

Regulacyjna rola białek Bcl-2 i Bax w procesie apoptozy w produktywnym zakażeniu myszy BALB/c wirusem ektromelii*)

MAŁGORZATA KRZYŻOWSKA, ANNA WINNICKA*, MAREK NIEMIAŁTOWSKI

Zakład Immunologii Katedry Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW,
ul. Ciszewskiego 8, Warszawa 02-786

*Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Klinicznej Katedry Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW,
ul. Nowoursynowska 159c, Warszawa 02-776

Krzyżowska M., Winnicka A., Niemiałtowski M.

Role of Bcl-2 and Bax proteins in apoptosis observed during ECTV-MOS infection of BALB/c mice

Summary

Apoptosis is the process involved in embryonic development and homeostasis maintenance of developed organisms. Furthermore, apoptosis is the mechanism of NK and T cells (CTL) cytotoxicity. The family of bcl-2 proteins plays a crucial role in regulation of cell death and consists both of proteins with pro-apoptotic (Bax, Bad, Bid, Bik), and anti-apoptotic (Bcl-2, Bcl-xL) activity. The present work was aimed at elucidating the role of Bax and Bcl-2 expression in pathogenesis of mousepox caused by virulent Moscow strain of Ectromelia virus (ECTV-MOS) in sensitive animals – BALB/c mice (H-2^d). BALB/c mice were infected via footpad with ECTV-MOS and at 5, 10 and 15 day of infection, lymph nodes, livers and spleens were isolated and subjected to further research. The tests included measurement of: apoptosis using TUNEL assay, caspase-9 activity and bcl-2 and Bax expression. The results showed: (a) influence of ECTV-MOS upon expression of Bcl-2/Bax and subsequent transduction of mitochondrial apoptotic pathway and (b) the role of Bcl-2 protein in suppression of apoptosis in M ϕ depending on specific immunological environment of infected organs.

Keywords: Ectromelia virus, apoptosis, Bcl-2, Bax

Apoptoza, inaczej programowana śmierć komórki, odpowiada za prawidłowy przebieg rozwoju embrionalnego oraz utrzymanie homeostazy dojrzałego organizmu, jest również przejawem cytotoksyczności komórek NK oraz antygenowo-swoistych limfocytów T cytotoksycznych (CTL). Kluczową rolę w regulacji apoptozy odgrywa rodzina białek Bcl-2, do której należą zarówno białka pro-apoptotyczne (Bax, Bad, Bid, Bik), jak i antyapoptotyczne (Bcl-2, Bcl-xL). Białka tej rodziny mogą pobudzać lub hamować uwalnianie cytochromu c i uruchamianie tzw. mitochondrialnego szlaku śmierci, w którym dochodzi do aktywacji enzymu efektorowego – kaspazy-9, a w dalszej konsekwencji do apoptozy (1, 3).

Jak wynika z piśmiennictwa (2), jednym z głównych mechanizmów związanych z patogenezą chorób wirusowych jest występowanie nadmiernej apoptozy lub jej supresja w narządach docelowych dla replikującego się wirusa. Wirusy wykształciły szereg mechanizmów mających na celu ochronę zakażonych komórek przed apoptozą indukowaną przez aktywne limfocyty CTL, m.in. poprzez kodowanie homologów ssaczych białek Bcl-2 (LMW5-HL z wirusa ASFV, M11 z gammaherpeswirusa 68 my-

szy) lub poprzez zmianę ekspresji białka Bcl-2 w zakażonej komórce, np. HTLV-1 (2).

