

Deteksi populasi Cd3+Cd4+Cd25+Foxp3+ T-regulator pada Limpa Mencit Galur *Balb/c* dan *Swiss-webster* yang Mudah dan Cepat dengan Metode *Flow Cytometry*

Detection of Cd3+Cd4+Cd25+Foxp3+ T-regulator Populations in Balb/c and Swiss-webster Mice's Spleen Easy and Quickly with Flow Cytometry Method

Yudy Tjahjono^{a)}, Hendy Wijaya^{a)*}, Senny Yesery Esar^{a)}, Caroline^{a)}, Nico Jafet^{a)}, I Made Andika Bara Kusuma^{a)}, Oryza Chrisantia^{a)}, Maria Theresia Primadewi Bhendy^{a)}, Sindi Siska Palpialy^{a)}, Shellin Soehadi^{a)} Yufita Ratnasari Wilianto^{a)}

^{a)}Fakultas Farmasi, Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya, Indonesia

Article info:

Received Date : 30/08/2022

Revised Date : 09/10/2022

Accepted Date : 14/10/2022

Key Words:

T-Regulator Cell

Spleen

Flow cytometry

Isolation

Corresponding Authors:

Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya, Jl. Raya Kalisari Selatan No. 1, Surabaya

E-mail: hendy_wijaya@ukwms.ac.id

Abstrak:

Sel T-regulator (Treg) memainkan peran kunci dalam mengendalikan autoimunitas, respon alergi, peradangan, dan respons terhadap infeksi. Sel T Cd4+ yang secara konstitutif mengekspresikan Cd25 dan protein *forkhead 3* (Foxp3; yaitu, Cd3+Cd4+Cd25+Foxp3+) atau disebut juga sebagai Treg fungsional, telah terbukti memainkan peran utama dalam pemeliharaan toleransi dan homeostasis imun, sehingga deteksi Treg fungsional sangat penting dilakukan sebagai salah satu parameter imunomodulasi. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi populasi sel Treg (Cd3+Cd4+Cd25+Foxp3+) pada organ limpa mencit galur *Balb/c* dan *Swiss-webster* dengan menggunakan metode yang mudah, cepat, serta terjangkau. Metode deteksi sel Treg dilakukan dengan cara isolasi organ limpa mencit *Balb/c* dan *Swiss-webster* kemudian dilakukan preparasi dan deteksi sel menggunakan instrumen *flow cytometry*. Hasil populasi sel Treg yang didapatkan berturut-turut pada mencit *Balb/c* dan *Swiss-webster* adalah $2,02 \pm 0,36\%$ dan $3,14 \pm 1,64\%$ dari total populasi yang dideteksi dengan hanya membutuhkan waktu 145 menit sejak pembedahan. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa pengamatan populasi sel Treg pada splenosit mencit galur *Balb/c* dan *Swiss-webster* dengan *flow cytometry* dapat dilakukan dengan mudah dan praktis dengan pewarnaan kombinasi antibodi yang tertera pada manuskrip ini. Selain itu, metode pewarnaan yang tertera dapat digunakan sebagai salah satu acuan untuk mendeteksi imunomodulator pada berbagai model hewan coba yang menggunakan mencit galur *Balb/c* dan *Swiss-webster*, khususnya yang berhubungan dengan populasi sel Treg.

Abstract

Regulatory T cells (Tregs) play a key role in controlling autoimmunity, allergic responses, inflammation, and responses to infection. Cd4+ T cells that constitutively express Cd25 and forkhead 3 protein (Foxp3; that is, Cd3+Cd4+Cd25+Foxp3+) have been shown to play a major role in the maintenance of self-defense and immune homeostasis. This study aims to detect the presence of a population of Tregs cells (Cd3+Cd4+Cd25+Foxp3+) in the spleen of *Balb/c* and *Swiss-webster* mice using an easy, quickly and affordable method. Tregs cell detection method was carried out by isolating the spleen organs of *Balb/c* and *Swiss-webster* mice, then preparation and cell detection were carried out using flow cytometry instruments. The results of the Tregs cell

population obtained in *Balb/c* and *Swiss-webster* mice, respectively, were $2.02 \pm 0.36\%$ and $3.14 \pm 1.64\%$ of the total population, which were detected only 145 minutes since surgery. Based on observation of Tregs cells in splenocytes of mice strains *Balb/c* and *Swiss-webster*, this can be done using the flow cytometry method, where from the results obtained the method of detecting the expression of Cd3+Cd4+Cd25+Foxp3+.

