



Характеристика В1-клеток в процессе экспериментального лейкомогенеза

Ездакова И.Ю., Капустина О.В., Гулюкин М.И., Степанова Т.В.

ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук». 109428, г. Москва, Россия

Введение. Вирус лейкоза крупного рогатого скота (КРС) вызывает значительную поликлональную экспансию CD5⁺, IgM⁺ В-лимфоцитов, известных как персистирующий лимфоцитоз приблизительно у 30% заражённого КРС. Однако пока не ясно, что происходит с данной субпопуляцией В-клеток в ранний период инфицирования животных.

Цель исследования – количественная характеристика IgM⁺ и CD5⁺ В-клеток в процессе иммунного ответа на заражение вирусом лейкоза крупного рогатого скота (BLV), которая может дать важную информацию о механизмах прайминга лимфоцитов при инфицировании BLV.

Материал и методы. В эксперименте использовали BLV-отрицательных телят чёрно-пёстрой породы в возрасте 8 мес ($n = 11$). Животным опытной группы ($n = 8$) внутривенно вводили кровь BLV-положительной коровы. Телятам контрольной группы ($n = 3$) вводили физиологический раствор. Исследования проводили до и после заражения на 5, 7, 14, 21, 28 и 65-е сутки иммунного ответа. Количество В-лимфоцитов в крови определяли методом иммунопероксидазного окрашивания на основе моноклональных антител к IgM и CD5.

Результаты. В результате проведённых исследований установлено, что уровень CD5⁺ В-клеток повышается на 14-е сутки первичного иммунного ответа, характеризующегося поликлональной пролиферацией CD5⁺ В-клеток, которые являются первичной мишенью для BLV. Данные исследований подтверждают, что в лимфоцитах экспериментально заражённого КРС поверхностная агрегация молекул IgM и CD5 на В-лимфоцитах отсутствует.

Обсуждение. Известно, что именно от субпопуляции В1-клеток зависит волнообразный характер синтеза IgM, который был показан в предыдущих исследованиях. После 7-х суток иммунного ответа показатели IgM⁺- и CD5⁺-клеток не коррелируют, что показывает их функциональное различие. Возможно, увеличение числа CD5⁺-клеток связано не с В-клетками, а с дифференцирующимися под влиянием вируса Т-лимфоцитами.

Выводы. Субпопуляция В1-клеток является первичной мишенью вируса лейкоза КРС. 65-е сутки иммунного ответа характеризуются экспансией IgM⁺ В-клеток, снижением числа CD5⁺-клеток и равномерным распределением рецепторов по периметру клеток.

Ключевые слова: вирус лейкоза крупного рогатого скота; В-клетки; моноклональные антитела; иммуноглобулин М; иммунопероксидажное окрашивание; рецепторы клеток.

Для цитирования: Ездакова И.Ю., Капустина О.В., Гулюкин М.И., Степанова Т.В. Характеристика В1-клеток в процессе экспериментального лейкомогенеза. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(1): 35-40.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-35-40>

Для корреспонденции: Ездакова Ирина Юрьевна, д-р биол. наук, зав. лабораторией иммунологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, 109428, г. Москва. E-mail: ezdakova.i@viev.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Гулюкин М.И., Ездакова И.Ю.; сбор и обработка материала – Капустина О.В., Ездакова И.Ю., Степанова Т.В.; статистическая обработка – Ездакова И.Ю.; написание текста – Ездакова И.Ю.

Поступила 23.01.20
Принята в печать 29.01.20

Characterization of B1-cells during experimental leukomogenesis

Ezdakova I.Yu., Kapustina O.V., Gulyukin M.I., Stepanova T.V.

All-Russian Scientific and Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Scriabin and Ya.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 109428, Russia

Background. Bovine leukemia causes a significant polyclonal expansion of CD5⁺, IgM⁺ B lymphocytes, known as persistent lymphocytosis (PL), in approximately 30% of infected cattle. However, it is not yet clear what happens to this subpopulation of B cells in the early period of infection of animals.

Purpose. Quantitative characterization of IgM⁺ and CD5⁺ B cells during the immune response, which can provide important information on the mechanisms of lymphocyte priming in BLV infection.

