

## 4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных (биологические науки)

doi 10.18286/1816-4501-2024-3-125-132

УДК: 619:616.937.5

## Уровни экспрессии и формы локализации рецепторов В-клеток в крови овец

А. Г. Григорьев✉, младший научный сотрудник лаборатории иммунологии

И. Ю. Ездакова, доктор биологических наук, заведующая лабораторией иммунологии

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

109428, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, корпус 1

✉artemprotos@yandex.ru

**Резюме.** В работе проведена оценка уровней экспрессии и форм локализации рецепторов В1-клеток в крови овец в норме и при экспериментальном заражении вирусом лейкоза крупного рогатого скота (BLV). Для выявления В1-клеток использовали прямой и непрямой методы иммунопероксидазного окрашивания (ИПО) на основе моноклональных антител (МкА) к slgM-рецептору рогатого скота и на основе МкА к CD5-рецептору человека. Исследования проводили в период с 2018 по 2023 гг. в животноводческом комплексе Московской области. В ходе экспериментального заражения BLV, в сравнении с установленной нормой, у взрослых и молодых овец выявлена сильная иммуносупрессия slgM- и CD5-лимфоцитов на 7-е сутки ( $4,4 \pm 1,5\%$  и  $2,8 \pm 1,0\%$ , а также  $6,2 \pm 1,5\%$  и  $8,4 \pm 2,5\%$  соответственно), а также на 7-й месяц ( $2,4 \pm 0,5\%$  и  $4,1 \pm 1,0\%$ , а также  $6,1 \pm 2,0\%$  и  $5,0 \pm 1,0\%$  соответственно) инфекционного процесса. На 1-е сутки иммунного ответа у 1-й и 2-й групп овец фиксируется увеличение числа slgM<sup>high</sup>-клеток в 2,5 и 2,3 раза соответственно с последующим сохранением высоких уровней экспрессии рецептора, а к 21-му месяцу болезни в 3,0 и 2,9 раза соответственно. Кластерный анализ в первые 12 суток лейкоза показал усиление процессов нанокластеризации slgM-рецептора у взрослых и молодых животных в 2,9 и 2,7 раза, подавление процессов микрокластеризации в 2,5 раза у 1-й группы и отсутствие видимых изменений у 2-й группы животных. На более поздних стадиях болезни при относительно оптимальных отношениях нанокластеризации, высокие уровни микрокластеризации slgM-рецептора у взрослых овец установлены на 18-м месяце (63,0 %), а у молодых на 15-м месяце (53,0 %) болезни. CD5<sup>low</sup>-лимфоциты являются преобладающими на всех этапах BLV-инфекции независимо от возраста овец. Полученные данные свидетельствуют о нарушении биомеханики рецепторов В1-клеток, что способствует развитию лейкоза. Анализ иммуномодуляционной активности рецепторов может быть использован как дополнительный инструмент в иммунодиагностике вирусных инфекций у овец.

**Ключевые слова:** овцы, slgM<sup>+</sup>-лимфоциты, CD5<sup>+</sup>-лимфоциты, ФЛР-slгM «ринг», ФЛР-slгM «петч / эндоцитоз», уровни экспрессии, BLV.

**Для цитирования:** Григорьев А. Г., Ездакова И. Ю. Уровни экспрессии и формы локализации рецепторов В-клеток в крови овец // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2024. № 3 (67). С. 125-132. doi 10.18286/1816-4501-2024-3-125-132

## Expression levels and localization forms of B-cell receptors in sheep blood

A. G. Grigoriev✉, I. Yu. Ezdakova,

FSBEI Federal Research Center – All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Skryabin and Ya.R. Kovalenko, Russian Academy of Sciences

109428, Moscow, Ryazansky Ave., 24, bld. 1

✉artemprotos@yandex.ru

**Abstract.** The work assesses the expression levels and localization forms of B1-cell receptors in the blood of sheep in normal conditions and during experimental infection with the bovine leukemia virus (BLV). To detect B1 cells, direct and indirect immunoperoxidase staining (IPS) was used based on monoclonal antibodies (MA) to slgM receptor of cattle and based on MA to CD5 receptor of humans. The studies were conducted from 2018 to 2023 in a livestock complex in Moscow Region. During the experimental infection with BLV, strong immunosuppression of slgM and CD5 lymphocytes was revealed in comparison with the established norm among adult and young sheep on the 7th day ( $4.4 \pm 1.5\%$  and  $2.8 \pm 1.0\%$ , as well as  $6.2 \pm 1.5\%$  and  $8.4 \pm 2.5\%$ , respectively), as well as on the 7th month ( $2.4 \pm 0.5\%$  and  $4.1 \pm 1.0\%$ , as well as  $6.1 \pm 2.0\%$  and  $5.0 \pm 1.0\%$ , respectively) of the infectious process. An increase in the number of slgM<sup>high</sup> cells by 2.5 and 2.3 times, respectively, with subsequent preservation of high levels of receptor expression was recorded on

the 1st day of the immune response in the 1st and 2nd groups of sheep, and by 3.0 and 2.9 times, respectively, by the 21st month of the disease. Cluster analysis within the first 12 days of leukemia showed an increase in the processes of sIgM receptor nanoclustering of adult and young animals by 2.9 and 2.7 times, suppression of microclustering processes by 2.5 times in the 1st group and the absence of visible changes in the 2nd group of animals. At later stages of the disease, with relatively appropriate nanoclustering ratios, high levels of sIgM receptor microclustering of adult sheep were established at the period of 18th month (63.0%), and of young animals at the period of 15th month (53.0%) of the disease. CD5<sup>low</sup> lymphocytes are predominant at all stages of BLV infection regardless of the age of the sheep. The obtained data indicate a violation of the biomechanics of B1 cell receptors, which contributes to development of leukemia. Analysis of the immunomodulatory activity of receptors can be used as an additional tool in the immunodiagnostics of viral infections of sheep.