Wirus ospy myszy (wirus ektromelii; ectromelia virus [ECTV]) należy do rodzaju *Orthopoxviridae*, do którego zalicza się wirus ospy prawdziwej (Variola virus, VARV) i stanowi naturalny model zwierzęcego pokswirusa do badań wirusowo-specyficznej odpowiedzi immunologicznej. Zakażenia ortopokswirusami mogą mieć charakter miejscowy lub ogólny. W przebiegu zakażeń ogólnych, wysypkowych (ECTV lub VARV) wirus replikuje się we wrotach zakażenia, a następnie wraz z krwią (wiremia pierwotna) dostaje się do narządów mięsnych, gdzie przechodzi ponownie cykl replikacyjny. Narząd manifestujący dla pokswirusów stanowi skóra, do której przedostają się w wyniku wiremii wtórnej. Zakażenie pokswirusami prowadzi do zatrzymania normalnego metabolizmu komórki, co zazwyczaj stanowi endogenny sygnał do uruchomienia szlaku śmierci (apoptozy) (4, 7, 9). Z przeprowadzonych badań wiadomo, że szczep Moscow ECTV (ECTV-MOS) powoduje persystentne zakażenie komórek dendrytycznych i makrofagów (M ϕ) występujących w śledzionie, utrzymujące się do 120. dnia po zakażeniu (d.p.z.), co może świadczyć o zdolności wirusa do przedłużenia żywotności zakażonych M ϕ (5, 10, 11). Szereg badań wskazuje na istotną rolę zahamowania apoptozy

*) Badania w ramach grantów sfinansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 3 PO 4A 022 25 [MK] oraz nr 2 PO5A 050 30 [MN].

w cyklu replikacyjnym wirusów zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* (2, 8).

Celem badań było określenie, w jaki sposób zmiany ekspresji Bcl-2/Bax korelują ze zmianami odsetka komórek apoptotycznych oraz jaką rolę mogą odgrywać zmiany ekspresji Bcl-2 i Bax w przeżyciu M ϕ w zakażeniu ECTV-MOS *in vivo*.

Materiał i metody

Wirus. Do wszystkich badań użyto wysoce patogenego standardowego szczepu Moscow wirusa ektromelii (ECTV-MOS) pochodzącego z zasobów ATCC (American Type Culture Collection) (VR – 1374), pasażowanego na myszach BALB/c.

Myszy. Genetycznie wrażliwe na zakażenie ECTV myszy BALB/c (haplotyp H-2^d) obu płci w wieku 4-6 tygodni pochodziły ze zwierzątarni Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej w Warszawie. Wszystkie doświadczenia wykonano za zgodą III Lokalnej Komisji Etycznej w Warszawie. Myszy BALB/c podzielono na 4 grupy po 8 zwierząt w każdej i zakażono dostopowo dawką odpowiadającą 0,0005 LD₅₀ (PFU = 4 × 10³/ml). Zakażone zwierzęta obserwowano codziennie, oceniając rozwój objawów klinicznych. Grupę kontrolną stanowiły myszy, którym podawano dostopowo jałowy, zbuforowany roztwór fizjologiczny (PBS). W 5., 10. i 15. d.p.z. myszy usypiano (pentobarbital – 150 mg/ketamina – 100 mg/kg masy ciała) i skrawkiano. Następnie jałowo pobierano pachwinowe węzły chłonne, śledzionę i wątrobę. Wyizolowane narządy umieszczano w 10% formalinie/PBS, pH 7,4 w 4°C, a następnie zatapiano w parafinie. Bezpośrednio po izolacji przecierano je przez jałowe, metalowe sitka, celem uzyskania zawiesiny pojedynczych komórek, jak opisano wcześniej (5, 8, 10).

Identyfikacja komórek apoptotycznych. Do identyfikacji komórek apoptotycznych w skrawkach parafinowych użyto zestawu ApopTag[®] Peroxidase *in situ* (Oncor, Oxford, UK). Barwienie wykonywano zgodnie z instrukcją producenta. Indeks apoptotyczny określano jako liczbę komórek lub ciałek apoptotycznych wykazujących reakcję pozytywną w stosunku do wszystkich komórek liczonych w 10 polach widzenia w danym preparacie (mikroskop BX60 [Olympus]; × 400). Standardowo badano 3 preparaty, zawierające po dwa skrawki danego narządu.