PENDAHULUAN

Sel T-regulator (Treg) membentuk sekitar 2-20% dari total populasi sel limfosit-T Cd4+ memainkan peran kunci dalam mengendalikan respon autoimun, alergi, peradangan, dan pertahanan tubuh terhadap infeksi atau disebut juga dengan imunomodulator (Sakaguchi, *et al.*, 2008). Secara garis besar sel Treg dibedakan menjadi dua jenis yakni sel Treg natural dan sel Treg dari hasil induksi. Sel Treg natural merupakan populasi sel T-limfosit yang mengekspresikan molekul Cd25. Molekul Cd25 merupakan rantai alfa dari reseptor IL-2 yang berperan sebagai marker yang biasa ditemukan pada sel Treg (Wing, *et al.*, 2019). Sel Treg natural ditandai dengan Cd4+Cd25+ (nT reg).

Protein Foxp3 (*forkhead protein-3*) merupakan protein faktor transkripsi yang banyak ditemukan di beberapa sub populasi Treg. Mutasi terhadap protein Foxp3 menghasilkan defisiensi Cd4+Cd25+ sel Treg di timus dan di perifer, dan menyebabkan gangguan ada sistem imun dan memicu terjadinya autoimun, baik pada mencit maupun manusia (Bennett, *et al.*, 2001; Brunkow, *et al.*, 2001). *Knock-out* terhadap gen Foxp3 pada mencit menyebabkan deplesi populasi sel Treg, sehingga dapat disimpulkan bahwa Foxp3 *marker* penanda adanya Treg yang fungsional, di samping Cd4 dan Cd25 (Georgiev, *et al.*, 2019). Dari tinjauan di atas, maka untuk mendeteksi secara spesifik sel Treg Cd4+ fungsional dapat menggunakan marker yang mengekspresikan glikoprotein intermembran Cd25 dan protein intraseluler *forkhead-3* (Foxp3), selain juga Cd4+ dan Cd3+ sebagai karakter sel limfosit T itu sendiri.

Salah satu cara yang paling mudah dan diakui dalam dunia diagnostika untuk mendeteksi populasi sel Treg adalah dengan *flow cytometry* dikarenakan jumlahnya yang sangat sedikit, dan perlunya menggunakan lebih dari dua marker seluler berbeda (Lambert, *et al.*, 2020; Santegoets, *et al.*, 2015). Pada umumnya, populasi sel Treg Cd4+ pada *flow cytometry* disebut sebagai populasi sel Cd3+Cd4+Cd25+Foxp3+. Deteksi populasi sel Treg Cd4+ sudah banyak dilakukan, baik pada manusia maupun pada mencit (Josefowicz, *et al.*, 2012, Okeke, *et al.*, 2013, Singh, *et al.*, 2015). Namun deteksi populasi sel Treg Cd4+ pada jurnal-jurnal tersebut menggunakan panel antibodi dari perusahaan terkemuka, yang apabila diimpor di Indonesia

harganya sangat mahal sehingga banyak membebani peneliti dalam dunia imunologi untuk mendeteksi dan mempelajari populasi sel Treg Cd4+. Selain itu, untuk mendeteksi *marker* protein intraseluler Foxp3, berbagai publikasi menggunakan campuran detergen permeabilisasi yang cukup kompleks, sehingga mengurangi efisiensi dalam mendeteksi Foxp3 (Gregorczyk, *et al.*, 2019).

