riziku používaného biologického i chemického materiálu.

- Kultivace buněk ID8-VEGF (GMO Kategorie A: *Organismy, u kterých není pravděpodobné, že by způsobovaly lidská nebo zvířecí onemocnění nebo představovaly riziko pro životní prostředí*) je prováděna za standardních aseptických podmínek v laboratoři BSL1 (*Biosafety Level 1*).
- Pracovníkům je doporučeno použití osobních ochranných prostředků (laboratorní pláště, rukavice, brýle, ochranné štíty, přezůvky) a přístup k prostředkům pro poskytnutí první pomoci (dezinfekční prostředky na bázi ajatinu, jodová tinktura, antihistaminikum, náplast, běžný obvazový materiál). Laboratoř by měla být vybavena omyvatelnými pracovními stoly, přívodem vody a digestoří nebo bezpečnostním

boxem Biohazard. Doporučena je zde práce v souladu s podmínkami správné laboratorní praxe.

- Dodržování pracovních postupů, postup sanitace prostoru a zařízení po ukončení pracovní činnosti, postup dekontaminace nástrojů, osobních a ochranných prostředků a oděvů při ukončení pracovní činnosti se řídí podle charakteru činnosti. Ochranné oděvy, kontaminované geneticky modifikovanými mikroorganismy, se budou prát jako infekční materiál. Samostatný sběr a oddělená, izolovaná přeprava do specializované firmy, která praní infekčního prádla odborně provádí.
- Myši jsou chovány v laboratorních prostorách k tomu určených za dvojitou fyzickou bariérou.
- Nakládání s živými laboratorními zvířaty je možné pouze na základě osvědčení o odborné způsobilosti dle §15d odstavce 3 zákona 246/92 Sb. (verze 26), Zákon České národní rady na ochranu zvířat proti týrání (navrhování pokusů a projektů pokusů, provádění pokusů na pokusných zvířatech, péče o pokusná zvířata a jejich usmrcování).

3.3. Materiál

3.3.1. Vybavení

- Vybavení zvířetníku pro chov myší – chovné nádoby, pítka, spotřební materiál – stelivo, krmivo
- Preparační podložky
- Sterilní ocelové nástroje (chirurgické nůžky, pinzety)
- Sterilní jednorázové skalpely
- Kuličkový sterilizátor pro nástroje (Steri-Lite)
- Stolní centrifuga
- Bürkerova komůrka nebo automatický počítací buněk (Automated Cell Counter BioRad TC20)
- pH metr
- Hlubokomrazicí zařízení
- Průtokový cytometr (BDFACS Aria)

3.3.2. Spotřební materiál

- Zkumavky Eppendorf, objem 0,5 ml
- Zkumavky Eppendorf, objem 1,5 ml
- Buněčný filtr Corning® cell strainer 70 µm
- Zamrazovací kryo-zkumavky Cryovial (PP, 1,8ml, Internal cap, Sterile)
- Sterilní jednorázové stříkačky 20 ml
- Injekční jehly 0,9 Omnican 50, U-100 Insulin 0.5 ml
- Membránový filtr 0,22 µm (MF-Millipore™ Membrane Filter)
- Filtr pro kultivační média (Filter top 250 ml)
- Kultivační Petriho miska ø 10 cm (TPP cell culture dish)
- Kultivační Petriho miska ø 6 cm (TPP cell culture dish)
- Pipetovací špičky 10 ul

- Pipetovací špička 250 ul
- Serologická pipeta 5ml
- Serologická pipeta 10ml
- Centrifugační zkumavky kónické, objem 15 ml
- Zkumavka pro průtokovou cytometrii - 5 ml
- Búkerova komůrka nebo komůrky pro automatický počítací buněk (Cell Counting Slides for TC10™/TC20™ Cell Counter, #1450011)

