

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2022-21-2-47-55>

Влияние пола и возраста больных раком слизистой оболочки полости рта на фенотип системного и локального иммунитета

Т.Н. Заботина, А.И. Черткова, А.А. Борунова, Е.Н. Захарова, Э.К. Шоуа, И.Б. Шоуа, В.Т. Циклаури, И.А. Задеренко, З.Г. Кадагидзе

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Татьяна Николаевна Заботина tatzabotina@yandex.ru

Введение. Частота развития рака слизистой оболочки полости рта (РСОПР) выше у лиц старше 50 лет, а агрессивность течения заболевания выше у лиц младше 50 лет. В этом контексте представляет интерес выяснение механизмов иммунных нарушений, характерных для пациентов различных возрастных групп.

Цель исследования – провести сравнительное исследование системного и локального иммунитета у больных РСОПР, изучить взаимосвязь субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови (ПК) и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (tumor infiltrating lymphocytes, TILs), с полом и возрастом пациентов.

Материалы и методы. В исследование были включены пациенты в возрасте от 29 до 84 лет. Методом проточной цитометрии исследовали эффекторные и супрессорные популяции лимфоцитов ПК и TILs.

Результаты. У больных РСОПР в опухолевой ткани по сравнению с ПК было повышено процентное содержание CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺-клеток, регуляторных CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} (CD4Treg) и CD8⁺CD11b⁺CD28⁺ (CD8Treg) Т-лимфоцитов, а также CD4⁺ и CD8⁺-Т-клеток, экспрессирующих коингибиторный рецептор PD-1. Уровни цитотоксических CD8⁺CD11b⁺CD28⁺-Т-лимфоцитов и CD8⁺Perforin⁺-клеток, цитотоксический потенциал CD8-Т-клеток, процент NK-клеток, включая CD16⁺Perforin⁺-популяцию, в опухоли были ниже, чем в ПК. Характер взаимосвязи уровня CD4Treg с другими популяциями лимфоцитов ПК и TILs зависел от пола пациентов. Возрастные изменения уровней NK- и CD8-Т-клеток наблюдались главным образом у мужчин, а CD4Treg – у женщин.

Заключение. Полученные данные подтверждают выраженное супрессивное состояние локального иммунитета у больных РСОПР. Пол пациентов влияет на характер взаимосвязи CD4Treg с другими популяциями лимфоцитов ПК и TILs, а также на возрастные изменения в иммунной системе пациентов с РСОПР. Результаты данного исследования могут внести определенный вклад в обеспечение персонализированного лечения больных РСОПР с учетом различий в системном и локальном иммунитете и в иммунном ответе на опухоль у больных разного пола и возраста.

Ключевые слова: лимфоциты периферической крови, TILs, CD4Treg лимфоциты, CD4⁺PD-1⁺ и CD8⁺PD-1⁺-лимфоциты, пол пациентов, возраст пациентов

Для цитирования: Заботина Т.Н., Черткова А.И., Борунова А.А. и др. Влияние пола и возраста больных раком слизистой оболочки полости рта на фенотип системного и локального иммунитета. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(2):47–55. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-47-55

Influence of gender and age of patients with oral mucosa cancer on the phenotype of systemic and local immunity

Tatiana N. Zabolina, Antonina I. Chertkova, Anna A. Borunova, Elena N. Zakharova, Esma K. Shoua, Ilona B. Shoua, Vasily T. Tsiklauri, Igor A. Zaderenko, Zaira G. Kadagidze

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Contacts: Tatiana Nicolaevna Zabolina tatzabotina@yandex.ru

Background. The incidence of oral mucosa cancer (OMC) is higher in people over 50 years of age, and the aggressiveness of the course of the disease is higher in people under 50 years of age. In this context, it is of interest to clarify the mechanisms of immune disorders characteristic of patients of different age groups.

Aim. To research systemic and local immunity in OMC patients and the relationship of peripheral blood lymphocyte population (PBLs) and tumor infiltrating lymphocytes (TILs) with the patient's sex and age.

Materials and methods. PBLs and TILs effector and suppressor populations were studied by flow cytometry in OMC patients aged 29 to 84 years.

Results. The percentage of CD3, CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ T cells, regulatory CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} (CD4Treg) and CD8⁺CD11b⁻CD28⁻ (CD8Treg) T lymphocytes, CD4⁺PD-1⁺ and CD8⁺PD-1⁺ T cells was increased in TILs compared to PBLs. The levels of cytotoxic CD8⁺CD11b⁺CD28⁻ T lymphocytes, NK, CD8⁺Perforin⁺ and CD16⁺Perforin⁺ cells in TILs were lower than in PBLs. The relationship between the level of CD4Treg and other TILs and PBLs depended on the patient's sex. Age-related changes in the levels of NK and CD8 T-cells were observed in men, and CD4Treg – in women.

Conclusion. Local immunity in OMC patients is highly immunosuppressive. The sex of patients influences the relationship between CD4Treg and other populations of PBLs and TILs, as well as age-related changes in the OMC patients' immune system. This investigation results can make a certain contribution to personalized treatment of patients with OMC, taking into account differences in systemic and local immunity and in the immune response to the tumor in patients of different sex and age.

