

Ekspresja białek szoku cieplnego (hsp90, hsp70 i hsp27) w komórkach mózgu myszy BALB/c zakażonych wirusem ospy myszy

JOANNA CYMERYYS, MAREK NIEMIAŁTOWSKI

Pracownia Immunologii Zakładu Wirusologii, Mykologii i Immunologii Katedry Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Cymeryys J., Niemiałtowski M.

Expression of heat shock proteins (hsp90, hsp70 and hsp27) in brain cells of BALB/c mice infected with mouse pox virus

Summary

Ectromelia virus (ECTV) is a member of the Orthopoxvirus genus of the Poxviridae family. It is a causative agent of mouse pox in genetically sensitive mice strains of H-2^d (e.g. BALB/c) and H-2^a (e.g. A, A/J) haplotypes. Mouse pox virus is a well recognized model for studying generalized viral infections in natural hosts. The aim of this study was to determine the role of heat shock proteins (namely hsp90, hsp70 and hsp27) during the replication of the Moscow strain of ECTV (ECTV-MOS) in BALB/c mice. The internal organs of mice are important sites for primary virus replication whereas ECTV penetration into the brain may seriously influence mechanisms supervising immune and nervous systems cooperation. Based on studies carried out in BALB/c mice infected with ECTV-MOS, it was found that the hsp (hsp90, hsp70 and hsp27) expression in brain cells reach peak values during the incubation period and clinical manifestation of mouse pox but the relative numbers of hsp⁺ cells in the brains decreased during the recrudescence of the infection to values observed in the control mice. The high expression of hsp (hsp90, hsp70 and hsp27) on oligodendrocytes in BALB/c mice during the incubation and clinical periods may reflect the protective action of heat shock proteins within the brain.

Keywords: ectromelia virus (ECTV), heat shock protein (hsp)

Wirus ektromelii (ectromelia virus, ECTV; wirus ospy myszy) należy do *Poxviridae*, a więc do tej samej rodziny i do tego samego rodzaju *Orthopoxvirus* co wirus ospy prawdziwej (variola virus, VARV). ECTV stanowi uznany model pozwalający poznać nowe aspekty patogenezы choroby wirusowej w zakażeniu uogólnionym. Badania prowadzone nad ortopokswirusami istotnie przyczyniły się do rozwoju wirusologii i immunologii zakażeń, pozwoliły też stwierdzić, że wiele z tych wirusów (VARV, ECTV) wywołuje poważne choroby u swoich gospodarzy, pomimo sprawnie funkcjonującego układu odpornościowego (2, 12, 15, 16, 22).

Jednym z ważnych przejawów zakażenia wirusowego, które jest oddziaływaniem stresogennym dla zakażonego organizmu/komórek, jest ekspresja białek szoku cieplnego (heat shock protein, hsp). Wykazują one bardzo dużą homologię międzygatunkową, nawet pomiędzy tak odległymi organizmami, jak bakterie i ssaki. Hsp, określane też jako molekularne przyzwitki (molecular chaperones), chronią komórki przed szkodliwymi konsekwencjami metabolicznymi i środowiskowymi (6). Ekspresję genów kodujących hsp indukuje ekspozycja komórek na liczne egzogenne i endogenne czynniki, nazywane stresorami (molecular stressor), którymi mogą być:

analogi aminokwasów, metale ciężkie, alkohole, wolne rodniki, wiele trucizn, zmiana pH środowiska, zakażenia wirusowe i bakteryjne, niedobór glukozy, cytokiny, promieniowanie UV i inne (10, 11, 13, 18). Potwierdzono udział hsp różnych rodzin w odporności przeciwwirusowej, nadal jednak nie wiadomo, czy hsp ułatwiają eliminację zakażonych komórek, czy też ich obecność chroni wirusy przed usunięciem z organizmu gospodarza. Ponadto, indukcja określonego genu hsp jest zmienna w zależności od rodzaju i natężenia bodźca, warunków, w których bodziec działa oraz od typu komórek (1, 4, 8).