Pada manuskrip ini, kami mendemonstrasikan cara cepat, praktis, dan lebih terjangkau dalam mendeteksi populasi sel Treg Cd4+ pada kelenjar limpa mencit *Balb/c* dan *Swiss-webster*. Keterjangkauan deteksi populasi sel Treg Cd4+ terletak pada panel antibodi yang kami gunakan, menggunakan panel antibodi Cd3+Cd4+Cd25+Foxp3+ merk Elabscience (Houston, United States) yang harganya jauh lebih murah daripada panel antibodi dari merk lainnya. Selain itu, hanya dengan menggunakan 0,1% detergen saponin, kami mampu mendeteksi populasi sel Treg Cd4+ hingga 4,96% dari jumlah seluruh populasi T-limfosit. Diharapkan metode dan hasil pada penelitian ini dapat dijadikan referensi bagi para peneliti dalam bidang imunologi untuk menginvestigasi populasi sel Treg Cd4+ dan menepis anggapan bahwa deteksi populasi sel Treg Cd4+ khususnya pada kelenjar limpa mencit *Balb/c* dan *Swiss-webster* merupakan hal yang rumit. Metode pewarnaan yang tertera juga dapat digunakan sebagai salah satu acuan untuk mendeteksi efek imunomodulator pada berbagai model hewan coba yang menggunakan mencit galur *Balb/c* dan *Swiss-webster*, khususnya yang berhubungan dengan populasi sel Treg fungsional.

METODE

Hewan Coba

Mencit galur *Balb/c* dan *Swiss-webster* usia 12 minggu yang dibeli di Pusat Veteriner Farma (Pusvetma), Ketintang, Kecamatan Gayungan, Surabaya. Pemeliharaan hewan coba berdasarkan dengan Keterangan Kelaikan Etik Nomor: 001/EC-FKH/Eks./2022 di mana hewan coba yang baru saja datang dilakukan aklimatisasi selama 7 hari. Hewan coba dipelihara dalam kandang yang kandang yang terbuat dari bak plastik dan ditutupi kawat pada bagian atasnya pada suhu ruangan berkisar antara 22-25°C bebas dari kebisingan, dengan kelembaban sekitar 50-

60%, dan pencahayaan ruangan dikendalikan dengan 12 jam siklus terang dan 12 jam siklus gelap serta pengantungan ventilasi yang baik namun tidak ada jendela yang terbuka. Mencit diberikan pakan standar BR-2 sebanyak 10-15 gram/ekor/hari. Air minum yang diberikan adalah air mineral secara *ad libitum*. Pakan dan air minum diganti setiap hari sedangkan sekam dan kandang diganti setiap 2 kali sehari.

Alat dan Bahan

Reagen yang dibutuhkan terdiri dari: buffer ACK (NH₄Cl, KHCO₃, dan Na₂EDTA); buffer PBS (*Phosphate Buffer Saline*); DNase dan kolagenase dibeli dari Worthington; RPMI-1640 dibeli dari Gibco; Permeabilization Buffer (1X Permeabilization Buffer mengandung 0,1% Saponin dan 0,09% Sodium azide) dibeli dari Invitrogen; BSA, PE *Anti-mouse* CD3 (17A2), PerCP/Cyanine5.5 *Anti-mouse* CD4 (GK1.5), FITC *Anti-mouse* CD25 (PC-61.5.3), APC *Anti-mouse* Foxp3 (3G3) dibeli dari Elabscience; Formaldehid; Buffer A (PBS/0,5%BSA); Buffer B (0,01% Formaldehid dalam PBS/0,5%BSA); Buffer C (0,1% Formaldehid dalam PBS/0,5%BSA); Permeabilization buffer (2x Permeabilization buffer dalam Buffer B).