Material and methods. The experiment used BLV-negative calves of black-motley breed at the age of 8 months ($n = 11$). Animals ($n = 8$) were intravenously injected with blood of a BLV-positive cow. Control calves ($n = 3$) were injected with saline. Studies were performed before and after infection on days 5, 7, 14, 21, 28 and 65 of the immune response. The determination of the number of B-lymphocytes in the blood was carried out by the method of immunoperoxidase staining based on monoclonal antibodies to IgM, CD5.

Results. As a result of the studies, it was found that the level of CD5⁺ B cells increases on the 14th day of the primary immune response, characterized by polyclonal proliferation of CD5⁺ B cells, which are the primary target for BLV. Our research data confirm that in the lymphocytes of experimentally infected cattle, surface aggregation of IgM and CD5 molecules on B-lymphocytes is absent.

Discussion. It is known that the wave-like nature of IgM synthesis, which was shown in previous studies, depends on a subpopulation of B1 cells. After 7 days of the immune response, IgM⁺ and CD5⁺ cells do not correlate, which shows their functional difference. The increase in CD5⁺ cells is probably not associated with B cells, but with T cells differentiating under the influence of the virus.

Conclusions. A subset of B1 cells is the primary target of cattle leukemia virus. The 65th day of the immune response is characterized by the expansion of IgM⁺ B cells, a decrease in the number of CD5⁺ cells and a uniform distribution of receptors around the perimeter of the cells.

Keywords: BLV; B cells; monoclonal antibodies; immunoglobulin M; immunoperoxidase staining; cell receptors.

For citation: Ezdakova I.Yu., Kapustina O.V., Gulyukin M.I., Stepanova T.V. Characterization of B1-cells during experimental leukomogenesis. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2020; 65(1): 35-40. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-35-40>

For correspondence: Irina Yu. Ezdakova, Doctor of Biological Sciences, Head Laboratory of Immunology, Federal Scientific Centre VIEV, Moscow, 109428, Russia. E-mail: ezdakova.i@viev.ru

Information about authors:

Ezdakova I.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8467-4920>

Kapustina O.V., <https://orcid.org/0000-0002-7382-8656>

Gulyukin M.I., <https://orcid.org/0000-0002-7489-6175>

Stepanova T.V., <https://orcid.org/0000-0001-9092-8045>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Contribution: the concept and design of the study – Gulyukin M.I., Ezdakova I.Yu.; collection and processing of material – Kapustina O.V., Ezdakova I.Yu., Stepanova T.V.; statistical processing – Ezdakova I.Yu.; writing a text – Ezdakova I.Yu. .

Received 23 January 2020

Accepted 29 January 2020

Введение

Вирус лейкоза крупного рогатого скота (BLV) – один из наиболее распространённых патогенов молочного скота. BLV передаётся горизонтально между животными при контакте с биологическими жидкостями, содержащими инфицированные клетки, особенно с кровью и молоком. Также инфицирование может быть связано с травмой, загрязнёнными хирургическими инструментами и насекомыми (гематофаги), которые служат механическими переносчиками вируса. Чаще всего передача происходит от матери к потомству при выпойке молозивом и молоком от коров с высокой вирусной нагрузкой. Приблизительно у 30% зараженного крупного рогатого скота (КРС) в итоге развивается стойкий лимфоцитоз (постоянно больше 7500 лимфоцитов в 1 мкл крови), который обычно не имеет очевидных клинических признаков. У 1–3% инфицированных животных развивается лимфосаркома в возрасте 4–8 лет.

Несмотря на низкую частоту развития клинических признаков у КРС, заражённого BLV, инфекция может привести к экономическим потерям в результате выбраковки высокопродуктивных молочных коров [1]. Лейкоз КРС снижает как долголетие животных, так и выработку молока, и может нарушать иммунный статус. При высокой распространённости BLV в молочных стадах важно понимать механизмы патогенеза, при которых вирус отрицательно влияет на иммунную систему заражённого животного [2]. Известно, что вирус вне клетки менее инфекционен, чем вирус, связанный с клетками крови, поскольку BLV использует межклеточные контакты для передачи информации между инфицированными клетками и неинфицированными клетками-мишенями, которыми являются В-клетки [3, 4]. Для выявления субклинического прогрессирования инфекции BLV более эффективно

определение относительного количества В-клеток, нежели абсолютного количества лимфоцитов [5].