3.3.3. Chemikálie

- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)
- RBC lyzační pufr (Fixative-Free Lysing Solution, High-Yield Lyse)
- Kultivační médium RPMI (1640 w/ stable Glutamine – Biosera)
- Kultivační médium DMEM High Glucose (w/ L-Glutamine w/ Sodium Pyruvate – Biosera)
- Fetální bovinní sérum (FBS)
- Bovinní sérový albumin (BSA)
- Insulin-Transferrin-Selenium (ITS-G) (100×)
- Penicillin-Streptomycin roztok 100× (Biosera)
- L-Glutamin roztok 100× (200mM – Biosera)
- 2-Mercaptoethanol
- GM-CSF, rekombinantní protein, myší – 20 ng/ml
- IL-4 rekombinantní protein, myší – 500 ng/ml
- Interferon-γ, rekombinantní protein, myší (INF) – 100 ng/ml
- Trypsin EDTA 1× v PBS (w/o Calcium w/o Magnesium w/o Phenol Red – Biosera)
- Dimethylsulfoxid (DMSO)
- Lipopolysaccharidy z *Escherichia coli* (O111:B4 (LPS) – 250 ng/ml)
- Myší monoklonální protilátka Anti-CD11c (KB90)
- Sekundární protilátka konjugovaná s fluorochromem - Goat anti-Mouse (IgG [H+L]) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 555)
- Fosfátový pufr (PBS)
- Ethanol 70 %
- Propidium jodid

3.3.4. Biologický materiál

- Samice myšího kmene C57BL/6 (stáří 8-12 týdnů)
- Buňky myšího ovariálního karcinomu linie ID8 izolované z myšího kmene C57/BL6 geneticky upravené ke zvýšené produkci vaskulárního endoteliálního faktoru (VEGF). Buněčná linie (pracovně nazvaná ID8-VEGF) byla poskytnuta darem laboratoří nádorové imunologie Dr. Denarda Dangaj v Ludwig Institute for Cancer Research, Lausanne.

3.4. Metody

3.4.1. Příprava kultivačních médií pro nádorové a dendritické buňky

Kultivační médium DMEM High Glucose pro kultivaci buněk myšího ovarialního karcinomu linie ID8-VEGF je obohaceno o 4 % FBS, 1 % ITS a 1 % Penicilin/Streptomycin. Takto připravené médium je přefiltrováno přes filtr s velikostí pórů 0,22 μm .

Kultivační médium RPMI 1640 pro kultivaci buněk izolovaných z kostní dřeně myšího kmene C57/B16 je obohaceno o 10 % FBS, 1 % L-glutamin, 1,5 % Penicilin/Streptomycin a 50 μM 2-mercaptoethanol. Takto připravené médium je přefiltrováno přes filtr s velikostí pórů 0,22 μm .

3.4.2. Vlastní kultivace

3.4.2.1. Kultivace buněk ID8-VEGF

Buňky myšího ovarialního karcinomu linie ID8-VEGF jsou kultivovány na Petriho miskách $\varnothing$ 10 cm v DMEM High Glucose médiu s 4 % FBS, 1 % ITS a 1,5 % Penicilin/Streptomycin při 37 °C v atmosféře s 5 % CO_2 .

3.4.2.2. Kultivace buněk myší kostní dřeně

Buňky myší kostní dřeně jsou kultivovány na Petriho miskách $\varnothing$ 6 cm v RPMI 1640 médiu s 10 % FBS, 1 % L-glutamin, 1 % Penicilin/Streptomycin a 50 μM 2-Mercaptoethanol. Do kultivační misky s buňkami bylo následně přidáno myší GM-CSF v koncentraci 20 ng/ml. Buňky byly kultivovány při 37 °C v atmosféře s 5 % CO_2 .

3.4.3. Výměna kultivačního média a pasážování buněčné kultury

Buňkám myšího ovarialního karcinomu ID8-VEGF je každý druhý den prováděna výměna média. Z Petriho misky $\varnothing$ 10 cm je odsáto kultivační médium, buňky jsou opláchnuty 5 ml PBS, to je následně odsáto. Na Petriho misku $\varnothing$ 10 cm s buňkami ID8-VEGF je následně sterilní sérologickou pipetou přidáno 10 ml kultivačního média DMEM High Glucose s 4 % FBS, 1 % ITS a 1,5 % Penicilin/Streptomycin. Při 80 % konfluenci buněk je prováděna enzymatická pasáž buněk ID8-VEGF. Z Petriho misek je odsáto kultivační médium, buňky jsou opláchnuty 5 ml PBS a disociovány z kultivačního plastiku inkubací v 5 ml Trypsin EDTA 1X in PBS při 37 °C po dobu 5 minut.