Isolasi Organ Limpa (Splenektomi)

Sebelum pembedahan, berat badan mencit ditimbang untuk menghitung massa indeks. Isolasi organ limpa diawali dengan melakukan euthanasia pada mencit dengan menggunakan Ketamin (90 mg/kg) dan Xylazine (10 mg/kg). Melakukan pembedahan dengan alat bedah minor lalu mengisolasi organ limpa. Organ limpa ditimbang terlebih dahulu untuk menghitung massa indeks organ. Sel splenosit yang dibiarkan selama 16 jam paska splenektomi pada suhu ruang masih mampu menunjukkan ekspresi Treg tinggi (Zhou, *et al.*, 2010).

Isolasi Sel Splenosit

Organ limpa diinkubasi dalam plat 6-*Wells* pada inkubator CO₂ (37°C/5% CO₂) selama 30 menit dengan campuran yang berisi Kolagenase Tipe IV 340 U/mg dengan konsentrasi 100U/ml sebanyak 1 ml, DNase 0,2% sebanyak 250 µl, dan medium RPMI hingga volume total pada plat 2,5 ml untuk tiap *wells*. Kolagenase dan DNase disuntikkan ke dalam organ bertujuan agar sel Splenosit dapat terdisosiasi sehingga akan memudahkan dalam pengamatan dan perhitungan konsentrasi sel. Setelah inkubasi, organ limpa dihancurkan dengan *syringe* bagian *plunger* untuk mendapatkan splenosit. Setelah itu resuspensi dengan mikropipet, menyaring dengan menggunakan *cell-strainer* 70 µm pada tabung sentrifugasi. Sentrifugasi 1500 rpm selama 5

menit, membuang supernatan.

Penyiapan Sel Splenosit

Buffer ACK sebanyak 3 mL dimasukkan untuk tiap tabung sentrifugasi dan didiamkan selama 2 menit dalam es. Pemberian ACK bertujuan untuk menghancurkan sel darah merah. Sentrifugasi 1500 rpm selama 5 menit, membuang supernatan. Resuspensi dengan 1 ml PBS/0,5% BSA.

Perhitungan Konsentrasi Sel Splenosit dengan Mikroskop

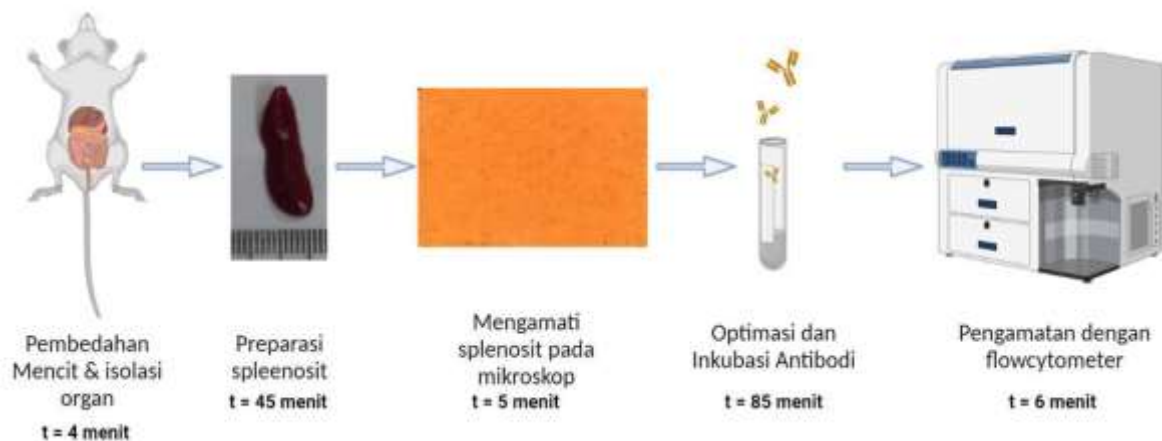
Sebanyak 100 µL masing-masing suspensi sel diencerkan 1:8 PBS/0,5%BSA. Hasil pengenceran tersebut diambil 20 µL dan diencerkan lagi dengan trypan blue 1:5 untuk digunakan dalam pengamatan menggunakan mikroskop. Dimasukkan sebanyak 10 µL/sisi pada Neubauer-Chamber. Melakukan perhitungan dan didapatkan konsentrasi sel. Hasil yang diperoleh dikalikan dengan 40 kali pengenceran dan didapat hasil dalam satuan sel/µl. Kemudian satuan akhir yang diperoleh menjadi sel/ml.