Keywords: peripheral blood lymphocytes, TILs, CD4Treg lymphocytes, CD4⁺PD-1⁺ and CD8⁺PD-1⁺ lymphocytes, patients gender, patients age

For citation: Zabolina T.N., Chertkova A.I., Borunova A.A. et al. Influence of gender and age of patients with oral mucosa cancer on the phenotype of systemic and local immunity. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022;21(2):47–55. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-47-55

Введение

Рак слизистой оболочки полости рта (РСОПР) — один из наиболее распространенных вариантов злокачественных новообразований головы и шеи. РСОПР встречается в 2–4 раза чаще у мужчин, чем у женщин. Одним из факторов риска при этом варианте опухоли является возраст. Частота развития РСОПР наиболее высока у лиц 50–80 лет, однако течение заболевания у них менее агрессивное по сравнению с более молодыми людьми [1]. РСОПР — заболевание с высокой степенью иммуносупрессии, которая обусловлена истощением эффекторных Т-лимфоцитов, выработкой иммуносупрессивных цитокинов и высокой активностью регуляторных (супрессорных) клеток [2–5]. В последнее десятилетие были изучены новые подходы к терапии РСОПР. Предполагается, что лечение в большинстве случаев должно быть комплексным, с включением иммунотерапевтических методов, в том числе с использованием ингибиторов контрольных точек иммунитета [6, 7]. В связи с этим изучение основных показателей системного и локального иммунитета, а также их взаимосвязи с полом и возрастом больных РСОПР является актуальным. Полученные результаты могут внести определенный вклад в обеспечение персонализированного лечения больных РСОПР и прогнозирование клинического ответа на иммунотерапию.

Цель исследования — провести сравнительное исследование показателей системного и локального иммунитета, изучить взаимосвязь субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови (ПК) и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (tumor-infiltrating lymphocytes, TILs), с полом и возрастом больных РСОПР.

Материалы и методы

Характеристика пациентов. В исследование были включены больные с I–IV стадиями РСОПР, получавшие лечение в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Исследование лимфоцитов ПК проводилось у 62 пациентов (30 мужчин и 32 женщин). Медиана возраста пациентов составила 57,0 года (от 15 до 84 лет): женщины — 57,0 года (от 29 до 84 лет), мужчины — 58,0 года (от 15 до 79 лет). Исследование TILs проводилось у 48 пациентов (27 женщин и 21 мужчины).

Иммунологическое исследование. Исследовали параметры системного (лимфоцитов ПК) и локального (TILs) иммунитета. Лимфоциты выделяли из ПК и полученной из опухолевой ткани клеточной суспензии (операционный материал) по параметрам светорассеяния и экспрессии CD45. Проводили многопараметровый цитометрический анализ на 5-параметровом проточном цитофлуориметре аналитического типа FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Для 2-, 3- и 4-цветного окрашивания использовали панель моноклональных антител к поверхностным и внутриклеточным (Perforin) маркерам лимфоцитов (Becton Coulter, США). Определяли процентное содержание Т-клеток и их субпопуляций (CD3⁺CD19⁻, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺); активированных Т-клеток (CD4⁺CD25⁺, CD3⁺HLA-DR⁺); В-клеток (CD3⁻CD19⁺); активированных CD25⁺-, HLA-DR⁺-, CD3⁻HLA-DR⁺-лимфоцитов; CD3⁻CD16⁺CD56⁺- и CD16⁺Perforin⁺-NK-клеток; регуляторных CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}-Т-клеток (CD4Treg); CD4⁺PD-1 (CD279)⁺- и CD8⁺PD-1 (CD279)⁺-клеток; CD8⁺CD11b⁻CD28⁺ (наивных), CD8⁺CD11b⁺CD28⁺ (наивных/клеток

памяти), CD8⁺CD11b⁺CD28⁻ (цитотоксических), CD8⁺CD11b⁻CD28⁻ (CD8Treg) популяций в составе CD45⁺CD8⁺-лимфоцитов. Процент Perforin⁺-клеток в составе CD16⁺- и CD8⁺-лимфоцитов оценивался как цитотоксический потенциал (ЦТП).

Статистический анализ. Для статистической обработки данных использовали программный пакет Statistica 7. Характер распределения данных определяли с использованием критериев Шапиро–Уилка (при $n < 50$) и Колмогорова–Смирнова (при $n \geq 50$). Результаты представлены в виде медианы (Me) и 25-го и 75-го процентилей (квартилей). Различия между показателями определяли с помощью двустороннего

U-критерия Манна–Уитни и критерия Вальда–Вулфовица (W-W). Для определения статистической взаимосвязи между показателями вычисляли коэффициент корреляции Пирсона (r) при нормальном распределении или коэффициент ранговой корреляции Спирмена (ρ) при распределении показателей, отличном от нормального. Уровень статистической значимости был принят равным 0,05.

Результаты

Сравнительное исследование системного и локального иммунитета выявило значительные различия субпопуляционного состава лимфоцитов ПК и TILs (табл. 1).