3.4.4. Příprava lyzátů nádorových buněk

Buňky ID8-VEGF jsou při 70 % konfluenci vystaveny teplotnímu šoku, kdy jsou zahřáty na 42 °C po dobu 25 minut. Následně jsou navraceny zpět do kultury při 37 °C v atmosféře s 5 % CO_2 po dobu 24 hodin. Následně je z misek odsáto kultivační médium, buňky jsou opláchnuty přídatkem 5 ml PBS a disociovány z kultivačního plastiku inkubací v 5 ml Trypsin EDTA (1X v PBS) při 37 °C po dobu 5 minut. Disociované buňky jsou následně z plastiku odmyty přídatkem PBS a přeneseny do sterilní centrifugační zkumavky. Takto získané buňky ID8-VEGF jsou spočítány na automatickém počítací buněk Automated Cell Counter BioRad TC20. Buňky jsou centrifugovány při 1000 rpm, 5 minut, 24 °C a resuspendovány v DMEM médiu na výslednou koncentraci 5×10^6 buněk /ml. Buněčná suspenze je rozaliquotována do

kryozkumavek Cryovial, PP, 1.8ml. Takto připravené alikvoty jsou následně zmrazeny na -80 °C. Buněčné lyzáty jsou připraveny 6 cykly rozmražení buněk na 37 °C a následným zmražením zpět na -80 °C. Lyzáty jsou sonikovány (3 cykly, 5 W, 15 sekund) a centrifugovány při 1700 g, 4 °C, 5 minut, supernatant je následně použit k maturaci připravovaných dendritických vakcín.

3.4.5. Izolace buněk myší kostní dřeně

Samice myšího kmene C57BL/6 jsou usmrceny cervikální dislokací. Následně jsou sterilními chirurgickými nástroji vypreparovány stehenní, lýtkové a pánevní kosti. Intaktní kosti zbavené svaloviny jsou sterilizovány 70 % ethanolem a ihned osušeny buničinou. Sterilním skalpelem je odříznuta jedna z epifýz a kosti jsou vloženy odříznutou částí směrem dolů do 0,5 ml Eppendorf zkumavek (ve spodní části zkumavek byl sterilní jehlou vytvořen otvor). Takto upravené zkumavky s vloženými kostmi jsou umístěny do 1,5 ml zkumavek s obsahem 100 µL 0,2 M EDTA v PBS (pH 7,4) a krátce stočeny ve stolní centrifuze. Izolovaná buněčná suspenze v 0,2 M EDTA je ihned po stočení homogenizována energickým pipetováním s následným zředěním 1 ml 0,2 M EDTA v PBS (pH 7,4). S takto připravenou buněčnou suspenzí je dále pracováno na ledu.