Optimasi Antibodi

Mengambil sel dengan konsentrasi 0,5x10⁷ sel/ml, masukkan 5 µl anti-Cd25 FITC (*Fluorescein Isothiocyanate*) dan inkubasi 20 menit dalam ruang tertutup gelap. Setelah inkubasi, menambahkan 5 µl anti-Cd3 dan 5 µl anti-Cd4, lalu inkubasi kembali 20 menit dalam ruang tertutup gelap. Menambahkan 1 ml buffer A, sentrifugasi 1800 rpm selama 5 menit lalu membuang supernatan. Setelah proses tersebut selesai, lakukan inkubasi Foxp3 dengan memasukkan 250 µl buffer B, 250 µl permeabilization buffer, resuspensi, dan inkubasi 10 menit dalam ruang tertutup gelap. Memasukkan 500 µl buffer A, sentrifugasi 1800 rpm selama 5 menit, lalu membuang supernatan. Memasukkan 200 µl buffer A, memindahkan pada tabung *flow cytometer*, menambahkan 5 µl anti-Foxp3, inkubasi selama 20 menit pada ruang tertutup gelap. Memasukkan 1 ml buffer A, sentrifugasi 1800 rpm selama 5 menit, membuang supernatan, menambahkan 500 µl buffer C lalu melakukan pembacaan hasil pada *flow cytometer*.

Analisis Flow Cytometry

Sel yang telah dipreparasi dan diisolasi selanjutnya dianalisis dengan alat *flow cytometry* merk BD FACS-Calibur untuk mendeteksi populasi sel Treg fungsional (Cd4⁺Cd25⁺Foxp3). Analisis dilakukan dengan mengatur parameter yang diperlukan untuk dianalisis. Hasil analisis yang didapatkan akan diolah dengan program *Flowing Software 2TM*.



Gambar 1. Skema Kerja *Flow cytometry* untuk mendeteksi sel Treg

Strategi Gating

Strategi *gating* dilakukan dengan cara memasukkan data pada plot grafik, lalu dilakukan *gating* R1 dengan memilih daerah dengan populasi yang banyak dan padat. Dari hasil *gating* R1 tersebut, dimasukkan pada plot grafik berikutnya dengan parameter Cd4 vs Cd3. Pada plot grafik tersebut dilakukan pembagian kuadran dengan menempatkan titik tengah garis pembagi pada populasi sel yang padat sehingga akan diperoleh 4 kuadran. Selanjutnya melakukan *gating* R2 pada kuadran P2. Hasil *gating* R2 dimasukkan kedalam plot grafik ketiga dengan parameter Foxp3 vs Cd25. Langkah selanjutnya sama seperti plot grafik sebelumnya yaitu dilakukan pembagian kuadran dengan menempatkan titik tengah dari garis pembagi dan mendapatkan 4 kuadran. Dari *gating* tersebut Cd3+Cd4+Cd25+Foxp3+ atau Cd4+ Treg diamati pada kuadran Q2.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, sel Treg fungsional yang ditandai dengan populasi Cd3+Cd4+Cd25+Foxp3+ berhasil dideteksi. Hasil yang didapatkan pada (Tabel 1) menunjukkan indeks organ terhadap konsentrasi sel mencit *Balb/c* dengan *Swiss-webster*. Hasil perhitungan penentuan indeks organ untuk mencit *Balb/c* adalah sebesar $0,326 \pm 0,06\%$ dan mencit *Swiss-webster* adalah $0,309 \pm 0,21\%$, sedangkan untuk konsentrasi sel yang didapatkan berdasarkan hasil pengamatan dengan mikroskop berturut-turut untuk mencit *Balb/c* dan *Swiss-webster* adalah $0,701 \times 10^7 \pm 0,65$ sel/ml dan $1,382 \times 10^7 \pm 0,26$ sel/ml. Perbedaan indeks organ yang dihasilkan dapat disebabkan oleh ukuran dan berat dari organ limpa dari *Balb/c* lebih kecil dibandingkan organ limpa mencit galur *Swiss-webster*. Ukuran dan berat dari limpa dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti, adanya variasi spesies, hiperplasia, stres, dan EMH (*Extramedullary Hematopoiesis*)