Pomiar aktywności kaspazy-9. Do pomiaru aktywności kaspazy-9 wykorzystano zestaw Caspase-9 fluorometric assay (Oncogene) zgodnie z instrukcją producenta. Aktywność kaspazy-9 w próbce określano w umownych jednostkach fluorescencji (RFU) przeliczonych na 50 µg białka/h⁻¹.

Określenie ekspresji bcl-2 lub bax. Skrawki parafinowe poddawano standardowej procedurze immunohistochemicznej (6), wykorzystując do barwienia przeciwciała monoklonalne anti-bcl i poliklonalne anti-bax (Becton Dickinson). Jako przeciwciał drugorzędowych użyto kozich IgG przeciwko, odpowiednio, mysim IgG lub króliczym IgG. W ostatnim etapie nakładano streptawidynę znakowaną peroksydazą chrzanową, a dalej postępowano zgodnie z powszechnie dostępnymi zaleceniami producenta (6). Odsetek M ϕ z ekspresją bcl-2 lub bax określano przy użyciu przeciwciał monoklonalnych anti-F4/80 (Dako) skoniugowanych z fikoerytryną. W pierwszym etapie wykonywano znakowanie antygenów powierzchniowych, a następnie posługując się zestawem Cytofix/Cytoperm[™] Plus Fixation/Permeabilization Kit (Becton Dickinson BD) znakowano przy użyciu przeciwciał anti-bcl-2 i anti-bax, j.w. W kolejnym etapie do barwienia komórek stosowano

odpowiednie poliklonalne przeciwciała drugorzędowe skoniugowane z FITC. Komórki analizowano w cytometrze przepływowym FACS Calibur (B&D).

Każde doświadczenie wykonywano w trzech powtórzeniach, zaś wyniki w postaci średnich analizowano testem par wiązanych t-Studenta przy użyciu programu SPSS 9.0.

Wyniki i omówienie

W niniejszych badaniach do zakażenia myszy BALB/c zastosowano dawkę ECTV-MOS powodującą rozwój klinicznej postaci ospy myszy, co miało na celu określenie związku pomiędzy nasileniem apoptozy w poszczególnych narządach a fazą rozwoju choroby. W pachwinowych węzłach chłonnych izolowanych od myszy zakażonych ECTV pomiędzy 10. a 15. d.p.z. komórki TUNEL⁺ znajdowano głównie w grudkach limfatycznych kory węzła, a zwłaszcza w ośrodkach rozmnażania. Indeks apoptotyczny wynosił, odpowiednio, w 10 d.p.z. – 3,78%, 15 d.p.z. – 12% (p = 0,04). W śledzionie myszy zakażonych ECTV-MOS komórki TUNEL⁺ zidentyfikowano w grudkach limfatycznych oraz ich strefie brzeżnej w 5. d.p.z. (22,7%, p = 0,01), a także w otaczającej te grudki strefie grasiczozależnej. Odsetek komórek TUNEL⁺ zwiększał się aż do 10. d.p.z., kiedy to odnajdywano je głównie w strefach martwicy, a ich odsetek wynosił 78,45% (p = 0,001). W wątrobie myszy zakażonych ECTV-MOS komórki TUNEL⁺ znajdowano w strefach nacieków zapalnych w mięszu oraz nacieków zapalnych otaczających główne naczynia wątroby. Odsetek komórek TUNEL⁺ wynosił w 5. i 10. d.p.z., odpowiednio, 36,21% (p = 0,001) i 27,1% (p = 0,005) (tab. 1). Zgodnie

Tab. 1. Zmiany odsetka komórek Bcl-2⁺, Bax⁺ oraz F4/80⁺, F4/80/Bcl-2⁺ i F4/80/Bax⁺ w węzłach chłonnych śledzionie i wątrobie w przebiegu zakażenia ECTV-MOS myszy BALB/c (± SEM)