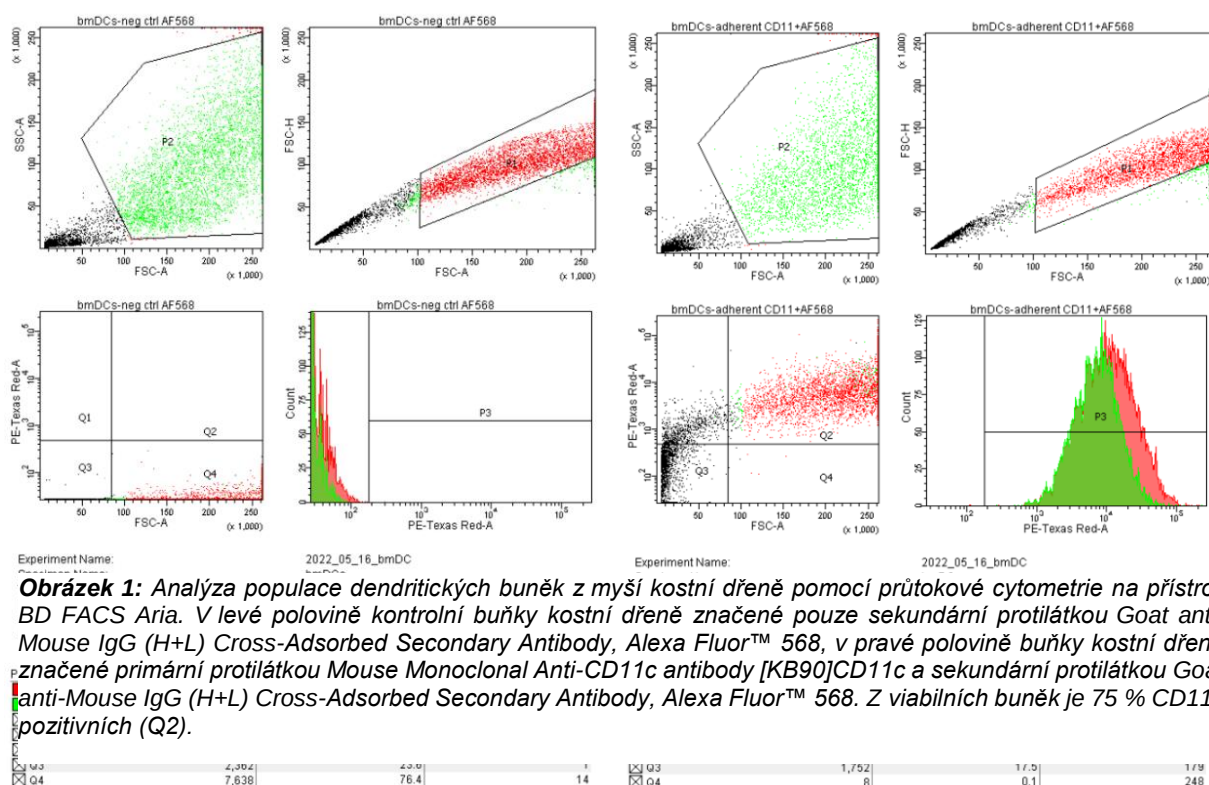
3.4.6. Přenos buněk myší kostní dřeně do *in vitro* kultury

Buněčná suspenze v 0,2 M EDTA v PBS je filtrována přes 70 µm buněčný filtr Corning® cell strainer do 15 ml centrifugačních zkumavek. Buňky jsou centrifugovány při 300 g, 24 °C, 10 minut a následně resuspendovány v 1 ml RBC lyzačního pufru Fixative-Free Lysing Solution, High-Yield Lyse. Lýzy červených krvinek je dosaženo inkubací v lyzačním pufru při 37 °C po dobu 2 minut. Buňky jsou centrifugovány při 300 g, 24 °C, 10 minut, následně resuspendovány v kultivačním médiu RPMI 1640 s 10 % FBS, 1 % L-glutamin, 1 % Penicilin/Streptomycin, 50 µM 2-mercaptoethanol a GM-CSF 20 ng/ml a přeneseny na Petriho misku ø 6 cm. Koncentrace buněk v médiu dosahuje 1×10^6 buněk /ml. Takto získané buňky jsou dále diferencovány a maturovány a je stanovena čistota buněčné populace.

3.4.7. Stanovení čistoty populace dendritických buněk metodou průtokové cytometrie

Ke stanovení čistoty populace dendritických buněk je prováděna analýza exprese markeru CD11c pomocí průtokového cytometru BD FACS Aria. Z Petriho misky ø 6 cm je odebráno médium se suspenzními buňkami do 15 ml centrifugační zkumavky. Adherované buňky jsou omyty 1 ml PBS a následně disociovány z misky inkubací s 2 ml Trypsinu EDTA 1× PBS při 37 °C po dobu 15 minut. Disociované buňky jsou následně přidány k dříve odebrané buněčné suspenzi v 15 ml centrifugační zkumavce a společně centrifugovány při 1700 rpm, 24 °C, 10 minut. Pelet buněk je resuspendován v 1 % BSA v PBS, buňky jsou spočítány na automatickém počítací buňek Automated Cell Counter BioRad TC20 a rozděleny po 1×10^6 buněk do 3 eppendorf zkumavek o objemu 1,5 ml: a) neznačené buňky, b) buňky značené propidium jodidem, c) buňky značené sekundární protilátkou Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 568, d) buňky značené primární protilátkou Mouse Monoclonal Anti-CD11c antibody [KB90]CD11c a sekundární protilátkou Alexa Fluor 568, e) buňky značené primární protilátkou Mouse Monoclonal Anti-CD11c antibody [KB90]CD11c a sekundární protilátkou Alexa Fluor 568 a propidium jodidem. Buňky jsou stočeny při 800 g, 4 °C, 5 minut. Po odstranění supernatantu jsou buněčné pelety

