

УДК 616.311-002-006:612.017.1

УРОВЕНЬ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т CD8+CD69+ ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ЛЕЙКОПЛАКИЕЙ И ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ РТА

¹Карпук Н. А., ²Бабицкий М. В., ¹Браим А. Е., ¹Красовский В. Н.

¹ Витебский государственный ордена Дружбы народов
медицинский университет, Республика Беларусь

² Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

ms.karpuk@mail.ru

maxvb279@gmail.com

alexandra270107@gmail.com

vadimkrasovskij3@gmail.com

Введение. Одним из патогенетических звеньев злокачественной трансформации слизистой оболочки рта (СОР) являются нарушения пролиферации и дифференцировки эпителия с развитием плоскоклеточного интраэпителиального поражения низкой степени — low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL). Исследование иммунного статуса пациентов с плоскоклеточным раком СОР (ПРСОР) и лейкоплакией СОР (ЛСОР) с учетом морфологической гетерогенности являются весьма актуальным научным направлением.

Цель исследования — оценить уровень цитотоксических Т CD8+CD69+ лимфоцитов у пациентов с ЛСОР с учетом морфологической гетерогенности и выявить различия между пациентами с ПРСОР и здоровыми лицами.

Объекты и методы. Исследование выполнено по протоколу открытого когортного исследования. В исследование включали пациентов с ЛСОР (n = 66), а также с ПРСОР (n = 33). Группу сравнения составили здоровые добровольцы (n = 30). Пациенты с ЛСОР были разделены на группы: с LSIL (n = 34) и без (n = 32).

Результаты. У обследованных пациентов с ЛСОР и LSIL выявлены признаки дисфункции системы иммунитета, а именно снижение количества цитотоксических Т CD8+CD69+ лимфоцитов по сравнению с группой ЛСОР без LSIL и здоровыми лицами.

Заключение. Полученные результаты будут способствовать эффективной дифференциальной диагностике и верификации диагноза пациента.

Ключевые слова: лейкоплакия слизистой оболочки рта; опухолевая трансформация; плоскоклеточный рак слизистой оболочки рта; CD69+; CD8+CD69+.

LEVEL OF THE CYTOTOXIC T CD8+CD69+ LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH LEUKOPLAKIA AND SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE ORAL MUCOSA

¹Karpuk N., ²Babitsky M., ¹Braim A., ¹Krasovsky V.

¹ Vitebsk State Medical University, Belarus

² Belarusian State Medical University, Minsk

Introduction. One of the pathogenetic links in the malignant transformation of oral mucosa (OM) is the disturbance of proliferation and differentiation of the epithelium with the development of low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL). The study of the immune status of patients with Squamous cell carcinoma of the oral cavity (OSCC) and leukoplakia oral mucosa (LOM), taking into account the morphological heterogeneity, is a very relevant scientific direction.

The aim of the study was to assess level of the cytotoxic T CD8+CD69+ lymphocytes of patients with LOM, taking into account morphological heterogeneity, and to identify differences between patients with LOM and healthy individuals.

Objects and methods. The study was conducted according to the protocol of an open cohort study. The study included patients with (n = 66) and OSCC (n = 33). The comparison group consisted of healthy volunteers (n = 30). Patients with LOM were divided into groups: with LSIL (n = 34) and without (n = 32).

Results. The examined patients with LOM and LSIL showed signs of dysfunction of the immune system, namely a decrease in the number of cytotoxic T CD8+CD69+ lymphocytes compared to the LOM group without LSIL and healthy individuals.

Conclusion. The results obtained will contribute to effective differential diagnosis and verification of the patient's diagnosis.

Keywords: leukoplakia of the oral mucosa; tumor transformation; squamous cell carcinoma of the oral mucosa; CD69+; CD8+CD69+.

Введение. Подавляющее число злокачественных новообразований слизистой оболочки рта (СОР) приходится на плоскоклеточный рак. Плоскоклеточный рак СОР (ПРСОР) развивается, как правило, в исходе предшествующих предопухолевых заболеваний, ведущим из которых является лейкоплакия [1].

Основное клиническое значение предопухолевых заболеваний слизистой оболочки рта (ПЗСОР) заключается в значительном канцерогенном потенциале. Средний уровень злокачественной трансформации, например, при лейкоплакии СОР (ЛСОР), для всей популяции, описанный в 55 исследованиях, составляет 6,6 % [2].

Одним из патогенетических звеньев злокачественной трансформации СОР являются нарушения пролиферации и дифференцировки эпителия с развитием дисплазии: LSIL (low-grade squamous intraepithelial lesions — плоскоклеточное интраэпителиальное поражение низкой степени) и HSIL (high grade squamous intraepithelial lesions — интраэпителиальное поражение тяжелой степени) [3].