Несмотря на большое количество исследований в данной области, многие механизмы адаптивного клеточного иммунного ответа до сих пор неизвестны [6, 7]. Процесс проникновения вируса в клетку пока до конца не ясен. Некоторые авторы полагают, что вирусные белки нарушают внутриклеточные сигнальные пути [8, 9]. Большинство известных в настоящее время поверхностных белков суперсемейства иммуноглобулинов, в том числе трансмембранный мономер молекулы иммуноглобулина М (IgM), являются рецепторами контактного взаимодействия клеток, которые трансформируют антигенные сигналы в определённые клеточные реакции. Связывание рецептора с его лигандом сопровождается не только изменением конфигурации поверхностного белка, но и его латеральной диффузией [10]. Топография поверхности В-клеток модулирует активацию сигнального пути. Липидные рафты играют важную роль в передаче сигнала В-клеткам, способствуя локализации В-клеточного антигенного рецептора (BCR), ограничению его подвижности и образованию сигнальных комплексов. BCR, распознавший антиген, вместе с белками главного комплекса гистосовместимости класса II кластеризуется и скрепляется актиновыми нитями со стороны цитоплазмы. В результате на мембране В-клетки могут собираться рецепторы в форме «ринг» (равномерное распределение в плоскости мембраны), «пэтч» (неравномерное распределение), «кэп» (скопление на одном из полюсов клетки) с последующим погружением в цитоплазму (эндоцитоз).

В проведённых ранее экспериментах установлено, что основной формой локализации Ig-рецепторов В-клеток крови КРС является «пэтч»/эндоцитоз (68,9%) [11]. Развитие этой популяции лимфоцитов

зависит от экспрессии рецептора В-клеток для антигена (BCR), сформированного из молекул IgM и CD79. Предшественники В-клеток могут впоследствии проходить продуктивную реаранжировку генов лёгких цепей, чтобы стать IgM⁺ В-клетками. В формировании рецептора В-клеток (BCR) принимают участие три компонента: мономер IgM и два полипептида – Igα, Igβ (CD79). В цитоплазме пре-В-клеток обнаруживается тяжёлая μ-цепь IgM. Наивная В-клетка на своей поверхности экспрессирует полные молекулы данного иммуноглобулина. Циркулирующая фолликулярная и экстра-фолликулярная В-клетки также несут на своей мембране IgM.

В настоящее время обсуждаются эксперименты, показавшие, что у популяции IgM⁺ В-клеток инфицированных животных изменяется механизм передачи сигналов и они приобретают устойчивость к апоптозу, что вызывает экспансию В-клеток. Связывание антигена В-клетками инициирует диффузию BCR в мембранные микродомены, обогащённые сфинголипидами и холестерином, называемые липидными рафтами. Липидные рафты включают представителей киназ семейства Src и исключают некоторые фосфатазы. Включение BCR в липидные рафты играет важную роль в регуляции ранних сигнальных событий и последующей интернализации антигена. Известно, что BLV вызывает значительную поликлональную экспансию CD5⁺, IgM⁺ В-лимфоцитов, известных как персистирующий лимфоцитоз приблизительно у 30% заражённого КРС [12]. Однако пока не ясно, что происходит с данной субпопуляцией В-клеток в ранний период инфицирования животных. Поэтому целью исследований была количественная характеристика субпопуляций IgM⁺ и CD5⁺-В-клеток в процессе иммунного ответа на заражение BLV, которая может дать важную информацию о механизмах прайминга лимфоцитов при инфицировании BLV.

Материал и методы

В эксперименте использовали BLV-отрицательных телят чёрно-пёстрой породы в возрасте 8 мес ($n = 11$). Вся работа с лабораторными животными проводилась в соответствии с приказом Минздрава России от 19.06.2003 № 267 «Правила лабораторной практики в Российской Федерации». Животным опытной группы ($n = 8$) внутривенно вводили кровь BLV-положительной коровы. Телятам контрольной группы ($n = 3$) вводили физиологический раствор. Исследования проводили до и после заражения на 5, 7, 14, 21, 28 и 65-е сутки иммунного ответа. Лимфоциты крови выделяли методом центрифугирования в градиенте плотности Histopaque-1077 при 3000 об/мин в течение 45 мин. Концентрацию мононуклеарных клеток в суспензии доводили до $1,0-0,5 \cdot 10^6$ кл/мл. Количество В-лимфоцитов в крови определяли методом иммунопероксидазного окрашивания на основе моноклональных антител к IgM CD5.