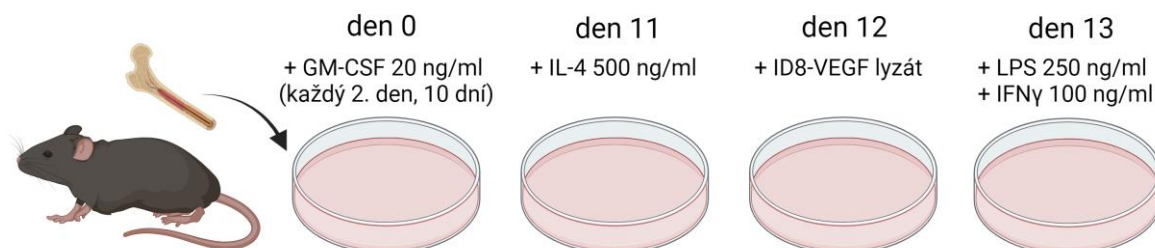
resuspendovány v 30 μ L 1 % BSA/PBS, do zkumavek d) a e) je přidána primární protilátka Mouse Monoclonal Anti-CD11c antibody [KB90]CD11c dle ředění doporučeného výrobcem. Zkumavky jsou umístěny na led a inkubovány s primární protilátkou 30 minut. Po inkubaci jsou buňky následně stočeny při 800 g, 4 °C, 5 minut a 3x opláchnuty 200 μ L 1 % BSA/PBS. Následně jsou buňky resuspendovány v 30 μ L 1 % BSA/PBS a do zkumavek c), d) a e) je přidána sekundární protilátka Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 568 dle ředění doporučeného výrobcem. Buňky jsou inkubovány se sekundární protilátkou v temnu na ledu po dobu 30 minut. Po inkubaci jsou buňky stočeny a pelety resuspendovány v 300 μ L 1 % BSA/PBS. Před samotnou analýzou je do zkumavek b) a e) přidán propidium jodid v koncentraci 0,5 μ g/ml v PBS.



3.4.8. Diferenciace a maturace dendritických buněk

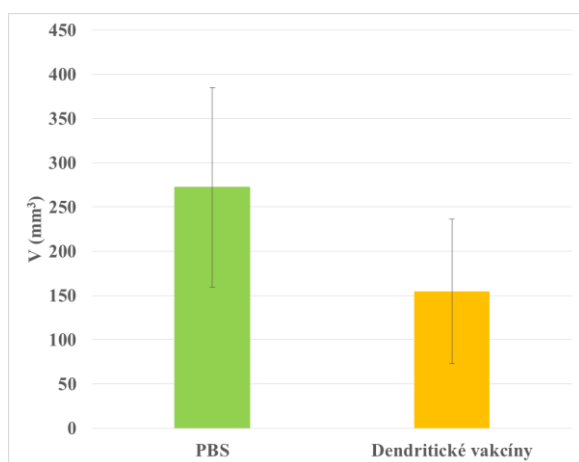
Každé 3 dny je buňkám kostní dřeně vyměněna 1/2 objemu média s přidavkem GM-CSF o výsledné koncentraci 20 ng/ml. Buňky jsou v tomto režimu ponechány v kultuře 10 dní. Jedenáctý den kultivace je buňkám do kultivačního média přidán Interleukin 4 (Mouse IL-4 Recombinant Protein) v koncentraci 500 ng/ml. Dvanáctý den kultivace je buňkám do média přidán supernatant z lyzovaných buněk ID8-VEGF v poměru 1:1 (na daný počet buněk kostní dřeně aplikovat supernatant z lyzátu o stejném množství ID8-VEGF). Buňky jsou s lyzáty ID8-VEGF kultivovány 20 až 24 hodin. Třináctý den kultivace je buňkám vyměněno médium. Suspenzní buňky jsou resuspendovány v čerstvém médiu a vráceny do Petriho misky s přidavkem Lipopolysaccharidu z *E. coli* O111:B4 (LPS) o koncentraci 250 ng/ml a myším rekombinantním Interferonem- γ (INF) o koncentraci 100 ng/ml na dalších 24 hodin. Následně jsou takto připravené dendritické buňky disociovány z kultivačím plastiku inkubací v 5 ml Trypsin EDTA 1X in PBS při 37 °C po dobu 15 minut. Získané buňky jsou spočítány na automatickém počítací buňek Automated Cell Counter BioRad TC20. Buňky jsou