U wrażliwych myszy ECTV-MOS w ciągu 24 godzin po zakażeniu namnaża się we wrotach zakażenia, tj. w skórze i regionalnych węzłach chłonnych, a następnie jest uwalniany do krwi (wiremia pierwotna) i razem z nią dociera do narządów mięsaszowych – wątroby i śledziony. Wirus namnaża się w wątrobie i śledzionie, a następnie w 5. dniu po zakażeniu (wiremia wtórna), przenosi się do narządów manifestujących (skóra, spojówki). Do rozwoju zmian skórnych dochodzi pomiędzy 10. a 15. dniem po zakażeniu. Klinicznym objawom choroby może towarzyszyć wysoka śmiertelność, szczególnie w ostrym stanie choroby w kilka dni po zakażeniu. W niniejszej pracy zastosowano dawkę wirusa powodującą rozwój

klinicznej postaci ektromelii, co miało na celu określenie związku pomiędzy indukcją hsp a fazą rozwoju choroby. Szczególną uwagę poświęcono mózgowi. Interesujące z naukowego punktu widzenia jest wyjaśnienie, czy ECTV-MOS jest w stanie pokonać barierę krew–mózg, a także jaka jest droga zakażenia mózgu i czy dochodzi do wzrostu ekspresji hsp w badanym materiale. W związku z tym celem badań przeprowadzonych na myszach BALB/c zakażonych ECTV-MOS była identyfikacja antygenów ECTV-MOS w mózgu, określenie poziomu ekspresji hsp90, hsp70 i hsp27 oraz ustalenie fenotypu komórek wykazujących ekspresję hsp90, hsp70 i hsp27 w mózgu.

Materiał i metody

Do badań używano wysoce patogenego szczepu Moscow wirusa ektromelii (ECTV-MOS) otrzymanego od dr R.M.L. Bullera z St. Louis University Health Sciences Center, St. Louis, MO, USA. Myszy szczepu Balb/c (H-2^d), genetycznie wrażliwe na zakażenie ECTV-MOS, obu płci w wieku 4-6 tygodni, pochodziły ze zwierzętarni Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie. Wszystkie doświadczenia wykonano zgodnie z zaleceniami Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for Ophthalmic and Vision Research (1995) oraz za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej w Warszawie (III Lokalna Komisja Etyczna przy SGGW, nr opinii 22/2001). Do badań myszy BALB/c dzielono na 5 grup (grupa kontrolna oraz myszy zakażone) po 5 zwierząt. Myszy zakażone ECTV-MOS zawieszonym w jałowym, buforowanym fosforanami roztworze fizjologicznym (PBS) z dodatkiem gentamycyny. Zawiesinę wirusa w dawce 0,0005 LD₅₀ podawano dostopowo w objętości 0,03 ml/kończynę.