Для удаления экзогенных иммуноглобулинов 100 мкл взвеси мононуклеарных клеток крови обрабатывали 1% раствором лимонной кислоты

в течение 1 мин, центрифугировали 5-кратно в фосфатном буфере (pH 7,2) при 1100 об/мин по 5 мин. Взвесь клеток фиксировали этанолом на предметном стекле. Блокаду пероксидазы проводили 1% раствором перекиси водорода в течение 10 мин. В качестве блокирующего раствора использовали 10% раствор сыворотки крови лошади. Инкубировали 60 мин при комнатной температуре и тщательно отмывали клетки фосфатным буфером (pH 7,2). К фиксированным клеткам добавляли моноклональные антитела к IgM рогатого скота (1 : 400). Затем добавляли антивидовой конъюгат в рабочем разведении (1 : 1500). Для визуализации комплекса антиген/антитело использовали 3-амино-9-этилкарбазол (АЕС; Sigma, США). АЕС-позитивные клетки идентифицировали по красно-коричневому окрашиванию при просмотре препаратов под микроскопом ($\times 1000$). Статистическую обработку выполняли с использованием стандартных программ SPSS – Statistical package for the social sciences. Уровень значимости вариационных рядов оценивали с использованием параметрического *t*-критерия Стьюдента.

Результаты

В результате проведённых исследований установлено, что корреляционная связь показателей субпопуляций В-клеток с фенотипом IgM⁺ и CD5⁺ имеет среднюю степень сопряжённости ($r = 0,61$). Это показывает относительную независимость данных субпопуляций.

Как видно на рис. 1, уровень CD5⁺ В-клеток повышается на 14-е сутки первичного иммунного ответа, характеризующегося поликлональной пролиферацией CD5⁺ В-клеток, которые являются первичной мишенью для BLV.

Поскольку большинство CD5⁺ В-клеток содержат провирус [13, 14], повышение их уровня усиливает передачу вируса через кровь от инфицированных к здоровым животным. Персистирующий лейкоцитоз также является предиктором позднего развития лимфомы, состоящей в основном из CD5⁺ В-клеток. Следовательно, повышение CD5⁺-субпопуляции имеет решающее значение для передачи и прогрессирования лейкомогенеза.

В предыдущих исследованиях было установлено, что к 7-м суткам иммунного ответа уровень IgM-специфических антител увеличивался, а это соответствует повышению относительного количества IgM⁺ CD5⁺ В-клеток [15]. После 7-х суток субпопуляционная характеристика первичного иммунного ответа изменяется. Уровень CD5⁺-лимфоцитов увеличивается, а относительное количество IgM⁺ В-клеток уменьшается, но к 65-м суткам опять возрастает. У КРС молекула CD5 конститутивно диссоциирует от мембранного IgM, что связано с защитой от апоптоза после передачи антигенного сигнала. Кроме того, экспериментальная диссоциация молекулы CD5 и BCR В-клеток у BLV-отрицательного КРС снижает BCR-стимулируемый апоптоз [16]. Возможно, что увеличение с 7-х суток иммунного ответа окрашенных анти-CD5⁺ антител