Таблица 1. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, у больных раком слизистой оболочки полости рта

Table 1. Subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes and tumor-infiltrating lymphocytes in oral mucosa cancer patients

Популяция лимфоцитов Lymphocyte populations	Лимфоциты периферической крови Peripheral blood lymphocytes		Лимфоциты, инфильтрирующие опухоль Tumor infiltrating lymphocytes		p (U)
	Me (квартили), % Me (quartiles), %	n	Me (квартили), % Me (quartiles), %	n	
CD3 ⁺	71,9 (57,6–80,3)	62	88,4 (82,1–91,9)	48	0,000
CD3 ⁺ CD4 ⁺	39,3 (26,9–49,0)	62	48,6 (39,2–58,8)	48	0,000
CD3 ⁺ CD8 ⁺	20,9 (16,3–27,6)	62	39,7 (28,6–50,0)	48	0,000
CD3 ⁻ CD8 ⁺	8,6 (6,4–16,4)	61	1,2 (0,5–2,1)	48	0,000
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	7,3 (5,1–13,1)	62	5,9 (1,9–17,1)	43	0,322
CD3 ⁻ HLA-DR ⁺	6,5 (4,1–9,8)	61	2,0 (0,3–5,4)	43	0,000
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	16,2 (10,7–26,0)	62	2,9 (1,4–4,7)	47	0,000
CD3 ⁻ CD19 ⁺	4,4 (2,4–8,0)	62	3,1 (1,2–7,2)	46	0,183
CD16 ⁺ Perforin ⁺	16,4 (12,9–22,4)	61	2,1 (1,1–6,1)	40	0,000
ЦТП CD16 Cytotoxic potential CD16	92,6 (86,2–96,5)	61	34,6 (21,3–59,0)	40	0,000
CD8 ⁺ Perforin ⁺	19,7 (14,2–25,2)	62	2,6 (1,7–4,9)	41	0,000
ЦТП CD8 Cytotoxic potential CD8	61,4 (49,6–76,0)	62	12,6 (5,3–43,1)	41	0,000
CD4/CD8	1,07 (0,65–1,53)	62	1,22 (0,83–2,01)	45	0,181
CD4 ⁺ CD25 ⁺	9,8 (6,6–18,1)	61	18,8 (14,1–22,7)	45	0,000
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low/-}	7,2 (6,1–8,8)	61	18,3 (11,1–24,4)	44	0,000
CD8 ⁺ CD11b ⁺ CD28 ⁻	56,2 (43,3–68,5)	62	9,6 (6,9–15,5)	44	0,000
CD8 ⁺ CD11b ⁺ CD28 ⁺	5,8 (3,9–9,0)	62	8,2 (5,8–18,9)	44	0,006
CD8 ⁺ CD11b ⁻ CD28 ⁻	7,4 (4,9–10,4)	62	41,0 (24,9–61,2)	44	0,000
CD8 ⁺ CD11b ⁻ CD28 ⁺	25,2 (16,9–38,0)	61	26,6 (18,4–41,1)	44	0,330
CD4 ⁺ CD279 ⁺	5,7 (3,5–10,4)	39	31,7 (24,4–38,5)	33	0,000
CD8 ⁺ CD279 ⁺	4,4 (2,1–9,4)	39	22 (9,2–27,4)	34	0,000

Примечание. n – число пациентов, у которых определялась данная популяция лимфоцитов; U – U -критерий Манна–Уитни; ЦТП – цитотоксический потенциал.

Note. n – the number of patients in whom this lymphocyte population was determined; U – Mann–Whitney U -criterion.

Определение процентного содержания клеток основных линейных популяций лимфоцитов — Т-, NK- и В-клеток — показало, что в опухолевой ткани по сравнению с ПК количество CD3⁺-Т-клеток было статистически значимо выше, что закономерно сочеталось со значительным снижением процентного содержания CD3⁺CD16⁺CD56⁺-NK-клеток (их доля в составе TILs была в 5,6 раза ниже, чем в ПК). Различий в количестве CD3⁺CD19⁺-В-лимфоцитов между ПК и TILs не наблюдалось (см. табл. 1). Уровень основных субпопуляций Т-клеток (CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺) также был выше в составе TILs, чем в ПК.

Т-лимфоциты являются главными клетками-эффекторами противоопухолевого иммунитета [8]. При многих вариантах опухолей, включая РСОПР, в опухолевом микроокружении обнаруживаются высокие уровни CD4⁺- и CD8⁺-Т-лимфоцитов [9–11]. Однако в подавляющем большинстве случаев они не предотвращают опухолевую прогрессию, что указывает на их дисфункциональное состояние [4, 12]. Установлено, что постоянная антигенная стимуляция, характерная для хронических инфекций и многих типов рака, приводит к развитию истощения (exhaustion) Т-клеток. Это состояние отличается от толерантности и анергии [12–15]. Истощение характеризуется высокой и устойчивой экспрессией множества ингибиторных рецепторов, в частности PD-1, CTLA4, Tim-3 и Lag-3, отсутствием адекватного ответа на стимуляцию Т-клеточного рецептора, снижением секреции эффекторных цитокинов, таких как интерлейкин 2, интерферон γ и фактор некроза опухолей α , значительным снижением пролиферативного потенциала, нарушением эффекторных функций и, как следствие, неэффективным контролем опухолевого роста [15–17]. В настоящем исследовании было выявлено, что процентное содержание CD4⁺-, и CD8⁺-Т-клеток, экспрессирующих ингибиторный рецептор PD-1 (CD279), было значительно выше в опухолевой ткани, чем в ПК (см. табл. 1). Отмечалось снижение функциональной активности CD8⁺-лимфоцитов: уровень CD8⁺-клеток, экспрессирующих Perforin, и их ЦТП в опухоли были статистически значимо ниже, чем в составе лимфоцитов ПК. К тому же процентное содержание цитотоксических CD8⁺CD11b⁺CD28⁺-Т-клеток в составе CD8⁺-TILs было резко снижено по сравнению с ПК, где они являлись основной популяцией CD8⁺-клеток (см. табл. 1).