Показано, что прогрессирование злокачественности связано с подавлением иммунитета посредством инфильтрации регуляторных Т-клеток (56,0 %), истощения цитотоксических Т-клеток (68,0 %) и антигенпрезентирующих дендритных клеток (72,0 %) с сопутствующим усилением воспаления (92,0 %) [4]. Поэтому исследование иммунного статуса пациентов с ПРСОР и ЛСОР с учетом морфологической гетерогенности является весьма актуальным научным направлением.

Цель работы — оценить иммунный статус пациентов с ЛСОР с учетом морфологической гетерогенности и выявить различия между пациентами с плоскоклеточным раком полости рта и здоровыми лицами.

Объекты и методы. Исследование выполнено по протоколу открытого когортного исследования. В работу включали пациентов с лейкоплакией слизистой оболочки рта (ЛСОР) ($n = 66$), а также с плоскоклеточным раком СОР ($n = 33$). Группу сравнения составили здоровые добровольцы ($n = 30$). Пациенты с ЛСОР были разделены на группы: с LSIL ($n = 34$) и без ($n = 32$). Все участники исследования собственноручно заполнили добровольное информированное согласие. Демографическая характеристика и статус курения участников исследования представлены в табл. 1. Группы были однородны по возрасту, полу, продолжительности заболевания, курению, употреблению алкоголя и сопутствующим заболеваниям.

Таблица 1

Демографическая характеристика пациентов при исследовании иммунного статуса, Ме (25–75 %)

Группы пациентов	Возраст, годы, Ме (25–75 %)	Пол, мужской/женский	История курения, n		
			Никогда	Бывший курильщик	Курящий в настоящее время
ЛСОР без дисплазии эпителия, $n = 34$	53 (46–74)	18/16	8	7	19
ЛСОР и LSIL, $n = 32$	49 (41–68)	18/14	8	7	17
ПРСОР, $n = 33$	54 (45–72)	15/18	7	7	16
Здоровые лица, $n = 30$	51 (40–67)	16/14	11	6	13

В ходе исследования в периферической крови определяли относительное содержание цитотоксических лимфоцитов (CD8+), в том числе активированных (CD8+CD69+).

Исследование образцов крови добровольцев осуществляли в научно-исследовательской лаборатории учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» методом проточной цитофлуориметрии. Для анализа забирали 5 мл крови из

локтевой вены натошак в утреннее время в стерильную пробирку с гепарином (20 ед/мл). Анализ образцов клеточных суспензий проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 (Becton Dickinson, США). Обработку материала выполняли в соответствии с инструкциями изготовителя наборов моноклональных антител производства Invitrogen Corporation (США), Beckman Coulter, Thermo Fisher.

Статистический анализ результатов был проведен с использованием компьютерных программ Statistica 10.0, Microsoft Office Excel 2020.

Результаты. При оценке субпопуляций лейкоцитов крови пациентов различных групп были обнаружены отличия у пациентов с лейкоплакией, плоскоклеточным раком и здоровых лиц (табл. 2).

Таблица 2

**Сравнительные показатели фенотипа лейкоцитов крови
у обследованных пациентов, Ме (25–75 %)**

Показатель	Группы				Р _{к-у}
	1	2	3	4	
	ЛСОР без LSIL, n = 34	ЛСОР и LSIL, n = 32	ПРСОР, n = 33	Здоровые лица, n = 30	
Относительно лимфоцитов, %					
CD8+	25,5 (21,9–34,5)	20,7 (18,9–29,5)	20,5 (19,7–31,8)	21,3 (20,9–29,2)	0,986
CD8+CD69+	2,8 (2,0–3,1)	1,1 (0,2–2,3)*	0,9 (0,6–1,7)Ω	2,6 (1,0–2,9)	0,005

Примечание: Р_{к-у} — критерий Краскела–Уоллиса; при Р_{к-у} < 0,05 попарное сравнение между группами методом Ньюмена–Кейлса.

В группе пациентов с раком СОР обнаружено снижение уровня Т-CD8+CD69+ как в сравнении с контрольной группой (CD8+CD69+ $p_{3-4} = 0,003$), так и с группой пациентов с лейкоплакией без дисплазии (CD8+CD69+ $p_{3-1} = 0,001$). В группе пациентов с ЛСОР и LSIL CD8+CD69+ клеток было также меньше по сравнению со здоровыми лицами и пациентами с ЛСОР без LSIL ($p_{2-4} = 0,015$; $p_{2-1} = 0,012$).

Авторами впервые проведена сравнительная оценка иммунного статуса пациентов с лейкоплакией (с LSIL и без) и пациентов с плоскоклеточным раком СОР. Для оценки были выбран один из важных системных показателей и биомаркер противоопухолевого иммунитета, а именно — цитотоксические лимфоциты CD8+, в том числе активированные CD8+CD69+.