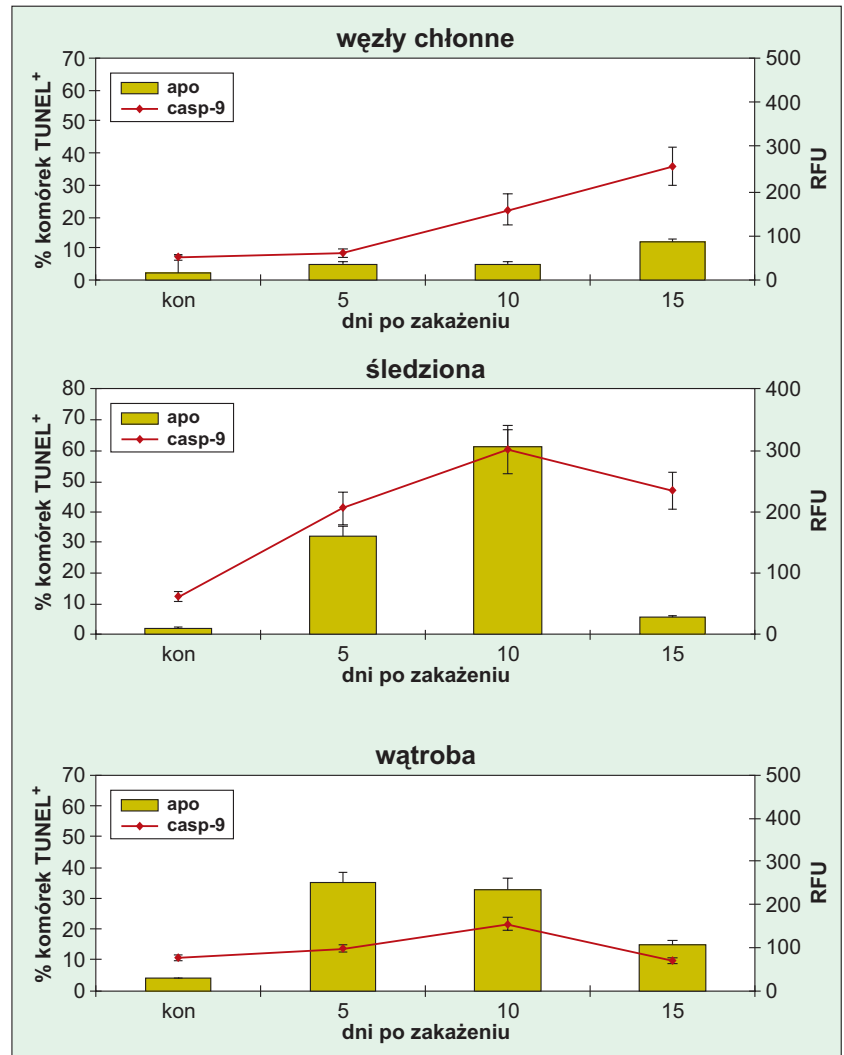
Badane narządy/ barwienie	Dni po zakażeniu			
	Kontrola	5	10	15
Węzły chłonne				
Bcl-2 ⁺	73,87 ± 7,89	56,30 ± 3,45	65,17 ± 6,78	90,26 ± 16,78
F4/80 ⁺ /Bcl-2 ⁺	99,75 ± 0,43	95,76 ± 1,65	86,18 ± 9,18	99,33 ± 0,58
Bax ⁺	12,76 ± 1,11	11,79 ± 0,61	4,28 ± 0,34	4,85 ± 0,90
F4/80 ⁺ /Bax ⁺	5,417 ± 1,2	28,38 ± 1,50	8,31 ± 0,80	1,83 ± 0,01
F4/80 ⁺	39,67 ± 3,89	33,07 ± 3,67	7,67 ± 5,60	16,85 ± 1,45
Śledziona				
Bcl-2 ⁺	84,61 ± 6,78	33,04 ± 4,50	62,19 ± 7,20	84,87 ± 11
F4/80 ⁺ /Bcl-2 ⁺	92,41 ± 6,68	81,3 ± 5,09	72,28 ± 0,74	98,73 ± 0,23
Bax ⁺	8,48 ± 1,23	26,0 ± 4,30	12,61 ± 1,89	15,54 ± 1,09
F4/80 ⁺ /Bax ⁺	1,58 ± 6,00	4,57 ± 4,83	4,91 ± 6,52	2,22 ± 0,24
F4/80 ⁺	11,74 ± 1,90	28,8 ± 2,00	30,84 ± 3,45	16,91 ± 7,80
Wątroba				
Bcl-2 ⁺	94,00 ± 11,2	74,66 ± 8,10	58,97 ± 6,70	97,43 ± 8,90
F4/80 ⁺ /Bcl-2 ⁺	97,91 ± 2,09	99,25 ± 0,46	96,83 ± 3,30	99,93 ± 0,05
Bax ⁺	6,16 ± 0,67	10,20 ± 1,00	4,07 ± 1,00	5,43 ± 0,87
F4/80 ⁺ /Bax ⁺	8,61 ± 1,40	8,71 ± 0,87	7,76 ± 1,95	5,16 ± 0,62
F4/80 ⁺	44,18 ± 3,80	37,05 ± 5,00	28,17 ± 1,60	42,2 ± 5,60