Od 5. do 20. d.p.z., w odstępach 5-dniowych, zwierzęta uśmiercano przez przerwanie rdzenia przedłużonego, a następnie pobierano jałowo mózg. W zależności od dalszego przeznaczenia wyizolowany mózg: (i) umieszczano w zimnym (4°C), jałowym PBS bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺ (pH 7,4) z dodatkiem roztworu, zawierającego 10 000 j penicyliny, 10 mg streptomycyny, 25 µg amfoterycyny B w 1 ml (Antibiotic-antimycotic, Sigma), w ilości 1,25 ml/100 ml PBS, w celu przygotowania zawiesiny pojedynczych komórek w dalszych etapach badań, (ii) zatapiają w medium Tissue Tek OCT (Miles, Elkhart, IN, USA), zamrażano w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w -80°C do czasu wykonania ultracienkich (5 µm) skrawków mrożeniowych. Antygeny ECTV-MOS w preparatach z mózgu myszy BALB/c wykrywano metodą immunofluorescencji bezpośredniej. W tym celu skrawki mrożeniowe o grubości 5 µm z mózgu myszy Balb/c (w 5., 10., 15. i 20. d.p.z.) utrwalano w absolutnym alkoholu metylowym (-20°C przez 15 min.), a następnie inkubowano z króliczymi poliklonalnymi przeciwciałami przeciwko ECTV-FITC (FITC-r-pAb) w rozcieńczeniu 1 : 16, w 37°C przez 45 minut, po czym płukano 2 razy w PBS. Stosowano również barwienie barwnikiem Hoechst 33342 (Sigma), w stężeniu 1 µg/ml w ciągu 2-3 minut w temperaturze pokojowej, celem uwidocznienia jąder komórkowych. Preparaty oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym BX-60 (Olympus) wyposażonym w lampę HBO 200 z użyciem zielonego filtra (końcowe powiększenie × 400). Obraz analizowano za pomocą systemu MicroImage, określając odsetek komórek wykazujących fluorescencję w 10 polach widzenia trzech różnych preparatów. Identyfikację komórek ECTV-MOS⁺ na tych samych preparatach wykonano również przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego w Microbiology and Tumorbiology Center, Karolinska Institute w Sztokholmie dzięki uprzejmości dr M. Krzyżowskiej.

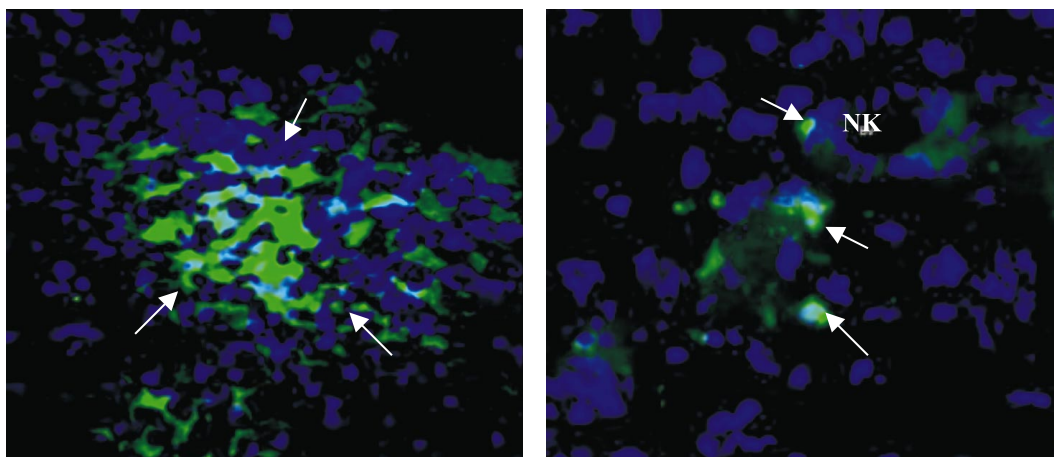
Odsetek komórek hsp90⁺, hsp70⁺ oraz hsp27⁺ w mózgu w przebiegu zakażenia ECTV-MOS myszy BALB/c określono metodą cytometrii przepływowej. W tym celu zawiesinę pojedynczych komórek utrwalano w 2% PFA w PBS (p-formaldehyd; Sigma) przez 30 minut, a następnie płukano w PBS, zawieszano w 0,2% roztworze Tween 20 w PBS i inkubowano w 37°C przez 15 minut. W kolejnym etapie płukano komórki dwukrotnie w 0,1% Tween 20 w PBS z dodatkiem 2% FBS (wirowano przy 1000 rpm w 4°C przez 5 minut). Następnie barwiono mysiami mAb IgG₁ anty-hsp90 (klon 68), anty-hsp70 (klon 7) oraz anty-hsp27 (klon G3.1.) (BD) w ilości 0,5 µg/10⁷ komórek w 4°C w ciągu 30 minut. Po kolejnym płukaniu w 0,1% roztworze Tween 20 w PBS z dodatkiem 2% FBS, do zawiesiny komórek dodano szczurze mAb przeciwko mysim IgG₁ skoniugowane z FITC (BD) w ilości 0,5 µg/10⁷ komórek i inkubowano w 4°C w ciągu 30 minut. W ostatnim etapie procedury komórki utrwalano, zawieszając je w 200 µl 1% PFA w PBS.