**Keywords:** sheep, sIgM<sup>+</sup> lymphocytes, CD5<sup>+</sup> lymphocytes, FLR-sIgM "ring", FLR-sIgM "patch / endocytosis", expression levels, BLV.

**For citation:** Grigoriev A. G., Ezdakova I. Yu. Expression levels and localization forms of B-cell receptors in sheep blood // Vestnik of Ulyanovsk state agricultural academy. 2024;3(67): 125-132 doi:10.18286/1816-4501-2024-3-125-132

#### Введение

Клеточная мембрана лимфоцитов крови представляет собой довольно сложную динамическую систему, в которой происходит постоянная кооперация поверхностных молекул. Ключевым аспектом функционирования клеток является модуляция рецепторных комплексов или кластеров дифференцировки (CD), которые имеют особое значение в биологии клетки. В процессе жизнедеятельности лимфоцитов белки постоянно перемещаются по поверхности мембраны, связываются с соседними молекулярными структурами, кластеризуются и создают специфические формы локализации рецепторов (ФЛР) типа «ринг» (нанокластеризация), «петч / эндоцитоз» (микрокластеризация), «кэп» и «шеддинг» [1, 2, 3], каждая из которых определяет функциональную активность лимфоцитов в определённый момент времени [4]. Помимо этого клетка постоянно регулирует уровни экспрессии рецепторов (high или low), что приводит к синтезу новых белков, необходимых для поддержания внутриклеточной сигнализации и запуска пролиферативных и дифференцирующих механизмов [5].

Изучение иммуномодулирующей активности рецепторов В-клетки представляет особый интерес, так как популяция относится к популяции лимфоцитов адаптивной иммунной системы, которая инициирует иммунный ответ путем взаимодействия В-клеточного рецептора (BCR) с чужеродными антигенами (АГ), что приводит к запуску процессов дифференцировки в плазматические клетки, их пролиферации и синтезу специфических антител (АТ). Такие маркеры как sIgM- и CD5-рецепторы определяют уникальные механизмы распознавания, связывания и нейтрализации вирусов и бактерий [6, 7].

sIgM-рецепторы считают мембранно-связанными иммуноглобулинами, которые располагаются на внешней поверхности В-лимфоцитов. Белки обладают уникальной антигенсвязывающей областью, распознают огромное разнообразие чужеродных компонентов. Их связь с другими трансмембранными белками приводит к образованию комплексов BCR-CD, сигнализация от которых поддерживает жизнеспособность клетки, а также запускает пролиферацию и дифференцировку клеток [8]. sIgM-

рецептор инициирует сигналы независимо от других белков ввиду нахождения в отдельном нанокластере, в мембранном нерафтоподобном домене в состоянии покоя [9, 10], тогда как его перемещение и сближение с другими рецепторами происходит после активации клетки [11].

CD5-антигены являются сигнальными корецепторами и относятся к надсемейству рецепторов-мусорщиков (SRCR). Эти белки обеспечивают передачу сигналов путём повышения порога активации и дифференцировки лимфоцита в процессе распознавания АГ, а также регулируют противовирусный и противомикробный ответ [12]. В медицинской практике CD5 используется как диагностический маркер при ряде вирусных, аутоиммунных и онкологических заболеваний. У сельскохозяйственных животных, таких как коровы и овцы рецептор используется в комплексе с BCR-CD при изучении патогенеза лейкоза, что фенотипически относится к В1-клеткам-мишеням (CD5<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>) [13].

Изучение модуляционной активности рецепторов В-лимфоцитов крови у сельскохозяйственных животных сильно ограничено из-за отсутствия на рынке моноклональных антител (МкА), что значительно тормозит изучение процессов кластеризации и экспрессии белков не только в норме, но и при патологических процессах [14]. В качестве альтернативного инструмента для изучения клеточного иммунитета у животных являются коммерческие МкА к CD-антигенам человека, применение которых возможно в ветеринарной практике из-за наличия определённой степени гомологии многих мембранных белков, что допускает их применение для количественной оценки лимфоцитов крови у животных [15]. На сегодняшний день данные о модуляции sIgM- и CD5-рецепторов у овец и коров остаются немногочисленными и зачастую противоречивыми. Поэтому использование МкА к CD-антигенам животных и адаптация коммерческих МкА к CD-рецепторам человека для изучения модуляции рецепторов В-лимфоцитов является актуальной задачей.

Цель исследования – изучить динамику В1-лимфоцитов, а также модуляционную активность sIgM- и CD5-рецепторов с помощью МкА в процессе

хронической вирусной инфекции для уточнения патогенеза заболевания и разработки новых тест-систем.

### Материалы и методы

Исследования проведены в лаборатории иммунологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН. Объектом исследования были взрослые (7...8 лет, 1 группа – 5 голов) и молодые овцы (3...4 месяца, 2 группа – 5 голов) Романовской породы. Выделение мононуклеарных клеток (МНК) проводили по уже описанной методике до и после экспериментального заражения вирусом лейкоза крупного рогатого скота [13]. Для подсчёта количества и жизнеспособности клеток в камере Горяева полученную взвесь МНК смешивали с равным объемом 0,4 % раствора трипанового синего. В реакциях использовали суспензию клеток с жизнеспособностью не менее 90 %.

