

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Filip Tudor

**USPOREDBA IZRAŽAJA I ZNAČAJ PROGRAMIRANOG
LIGANDA SMRTI 1 U PREINVAZIVNIM LEZIJAMA I
SKVAMOZNOM KARCINOMU GRKLJANA**

Doktorski rad

Rijeka, 2025.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Filip Tudor

**USPOREDBA IZRAŽAJA I ZNAČAJ PROGRAMIRANOG
LIGANDA SMRTI 1 U PREINVAZIVNIM LEZIJAMA I
SKVAMOZNOM KARCINOMU GRKLJANA**

Doktorski rad

Mentori: izv. prof. dr.sc. Ita Hadžisejdić dr. med. i
dr. sc. Blažen Marijić dr. med.

Rijeka, 2025.

UNIVERSITY OF RIJEKA
SCHOOL OF MEDICINE

Filip Tudor

**COMPARISON OF EXPRESSION AND SIGNIFICANCE OF
PROGRAMMED DEATH LIGAND 1 IN PREINVASIVE
LESIONS AND LARYNGEAL SQUAMOUS CELL
CARCINOMA**

Doctoral thesis

Mentors: Assoc. Prof. Ita Hadžisejdić, MD, PhD and
Blažen Marijić, MD, PhD

Rijeka, 2025.

Mentori doktorskog rada: izv. prof. dr. sc. Ita Hadžisejdić dr. med. i dr. sc. Blažen Marijić dr. med.

Doktorski rad obranjen je dana _____ u/na _____

_____ pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

4. _____

5. _____

Rad ima _____ listova.

UDK: _____

PREDGOVOR

Disertacija je izrađena na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju i na Klinici za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata Kliničkog bolničkog centra Rijeka.

Želim zahvaliti:

izv. prof. dr. sc. Ili Hadžisejdić, dr. med., mojoj mentorici koja me vrlo jasno vodila kroz proces istraživanja i izrade doktorske disertacije, davala savjete i podršku te u najkraćem mogućem vremenskom roku odgovarala na sva moja pitanja i razjašnjavala sve nedoumice. Također zahvaljujem na velikoj pomoći prilikom pisanja i objave znanstvenog rada te pomoći prilikom pripreme obrane teme i obrane doktorske disertacije.

dr. sc. Blaženu Marijiću, dr. med., mojem komentoru, koji me prije svega povezo s mentoricom. Nadalje, bio je prvi koji me uveo u "svijet znanosti" te me naučio osnovama znanstvenog rada. Također zahvaljujem na velikoj pomoći u raznim fazama samog istraživanja, prilikom pisanja te pomoći prilikom pripreme obrane teme i obrane doktorske disertacije.

Zahvaljujem roditeljima na bezuvjetnoj podršci tijekom cijelog razdoblja studiranja i specijalizacije.

Zahvaljujem supruzi Ani na velikoj podršci, a posebice u zadnjim mjesecima pisanja znanstvenog rada i doktorske disertacije koje je dodatno bilo "zakomplicirano" rođenjem našeg sina Nike.

"Život je kratak, stjecanje znanja dugo, iskustvo varljivo, a povoljna prigoda trenutačna."

Hipokrat

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Unatoč značajnom napretku u području medicine, karcinom grkljana i dalje predstavlja izazov obzirom da se petogodišnje preživljenje nije značajnije mijenjalo u zadnjim desetljećima. Područje imunološke onkologije stvorilo je obećavajuće imunomodulacijske terapije i otvorilo nove načine liječenja. Programirani ligand smrti 1 (PD-L1) transmembranski je protein koji se veže na protein programirane stanične smrti 1 (PD-1) smješten na površini citotoksičnih limfocita. Vezivanje uzrokuje niz kaskadnih reakcija koje dovode do smanjenog imunološkog odgovora. Cilj ove studije je utvrditi razinu izražaja PD-L1 kao i stanica mikrookoliša (CD4, CD8, CD68 i CD163) u skvamoznim lezijama grkljana, njihov međusobni odnos te utjecaj na preživljenje kod skvamoznih karcinoma ili progresiju bolesti u slučaju displazija.

Ispitanici i metode: Ova retrospektivna studija uključila je 179 bolesnika, a od toga 102 s dijagnozom skvamoznog karcinoma grkljana, 41 s displazijom grkljana te 36 s polipima glasnica. Za procjenu izražaja PD-L1 kao i stanica tumorskog mikrookoliša (CD4, CD8, CD68 i CD163) korištena je imunohistokemijska analiza.