z wcześniejszymi (8) wynikami badań można wnioskować, że w narządach, gdzie odbywa się intensywna replikacja ECTV, pojawiają się zmiany o charakterze martwicy, którym towarzyszy nasilona apoptoza. Węzły chłonne, gdzie wirus namnaża się stosunkowo najmniej intensywnie, charakteryzują się nieco innym mechanizmem apoptozy – być może w węzłach chłonnych apoptoza jest powiązana z eliminacją dosyć długo utrzymujących się komórek ECTV⁺ (8).

W kontekście normalnych i patologicznych procesów, w których uczestniczą komórki immunologicznie kompetentne, szczególnie ważnymi białkami uczestniczącymi w apoptozie są białka bcl-2 oraz bax. Z wielu doniesień wiadomo, że wzajemny stosunek ekspresji tych białek może decydować o wejściu komórki na drogę apoptozy, bądź nie (1, 3). Jednym z wyznaczników uruchomienia mitochondrialnego szlaku apoptozy jest aktywność kaspazy-9, będącej proteinazą cysternową, której aktywacja zachodzi po związaniu nieaktywnej pro-kaspazy-9 z kompleksem apoptosomu, składającym się z białka apaf-1 oraz uwolnionego z mitochondriów cytochromu c. Wyniki aktywności kaspazy-9 otrzymane w niniejszych badaniach wykazały, że aktywność kaspazy-9 korelowała z ogólnym poziomem stwierdzanej apoptozy w danym narządzie (ryc. 1). W węzłach chłonnych aktywność kaspazy-9 rosła po 10. d.p.z. i korelowała ze wzrostem odsetka komórek apoptotycznych (ryc. 1) ($p \leq 0,005$), natomiast w śledzionie wzrost aktywności kaspazy-9 pozostawał na poziomie istotnym statystycznie w całym badanym okresie zakażenia ($p \leq 0,005$), w wątrobie aktywność kaspazy-9 była wysoka w 15. i 20. d.p.z. ($p \leq 0,005$) (ryc. 1).

Rodzina białek Bcl-2 reguluje mitochondrialny szlak apoptozy, regulując uwalnianie cytochromu c z mitochondriów. Białka Bcl-2, Bcl-x1 hamują uwalnianie cytochromu c, podczas gdy Bad, Bax, Bid i Bim, wbudowując się w trakcie procesu apoptozy do błon mitochondriów w odpowiedzi na sygnał apoptotyczny, sprzyjają aktywacji apoptozy na drodze zależnej od mitochondrium (1, 3).