Супрессорные факторы опухолевого микроокружения могут вызывать дисфункцию и NK-клеток [18]. У больных РСОПР в данном исследовании отмечалось снижение уровня эффекторных CD16⁺Perforin⁺-NK-клеток, а также снижение ЦТП NK-клеток. Понижение уровня активированных CD3⁺HLA-DR⁺-лимфоцитов, скорее всего, было связано с уменьшением числа NK-клеток в составе TILs. Истощение

Т-клеток обратимо, и накапливаются данные о том, что важным механизмом противоопухолевого эффекта блокаторов PD-1-пути у больных с некоторыми типами злокачественных опухолей является «отмена» истощения Т-клеток [15, 16]. В то же время частота случаев успешного применения блокаторов контрольных точек иммунитета у онкологических пациентов по-прежнему недостаточно высока. Известно, что ингибиторные рецепторы участвуют в процессе активации Т-клеток и играют физиологическую роль в иммунном ответе. Это усложняет обнаружение специфических для истощенных Т-клеток маркеров и, следовательно, идентификацию и разработку эффективных целевых методов лечения [17].

В опухолевом микроокружении эффекторные Т-клетки сталкиваются с различными клетками и цитокинами, которые подавляют их эффективность и превращают в дисфункциональные Т-клетки. В настоящее время предполагается, что истощению Т-клеток могут прямо или опосредованно содействовать регуляторные клетки: CD4⁺Treg, CD8⁺Treg, NKT-и другие супрессорные популяции [14]. В настоящем исследовании в составе CD8⁺-лимфоцитов в опухолевой ткани, в отличие от ПК, наибольший процент составляли регуляторные (супрессорные) CD8⁺CD11b⁺CD28⁺-Т-клетки. Процентное содержание CD4⁺CD25⁺-клеток было статистически значимо выше в опухоли, чем в ПК. При этом количество CD4⁺Treg-клеток в составе CD4⁺CD25⁺-популяции TILs был более чем в 2 раза выше, чем в ПК (см. табл. 1). Отмечалась положительная корреляция CD8⁺PD-1⁺-лимфоцитов с CD8⁺Treg (p (95 % доверительный интервал (ДИ) — 0,474 (0,145; 0,742); $n = 32$; $p = 0,006$) и CD4⁺PD-1⁺-лимфоцитов с CD4⁺CD25⁺-клетками (p (95 % ДИ) — 0,565 (0,246; 0,790); $n = 32$; $p = 0,001$). В экспериментальных исследованиях двойная блокада CD4⁺Treg и PD-1/PD-L1-пути приводила к отмене истощения CD8⁺-Т-клеток, и эффект был более выраженным, чем при блокаде только PD-L1 [19]. Эти результаты свидетельствуют о том, что регуляторные Т-клетки эффективно поддерживают дисфункциональное состояние эффекторных Т-клеток.

На характер взаимоотношения иммунной системы и опухоли могут оказывать влияние различные факторы организма, включая возраст и пол пациента [20, 21]. Согласно исследованиям о влиянии возраста на иммунную систему человека, представленным в обзоре G. Pawelec [20], в течение жизни происходит общее старение всех популяций лимфоцитов врожденного и адаптивного иммунитета, изменение их количества в ПК, и, как правило, снижение их функциональной активности. Иммунная система становится менее способной функционировать оптимально. Для пожилых людей характерно присутствие меньшего числа наивных Т-клеток с ограниченным

репертуаром Т-клеточных рецепторов в сочетании с большим количеством Т-клеток памяти. Наиболее типичным изменением является выраженное увеличение дифференцированных клеток памяти, в частности CD28-негативных, CD27-негативных CD8⁺-Т-клеток (процесс, называемый иммуностарением, — immunosenescence), накопление которых может быть неблагоприятным прогностическим фактором [20, 22]. Хотя увеличение числа senescent-Т-клеток наиболее характерно для лиц пожилого возраста, в ряде случаев их накопление обнаруживали и у относительно молодых людей при хронической инфекции или некоторых типах рака [12]. С возрастом могут также увеличиваться уровни CD4Трег-клеток, что еще больше ослабляет иммунную реактивность у пожилых людей. Количество периферических NK-клеток у лиц старшего возраста обычно выше, чем у молодых людей. Однако NK-клетки пожилых людей могут иметь более низкую экспрессию активационных рецепторов NKp30 и NKp46 и костимулирующей молекулы DNAX (DNAM-1), что приводит к ухудшению их функционирования. Нарушение противоопухолевых функций senescent- и exhausted-Т-клеток контролируется различающимися регуляторными и молекулярными механизмами, однако оба процесса приводят к неспособности иммунной системы элиминировать опухолевые клетки и противодействовать прогрессивному опухолевому росту [12]. В нашем исследовании в опухолевой ткани статистически значимой корреляции содержания исследованных популяций лимфоцитов с возрастом не наблюдалось ни в целом по группе, ни в зависимости от пола (результаты не представлены). К сожалению, о влиянии старения на резидентные тканевые иммунные клетки известно очень мало [20].