Rezultati: PD-L1 izražaj kao i izražaj stanica tumorskog mikrookoliša statistički je značajno veći u karcinomima grkljana u odnosu na displazije te u displazijama u odnosu na benigne lezije. Nije nađena statistički značajna razlika u PD-L1 izražaju niti u izražaju stanica tumorskog mikrookoliša između displazija koje su progredirale u karcinom i onih koje to nisu. Dokazana je statistički značajna pozitivna korelacija PD-L1 sa svim ispitivanim stanicama tumorskog mikrookoliša. Bolesnici s visokim intraepitelnim izražajem CD68 i CD163 ($p=0.0005$ i $p=0.006$) imali su statistički značajno kraće preživljenje specifično za bolest. Nadalje, statistički kraće vrijeme do pojave recidiva bolesti pronađeno je u bolesnika s visokim intratepelnim CD68 i visokim ukupnim CD8 ($p=0.049$ i $p=0.019$). Pojačan ukupni izražaj CD8 ($>23\%$) i pojačan intraepitelni izražaj CD68 ($>2,7\%$) također su bili statistički značajni prediktori recidiva ($p=0.028$, OR=3.11 i $p=0.019$, OR=3.13).

Zaključak: Rezultati ove studije ukazuju da su stanice mikrookoliša tumora značajni prognostički čimbenici kod skvamoznog karcinoma grkljana. Pojačani izražaji CD68 i CD163 prediktori su lošijeg preživljenja kod bolesnika sa skvamoznim karcinomom grkljana.

Ključne riječi: Displazije; Karcinom grkljana; PD-L1; Preživljenje; Tumorski mikrookoliš.

SUMMARY

Objectives: Despite significant progress in the field of medicine, laryngeal cancer continues to represent a challenge, given that the five-year survival rate has not significantly changed in recent decades. The field of immune oncology has created promising immunomodulation therapies and opened up new ways of treatment. Programmed death ligand 1 (PD-L1) is a transmembrane protein that binds to the programmed cell death protein 1 (PD-1) located on the surface of cytotoxic lymphocytes. The binding causes a series of cascade reactions that lead to a reduced immune response. The aim of this study is to determine the expression level of PD-L1 as well as microenvironmental cells (CD4, CD8, CD68 and CD163) in laryngeal squamous lesions, their mutual relation and influence on survival in squamous carcinomas or disease progression in the case of dysplasia.

Patients and methods: This retrospective study included 179 patients, of which 102 were diagnosed with squamous laryngeal carcinoma, 41 with laryngeal dysplasia, and 36 with vocal fold polyps. Immunohistochemical methods were used to evaluate the expression of PD-L1 as well as the cells of the tumor microenvironment (CD4, CD8, CD68 and CD163).

Results: PD-L1 expression as well as the expression of cells in the tumor microenvironment is statistically significantly higher in laryngeal carcinomas compared to dysplasias and in dysplasias compared to benign lesions. No statistically significant difference was found in PD-L1 expression or in the expression of cells in the tumor microenvironment between dysplasias that progressed to cancer and those that didn't. A statistically significant positive correlation of PD-L1 with all examined cells of the tumor microenvironment was demonstrated. Patients with high intraepithelial expression of CD68 and CD163 ($p=0.0005$ and $p=0.006$) had statistically significantly shorter disease-specific survival. Furthermore, a statistically shorter time to recurrence was found in patients with high intraepithelial CD68 and high overall CD8 ($p=0.049$ and $p=0.019$). Increased overall expression of CD8 ($>23\%$) and increased intraepithelial expression of CD68 ($>2.7\%$) were also statistically significant predictors of recurrence ($p=0.028$, $OR=3.11$ and $p=0.019$, $OR=3.13$).

Conclusion: The results of this study indicate that tumor microenvironment cells are significant prognostic factors in squamous laryngeal carcinoma. Increased expression of CD68 and CD163 are predictors of worse survival in patients with squamous laryngeal carcinoma.

Key words: Dysplasia; Laryngeal carcinoma; PD-L1; Survival; Tumor microenvironment.