Identyfikację hsp90, hsp70 i hsp27 na komórkach Tau⁺ (neurony), CNP⁺ (oligodendrocyty) i GFAP⁺ (astrocyty) izolowanych z mózgu wykonano przy użyciu cytometrii przepływowej. Komórki w zawiesinie utrwalano w 2% PFA przez 30 minut, następnie po przepłukaniu w PBS zawieszano w 0,2% Tween 20 w PBS i inkubowano w 37°C przez 15 minut. W dalszym ciągu utrwalone komórki płukano dwukrotnie w 0,1% Tween 20 w PBS z dodatkiem 2% FBS i poddawano barwieniu przy użyciu króliczych mAb IgG₁ anty-hsp90α (klon 2-12), anty-hsp70, anty-hsp27 oraz anty-Tau (neurony; klon 15), anti-CNPase (oligodendrocyty; klon 11-5B) i anty-GFAP (astrocyty; klon 1B4) (BD) w ilości 0,5 µg/10⁷ komórek w 4°C przez 30 minut. Po kolejnym płukaniu do zawiesiny komórek dodano biotynylowane kozie przeciwciała poliklonalne. Analizę cytometryczną przeprowadzono w cytometrze przepływowym (Becton Dickinson FACScan) objętym systemem kontroli jakości (Cequal). Pomiaru dokonywano dla 8000 komórek zawartych w każdej próbce. Dane z cytometru analizowano przy użyciu programu CellQuest. Wykonano 4 niezależne serie badań. Badania cytometryczne przeprowadzono dzięki uprzejmości dr hab. Anny Winnickiej prof. SGGW, w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej Katedry Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW.

Każde doświadczenie wykonywano w trzech powtórzeniach, a wyniki w postaci średnich porównywano testem par wiązanych t-Studenta przy użyciu programu do analizy statystycznej SPSS 10.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Istotność statystyczną określano przy p ≤ 0,05.

Wyniki i omówienie

Antygeny wirusa zidentyfikowano w mózgu izolowanym od zwierząt w 5. d.p.z., czyli w okresie inkubacji choroby, wówczas gdy replikację wirusa stwierdza się głównie w śledzionie i wątrobie (ryc. 1). W szczycie objawów klinicznych (tj. około 15. d.p.z.) ilość antygenów wirusowych w mózgu zmniejszała się. W 20. d.p.z. w obrazie mikroskopowym mózgu nie wykazano obecności antygenów ECTV-MOS. Antygeny ECTV-MOS w mózgu znajdowano głównie w rejonach otaczających naczynia krwionośne (ryc. 1a). Wprowadzenie bariery krew–mózg uniemożliwia swobodne wnikanie leukocytów z krwi do OUN, wiadomo jednak, że wirusy mogą zakażać komórki śródbłonka naczyń, a następnie uwalniać się do przestrzeni okołonaczyniowej, gdzie wchodzą w kontakt z wypustkami astrocytów i w ten sposób zakażają komórki mikrogleju (przykładem tego jest zakażenie OUN przez HIV).