В целом по группе мы обнаружили в ПК положительную взаимосвязь с возрастом уровня CD3⁺CD8⁺-NK-клеток и отрицательную — количества наивных CD8⁺CD28⁺-Т-лимфоцитов. Соответственно, с увеличением возраста снижалась величина соотношения CD8⁺CD28⁺/CD8⁺CD28⁻ (табл. 2). В то же время характер возрастных изменений уровней NK-, Т- и CD4Трег-клеток у больных РСОПР зависел от пола пациентов (табл. 3).

Оказалось, что возрастание в ПК уровня CD3⁺CD56⁺CD16⁺-NK-клеток, CD3⁺CD8⁺, CD16⁺Perforin⁺-популяций в их составе и CD8⁺CD28⁻-Т-лимфоцитов, а также уменьшение числа наивных CD8⁺CD28⁺-Т-клеток наблюдалось только у пациентов мужского пола. У женщин отмечалось лишь изменение уровня регуляторных Т-клеток: с увеличением возраста их уровень не повышался, а снижался (см. табл. 3).

На основании анализа публикаций за период с 1999 по 2014 г. L. Mirandola и соавт. [23] пришли

Таблица 2. Корреляция количества лимфоцитов периферической крови с возрастом больных раком слизистой оболочки полости рта
Table 2. Correlation of the number of peripheral blood lymphocytes with the age of patients with oral mucosa cancer

Популяция лимфоцитов (%) Lymphocyte population (%)	n	r (95 % ДИ) r (95 % CI)	p
CD3-CD8 ⁺	61	0,423 (0,200; 0,592)	0,000
CD8 ⁺ CD28 ⁺	61	-0,426 (-0,667; -0,164)	0,001
CD8 ⁺ CD28 ⁺ / CD8 ⁺ CD28 ⁻	61	-0,379 (-0,587; -0,131)	0,005

Примечание. В таблице представлены только статистически значимые результаты. n — число пациентов, у которых определялась данная популяция лимфоцитов; r — коэффициент корреляции Пирсона; ДИ — доверительный интервал.

Note. The table shows only statistically significant results. n — the number of patients in whom this lymphocyte population was determined; r — Pearson correlation coefficient; CI — confidence interval.

Таблица 3. Взаимосвязь количества NK-, Т- и CD4Трег-клеток периферической крови с возрастом в зависимости от пола больных раком слизистой оболочки полости рта

Table 3. The relationship of the number of NK-, T- and CD4Treg cells of peripheral blood with age, depending on the sex of patients with oral mucosa cancer

Популяция лимфоцитов (%) Lymphocyte population (%)	n	R (95 % ДИ) R (95 % CI)	p
Мужчины Men			
CD3-CD8 ⁺	30	0,508* (0,186; 0,738)	0,004
CD3-CD16 ⁺ CD56 ⁺	30	0,569* (0,303; 0,753)	0,001
CD16 ⁺ Perforin ⁺	29	0,667* (0,383; 0,836)	0,000
CD8 ⁺ CD28 ⁺	30	-0,436* (-0,697; -0,073)	0,016
CD8 ⁺ CD28 ⁻	30	0,484** (0,073; 0,735)	0,007
Женщины Women			
CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low/-}	32	-0,477* (-0,745; -0,128)	0,006

Примечание. В таблице представлены только статистически значимые результаты. n — число пациентов, у которых определялась данная популяция лимфоцитов; R — коэффициент корреляции: *Спирмена (ρ), **Пирсона (r); ДИ — доверительный интервал.

Note. The table shows only statistically significant results. n — the number of patients in whom this lymphocyte population was determined; R — correlation coefficient: *Spearman (ρ), **Pearson (r); CI — confidence interval.

к заключению, что иммунные системы мужчин и женщин демонстрируют радикальные различия, главным образом из-за иммунорегуляторных эффектов половых гормонов. Факторы, связанные с полом, коррелируют с заболеваемостью раком, исходом и реакцией на терапию; подчеркивается, что половые различия имеют большое значение во взаимодействии опухоль-хозяин [21, 24, 25].

В настоящей работе также исследовалось влияние CD4Трег на уровень других популяций лимфоцитов ПК и TILs у больных РСОПР в зависимости от пола пациентов. Результаты представлены в табл. 4 и 5. Уровень CD4Трег у конкретного больного определялся по отношению к значению медианы этого показателя для всей группы больных: $\geq \text{Me}$ или $< \text{Me}$.

Оказалось, что статистически значимое влияние CD4Трег на уровень других популяций лимфоцитов ПК наблюдалось главным образом у женщин. Повышение процентного содержания CD4Трег сочеталось со снижением общего числа CD3⁺CD19⁻-Т-клеток и их популяций CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺, а также наивных CD8⁺CD11b⁻CD28⁺-Т-клеток и компенсаторным повышением процента НК-клеток, включая

CD16⁺Perforin⁺-популяцию (группы 1 и 2). В то же время у мужчин повышенный уровень CD4Трег приводил лишь к снижению ЦТП CD8⁺-Т-лимфоцитов (группы 3 и 4).