Для идентификации  $\text{slgM}^+$ -лимфоцитов использовали «Набор препаратов для определения В-лимфоцитов крупного и мелкого рогатого скота прямым методом иммунопероксидазного окрашивания на основе МКА к иммуноглобулину М (IgM) крупного рогатого скота» («ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН», г. Москва). В качестве пероксидазного конъюгата – МКА к IgM в разведении 1:400.

Для идентификации  $\text{CD5}^+$ -лимфоцитов использовали метод непрямого иммунопероксидазного окрашивания (ИПО) с применением МКА в разведении 1:100 (ООО «Сорбент») к  $\text{CD5}$ -рецептору В-клеток человека. В качестве вторичных антител использовали пероксидазный конъюгат к Ig мыши в разведении 1:400. Для визуализации окрашенных клеток применяли хромогенный субстрат 3-амино-9-этил карбазол (АЭК) [4, 16].

Подсчёт количества неокрашенных (бесцветные клетки) и окрашенных клеток (специфическое мембранное красно-коричневое окрашивание) проводили под световым микроскопом ( $\times 1000$ ). В исследуемых препаратах определяли уровни экспрессии  $\text{slgM}^-$  и  $\text{CD5}$ -рецепторов на поверхности В-клеток (high / low), а также и ФЛР- $\text{slgM}$ : «ринг», «петч / эндоцитоз», «кэп» и «шеддинг».

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Excell (Microsoft, USA) и Statistica 8.0. Обработку изображений осуществляли в программе Adobe Photoshop Express.

### Результаты

В результате применения набора для определения В-лимфоцитов прямым методом ИПО на основе МКА к IgM было установлено, что в норме у овец 3-х лет количество  $\text{slgM}^+$ -клеток составляет  $20,0 \pm 2,2$  %, а высоко- (high) и низкореперторных (low)  $\text{slgM}^+$ -лимфоцитов  $30,0 \pm 1,5$  % и  $44,0 \pm 1,0$  % соответственно. Количество клеток с ФЛР- $\text{slgM}$  «ринг» составило  $22,0 \pm 0,4$  %, с ФЛР- $\text{slgM}$  «петч / эндоцитоз»  $37,0 \pm 1,2$  %, с ФЛР- $\text{slgM}$  «кэп»  $10,5 \pm 0,5$  % и с ФЛР- $\text{slgM}$  «шеддинг»  $32,0 \pm 1,0$  % (табл. 1)

С помощью метода на основе коммерческих МКА к  $\text{CD5}$ -рецептору было установлено, что относительное количество  $\text{CD5}^+$ -лимфоцитов составляет  $38,0 \pm 4,5$  %. Количество высоко- и низкореперторных  $\text{CD5}$ -клеток составило  $43,0 \pm 5,0$  % и  $57,3 \pm 5,0$  % соответственно, а лимфоцитов с ФЛР- $\text{CD5}$  «ринг», ФЛР- $\text{CD5}$  «петч / эндоцитоз», ФЛР- $\text{CD5}$  «кэп» и ФЛР- $\text{CD5}$  «шеддинг» было равно  $15,4 \pm 3,0$  %,  $43,3 \pm 7,0$  %,  $16,0 \pm 4,0$  % и  $43,3 \pm 4,2$  % соответственно (табл. 1).

Клетки с равными уровнями экспрессии и ФЛР представлены на рис. 1.

**Таблица 1. Физиологическая норма В-клеток крови у овец**

| В-лимфоциты |         |                  |
|-------------|---------|------------------|
| %           |         |                  |
|             |         | $\text{slgM}$    |
|             |         | $\text{CD5}$     |
| Эксп.       | Low     | $20,0 \pm 2,2$ % |
|             | High    | $38,5 \pm 4,5$ % |
| ФЛР         | Ринг    | $44,0 \pm 1,0$ % |
|             | Петч    | $57,3 \pm 5,0$ % |
|             | Кэп     | $30,0 \pm 1,5$ % |
|             | Шеддинг | $43,0 \pm 5,0$ % |
|             | Ринг    | $22,0 \pm 0,4$ % |
|             | Петч    | $15,4 \pm 3,0$ % |
|             | Кэп     | $43,3 \pm 7,0$ % |
|             | Шеддинг | $16,0 \pm 4,0$ % |
|             |         | $43,3 \pm 4,2$ % |

В зависимости от этапа патологического процесса, BLV вызывает изменения в количественной динамике В1-лимфоцитов и по-разному влияет на уровни экспрессии  $\text{slgM}^-$  и  $\text{CD5}$ -рецепторов, а также на формы локализации  $\text{slgM}$ -рецепторов.

При изучении динамики  $\text{slgM}^+$ -лимфоцитов (рис. 2) у взрослых овец была зафиксирована супрессия клеток на 3-е ( $5,2 \pm 1,5$  %), 7-е ( $4,4 \pm 1,5$  %) и 20-е ( $2,2 \pm 0,5$  %) сутки, а также на 15-й месяц ( $1,8 \pm 0,3$  %) хронической вирусной инфекции. У молодых животных уменьшение количества  $\text{slgM}^+$ -клеток зарегистрировано на 3-е ( $2,0 \pm 0,5$  %) и 14-е ( $3,0 \pm 1,0$  %) сутки, а также на 15-й и 26-й месяц иммунного ответа ( $2,2 \pm 0,2$  % и  $4,7 \pm 0,5$  % соответственно). Наиболее значимая пролиферативная активность  $\text{slgM}^+$ -лимфоцитов у обеих групп овец установлена на 12-е ( $12,0 \pm 2,0$  % и  $13,0 \pm 2,5$  % соответственно) сутки и на 21-й месяц лейкоза ( $11,3 \pm 2,3$  % и  $16,3 \pm 5,1$  % соответственно).