yaitu kondisi di mana terjadi pembentukan sel darah merah di luar sumsum tulang (Parker, 2017).

Pada penelitian ini akan dilihat proporsi jumlah dari Cd3+Cd4+Cd25+Foxp3+ pada mencit (*Mus musculus*) galur *Balb/c* dan *Swiss-webster*. Data yang didapatkan dari hasil deteksi sel Treg dengan analisis *flow cytometry* kemudian diolah dengan aplikasi *flowing software 2™* untuk mendapatkan populasi sel. Analisa tersebut dilakukan dengan melakukan strategi *gating* pada populasi sel yang padat (R1) (Gambar 2). Pada hasil *gating* awal (R1) didapatkan populasi sel sebanyak 10.000 sel diamati pada strategi *gating* untuk mendapatkan masing-masing parameter berdasarkan galur *Balb/c* dan *Swiss-webster*.

Setelah dilakukan penentuan *gating* R1, hasil *gating* tersebut akan dilakukan *gating* kembali untuk mendeteksi adanya ekspresi dari Cd3+Cd4+pada splenosit tiap galur mencit, dimana hasil *gating* Cd3+Cd4+ akan digunakan untuk *gating* ekspresi Cd25+Foxp3+. Berdasarkan hasil yang didapatkan ekspresi populasi Cd4 dan Cd3 pada bagian kanan atas (*upper right*) (Gambar 3) yang dideteksi berturut-turut untuk mencit *Balb/c* didapatkan 13,50% dan mencit *Swiss-webster* sebesar 19,24% dari total populasi R1. Dari hasil *gating* R1 dilanjutkan dengan analisis ekspresi Cd25+Foxp3+ pada bagian kanan atas (*upper right*) (Gambar 3) yang menunjukkan hasil berturut-turut pada mencit *Balb/c* dan *Swiss-webster* adalah $2,02 \pm 0,36\%$ dan $3,14 \pm 1,64\%$ dari total populasi yang dideteksi.

Dari hasil deteksi tersebut dapat dilihat bahwa metode yang digunakan yaitu *flow cytometry* dengan panel antibodi Cd3+Cd4+Cd25+Foxp3+ merk Elabscience dengan harga terjangkau mampu mendeteksi keberadaan sel Treg pada splenosit mencit galur *Balb/c* dan *Swiss-webster* sehingga merupakan metode yang praktis dan cepat dengan waktu yang

ditempuh cukup singkat yaitu 145 menit. Hasil pada penelitian ini dapat dijadikan referensi bagi para peneliti dalam bidang imunologi untuk menginvestigasi populasi sel Treg Cd4+ dan menepis anggapan bahwa deteksi populasi sel Treg Cd4+ khususnya pada kelenjar limpa mencit Balb/c dan *Swiss-webster* merupakan hal yang

rumit. Metode pewarnaan yang tertera juga dapat digunakan sebagai salah satu acuan untuk mendeteksi efek imunomodulator pada berbagai model hewan coba yang menggunakan mencit galur Balb/c dan *Swiss-webster*, khususnya yang berhubungan dengan populasi sel Treg fungsional.