В опухолевой ткани влияние количества CD4Трег было менее выражено, чем в ПК, но различалось у мужчин и женщин. У женщин повышение уровня CD4Трег ассоциировалось с увеличением CD3⁺CD4⁺- и снижением CD3⁺CD8⁺-Т-клеток. Уровень CD3⁺CD4⁺, скорее всего, был повышен за счет увеличения числа CD4Трег (группы 5 и 6). В то же время у мужчин увеличение числа CD4Трег сочеталось с уменьшением процента активированных CD3⁺HLA-DR⁺-Т-клеток и увеличением процента CD8⁺-Т-лимфоцитов, экспрессирующих коингибиторный рецептор PD-1 (группы 7 и 8). Таким образом, пол пациентов имел определенное влияние на характер взаимоотношения CD4Трег с другими популяциями лимфоцитов ПК и TILs. В то же время следует отметить, что и в ПК, и в опухолевой ткани у пациентов обоего пола наиболее значимым неблагоприятным влиянием увеличения уровня CD4Трег было влияние на CD3⁺CD8⁺-Т-клетки-эффекторы: снижение их уровня у женщин,

Таблица 4. Влияние CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}-Т-клеток (CD4Трег) на количество лимфоцитов других популяций в периферической крови в зависимости от пола пациентов

Table 4. Influence of CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} T cells (CD4Трег) on the number of lymphocytes of other populations of peripheral blood depending on the sex of patients

Популяция лимфоцитов Lymphocyte population	Me (квартили), % Me (quartiles), %		p (U)
	Женщины Women		
	Группа 1* (n = 16) Group 1* (n = 16)	Группа 2* (n = 16) Group 2* (n = 16)	
CD3 ⁺ CD19 ⁻	78,2 (64,4–81,7)	65,2 (41,4–76,5)	0,021
CD3 ⁺ CD4 ⁺	48,8 (32,8–55,6)	28,9 (10,7–41,6)	0,017
CD3 ⁺ CD8 ⁺	23,6 (17,0–29,5)	17,1 (12,5–24,1)	0,047
CD8 ⁺ CD11b-CD28 ⁺	32,4 (18,2–39,3)	17,8 (10,6–23,7)	0,029
CD3-CD16 ⁺ CD56 ⁺	11,5 (10,0–27,7)	22,9 (18,3–41,2)	0,011
CD16 ⁺ Perforin ⁺	14,5 (7,6–19,3)	21,6 (13,8–29,0)	0,026
	Мужчины Men		
	Группа 3** (n = 15) Group 3** (n = 15)	Группа 4** (n = 15) Group 4** (n = 15)	
Цитотоксический потенциал CD8 ⁺ Cytotoxic potential CD8 ⁺	62,0 (56,1–77,0)	50,7 (39,6–66,2)	0,033

*Me CD4Трег в группе женщин — 6,6 % (группа 1: CD4Трег $< \text{Me}$; группа 2: CD4Трег $\geq \text{Me}$); **Me CD4Трег в группе мужчин — 7,8 % (группа 3: CD4Трег $< \text{Me}$; группа 4: CD4Трег $\geq \text{Me}$).

*Me CD4Трег in the group of women — 6.6 % (Group 1: CD4Трег $< \text{Me}$; Group 2: CD4Трег $\geq \text{Me}$); **Me CD4Трег in the male group — 7.8 % (Group 3: CD4Трег $< \text{Me}$; Group 4: CD4Трег $\geq \text{Me}$).

Примечание. Здесь и в табл. 5: U — U-критерий Манна–Уитни.

Note. Here and in table 5: U — Mann–Whitney U-criterion.

Таблица 5. Влияние $CD4^+CD25^+CD127^{low/-}$ -Т-клеток ($CD4Treg$) на количество лимфоцитов других популяций среди лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, в зависимости от пола пациентов

Table 5. Influence of $CD4^+CD25^+CD127^{low/-}$ T cells ($CD4Treg$) on the number of lymphocytes of other populations of tumor-infiltrating lymphocytes depending on the sex of patients

Популяция лимфоцитов Lymphocyte population	Me (квартили), % Me (quartiles), %		p (U)
	Женщины Women		
	Группа 5* (n = 12) Group 5* (n = 12)	Группа 6* (n = 12) Group 6* (n = 12)	
CD3 ⁺ CD4 ⁺	42,0 (36,4–49,8)	54,4 (45,3–60,6)	0,049
CD3 ⁺ CD8 ⁺	45,3 (39,4–49,4)	32,4 (24,5–39,8)	0,020
	Мужчины Men		
	Группа 7** (n = 10) Group 7** (n = 10)	Группа 8** (n = 10) Group 8** (n = 10)	
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	10,0 (5,1–16,6)	2,3 (0,8–6,6)	0,022
CD8 ⁺ CD279 ⁺	10,3 (5,4–23,3) (n = 8)	28,6 (27,4–47,5) (n = 5)	0,019

*Me $CD4Treg$ в группе женщин — 18,5 % (группа 5: $CD4Treg < Me$; группа 6: $CD4Treg \geq Me$); **Me $CD4Treg$ в группе мужчин — 19,6 % (группа 7: $CD4Treg < Me$; группа 8: $CD4Treg \geq Me$).