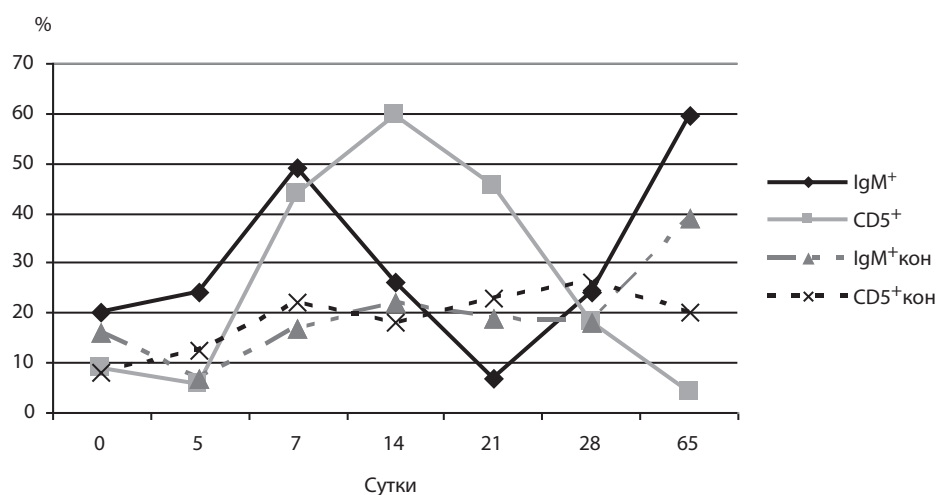


Рис. 1. Динамика количества IgM⁺ и CD5⁺ В-клеток.

По оси абсцисс – сроки отбора проб крови у опытной и контрольной групп телят, сут; по оси ординат – относительное количество IgM⁺- и CD5⁺-клеток опытной и контрольной групп телят, %.

Fig. 1. Dynamics of the number of IgM⁺ and CD5⁺ B cells.

The abscissa shows the time (day) of blood sampling in the experimental and control groups of calves. The ordinate shows the relative number (%) of IgM⁺ and CD5⁺ cells of the experimental and control groups of calves.

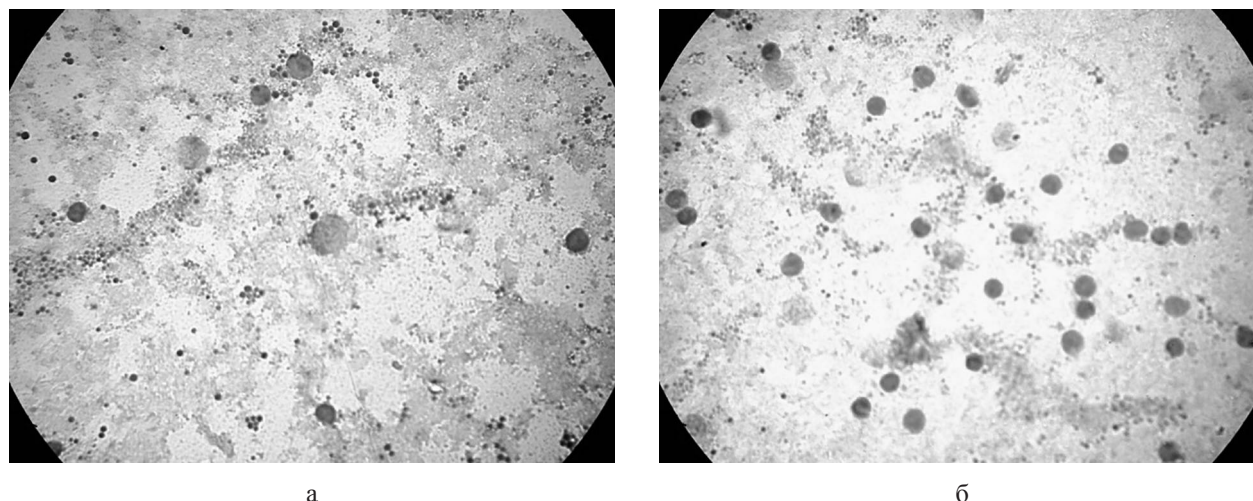


Рис. 2. IgM⁺ В-клетки на 5-е (а) и 65-е (б) сутки после экспериментального заражения BLV.

Имунопероксидазное окрашивание, ×1000.

Fig. 2. IgM⁺ B cells on days 5 (a) and 65 (b) after experimental infection with BLV.

Immunoperoxidase staining, × 1000.

ми клеток не связано с В-клетками, а характеризует пролиферацию Т-клеток, так как молекула CD5 является дифференцировочным маркером Т-лимфоцитов.

На микрофотографиях (рис. 2) показано увеличение числа IgM⁺ В-клеток на 65-е сутки после заражения по сравнению с количеством этих клеток на 5-е сутки после введения BLV, что характерно для поликлональной экспансии IgM⁺ В-клеток при лейкозе КРС.