Ryc. 1. Identyfikacja metodą immunofluorescencji bezpośredniej komórek ECTV-MOS⁺ (zielone) w mózgu myszy BALB/c w 5 d.p.z. Jądra komórek (niebieskie) zostały wybarwione barwnikiem Hoechst 33342. Pow. mik. × 1000. Strzałkami oznaczono parenchymę i NK – naczynie krwionośne. Zdjęcia wykonano w Microbiology and Tumorbiology Center, Karolinska Institute, Sztokholm

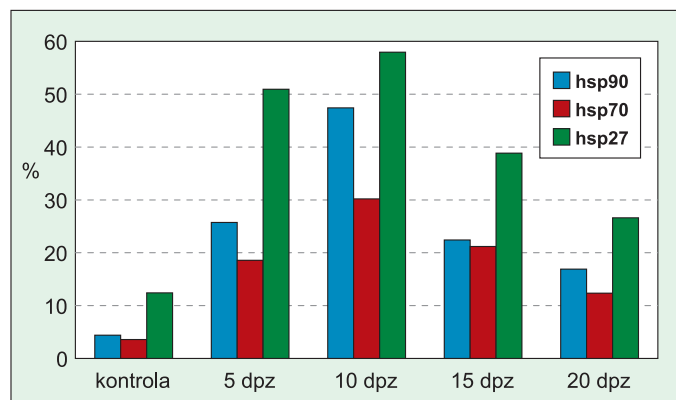
Wykorzystując metodę cytometrii przepływowej dokonano ilościowej oceny poziomu ekspresji badanych hsp w mózgu. Dane piśmiennictwa (9, 19, 20) wskazują, że ekspresja hsp wzrasta w komórkach OUN w następstwie działania wielu czynników stresogennych, dlatego można te białka uznać za doskonale markery neurotoksyczności. Zakażenie ECTV-MOS spowodowało wzrost poziomu ekspresji białek hsp90, hsp70 i hsp27 w mózgu myszy BALB/c zarówno w okresie inkubacji 5. d.p.z., jak i w fazie objawowej choroby (10. i 15. d.p.z.). Obecność ECTV-MOS w mózgu jest czynnikiem wywołującym indukcję głównie hsp27 (50% komórek pozytywnych) a w mniejszym stopniu hsp90 i hsp70. W fazie, w której obserwuje się objawy kliniczne choroby nadal w mózgu najwyższy poziom ekspresji wykazuje białko hsp27 (ponad 50%) oraz rośnie poziom hsp90 (47,41%). W czasie, gdy powinno nastąpić usuwanie wirusa z organizmu, ekspresja wszystkich badanych hsp maleje, jednak pozostaje na pewnym, ustalonym poziomie, wyższym od obserwowanego w mózgu myszy kontrolnych (tab. 1, ryc. 2). Właściwością niskocząsteczkowych hsp, w tym hsp27, jest konstytutywna ekspresja podczas różnicowania się komórek w określonych stadiach rozwoju organizmu, np.: mięśniach szkieletowych, mięśniu sercowym i mózgu (9).

Jednym z celów niniejszych badań była próba uzyskania odpowiedzi na pytanie, jakie komórki w mózgu myszy BALB/c wykazują ekspresję badanych hsp – neurony, astrocyty czy oligodendrocyty. W tym celu określono fenotyp komórek hsp⁺ w mózgu, wykorzystując markery powierzchniowe, takie jak: GFAP (astrocyty), CNP (oligodendrocyty) oraz Tau (neurony). Wykazano, że największy procent komórek hsp90⁺, hsp70⁺ i hsp27⁺ stanowiły oligodendrocyty, natomiast mniejszy procent stanowiły astrocyty i neurony. Liczba komórek CNP⁺ wykazujących ekspresję

badanych hsp osiągała największe wartości w 5. i 10. d.p.z., natomiast GFAP⁺ i Tau⁺ w 10. i 15. d.p.z., za wyjątkiem neuronów z ekspresją hsp27, których odsetek w 10. d.p.z. powrócił do poziomu obserwowanego w kontroli (ryc. 3). Podwyższona ekspresja hsp90, hsp70, hsp27 na oligodendrocytach u myszy BALB/c w okresie inkubacji choroby, a zwłaszcza w jej fazie klinicznej, sugeruje ochronne działanie białek szoku cieplnego w mózgu podczas intensywnego namnażania ECTV w organizmie.