W zakażeniu ECTV-MOS myszy BALB/c w śledzionie i wątrobie doszło do statystycznie istotnego wzrostu ekspresji białka Bax i jednoczesnego statystycznie istotnego spadku ekspresji anty-apoptotycznego białka Bcl-2 w szczycie choroby (5.-10. d.p.z.) ($p \leq 0,05$), co korelowało ze statystycznie istotnym wzrostem odsetka komórek apoptotycznych (tab. 1, ryc. 1). Ekspresja Bcl-2 w wątrobie zmniejszała się w sposób istotny w 5. i 10. d.p.z. ($p \leq 0,05$), zaś ekspresja Bax rosła jedynie w 5. d.p.z. ($p = 0,045$). W preparatach immunohistochemicznych pozytywną reakcją dla obu antygenów stwierdzono w obrębie nacieków zapalnych (ryc. 2), jednak słabą ekspresję białka Bcl-2 wykazywały wszystkie hepatocyty. W śledzionie obecność komórek z ekspresją Bax stwierdzano głównie w rejonie miazgi czerwonej, na obszarach otaczających ogniska zapalne (ryc. 2), zaś istotnie zwiększony odsetek komórek Bax⁺ utrzymywał się w całym ba-



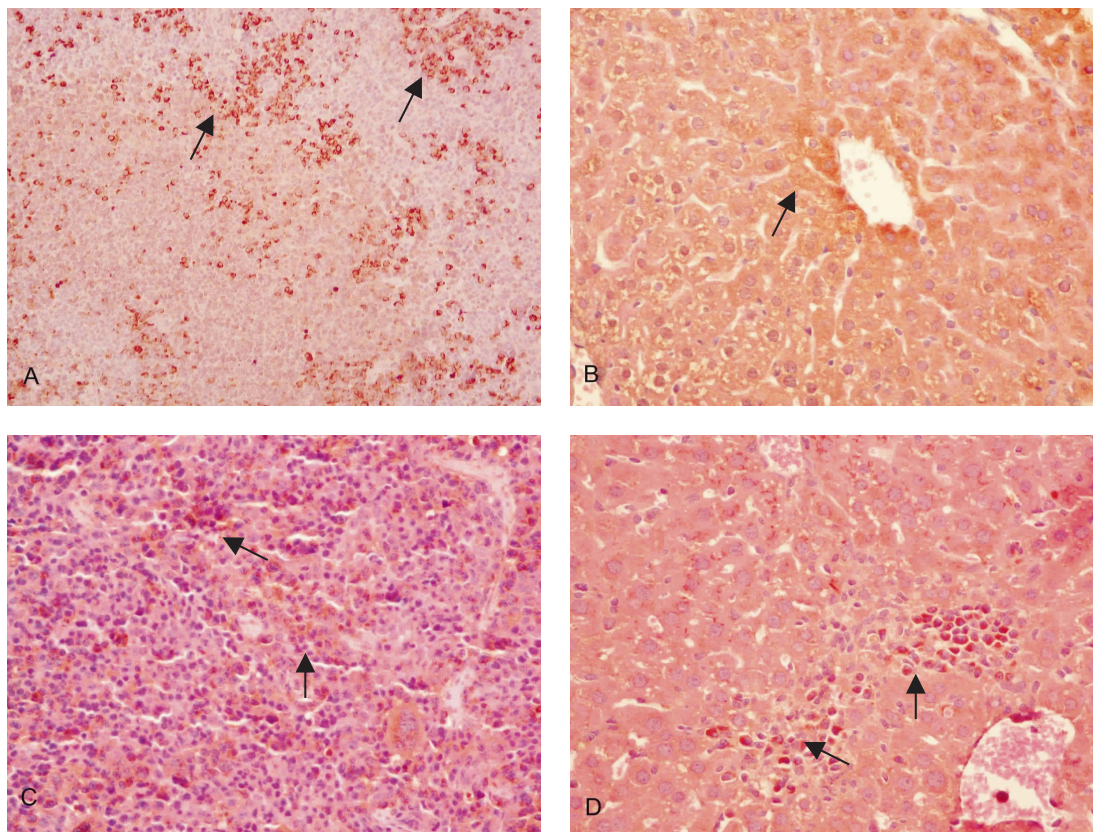
Ryc. 1. Zmiany odsetka komórek TUNEL⁺ w porównaniu do zmian aktywności kaspazy-9 w śledzionie, wątrobie i węzłach chłonnych w przebiegu zakażenia ECTV-MOS myszy BALB/c