Недавние исследования показали, что ранняя регуляция ответа BCR на антиген, вероятно, контролируется путём проникновения BCR в специфические мембранные микродомены (липидные рафты). Липидные рафты концентрируют сигнальные молекулы

IgM, Iga и Igβ в непосредственной близости от ранних сигнальных киназ после стимуляции антигеном (кэппинг-эффект).

В незрелых и толерантных В-клетках с более высокой поверхностной экспрессией CD5 после стимуляции происходит исключение BCR из липидных рафтов. То же происходит при лейкомогенезе, когда вирус ограничивает транслокацию в мембране и интернализацию в цитоплазму В-клеточного рецептора, в который входит IgM.

Пространственная координация мономера IgM внутри липидных рафтов играет важную роль в регуляции сигнальных путей в клетке. В настоящее время

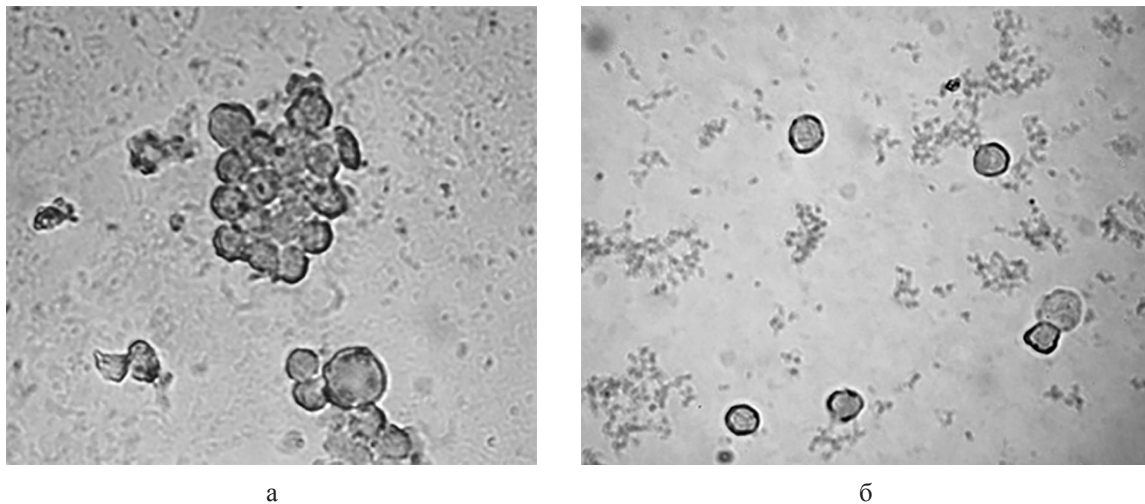


Рис. 3. IgM⁺ В-клетки (а) и CD5⁺-клетки (б) крови телят на 65-е сутки иммунного ответа. Иммунопероксидазное окрашивание, ×1000.

Fig. 3. IgM⁺B cells (a) and CD5⁺ blood cells (b) of calves on the 65th day of the immune response. Immunoperoxidase staining, × 1000.

обсуждается вопрос о том, что наблюдаемые различия в результатах передачи сигналов BCR в изменённых вирусом В-клетках КРС можно объяснить неспособностью В-клеток у КРС с персистирующим лимфоцитозом формировать плотную агрегацию IgM на плазматической мембране после стимуляции антигеном. Данные наших исследований подтверждают, что в лимфоцитах экспериментально заражённого КРС поверхностная агрегация молекул IgM и CD5 практически отсутствует (рис. 3). На микрофотографиях видно, что IgM⁺ В-клетки и CD5⁺-клетки окрашены по периметру в форме «ринг» без кэппинг-эффекта поверхностных рецепторов.

Обсуждение

Одним из отличительных признаков лейкомогенеза у животных является спонтанная пролиферация мононуклеарных клеток периферической крови, в основном В-лимфоцитов. Результаты наших исследований показали ассоциацию экспрессии поверхностных молекул IgM и CD5 в В-клетках крови экспериментально заражённых телят до 7-х суток иммунного ответа. Данные маркёры характерны для субпопуляции В1-клеток, которая является первичной мишенью для BLV. Эти лимфоциты предназначены для быстрого реагирования на наиболее распространённые антигены клеточных стенок бактерий в приборьерных полостях.