centrifugovány při 1000 rpm, 5 minut, 24 °C a resuspendovány v DMSO s 10 % FBS na výslednou koncentraci 30×10^6 buněk /ml. Suspenze dendritických buněk je alikvotována do zamrazovacích zkumavek Cryovial, PP, 1.8ml. Takto připravené alikvoty dendritických buněk jsou následně zmrazeny na -80 °C, kde jsou uchovány do dalšího použití. Buněčné vakcíny nesmí být před podáním myším opakovaně rozmrazeny a zamrazeny. Pro aplikaci jsou vakcíny jednorázově rozmrazeny, 3x promyty v PBS a naředěny na požadovanou koncentraci. Pro aplikaci je použito 1×10^6 buněk / myš / dávka ve fixním objemu 100 μ l.

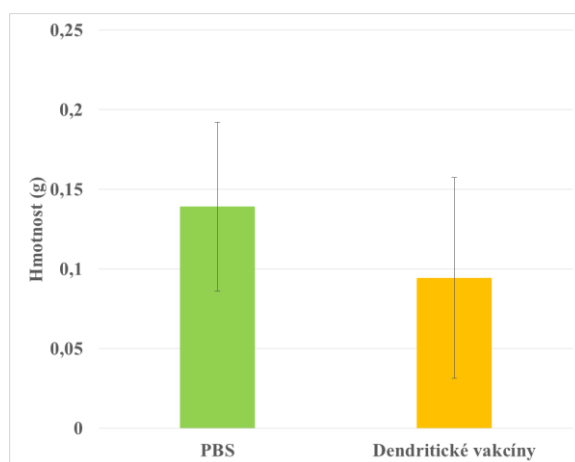


Obrázek 2: Schéma izolace buněk kostní dřeně, transport do kultury a in vitro maturace dendritických buněk stimulací GM-CSF, IL-4, lyzáty nádorových buněk (v poměru 1:1 s dendritickými buňkami), LPS a IFN γ .

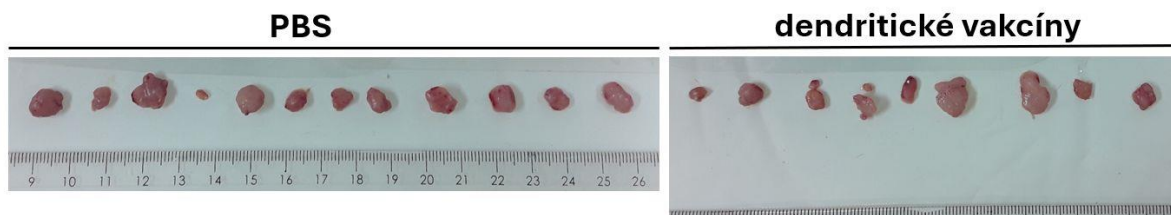
3.5. Přílohy



Obrázek 3: Graf znázorňující naměřený objem tumorů (průměr $\pm$ SD) u myší, kterým bylo podáváno PBS (vlevo, 12 myší) a myší, kterým byly podávány dendritické vakcíny (vpravo, 9 myší). PBS i DC vakcíny byly myším podávány intraperitoneálně 15., 19. a 22. den pokusu. Pokus byl ukončen 26. den, myši byly usmrceny, tumory vypreparovány a změřeny.



Obrázek 4: Graf znázorňující váhu tumorů (průměr $\pm$ SD) u myší, kterým bylo podáváno PBS (vlevo, 12 myší) a myší, kterým byly podávány dendritické vakcíny (vpravo, 9 myší). PBS i DC vakcíny byly myším podávány intraperitoneálně 15., 19. a 22. den pokusu. Pokus byl ukončen 26. den, myši byly usmrceny, tumory vypreparovány a zváženy.