danym okresie ($p \leq 0,05$), osiągając największą wartość w 5. d.p.z. (tab. 1). Analogicznie, w 5. d.p.z. zaobserwowano statystycznie istotny ($p \leq 0,05$) spadek komórek z ekspresją Bcl-2 (z $84,61 \pm 6,78$ w kontroli do $33,04 \pm 4,5$ w 5. d.p.z., $p = 0,001$) i spadek ten utrzymywał się do 10. d.p.z., kiedy to zaczęto identyfikować obecność pojedynczych komórek Bcl-2⁺ w obrębie miazgi czerwonej oraz obecność równomiernego znakowania komórek grudek limfatycznych (ryc. 2). Zaskakującym wynikiem było zaobserwowanie analogicznego, statystycznie istotnego wzrostu ekspresji Bax w węzłach chłonnych w całym badanym okresie (5.-15. d.p.z., $p \leq 0,05$), przy jednoczesnym istotnym statystycznie obniżeniu ekspresji Bcl-2 w 5. i 10. d.p.z. (tab. 1), co nie korelowało ze wzrostem odsetka komórek apoptotycznych i aktywnością kaspazy-9 (ryc. 1). Co więcej, w 15 d.p.z. zaobserwowano statystycznie istotny wzrost odsetka komórek z ekspresją Bcl-2, istotnie wyższy w porównaniu do niezakażonej kontroli (tab. 1, $p \leq 0,05$). Otrzymane wyniki wskazują zatem na mechanizm indukcji mitochondrialnego szlaku apoptozy w wątrobie i śledzionie myszy zakażonych ECTV-MOS zależny od spadku ekspresji anty-apoptotycznego białka Bcl-2, przy jednoczesnym wzroście ekspresji pro-apoptotycznego białka Bax.

Ze względu na zmiany ekspresji białka Bcl-2 nie korelujące ze zmianami odsetka komórek apoptotycznych w węzłach chłonnych postanowiono sprawdzić, czy mechanizm ten nie wynika z pojawienia się w węzłach chłonnych komórek M ϕ z wysoką ekspresją białka Bcl-2. Z otrzymanych wcześniej wyników wiadomo, że w warunkach *in vitro* hodowle pierwotne M ϕ nie ulegają apoptozie, co wiąże się ze wzrostem ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl-2. W wątrobie myszy zakażonych ECTV-MOS nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian odsetka komórek F4/80 z ekspresją Bax (tab. 1), natomiast spadek odsetka komórek F4/80⁺/Bcl-2 zaobserwowano w 10.

d.p.z. (tab. 1, $p \leq 0,05$), co korelowało ze spadkiem odsetka komórek F4/80⁺ w sposób istotny statystycznie w 10. d.p.z. (tab. 1, $p \leq 0,05$). Odmiennie sytuacja przedstawiała się dla śledziony, gdzie stwierdzono istotny statystycznie spadek odsetka komórek F4/80 z ekspresją Bcl-2 w 5. i 10. d.p.z. (tab. 1, $p \leq 0,05$), oraz niewielki, nieistotny statystycznie wzrost odsetka komórek F4/80 z ekspresją Bax (tab. 1), przy jednoczesnym wzroście odsetka komórek F4/80⁺ w całym badanym okresie (tab. 1, $p \leq 0,05$), co wskazuje na to, że w obrębie śledziony mogło dochodzić do apoptozy M ϕ na skutek bezpośredniego zakażenia lub na skutek rozwoju stanu zapalnego wywołanego martwicą (8). W węzłach chłonnych stwierdzono brak zmian odsetka komórek F4/80/Bcl-2⁺, zaś w 5. d.p.z. zaobserwowano istotny wzrost odsetka komórek F4/80/Bax ($p \leq 0,05$), przy jednoczesnym całkowitym spadku odsetka komórek F4/80⁺ w węzłach chłonnych w 10. i 15. d.p.z. (tab. 1, $p \leq 0,05$).