Естественные антитела, секретируемые В1-клетками, – это IgM и IgA, которые играют важную роль в противомикробной защите организма. Антитела, продуцируемые В1-лимфоцитами, преимущественно специфичны к тимуснезависимым антигенам. По нашему мнению, именно от этой субпопуляции В-клеток зависит волнообразный характер синтеза IgM, который был показан в предыдущих исследованиях. После 7-х суток иммунного ответа показатели IgM⁺- и CD5⁺-клеток не коррелируют, что показыва-

ет их функциональное различие. Возможно, увеличение числа CD5⁺-клеток связано не с В-клетками, а с дифференцирующимися под влиянием вируса Т-лимфоцитами [17, 18]. Для динамики IgM⁺ В-клеток характерно как повышение, так и уменьшение их числа в течение 2 мес наблюдения, что, вероятно, связано с влиянием вирусных белков на функциональную активность инфицированной клетки. Как было установлено, включение В-клеточного рецептора, составной частью которого является трансмембранный мономер IgM, в липидные рафты играет важную роль в регуляции сигналов и последующей интернализации антигена. Вирусные белки также могут влиять на процессы, происходящие в липидных рафтах [19]. Так, исключение BCR из липидных рафтов может частично объяснить различия в передаче сигналов, наблюдаемых между В-клетками BLV-инфицированного и BLV-отрицательного КРС. Наши результаты подтверждают эти исследования. Было показано, что через 2 мес после введения BLV рецепторы IgM и CD5 равномерно распределены по мембране клетки без образования «кэпов». Возможно, BLV, замедляя диффузию рецепторов в мембране клетки, таким образом блокирует апоптоз.

Выводы

1. Увеличение количества В-клеток с фенотипом IgM⁺/CD5⁺ в 1-е сутки иммунного ответа на введение BLV показывает, что субпопуляция В1-клеток является первичной мишенью BLV.
2. Повышение уровня CD5⁺-клеток на 14-е сутки иммунного ответа, вероятно, происходит за счёт Т-клеток в стадии дифференцировки.
3. Второй месяц иммунного ответа характеризуется экспансией IgM⁺ В-клеток, снижением числа CD5⁺-клеток и равномерным распределением рецепторов по периметру клеток.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-9, 12-14, 16-19)
 см. REFERENCES