Analizując otrzymane

wyniki można stwierdzić, że wytwarzanie hsp w mózgu towarzyszy obecności antygenów ECTV-MOS, w fazie jego namnażania się w organizmie oraz w czasie objawów klinicznych choroby. Zwiększona ekspresja hsp w mózgu towarzyszy stanom zapalnym oraz chorobom neurodegeneracyjnym, jak choroba Alzheimera, demencja związana z HIV, stwardnienie rozsiane czy choroba Parkinsona (14, 21). U osób, u których takich chorób nie stwierdzono, hsp27 znajdowało się w bardzo niewielkiej ilości, podczas gdy zmianom o charakterze neurodegeneracyjnym towarzyszyło znaczne zwiększenie ekspresji hsp27 (20). Z kolei Birnbaum i wsp. (3) wykazali,

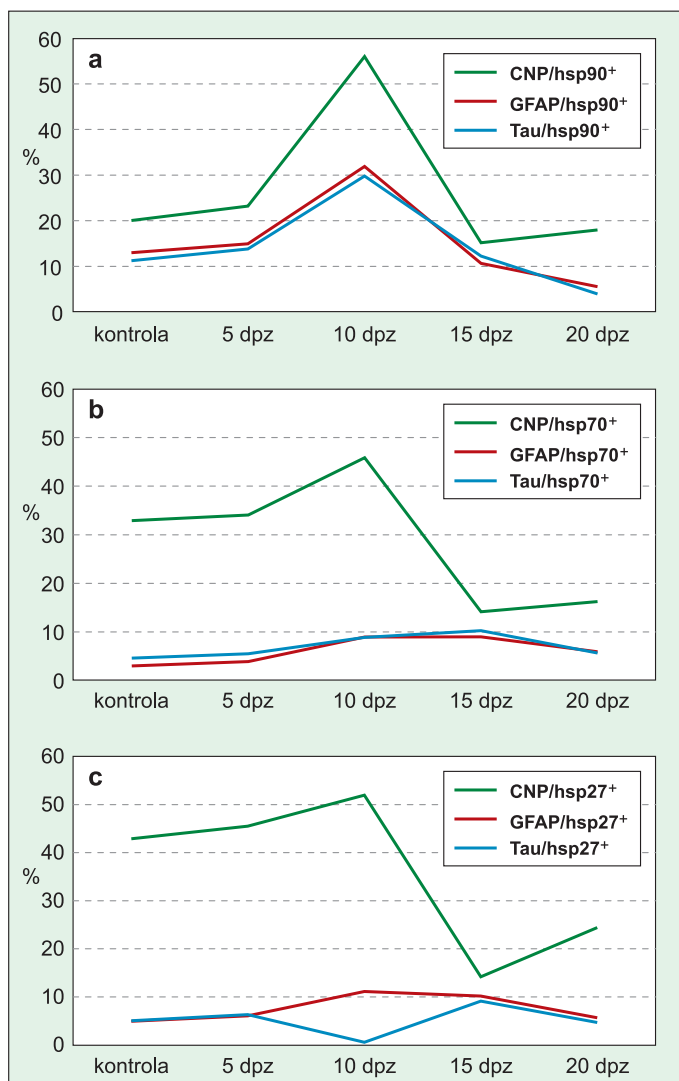


Ryc. 2. Poziom ekspresji hsp90, hsp70 i hsp27 w mózgu myszy BALB/c w przebiegu zakażenia ECTV-MOS określony metodą cytometrii przepływowej

Tab. 1. Odsetek komórek hsp90⁺, hsp70⁺ i hsp27⁺ w mózgu myszy BALB/c zakażonych ECTV-MOS określony metodą cytometrii przepływowej