У животных 1-й группы максимально низкий процент  $\text{CD5}^+$ -клеток зафиксирован на 3-е и 7-е сутки ( $7,2 \pm 1,6$  % и  $6,2 \pm 1,5$  % соответственно), а также на 7-й и 31 месяц болезни ( $6,1 \pm 2,0$  % и  $1,0 \pm 0,3$  % соответственно) (рис. 2). У животных 2-й группы снижение  $\text{CD5}$ -лимфоцитов зарегистрировано на 5-е сутки ( $3,0 \pm 0,4$  %), а также на 7-й месяц ( $5,0 \pm 1,0$  %) и 26-й месяц лейкоза ( $9,3 \pm 4,0$  %). Увеличение числа  $\text{CD5}^+$ -клеток у взрослых овец установлено на 12-е сутки ( $46,0 \pm 14,0$  %) и на 21-й месяц ( $50,0 \pm 9,5$  %) иммунного ответа, тогда как у молодых овец заметная пролиферативная активность обнаружена только на 21-й месяц ( $57,0 \pm 12,0$  %) иммунного ответа.



Рис. 1. ФЛР в крови овец (x1000). Первый ряд (low) слева направо: ФЛР «ринг», ФЛР «петч / эндоцитоз» ФЛР «кэп» и ФЛР «шеддинг». Второй ряд (high) слева направо: ФЛР «ринг», ФЛР «петч / эндоцитоз» ФЛР «кэп» и ФЛР «шеддинг»

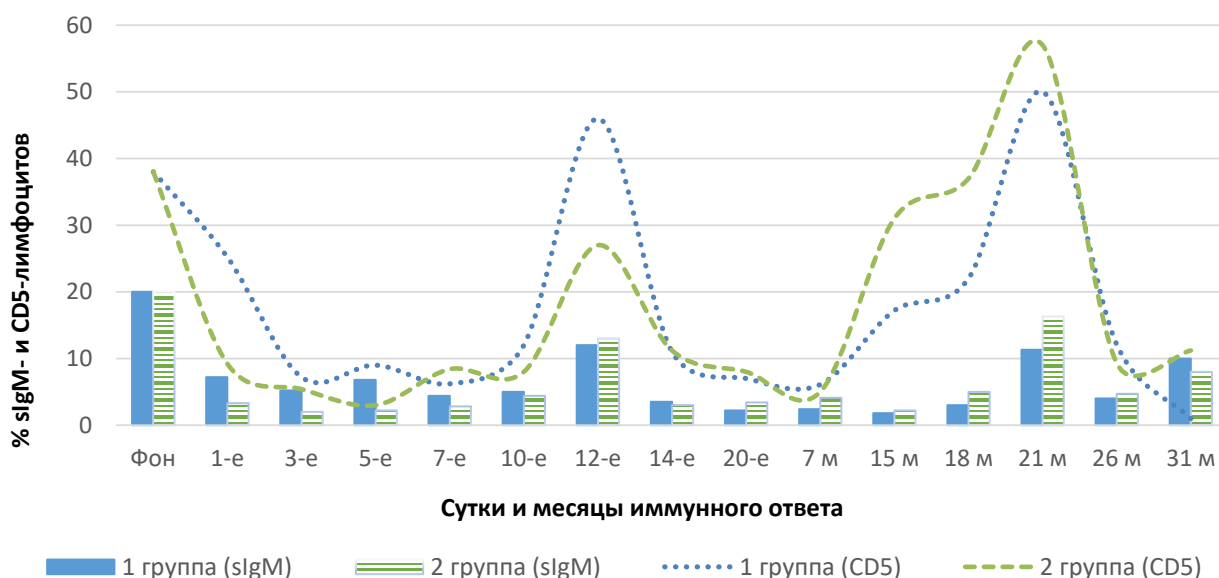


Рис. 2. Динамика slgM<sup>+</sup> и CD5<sup>+</sup>-лимфоцитов овец в процессе иммунного ответа

В ходе исследования характера экспрессии CD5-рецептора у взрослых овец было обнаружено преобладание числа CD5<sup>low</sup>-клеток в течение всего эксперимента, а максимальное количество низкореперторных клеток установлено на 3-е (72,5 %), 10-е (76,0 %), 20-е сутки (76,0 %), а также на 7-й (83,0 %) и 15-й месяц (80,2 %) инфекционного процесса. У молодых животных CD5<sup>low</sup>-лимфоциты так же являются доминирующими на протяжении всего иммунного ответа, а увеличение числа низкореперторных клеток зарегистрировано на 5-е (87,5 %), 7-е сутки (84,4 %), а также на 18-й (83,0%) и 26-й месяц (77,0 %) инфекционного процесса.

Анализ экспрессионной активности slgM-рецептора показал (рис. 3), что в сравнении с фоновыми значениями (30,0 %) у обеих групп овец количество slgM<sup>high</sup>-клеток увеличивается на 1-е сутки в 2,5 и 2,3 раза (74,0 % и 69,0 %). С незначительным отставанием у взрослых животных усиление экспрессии slgM-рецептора фиксируется с 14-х суток по 21-й месяц иммунного ответа (с 40,0 % до 89,0 %), в то время как у молодых овец повышение уровня экспрессии происходит спустя неделю – с 20-х суток по 21-й месяц инфекции (с 30,0 % до 87,0 %).