10. Ездакова И.Ю., Капустина О.В., Попова Е.В. Модуляция Ig-рецепторов В-клеток крови крупного рогатого скота. *Морфология*. 2019; 156(6): 93-4.
 11. Попова Е.В., Ездакова И.Ю. Иммуноглобулиновые рецепторы В-лимфоцитов животных. *Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко*. 2015; 78: 199-206.
 15. Гулюкин М.И., Капустина О.В., Ездакова И.Ю., Вальциферова С.В., Степанова Т.В., Аноятбеков М. Выявление специфических антител классов G и M к вирусу лейкоза крупного рогатого скота в сыворотках крови. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(4): 173-7.
 DOI: <http://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-173-177>
- REFERENCES**
1. Bartlett P.C., Norby B., Byrem T.M., Parmelee A., Ledergerber J.T., Erskine R.J. Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds. *J. Dairy Sci.* 2013; 96(3): 1591-7.
 DOI: <http://doi.org/10.3168/jds.2012-5930>
 2. Frie M.C., Sporer K.R., Wallace J.C., Maes R.K., Sordillo L.M., Bartlett P.C., et al. Reduced humoral immunity and atypical cell-mediated immunity in response to vaccination in cows naturally infected with bovine leukemia virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2016; 182: 125-35.
 DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.10.013>
 3. Florins A., Boxus M., Vandermeers F., Verlaeten O., Bouzar A.B., Defoiche J., et al. Emphasis on cell turnover in two hosts infected by bovine leukemia virus: A rationale for host susceptibility to disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2008; 125(1-2): 1-7.
 DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.04.007>
 4. Brym P., Rušć A., Kamiński S. Evaluation of reference genes for qRT-PCR gene expression studies in whole blood samples from healthy and leukemia-virus infected cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2013; 153(3-4): 302-7.
 DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.03.004>
 5. Mayr B., Vogel I., Graninger W., Schlerka G., Wöckl F., Schlegler W. Circulating immune cells and immune complexes in peripheral blood of healthy and of bovine leukemia virus-infected cows and lymphosarcomatous calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1982; 3(5): 475-84.
 DOI: [http://doi.org/10.1016/0165-2427\(82\)90013-7](http://doi.org/10.1016/0165-2427(82)90013-7)
 6. Murakami K., Sentsui H., Inoshima Y., Inumaru S. Increase in gammadelta T cells in the blood of cattle persistently infected with bovine leukemia virus following administration of recombinant bovine IFN-gamma. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2004; 101(1-2): 61-71.
 DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.04.016>
 7. Usui T., Konnai S., Ohashi K., Onuma M. Expression of tumor necrosis factor- α in IgM+ B-cells from bovine leukemia virus-infected lymphocytotic sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2006; 112(3-4): 296-301.
 DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.03.002>
 8. Frie M.C., Coussens P.M. Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2015; 163(3-4): 103-14.
 DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.11.014>
 9. Murakami K., Inumaru S., Yokoyama T., Okada K., Sentsui H. Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptor on B-1a cell from persistent lymphocytosis (PL) cows and lymphoma cell induced by bovine leukemia virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1999; 68(1): 49-59.
 DOI: [http://doi.org/10.1016/s0165-2427\(99\)00011-2](http://doi.org/10.1016/s0165-2427(99)00011-2)
 10. Ezbekova I.Yu., Kapustina O.V., Popova E.V. Modulation of bovine B-cell Ig receptors. *Morfologiya*. 2019; 156(6): 93-4. (in Russian)
 11. Popova E.V., Ezbekova I.Yu. Immunoglobulin receptors of animal B-lymphocytes. *Trudy Vserossiyskogo NII eksperimental'noy veterinarii im. Ya.R. Kovalenko*. 2015; 78: 199-206. (in Russian)
 12. Murakami H., Todaka H., Uchiyama J., Sato R., Sogawa K., Sakaguchi M., et al. A point mutation to the long terminal repeat of bovine leukemia virus related to viral productivity and transmissibility. *Virology*. 2019; 537: 45-52.
 DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virol.2019.08.015>
 13. Mirsky M.L., Olmstead C.A., Da Y., Lewin H.A. The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages infection. *J. Virol.* 1996; 70(4): 2178-83.
 14. Juliarena M.A., Barrios C.N., Ceriani C.M., Esteban E.N. Hot topic: Bovine leukemia virus (BLV)-infected cows with low proviral load are not a source of infection for BLV-free cattle. *J. Dairy Sci.* 2016; 99(6): 4586-9.
 DOI: <http://doi.org/10.3168/jds.2015-10480>
 15. Gulyukin M.I., Kapustina O.V., Ezbekova I.Yu., Val'tsiferova S.V., Stepanova T.V., Anoyatbekov M. Detection of specific antibodies of classes G and M to bovine leukemia virus in the blood serum. *Voprosy virusologii*. 2019; 64(4): 173-7.
 DOI: <http://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-173-177> (in Russian)
 16. Cantor C.H., Pritchard S.M., Dequiedt F., Willems I., Kettmann R., Davis W.C. CD5 is dissociated from the B-cell receptor in B cells from BLV-infected, PL cattle: consequences to B-cell receptor-mediated apoptosis. *J. Virol.* 2001; 75(4): 1689-96.
 DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.75.4.1689-1696.2001>
 17. Gillet N., Florins A., Boxus M., Burteau C., Nigro A., Vandermeers F., et al. Mechanisms of leukemogenesis induced by BLV: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*. 2007; 4: 18.
 DOI: <http://doi.org/10.1186/1742-4690-4-18>
 18. Suzuki S., Konnai S., Okagawa T., Ikebuchi R., Nishimori A., Kohara J., et al. Increased expression of the regulatory T cell-associated marker CTLA-4 in bovine leukemia virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2015; 163(3-4): 115-24.
 DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.10.006>
 19. Hamilton V.T., Stone D.M., Cantor G.H. Translocation of the B cell receptor to lipid rafts is inhibited in B cells from BLV-infected, persistent lymphocytosis cattle. *Virology*. 2003; 315(1): 135-47.
 DOI: [http://doi.org/10.1016/s0042-6822\(03\)00522-1](http://doi.org/10.1016/s0042-6822(03)00522-1)