Komórki	Dni po zakażeniu				
	kontrola	5 d.p.z.	10 d.p.z.	15 d.p.z.	20 d.p.z.
hsp90 ⁺	4,39 ± 0,46	*25,72 ± 7,56	*47,41 ± 8,67	*22,41 ± 7,72	16,91 ± 2,08
hsp70 ⁺	3,57 ± 0,99	*18,57 ± 3,58	30,20 ± 9,34	*21,19 ± 4,45	12,36 ± 6,55
hsp27 ⁺	12,40 ± 2,68	*50,92 ± 8,18	*57,96 ± 4,93	38,85 ± 14,87	*26,61 ± 0,35

Objaśnienia: * – zmiany istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w porównaniu do kontroli



Ryc. 3. Odsetek komórek GFAP⁺ (astrocyty), CNP⁺ (oligodendrocyty) i Tau⁺ (neurony) z ekspresją hsp90 (a), hsp70 (b) i hsp27 (c) w mózgu myszy BALB/c zakażonych ECTV-MOS określony metodą cytometrii przepływowej

że na komórkach OUN – oligodendrocytach, astrocytach i neuronach u ludzi, hsp są stale obecne, co może stanowić formę ochrony tych komórek przed czynnikami uszkodzającymi (stresogennymi). Te obserwacje zostały potwierdzone eksperymentalnie, w stosunku do HHV-1 (Human herpesvirus type 1). Porównywano skutki domózgowego zakażenia myszy HHV-1 zawierającym geny dla hsp27, które podlegały ekspresji w czasie replikacji wirusa i zakażenia HHV-1 nie zmodyfikowanym genetycznie. Konstytutywna ekspresja hsp27 zwiększała przeżywalność komórek nerwowych aż o 22-64% (19, 20), co świadczy o ochronnym działaniu tego białka na komórki podczas zakażenia wirusowego.

Dane piśmiennictwa (3, 9, 17, 19, 20) i otrzymane wyniki wskazują, że synteza hsp w OUN zależy od rodzaju komórek oraz nasilenia działania bodźca, czyli w tym przypadku intensywności replikacji wirusa. W badaniach *in vitro* w hodowli komórek glejowych wykazano, że ekspresję hsp60 obserwuje się głównie na oligodendrocytach, natomiast ekspresja hsp70 bardziej związana jest z astrocytami (5, 17). Neurony są komórkami bardzo wrażliwymi na działanie czynników wydzielanych

przez leukocyty w odpowiedzi na inwazję mikroorganizmów. Neurony syntetyzują hsp na niskim poziomie a ekspresja hsp zależy od natężenia bodźca i jego rodzaju (7, 9, 19, 20). Przykładowo wykazano, że w 43°C neurony zaczynają syntetyzować hsp70 po 2 h, a następnie przez 6 h notowana jest silna odpowiedź, z maksymalną akumulacją hsp70 po 24 h. W 45°C po 2 godz. nie obserwowano syntezy hsp70, zaś po 4-6 godz. pojawia się odpowiedź, taka jak w temperaturze 43°C. W warunkach fizjologicznych oraz w sytuacjach patologicznych prawidłowe funkcjonowanie komórek nerwowych jest zależne od tkanki glejowej, czyli od astrocytów, oligodendrocytów i mikrogleju.