Obrázek 5: Tumorigenicita buněk ID8-VEGF u myší C57BL/6 byla významně snížena ve skupině jedinců léčených třemi dávkami dendritické vakcíny (1 mil buněk na dávku, dávky byly podány intraperitoneálně ve dnech 15, 19 a 22). Nádory byly 26 dní po indukci (subkutánní injekce 5 mil buněk ID8-VEGF ve 100 ul PBS) vypitvány z podkoží a vyfoceny.

4. Využití a novost postupu

Myší syngenní dendritické vakcíny naleznou své využití při studiu imunitní odpovědi na nádorová onemocnění a při vývoji efektivnějších imunoterapeutických přístupů v léčbě nádorových onemocnění. Standardizovaný ucelený postup pro výše zmíněné účely, aplikovatelný napříč laboratořemi, doposud nebyl stanoven. Za tímto účelem byla vytvořena následující metodika.

5. Popis uplatnění metodiky

Myší syngenní dendritické vakcíny nacházejí své uplatnění nejen při studiu imunitní odpovědi na nádorová onemocnění, ale také při vývoji nových, efektivnějších imunoterapeutických přístupů v léčbě těchto onemocnění. Metodika umožňuje standardizovat experimentální postupy, což je zásadní pro přesné vyhodnocení imunologických reakcí a jejich potenciální přenos do klinické praxe. Přínos této metodiky spočívá jak v podpoře výzkumné a vývojové činnosti, kde pomáhá sjednotit a zpřesnit postupy, tak v dlouhodobé perspektivě pro pacienty, neboť může vést k novým poznatkům a pokroku v oblasti imunoterapie, který se přímo promítne do zlepšení terapeutických výsledků.

6. Literatura

- Madaan, Alka & Verma, Ritu & Singh, Anu & Jain, Sk & Jaggi, Manu (2014). A stepwise procedure for isolation of murine bone marrow and generation of dendritic cells. Journal of Biological Methods. 1. 10.14440/jbm.2014.12.
- Chiang CL, Kandalaft LE, Tanyi J, et al. A dendritic cell vaccine pulsed with autologous hypochlorous acid-oxidized ovarian cancer lysate primes effective broad antitumor immunity: from bench to bedside. Clin Cancer Res. 2013;19(17):4801-4815. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1185
- Hatfield P, Merrick AE, West E, et al. Optimization of dendritic cell loading with tumor cell lysates for cancer immunotherapy. J Immunother. 2008;31(7):620-632. doi:10.1097/CJI.0b013e31818213df
- Dohnal AM, Graffi S, Witt V, Eichstill C, Wagner D, Ul-Haq S, Wimmer D, Felzmann T. Comparative evaluation of techniques for the manufacturing of dendritic cell-based cancer

- vaccines. J Cell Mol Med. 2009 Jan;13(1):125-35. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00304.x. Epub 2008 Mar 17. PMID: 18363835; PMCID: PMC3823041.
- Iyer S, Zhang S, Yucel S, et al. Genetically Defined Syngeneic Mouse Models of Ovarian Cancer as Tools for the Discovery of Combination Immunotherapy. Cancer Discov. 2021;11(2):384-407. doi:10.1158/2159-8290.CD-20-0818
 - Janát-Amsbury MM, Yockman JW, Anderson ML, Kieback DG, Kim SW. Comparison of ID8 MOSE and VEGF-modified ID8 cell lines in an immunocompetent animal model for human ovarian cancer. Anticancer Res. 2006;26(4B):2785-2789.
 - Informace k IFN-gamma dostupné z: [Mouse IFN-gamma E. coli cell culture Millipore \(sigmaaldrich.com\)](#)
 - Informace k LPS dostupné z: [Lipopolysaccharide, E. coli O111: B4 Lipopolysaccharide, E. coli O111: B4 stimulates the activity of inducible nitric oxide synthase. Induces apoptosis in mouse thymus and swine lymphocytes | Sigma-Aldrich \(sigmaaldrich.com\)](#)
 - Informace k IL-4 dostupné z: [IL-4 from mouse, Interleukin-4, recombinant, expressed in E. coli, lyophilized powder, suitable for cell culture mIL-4 \(sigmaaldrich.com\)](#)
 - Informace k Gm-CSF dostupné z: [Gm-CSF from mouse Animal-component free, recombinant, expressed in E. coli, 98 \(SDS-PAGE\), 98 \(HPLC\), cell culture tested CSF-2 \(sigmaaldrich.com\)](#)