Podsumowując, w przebiegu zakażenia ECTV-MOS obserwowano znaczący udział apoptozy zależnej od Bcl-2/Bax. Wydaje się, że białka z rodziny Bcl-2 mają istotny udział w mechanizmie usuwania komórek zakażonych ECTV oraz komórek stanu zapalnego w śledzionie i wątrobie, które stanowią nie tylko M ϕ , ale również limfocyty, komórki dendrytyczne i hepatocyty. Natomiast w węzłach chłonnych zaobserwowana apoptoza jest mechanizmem eliminacji zakażonych M ϕ . W kontekście ograniczania rozwoju zakażenia ECTV-MOS interesująca może być również rola białek Bcl-2/Bax w ustanawianiu persystentnego zakażenia, co jednak wymaga dalszych badań.



Ryc. 2. Identyfikacja komórek Bcl-2⁺ w śledzionie (A), wątrobie (B) oraz komórek Bax⁺ w śledzionie (C), wątrobie (D) myszy BALB/c zakażonych ECTV-MOS (10 d.p.z.). Strzałkami zaznaczono komórki dodatnie

Piśmiennictwo

1. Antonsson B., Martinou J.-C.: The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell. Res.* 2000, 256, 50-57.
2. Benedict C. A., Norris P. S., Ware C. F.: To kill or be killed: viral evasion of apoptosis. *Nat. Immunol.* 2002, 3, 1013-1018.
3. Brenner M., Kroemer G.: Apoptosis. Mitochondria – the death signal integrators. *Science* 2000, 289, 1150-1151.
4. Buller M. L., Palumbo G. J.: Poxvirus pathogenesis. *Microb. Rev.* 1991, 55, 80-132.
5. Cespedes I., Toka F., Schollenberger A., Niemiłowski M. G.: Induction of Mac-1⁺ [(CD11b/CD18)_{αMB2}]⁺ cells in the spleen, but not in the lymph nodes, at peak of ectromelia orthopoxvirus infection in BALB/c (H-2^d) mice. *Centr. Eur. J. Immunol.* 2001, 26, 82-87.
6. Coligan J. E.: *Current Protocols in Immunology*. John Wiley & Sons. Nowy Jork 2003.
7. Fenner F. R., Buller R. M. L.: Mousepox, [w:] Nathanson N. (red.): *Viral Pathogenesis*. Lipincott-Raven, Filadelfia 1996, 535-553.
8. Krzyżowska M., Schollenberger A., Niemiłowski M. G.: Apoptosis during ectromelia orthopoxvirus infection is DEVD-ases dependent: in vitro and in vivo studies. *Microb. Infect.* 2002, 4, 599-611.
9. Niemiłowski M. G., Toka F. N., Malicka E., Spohr de Faundez I., Gieryńska M., Schollenberger A.: Orthopoxviruses and their immune escape. *Rev. Med. Virol.* 1997, 7, 45-47.
10. Spohr Cespedes I., Toka F. N., Schollenberger A., Gieryńska M., Niemiłowski M. G.: Pathogenesis of mousepox in H-2^d mice: evidence for MHC class I-restricted CD8⁺ and MHC class II-restricted CD4⁺ CTL antiviral activity in the lymph nodes, spleen and skin, but not in conjunctivae. *Microb. Infect.* 2001, 3, 1063-1072.
11. Spohr de Faundez I., Gieryńska M., Niemiłowski M. G., Malicka E., Popis A.: Ectromelia virus establishes a persistent infection in spleen dendritic cells and macrophages of BALB/c mice following the acute disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1995, 378, 257-261.

Adres autora: dr Małgorzata Krzyżowska, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: krzyzowska@yahoo.com