*Me $CD4Treg$ in the group of women — 18.5 % (Group 5: $CD4Treg < Me$; Group 6: $CD4Treg \geq Me$); **Me $CD4Treg$ in the male group — 19.6 % (Group 7: $CD4Treg < Me$; Group 8: $CD4Treg \geq Me$).

снижение ЦТП $CD8^+$ и повышение уровня $CD8^+PD-1^+$ -Т-лимфоцитов у мужчин.

Закключение

Повышенное число $CD4Treg$ - и $CD8Treg$ -лимфоцитов наряду со сниженным уровнем $CD8^+Perforin^+$ -лимфоцитов и ЦТП $CD8$ -клеток, крайне низким процентным содержанием НК-клеток, в том числе экспрессирующих Perforin, повышенным уровнем $CD4^+PD-1^-$ и $CD8^+PD-1^+$ -Т-клеток в опухолевой ткани по сравнению с ПК подтверждает высокоиммуносупрессивный характер локального иммунитета

у больных РСОПР. Это указывает на необходимость учета состояния иммунной системы каждого пациента с РСОПР при назначении системной терапии, и особенно иммунотерапии. Пол пациентов влияет на характер взаимосвязи $CD4Treg$ с другими популяциями лимфоцитов ПК и TILs, а также на возрастные изменения в иммунной системе пациентов с РСОПР. Полученные результаты могут внести определенный вклад в обеспечение персонализированного лечения больных РСОПР с учетом различий в системном и локальном иммунитете и в иммунном ответе на опухоль у больных разного пола и возраста.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Dhanuthai K., Rojanawatsirivej S., Thosaporn W. et al. Oral cancer: a multicenter study. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2018;23(1):e23–e9. DOI: 10.4317/medoral.21999
- Yokota T., Homma A., Kiyota N. et al. Head and neck cancer study group. Immunotherapy for squamous cell carcinoma of the head and neck. Jpn J Clin Oncol 2020;50(10):1089–96. DOI: 10.1093/jco/hyaa139
- Deng W.W., Li Y.C., Ma S.R. et al. Specific blockade CD73 alters the “exhausted” phenotype of T cells in head and neck squamous cell carcinoma. Int J Cancer 2018;143(6):1494–504. DOI: 10.1002/ijc.31534
- Fenoglio D., Belgioia L., Parodi A. et al. Development of exhaustion and acquisition of regulatory function by infiltrating $CD8^+CD28^-$ T Lymphocytes dictate clinical outcome in head and neck cancer. Cancers (Basel) 2021;13(9):2234. DOI: 10.3390/cancers13092234
- Chen J., Yang J., Li H. Single-cell transcriptomics reveal the intratumoral landscape of infiltrated T-cell subpopulations in oral squamous cell carcinoma. Mol Oncol 2021;5(4):866–86. DOI: 10.1002/1878-0261.12910
- Cohen E.E.W., Soulières D., Le Tourneau C. et al. KEYNOTE-040 investigators. Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. Lancet 2019;393(10167):156–67. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31999-8
- Johnson D.E., Burtneß B., Leemans C.R. et al. Head and neck squamous cell carcinoma. Nat Rev Dis Primers 2020;6(1):92. DOI: 10.1038/s41572-020-00224-3
- Raskov H., Orhan A., Christensen J.P., Gögenur I. Cytotoxic $CD8^+$ T cells in cancer and cancer immunotherapy. Br J Cancer 2021;124(2):359–67. DOI: 10.1038/s41416-020-01048-4