Установлено, что у пациентов с раком СОР, как и с лейкоплакией и LSIL, количество цитотоксических клеток, экспрессирующих CD69, было меньше, чем у здоровых лиц и пациентов с ЛСОР без LSIL. Рецептор CD69 является признанным классическим маркером активации лейкоцитов. Он появляется на цитоплазматических мембранах активированных клеток быстрее, чем CD25 и, таким образом, рассматривается как ранний

маркер активации лимфоцитов. У лиц с повышенной экспрессией CD69 маркеров на Т-киллерах были хорошие показатели выживаемости при обнаружении у них рака. Т-киллеры, несущие данный маркер, являются активированными, и в таком состоянии быстро обнаруживают и уничтожают опухолевые клетки, проявляя повышенную цитотоксичность в отношении различных опухолевых клеток.

Важной функцией CD69 является его регуляторная роль. Он может способствовать резидентности клеток в тканях, регулировать дифференцировку клеток в сторону Th17/Treg и способствовать истощению резидентных Т-клеток памяти, особенно в микроокружении опухоли. Недавно было обнаружено, что CD69 конститутивно экспрессируется в резидентных CD8+, CD4+, Treg, $\gamma\delta$ Т-клетках, врожденных лимфоцитах, естественных киллерных Т-клетках во всех тканях и дендритных клетках кожи [5]. Учитывая, что репопуляция погибших при ответе на инфекцию тканерезистентных клеток осуществляется как в результате пролиферации оставшихся, так и за счет миграции в ткани клеток костномозгового происхождения, вероятно низкий уровень циркулирующих CD8+CD69+ лимфоцитов у пациентов с раком слизистой ротовой полости и лиц с лейкоплакией и дисплазией связан с повышенной миграцией клеток в ткани. Кроме того, в доклинических исследованиях показано, что применение антител к CD69 усиливает противоопухолевые эффекты за счет активации врожденных и адаптивных Т-клеток [6]. Таким образом, CD69 можно считать целевой молекулой для иммунотерапии рака [7].

Обнаружены отличия в группах по составу субпопуляций лейкоцитов и цитокинового профиля периферической крови пациентов с лейкоплакией, плоскоклеточным раком и здоровых лиц. Выявлено, что в группе пациентов с ЛСОР и LSIL Т активированных лимфоцитов CD8+CD69+ меньше, чем у здоровых лиц и пациентов ЛСОР без LSIL ($p_{2-4} = 0,015$; $p_{2-1} = 0,012$). В группе пациентов с ПРСОР обнаружено снижение уровня Т-лимфоцитов киллеров с экспрессией маркера ранней активации CD8+CD69+ как в сравнении с контрольной группой (CD8+CD69+ $p_{3-4} = 0,003$), так и с группой пациентов с ЛСОР без дисплазии (CD8+CD69+ $p_{3-1} = 0,001$).

Заключение. Полученные результаты будут способствовать эффективной дифференциальной диагностике и верификации диагноза пациента.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. *Oral potentially malignant disorders: A consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer* / S. Warnakulasuriya [et al.] // Oral Dis. – 2021. – Vol. 27, N 8. – P. 1862–1880. – doi: 10.1111/odi.13704.
2. *Malignant transformation of oral leukoplakia: Systematic review and comprehensive meta-analysis* / L. A. Pimenta-Barros [et al.] // Oral Dis. – 2025. – Vol. 31, N 1. – P. 69–80. – doi: 10.1111/odi.15140.

3. *Incorporation of differentiated dysplasia improves prediction of oral leukoplakia at increased risk of malignant progression* / L. J. Wils [et al.] // *Mod. Pathol.* – 2020. – Vol. 33, N 6. – P. 1033–1040. – doi: 10.1038/s41379-019-0444-0.

4. *Integrative analysis of genomic and transcriptomic data of normal, tumour, and co-occurring leukoplakia tissue triads drawn from patients with gingivobuccal oral cancer identifies signatures of tumour initiation and progression* / A. Ghosh [et al.] // *J. Pathol.* – 2022. – Vol. 257, N 5. – P. 593–606. – doi: 10.1002/path.5900.

5. *CD69 is a promising immunotherapy and prognosis prediction target in cancer* / Y. Li [et al.] // *Immunotargets Ther.* – 2024. – Vol. 13. – P. 1–14. – doi: 10.2147/ITT.S439969.

6. *Schenkel, J. M.* Localization, tissue biology and T cell state — implications for cancer immunotherapy / J. M. Schenkel, K. E. Pauken // *Nat. Rev. Immunol.* – 2023. – Vol. 23, N 12. – P. 807–823. – doi: 10.1038/s41577-023-00884-8.

7. *CD8⁺ tissue-resident memory T-cell development depends on infection-matching regulatory T-cell types* / L. Barros [et al.] // *Nat. Commun.* – 2023. – Vol. 14. – P. 5579. – doi: 10.1038/s41467-023-41364-w.