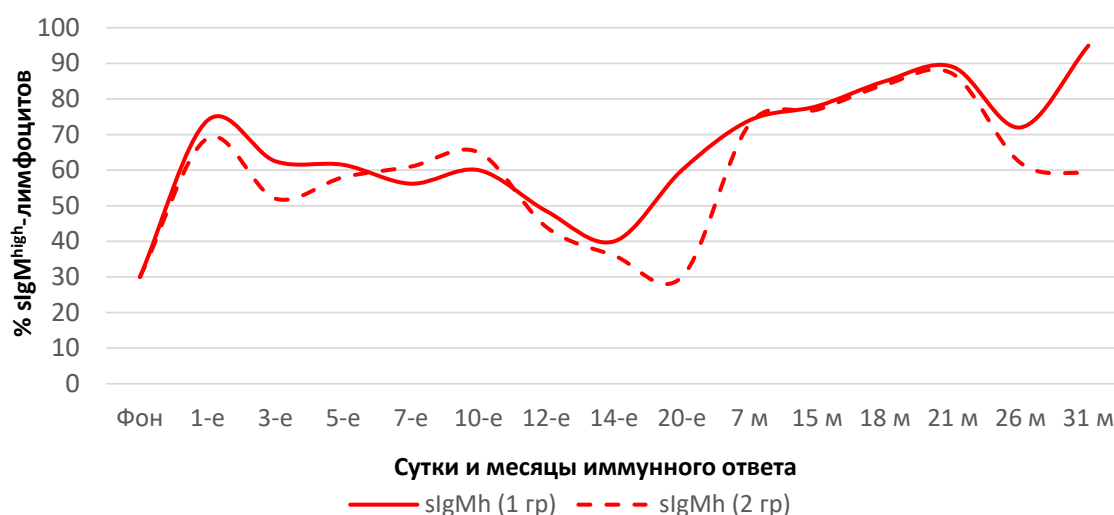


Рис. 3. Модуляция sIgM<sup>high</sup>-рецепторов у взрослых и молодых овец в процессе иммунного ответа

При изучении ФЛР-sIgM (рис. 4) у взрослых овец было установлено, что количество клеток типа «ринг», в сравнении с нормой (22,0 %), увеличивается на 3-е и 10-е сутки в 3,0 и 2,7 раза, а к 15-му месяцу лейкопогенеза снижается до фоновых значений (25,0 %). Последующая пролиферация лимфоцитов с ФЛР-sIgM «ринг» установлена на 26-й месяц (45,0 %) хронической инфекции, а к концу эксперимента зафиксировано снижение до 13,0 %. Напротив, в первый месяц иммунного ответа количество клеток с ФЛР-sIgM «петч / эндоцитоз» стабильно уменьшается и к 10-м суткам болезни достигает 15,0 %, что ниже фоновых значений (37,0 %) в 2,5 раза. С 14-х суток наблюдается изменение баланса в сторону лимфоцитов с ФЛР-sIgM «петч / эндоцитоз», после чего их количество постепенно увеличивается к 18-му месяцу болезни до 63,0 %. Последний месяц эксперимента так же характеризуется усилением пролиферативной активности В-

клеток с ФЛР-sIgM «петч / эндоцитоз», а их количество достигает 72,0 %.

У молодых овец (рис. 4) лимфоциты с ФЛР-sIgM «ринг» постепенно увеличиваются и достигают максимума лишь к 12-м суткам (61,0 %). Высокие значения так же установлены на 20-е (50,0 %) сутки, а также на 26-й месяц (60,0 %) лейкоза. Примечательно, что в первый месяц иммунного ответа количество лимфоцитов с ФЛР-sIgM «петч / эндоцитоз» изменяется незначительно, и может быть связано с возрастными особенностями иммунной системы. Увеличение показателей «петчинга» фиксируются только на 14-е сутки (50,0 %), а также на 15-й и 31-й месяц инфекционного процесса (53,0 % и 82,0 % соответственно). В целом, динамика клеток с нано- и микрокластеризацией довольно схожа с таковой у взрослых животных, но несколько сбалансирована и отличается процентным отношением.