Tabel 1. Indeks organ terhadap konsentrasi sel mencit *Balb/c* dan *Swiss-webster*

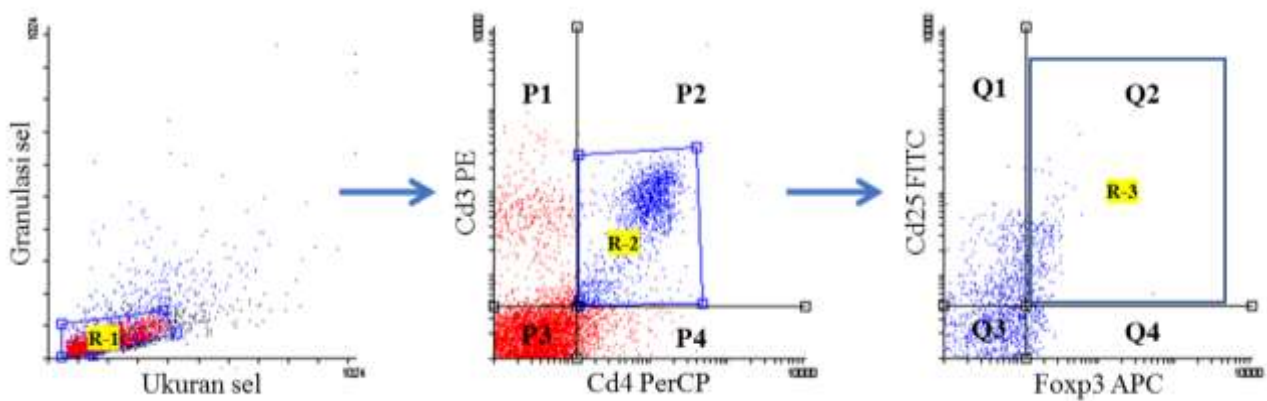
Parameter	<i>Balb/c</i> *	<i>Swiss-webster</i> *
Indeks Organ	0,326 ± 0,06%	0,309 ± 0,21%
Konsentrasi Sel	0,701 x 10 ⁷ ± 0,65 sel/ml	1,382 x 10 ⁷ ± 0,26 sel/ml

*n=3

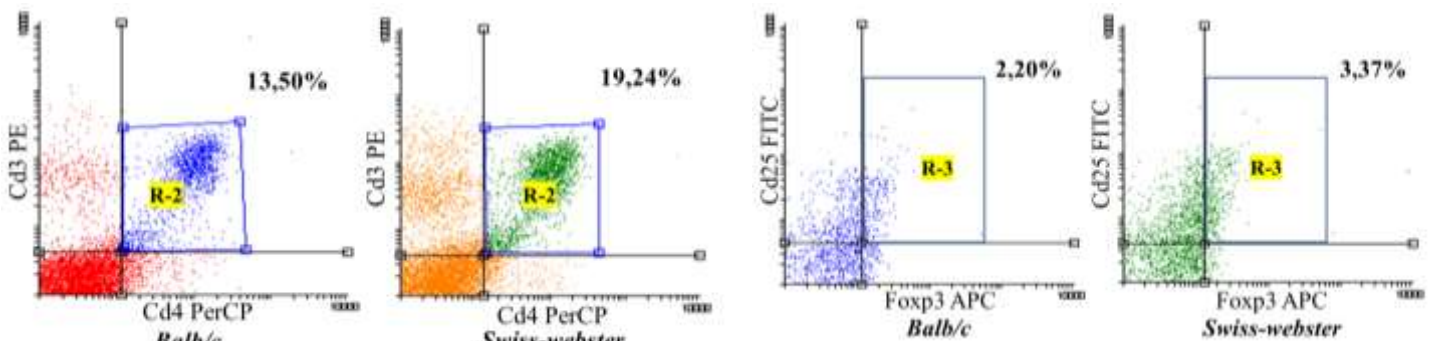
Tabel 2. Parameter jumlah Cd3+, Cd4+, Cd3+Cd4+Cd25+Foxp3+ Treg mencit *Balb/c* dan *Swiss-webster*