Piśmiennictwo

1. Agostini I., Popov S., Li J., Dubrovski L., Hao T., Bukrinsky M.: Heat-shock protein 70 replace viral protein R of HIV-1 during nuclear import of the viral preintegration complex. *Exp. Cell Res.* 2000, 259, 398-403.
2. Baś M., Faundez R., Spohr I., Cywińska A., Niemiętowski M.: Studies on spermatozoa morphology and acrosomal reaction in-vitro during experimental mousepox in BALB/c mice. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 113-224.
3. Birnbaum G., Kotilinek L.: Immunity to heat shock proteins and neurological disorders of women. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 1999, 7, 39-48.
4. Brenner B. G., Wainberg M. A.: Heat shock protein – based therapeutic strategies against human immunodeficiency virus type-1. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 1999, 7, 80-90.
5. Clark B. D., Brown I. R.: Axonal transport of a heat shock protein in rabbit visual system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985, 82, 1281-1285.
6. Cymerys J., Niemiętowski M.: Białka szoku cieplnego – molekularne perpetuum mobile. *Post. Biol. Kom.* 2004, 31, 331-352.
7. Feder J. H., Rossi J. M., Solomon J., Solomon N., Lindquist S.: The consequences of expressing hsp70 in *Drosophila* cells at normal temperatures. *EMBO J.* 1992, 11, 2357-2364.
8. Glotzer J. B., Saltik M., Chiocca S., Michpu A., Moseley P., Cotten M.: Activation of heat shock response by adenovirus is essential for virus replication. *Nature* 2000, 407, 207-211.
9. Hitotsumatsu T., Iwaki T., Fukui M., Tateishi J.: Distinctive immunohistochemical profiles of small heat shock proteins (Heat Shock Protein 27 and α B-Crystallin) in human brain tumors. *Cancer* 1996, 77, 352-361.
10. Jäättelä M.: Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann. Med.* 1999, 31, 261-271.
11. Jakubowicz-Gil J., Gawron A.: Rozmieszczenie i rola białek szoku termicznego w komórce zwierzęcej. *Post. Biol. Kom.* 1999, 26, 267-283.
12. Krzyżowska M., Polańczyk M., Baś M., Cymerys J., Schollenberger A., Chiodi F., Niemiętowski M.: Mousepox conjunctivitis: the role of Fas/FasL mediated apoptosis of epithelial cells in virus dissemination. *J. Gen. Virol.* 2005, 86.
13. Lisowska K., Krawczyk Z.: Rodzina genów stresu hsp70 ssaków. *Post. Biochem.* 1998, 44, 179-192.
14. Mocario A. J., Conway de Macario E.: Stress and molecular chaperones in disease. *Int. Clin. Lab. Res.* 2000, 30, 49-66.
15. Niemiętowski M., Toka F., Malicka E., Spohr de Faundez I., Gieryńska M., Schollenberger A.: Orthopoxviruses and their immune escape. *Rev. Medical Virol.* London 1997, 7, 35-47.
16. Niemiętowski M. G., Spohr de Faundez I., Gieryńska M., Malicka E., Toka F. N., Schollenberger A., Popis A.: The inflammatory and immune response to mousepox (infectious ectromelia) virus. *Acta Virol.* 1994, 38, 299-307.
17. Nishimura R. N., Dwyer B. E.: Evidence for different mechanisms of induction of HSP70i: a comparison of cultured rat cortical neurons with astrocytes. *Mol. Brain Res.* 1996, 36, 227-239.
18. Porankiewicz J., Gwóźdź E. A.: Białka szoku termicznego i ich rola w komórkach roślinnych. *Post. Biol. Kom.* 1993, 20, 155-170.
19. Rajdev S., Sharp F. R.: Stress proteins as molecular markers of neurotoxicity. *Toxicol. Pathol.* 2000, 28, 105-112.
20. Renkawek K., Stege G. J. J., Bosman G. J.: Dementia, gliosis and expression of the small heat shock proteins hsp27 and α B-crystallin in Parkinson's disease. *NeuroRaport* 1999, 10, 2273-2276.
21. Shinnick T. M.: Heat shock proteins as antigens of bacterial and parasitic pathogens. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2001, 167, 145-160.
22. Spohr de Faundez I., Gieryńska M., Niemiętowski 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, [w:] Bancheau J., Schmitt D.: Dendritic cells in fundamental and clinical immunology. Plenum Press, New York 1995, 2, 257-261.

Adres autora: dr Joanna Cymerys, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: jeymerys@op.pl