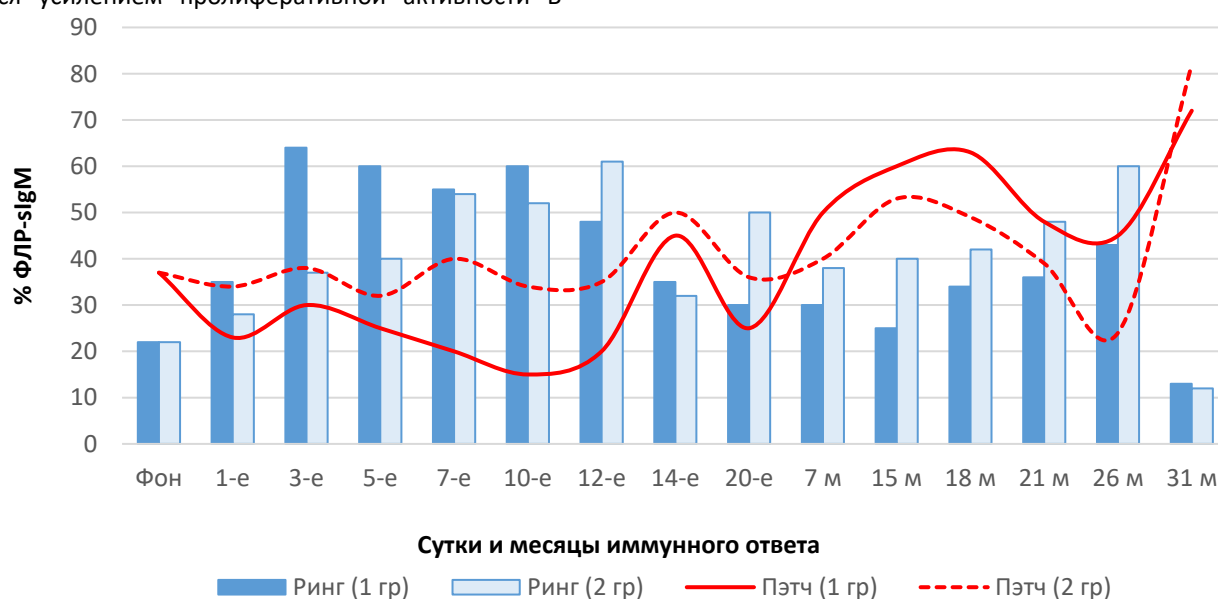


Рис. 4. Динамика В-клеток с ФЛР-IgM «ринг» и ФЛР-IgM «петч / эндоцитоз» у взрослых и молодых овец в процессе иммунного ответа

**Обсуждение**

Независимо от возраста овец BLV приводит к супрессии В1-лимфоцитов. Такого рода изменения могут быть обусловлены двумя не взаимоисключающими причинами.

С одной стороны, у обеих групп овец супрессия В1-лимфоцитов приходится на период активации гуморального звена иммунитета. Так, в первые 10 дней инфекции у 1-й группы животных уровни специфических IgG увеличиваются с 28,4,0 EU до 89,0 EU, а у 2-й группы с 30,0 EU до 60,3 EU (данные не показаны), что соответствует пролиферации плазматических клеток. Далее с 14-х суток по 6-й месяц иммунного ответа у взрослых овец фиксируется второе и более выраженное увеличение специфических IgG с 51,5 EU до 120,0 EU, а у молодых животных с 36,2 EU до 75,4 EU (данные не показаны), что соответствует цикличности количественной динамики В-клеток, а также переходу заболевания в хроническую стадию. При таком сценарии снижение числа В1-лимфоцитов в установленные периоды, в большей мере, обусловлено дифференцировкой и увеличением пула плазматических клеток, синтезирующих специфические антитела.

С другой стороны, В1-лимфоциты являются основной клеточной мишенью для вируса лейкоза, в связи, с чем формирование и выход новых вирионов в межклеточное пространство приводит к гибели клеток и уменьшению их числа. Однако после образования плазматических клеток наблюдается поддержание оставшихся 3...10 % инфицированных В1-лимфоцитов, что может являться частью сложной программы уклонения вируса от иммунного ответа, в результате чего нарушаются процессы сигнализации рецепторов, и сохраняется иммуносупрессивное состояние. Обнаружено, что в ходе развития болезни у обеих групп овец регистрировалась слабая экспрессия CD5-рецептора. Учитывая, что в норме CD5 является регулятором активации В-клеток [17], вирус лейкоза может приводить к торможению его регуляторных процессов, что приводит к нарушению механизмов дифференцировки и ограничению пролиферативной активности.

Известно, что sIgM-рецепторы играют важную роль в ответах В-лимфоцитов на белковые детерминанты различных патогенов, включая вирусы [11]. В результате проведенных исследований было установлено, что высокорепеторные клетки с ФЛР-sIgM отображают степень активности В1-лимфоцитов в процессе развития болезни. Так, у обеих групп овец в первый месяц иммунного ответа было выявлено увеличение и поддержание числа высокорепеторных В1-лимфоцитов с ФЛР-sIgM «ринг», тогда как в последующие несколько лет регистрировалось увеличение числа высокорепеторных В1-клеток с ФЛР-sIgM «петч / эндоцитоз». Установленная отрицательная корреляция в первые 12 суток между снижением числа sIgM-клеток и увеличением количества лимфоцитов с ФЛР-sIgM «ринг» у взрослых и

молодых овец ( $r = -0,82$  и  $r = -0,22$  соответственно), а также положительная корреляция между иммуносупрессией числа В1-клеток и ФЛР-sIgM «петч / эндоцитоз» ( $r = 0,70$  и  $r = 0,51$  соответственно) свидетельствует о развитии и поддержании анергичного состояния В-лимфоцитов в первые дни вирусной экспансии. Так как в норме sIgM-рецепторы сохраняют свою олигомерную структуру и находится в отдельных белковых островках [9, 11], провирус, по-видимому, приводит к их реорганизации и агрегации с образованием плотного бислоя (комплексы BCR-sIgM), что приводит к торможению последующих процессов микрокластеризации. Форма рецепторов «петч / эндоцитоз» является маркером взаимодействия комплексов BCR-CD или TCR-CD с АГ [3, 18], в результате которого происходит его интернализация и ферментативное расщепление на более мелкие пептиды. В норме фрагменты вирусных белков связываются с МНС и презентуются на поверхностной мембране В-лимфоцита для последующего взаимодействия с Т-хелперами, что инициирует сигналы активации, запуск процессов дифференцировки и пролиферации. Наблюдаемые нами изменения могут говорить о нарушении механизмов связывания рецептора со специфическими АГ, что влечёт к развитию иммуносупрессивного состояния. Действительно, у 1-й группы овец в течение первых 10 суток лимфоциты с ФЛР-sIgM «петч / эндоцитоз» уменьшаются в 2,5 раза, тогда как у 2-й группы показатели микрокластеризации практически не изменяются, что говорит о функциональной недостаточности В-клеток.