Parameter	<i>Balb/c</i> *	<i>Swiss-webster</i> *
Cd3+	20,72 ± 0,62%	32,78 ± 3,47%
Cd4+	18,01 ± 0,39%	25,33 ± 1,95%
Cd3+Cd4+Cd25+Foxp3+ T-reg	2,02 ± 0,36%	3,14 ± 1,64%

*n=3



Gambar 2. Strategi gating



Gambar 3. Populasi Cd3+, Cd4+, dan Cd3+Cd4+Cd25+Foxp3+ Treg mencit *Balb/c* dan *Swiss-webster*

KESIMPULAN

Pengamatan populasi sel Treg pada splenosit mencit galur *Balb/c* dan *Swiss-webster* dapat dilakukan dengan menggunakan metode *flow cytometry*, di mana dari hasil yang telah didapatkan metode ini mampu mendeteksi

ekspresi Cd3+Cd4+Cd25+Foxp3+ dengan mudah dan cepat, hanya membutuhkan waktu 145 menit mulai dari pembedahan. Metode pewarnaan yang tertera juga dapat digunakan sebagai salah satu acuan untuk mendeteksi efek imunomodulator pada berbagai model hewan coba yang

menggunakan mencit galur *Balb/c* dan *Swiss-webster*, khususnya yang berhubungan dengan populasi sel Treg.

UCAPAN TERIMA KASIH

RSUD Dr. Soetomo Surabaya, Prof. Dr. Jusak Nugraha, dr, MS., SpPK(K) selaku staf pengajar

Spesialis Patologi Klinik Divisi Imunologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Penelitian ini didanai oleh Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya, nomor 5308/WMO1/N/2021 yang diketuai oleh Senny Yesery Esar.

DAFTAR PUSTAKA

Georgiev, P., Charbonnier, L.M., and Chatila, T.A., 2019, Regulatory T Cells: The Many Faces of Foxp3, *Journal of Immunology*, 39(6): 1-18.

Gregorzcyk, I., Maślanka, T., 2019, Effect of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs on activation induced CD25 expression on murine CD4+ and CD8+ T cells: an in vitro study, *Experimental immunology*, 44(22): 109-118.

Josefowicz, S.Z., Lu, L.F., and Rudensky, A.Y., 2012, Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function, *Annual Review of Immunology*, 30: 531 – 564.

Okeke, E.B., Okwor, I., Mou, Z., Jia, P., Uzonna, J.E., 2013, CD4+ CD25+ regulatory T cells attenuate lipopolysaccharide-induced systemic inflammatory responses and promotes survival in murine *Escherichia coli* infection, *Shock*, 40(1): 65-73.

Parker, G.A., 2017, Immunology in Toxicology and Drug Development, USA: Humana Press.

Santegoets, S.J., Dijkgraaf, E.M., Battaglia, A., Beckhove, P., Britten, C.M., Gallimore, A., and van der Burg, S.H., 2015, Monitoring regulatory T cells in clinical samples: consensus on an essential marker set and gating strategy for regulatory T cell analysis by flow cytometry, *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 64(10): 1271-1286.

Singh, K., Hjort, M., Thorvaldson, L., and Sandler, S., 2015, Concomitant analysis of Helios and Neuropilin-1 as a marker to detect thymic derived regulatory T cells in naive mice, *Scientific Reports*, 5(1): 1-10.

Wing, J.B., Tanaka, A., and Sakaguchi, S., 2019, Human FOXP3+ Regulatory T Cell Heterogeneity and Function in Autoimmunity and Cancer, *Immunity*, 80: 302-316.

Zhou, Z., Wang, J., Shi, W., Brand, D.D., Liu, Z., Fan, H., Zhen, S.G., 2010, Isolation of Purified and Live Foxp3+ Regulatory T Cells using FACS Sorting on Scatter Plot, *Molecular Cell Biology*, 2(3): 164-169.