9. Заботина Т.Н., Короткова О.В., Борунова А.А. и др. Многопараметровое исследование иммунофенотипа лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль у онкологических больных. Российский онкологический журнал 2016;21(1–2):51–4. DOI: 10.18821/1028-9984-2015-21-1-51-54
Zabotina T.N., Korotkova O.V., Borunova A.A. et al. Multiparameter study of the immunophenotype of lymphocytes infiltrating the tumor in cancer patients. Rossiiskiy onkologicheskii zhurnal = Russian Journal of Oncology 2016;21(1–2):51–4. (In Russ.). DOI: 10.18821/1028-9984-2015-21-1-51-54
10. Заботина Т.Н., Черткова А.И., Циклаури В.Т. и др. Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови и инфильтрирующих опухоль у больных плоскоклеточным раком головы и шеи. Иммунология 2019;40(3):10–9. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-13002
Zabotina T.N., Chertkova A.I., Tsiklauri V.T. et al. Features of peripheral blood lymphocytes and tumor infiltrating lymphocytes subpopulations in patients with squamous cell head and neck cancer. Immunologiya = Immunology 2019;40(3):10–9. (In Russ.). DOI: 10.24411/0206-4952-2019-13002
11. Заботина Т.Н., Черткова А.И., Борунова А.А. и др. Взаимосвязь субпопуляций лимфоцитов больных раком молочной железы с результатами лечения. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(3):25–33. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-25
Zabotina T.N., Chertkova A.I., Borunova A.A. et al. Relationship of lymphocyte subpopulations in breast cancer patients with treatment results. Rossiiskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(3):25–33. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-25
12. Zhao Y., Shao Q., Peng G. Exhaustion and senescence: two crucial dysfunctional states of T cells in the tumor microenvironment. Cell Mol Immunol 2020;17(1):27–35. DOI: 10.1038/s41423-019-0344-8
13. Wherry E.J., Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. Nat Rev Immunol 2015;15(8):486–99. DOI: 10.1038/nri3862
14. Davoodzadeh Gholami M., Kardar G.A., Saeedi Y. et al. Exhaustion of T lymphocytes in the tumor microenvironment: significance and effective mechanisms. Cell Immunol 2017;322:1–14. DOI: 10.1016/j.cellimm.2017.10.002
15. Yang F., Zeng Z., Li J., Ren X., Wei F. IM-3 and CEACAM1 are prognostic factors in head and neck squamous cell carcinoma. Front Mol Biosci 2021;8:619765. DOI: 10.3389/fmolb.2021.619765
16. Kurachi M. CD8(+) T cell exhaustion. Semin Immunopathol 2019;41(3):327–37. DOI: 10.1007/s00281-019-00744-5
17. Jiang W., He Y., He W. et al. Exhausted CD8⁺ T cells in the tumor immune microenvironment: new pathways to therapy. Front Immunol 2021;11:622509. DOI: 10.3389/fimmu.2020.622509
18. Zhang C., Liu Y. Targeting NK cell checkpoint receptors or molecules for cancer immunotherapy. Front Immunol 2020;11:1295. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01295
19. Penalzo-MacMaster P., Kamphorst A.O., Wieland A. et al. Interplay between regulatory T cells and PD-1 in modulating T cell exhaustion and viral control during chronic LCMV infection. J Exp Med 2014;211(9):1905–18. DOI: 10.1084/jem.20132577
20. Pawelec G. Does patient age influence anti-cancer immunity? Semin Immunopathol 2019;41(1):125–31. DOI: 10.1007/s00281-018-0697-6
21. Irelli A., Sirufo M.M., D'Ugo C. et al. Sex and gender influences on cancer immunotherapy response. Biomedicines 2020;8(7):232. DOI: 10.3390/biomedicines8070232
22. Henson S.M., Riddell N.E., Akbar A.N. Properties of end-stage human T cells defined by CD45RA re-expression. Curr Opin Immunol 2012;24(4):476–81. DOI: 10.1016/j.coi.2012.04.001
23. Mirandola L., Wade R., Verma R. et al. Sex-driven differences in immunological responses: challenges and opportunities for the immunotherapies of the third millennium. Int Rev Immunol 2015;34(2):134–42. DOI: 10.3109/08830185.2015.1018417
24. Gubbels Bupp M.R., Potluri T., Fink A.L., Klein S.L. The confluence of sex hormones and aging on immunity. Front Immunol 2018;9:1269. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01269
25. Capone I., Marchetti P., Ascierto P.A. et al. Sexual dimorphism of immune responses: a new perspective in cancer immunotherapy. Front Immunol 2018;9:552. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00552

Вклад авторов

Т.Н. Заботина: разработка плана исследования, написание текста рукописи;
 А.И. Черткова: анализ и интерпретация данных, написание текста рукописи;
 А.А. Борунова: статистическая обработка данных;
 Е.Н. Захарова: подготовка полученных данных к анализу;
 Э.К. Шоуа, И.Б. Шоуа: создание базы данных, анализ данных;
 В.Т. Циклаури: клинические исследования, обработка клинических данных;
 И.А. Задеренко: клинические исследования, анализ клинических данных;
 З.Г. Кадагидзе: обзор публикаций по теме статьи, обсуждение и научное редактирование рукописи.

Authors contributions

T.N. Zabotina: development of a research plan, manuscript writing;
 A.I. Chertkova: analysis and interpretation of data, manuscript writing;
 A.A. Borunova: statistical data processing;
 E.N. Zakharova: preparation of the obtained data for analysis;
 E.K. Shoua, I.B. Shoua: creation of database; data analysis;
 V.T. Tsiklauri: clinical trials, processing of clinical data;
 I.A. Zaderenko: clinical trials, clinical data analysis;
 Z.G. Kadagidze: review of publications on the topic of the article, discussion and scientific editing of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

Т.Н. Заботина / T.N. Zabotina: <https://orcid.org/0000-0001-7631-5699>
 А.И. Черткова / A.I. Chertkova: <https://orcid.org/0000-0001-9146-5986>
 А.А. Борунова / A.A. Borunova: <https://orcid.org/0000-0002-1854-3455>
 Е.Н. Захарова / E.N. Zakharova: <https://orcid.org/0000-0003-2790-6673>
 Э.К. Шоуа / E.K. Shoua: <https://orcid.org/0000-0003-3937-474X>

И.Б. Шоуа / I.B. Shoua: <https://orcid.org/0000-0002-9488-4710>
В.Т. Циклаури / V.T. Tsiklauri: <https://orcid.org/0000-0002-3090-695X>
И.А. Задеренко / I.A. Zaderenko: <https://orcid.org/0000-0003-0183-4827>
З.Г. Кадагидзе / Z.G. Kadagidze: <https://orcid.org/0000-0002-0058-0987>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации в рамках темы НИР № AAA-A-19-119022090028-6.
Funding. The study was performed with the financial support of the Ministry of Health of Russian Federation in the framework of research No. AAA-A-19-119022090028-6.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.
Compliance with patient rights and principles of bioethics. All the patients signed informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 18.02.2022. Принята к публикации: 16.05.2022.
Article submitted: 18.02.2022. Accepted for publication: 16.05.2022.