Дальнейшее изменение баланса В1-клеток в сторону высокорепеторных В1-лимфоцитов с ФЛР-sIgM «петч / эндоцитоз» при одновременном увеличении уровня экспрессии sIgM-рецептора у взрослых и молодых свидетельствует о взаимодействии рецепторов с большим количеством антигенных детерминант BLV и увеличении напряжённости В-клеточного звена иммунитета. Так, с 7-го по 31-й месяц, у взрослых и молодых овец прослеживается отрицательная корреляция количественных показателей лимфоцитов с ФЛР-sIgM «ринг» и sIgM<sup>high</sup>-рецептором ( $r = -0,60$  и  $r = -0,53$  соответственно), тогда как между процессами микрокластеризации и увеличением клеток с sIgM<sup>high</sup>-рецептором положительная ( $r = 0,70$  и  $r = 0,54$ ), что подтверждает нагрузку вируса на иммунокомпетентные клетки, а также цикличность BLV-инфекции.

**Заключение**

Независимо от возраста овец вирус лейкоза поддерживает низкие уровни экспрессии CD5-рецептора на всех этапах инфекционного процесса, что влечёт к торможению процессов пролиферации и дифференцировки лимфоцитов.

Высокие уровни экспрессии sIgM-рецептора В-лимфоцитов на начальных и поздних стадиях развития лейкоза у обеих групп животных

свидетельствует о напряжённости В-клеточного звена иммунитета, что может способствовать иммунологическому истощению и повышать риск летального исхода на более поздних стадиях развития лейкоза.

Увеличение числа высокорецепторных клеток с ФЛР-sIgM «ринг» в первый месяц инфекционного процесса у обеих групп овец отображает интактность и анергичное состояние В-лимфоцитов в процессе вирусной экспансии, что индуцирует иммуносупрессивное состояние. Вероятно, такой механизм необходим для уклонения вируса от иммунного ответа и его интеграции в клетки-мишени для поддержания жизненного цикла на ранних и стадиях болезни.

Увеличение числа высокорецепторных клеток с ФЛР-sIgM «петч / эндоцитоз» в процессе

хронизации инфекции у обеих групп животных является маркером активации В-клеточного звена. Этот параметр хорошо демонстрирует цикличность инфекционного процесса, а также реактивность В-лимфоцитов.

В крови овец были определены уровни экспрессии sIgM<sup>high</sup> и sIgM<sup>low</sup>-клеток, CD5<sup>high</sup> и CD5<sup>low</sup> лимфоцитов, а также формы локализации данных рецепторов в норме и при экспериментальном заражении BLV.

Полученные данные по изменению уровней экспрессии и процессов нано- и микрокластеризации допустимо использовать для дальнейших исследований механизмов иммунного ответа при развитии инфекций различного генеза у овец.

### Литература

1. Jesse G., Katharina G. Mechanisms of protein nanoscale clustering // *Current Opinion in Cell Biology*. 2017. Vol. 44. P. 86-92. doi:10.1016/j.ceb.2016.09.004.
2. T cells use distinct topographical and membrane receptor scanning strategies that individually coalesce during receptor recognition / E. Cai, C. Beppeler, J. Eichorst et al. // *PNAS*. 2022. Vol. 119. No. 32. P. 1-11. doi:10.1073/pnas.2203247119
3. Модуляция рецепторов Т-клеток крови овец при экспериментальном заражении вирусом лейкоза крупного рогатого скота / А. Г. Григорьев, И. Ю. Ездакова, О. В. Капустина и др. // *Актуальные вопросы ветеринарной биологии*. 2023. Т. 58. № 2. С. 54-59. doi: 10.24412/2074-5036-2023-2-54-59
4. Ezbekova I.Yu., Kapustina O.V. Identification of Bovine Blood B Cells with the Immunoperoxidase Staining Method // *Russian Agricultural Sciences*. 2018. Vol. 44. No. 4. P. 361-364
5. Maciolek J. A. Pasternak A., Wilson H. L. Metabolism of activated T lymphocytes // *Current Opinion in Immunology*. 2014. Vol. 27. P. 60-74. doi:10.1016/j.coi.2014.01.006
6. Murphy K. Janeway's Immunology Biology // Garland Science. 2012. Pub. 8. P. 1-888
7. B cell Development and Maturation / Y. Wang, J. Liu, P.D. Burrows, et al. // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2020. Vol. 1254. P. 1-22.
8. Anelli T. Missing Links in Antibody Assembly Control // *International Journal of Cell Biology*. 2013. Vol. 2013. No. 1. P. 1-9 doi:10.1155/2013/606703
9. Klasener K. Maity P.C. Hobeika E. Yang J. Reth M. B cell activation involves nanoscale receptor reorganizations and inside-out signaling by Syk // *Immunology and Inflammation*. 2014. Vol. 3. P. 1-17. doi:10.7554/eLife.02069
10. The nanoscale organization of the B lymphocyte membrane P.C. Maity, J. Yang, K. Klaesener // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2015. Vol. 1853. No. 4. P. 830-840. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.11.010
11. Isotype Specific Assembly of B Cell Antigen Receptors and Synergism With Chemokine Receptor CXCR4 / P. Maity, M. Datta, A. Nicolo, et al. // *Frontier Immunology*. 2018. Vol. 9. No. 9. P. 1-11. doi:10.3389/fimmu.2018.02988
12. Cho J-H., Sprent J. TCR tuning of T cell subsets // *Immunological Reviews*. 2018. Vol. 283. No. 1. P. 129-137. doi:10.1111/imr.12646
13. Характеристика В-1 клеток в процессе экспериментального лейкомогенеза / И. Ю. Ездакова, О. В. Капустина, М. И. Гулюкин // *Проблемы Вирусологии*. 2020. Т. 65. №1. С. 35-40. doi:10.36233/0507-4088-2020-65-1-35-40
14. Flow cytometry panels for immunophenotyping dairy cattle peripheral blood leukocytes / M. G. Marrero, D. M. C. Madrid, J. G. Pri, et al. // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2022. Vol. 248. P. 1-6 doi:10.1016/j.vetimm.2022.110417
15. Large animal models of rare genetic disorders: sheep as phenotypically relevant models of human genetic disease / A. R. Pinnapureddy, C. Stayner, J. McEwan, et al. // *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2015. Vol. 10. No. 107. P. 1-8.
16. Патент №2761468С1 Российская Федерация, МПК G01N33/53. Способ мультиплексного анализа В-клеток для оценки клеточного звена иммунной системы рогатого скота: №2761468С1; заявлено 2020.12.28; опубликовано 2021.12.08 / И. Ю. Ездакова, О.В. Капустина, С.В. Вальциферова Заявитель и патентообладатель: ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко. 20 с. ил.
17. TLR induces reorganization of the IgM-BCR complex regulating murine B-1 cell responses to infections / H.P. Savage, K. Klasener, F.L. Smith, et al. // *eLife*. 2019. Vol. 8. P. 1-26.

18. Lii W., Wang H., Xu C. Antigen Receptor Nanoclusters: Small Units with Big Functions // Trends in Immunology. 2016. Vol. 37. No. 10. P. 680-689.

#### References

1. Jesse G., Katharina G. Mechanisms of protein nanoscale clustering // Current Opinion in Cell Biology. 2017. Vol. 44. P. 86-92. doi:10.1016/j.cceb.2016.09.004
2. T cells use distinct topographical and membrane receptor scanning strategies that individually coalesce during receptor recognition / E. Cai, C. Beppler, J. Eichorst et al. // PNAS. 2022. Vol. 119.No. 32. P. 1-11. doi:10.1073/pnas.2203247119
3. Modulation of T-cell receptors of sheep blood during experimental infection with bovine leukemia virus / A. G. Grigoriev, I. Yu. Ezdakova, O. V. Kapustina et al. // Current issues in veterinary biology. 2023. Vol. 58. No. 2. P. 54-59. doi: 10.24412/2074-5036-2023-2-54-59
4. Ezdakova I.Yu., Kapustina O.V. Identification of Bovine Blood B Cells with the Immunoperoxidase Staining Method // Russian Agricultural Sciences. 2018. Vol. 44. No. 4. P. 361-364.
5. Maciolek J. A. Pasternak A., Wilson H. L. Metabolism of activated T lymphocytes // Current Opinion in Immunology. 2014. Vol. 27. P. 60-74. doi:1016/j.coi.2014.01.006
6. Murphy K. Janeway's Immunology Biology // Garland Science. 2012. Pub. 8. P. 1-888.
7. B cell Development and Maturation / Y. Wang, J. Liu, P.D. Burrows, et al. // Advances in Experimental Medicine and Biology. 2020. Vol. 1254. P. 1-22.
8. Anelli T. Missing Links in Antibody Assembly Control // International Journal of Cell Biology. 2013. Vol. 2013. No. 1. P. 1-9 doi:10.1155/2013/606703
9. Klasener K. Maity P.C. Hobeika E. Yang J. Reth M. B cell activation involves nanoscale receptor reorganizations and inside-out signaling by Syk // Immunology and Inflammation. 2014. Vol. 3. P. 1-17. doi:10.7554/eLife.02069
10. The nanoscale organization of the B lymphocyte membrane P.C. Maity, J. Yang, K. Klaesener // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 2015. Vol. 1853. No. 4. P. 830-840. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.11.010
11. Isotype Specific Assembly of B Cell Antigen Receptors and Synergism With Chemokine Receptor CXCR4 / P. Maity, M. Datta, A. Nicolo, et al. // Frontier Immunology. 2018. Vol. 9. No. 9. P. 1 -11. doi:10.3389/fimmu.2018.02988
12. Cho J-H., Sprent J. TCR tuning of T cell subsets // Immunological Reviews. 2018. Vol. 283. No. 1. P. 129-137. doi:10.1111/imr.12646
13. Characteristics of B-1 cells in the process of experimental leukogenesis / I. Yu. Ezdakova, O. V. Kapustina, M. I. Gulyukin // Problems of Virology. 2020. V. 65. No. 1. P. 35-40. doi:10.36233/0507-4088-2020-65-1-35-40
14. Flow cytometry panels for immunophenotyping dairy cattle peripheral blood leukocytes / M. G. Marrero, D. M. C. Madrid, J. G. Pri, et al. // Veterinary Immunology and Immunopathology. 2022. Vol. 248. P. 1-6 doi:10.1016/j.vetimm.2022.110417
15. Large animal models of rare genetic disorders: sheep as phenotypically relevant models of human genetic disease / A. R. Pinnapureddy, C. Stayner, J. McEwan, et al. // Orphanet Journal of Rare Diseases. 2015. Vol. 10. No. 107. P. 1-8.
16. Patent No. 2761468C1 Russian Federation, IPC G01N33/53. Method of multiplex analysis of B cells for assessing the cellular component of the immune system of cattle: No. 2761468C1; appl. 2020.12. 28; publ. 2021.12.08 / I. Yu. Applicant and patent holder: FSBEI Federal Research Center – All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K. I. Skryabin and Ya. R. Kovalenko. 20 p. illustr.
17. TLR induces reorganization of the IgM-BCR complex regulating murine B-1 cell responses to infections / H. P. Savage, K. Klasener, F.L. Smith, et al. // eLife. 2019. Vol. 8. P. 1-26.
18. Lii W., Wang H., Xu C. Antigen Receptor Nanoclusters: Small Units with Big Functions // Trends in Immunology. 2016. Vol. 37. No. 10. P. 680-689.