SADRŽAJ

1.	UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1	Epidemiologija i etiologija skvamoznog karcinoma grkljana	1
1.2	Klinička slika	2
1.2.1	Klinička klasifikacija tumora	3
1.2.2	Patohistološke karakteristike tumora	5
1.3	Dijagnostika skvamoznog karcinoma grkljana	6
1.4	Mogućnosti liječenja	8
1.4.1	Kirurško liječenje	8
1.4.2	Onkološko liječenje	9
1.5	Prognoza i preživljenje	13
1.6	Prekancerozne lezije grkljana	13
1.7	Programirani ligand smrti 1 (PD-L1)	15
1.8	Tumorski mikrookoliš	19
1.8.1	T limfociti	19
1.8.2	Makrofazi	20
1.9	Humani papiloma virus (HPV)	21
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA	23
2.1	Hipoteza	23
3.	ISPITANICI I METODE	24
3.1	Ispitivana skupina	24
3.2	Tkivne mikroareje (TMA)	26
3.3	Metodologija rada	27

3.3.1	Imunohistokemijsko bojanje	27
3.3.2	Evaluacija imunohistokemijskog bojenja.....	30
3.3.3	Ekstrakcija DNA i lančana reakcija polimerazom (PCR).....	32
3.4	Etički aspekti istraživanja	33
3.5	Statistička obrada rezultata	33
4.	REZULTATI	36
4.1	Usporedba izražaja PD-L1, CD4, CD8, CD68 i CD163 u benignim lezijama, displazijama i skvamoznim karcinomima grkljana	36
4.2	Humani papiloma virus u laringealnim lezijama.....	37
4.3	Laringealne displazije	37
4.3.1	Usporedba izražaja PD-L1, CD4, CD8, CD68 i CD163 u displazijama niskog i visokog stupnja.....	37
4.3.2	Korelacija izražaja PD-L1 s CD4, CD8, CD68 i CD163 u laringealnim displazijama	40
4.3.3	Usporedba izražaja PD-L1, CD4, CD8, CD68 i CD163 displazija koje su progredirale u karcinom s displazijama koje nisu progredirale.....	41
4.4.	Skvamozni karcinom grkljana (SKG)	43
4.4.1.	Ispitivana skupina	43
4.4.2.	Izražaj PD-L1, CD4, CD8, CD68 i CD163 u SKG-u i usporedba između ranog i uznapredovalog stadija karcinoma	43
4.4.3.	Korelacija izražaja PD-L1 s CD4, CD8, CD68 i CD163 u skvamoznom karcinomu grkljana.....	46
4.4.4.	Povezanost izražaja PD-L1 te stanica tumorskog mikrookoliša s kliničko patološkim karakteristikama u skvamoznom karcinomu grkljana.....	47

4.4.5. Analiza preživljenja	51
5. RASPRAVA	63
5.1 Displazije.....	63
5.2 Skvamozni karcinomi grkljana	66
6. ZAKLJUČCI	71
7. LITERATURA	72
POPIS SLIKA	86
POPIS TABLICA	87
POPIS POKRATA	88
ŽIVOTOPIS	90

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Neoplastične lezije grkljana, bilo da se radi o dobroćudnim, displazijama ili skvamoznim karcinomima pobuđuju interes znanstvenih studija, a posebice nakon uvođenja imunoterapije. Imunoterapija je noviji koncept liječenja kojim se karcinom liječi indirektno, omogućavajući adekvatno djelovanje imunološkog sustava, zadnjih nekoliko godina prisutna je u onkologiji glave i vrata zahvaljujući primjeni inhibitora PD-1/PD-L1 (eng. Programmed Cell Death Protein 1/Programmed death ligand 1) signalnog puta.

1.1 Epidemiologija i etiologija skvamoznog karcinoma grkljana

Karcinom grkljana drugi je najčešći zloćudni tumor glave i vrata u svijetu [1]. Globalno gledajući, došlo je do porasta od 12% u odnosu na tri desetljeća ranije, a na račun regionalnog povećanja broja slučajeva u jugoistočnoj Aziji i zapadnom Pacifiku [1]. Ipak, ohrabrujuća je činjenica da razvijenije zemlje bilježe pad incidencije, pa je primjerice u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) zabilježena stopa od 4,3 oboljela na 100 000 stanovnika na prijelazu stoljeća, dok ona danas iznosi 2,3 [2]. Ovaj trend se prvenstveno može pripisati smanjenoj upotrebi duhanskih proizvoda. Slično je i u Republici Hrvatskoj gdje je 2011. godine dijagnosticiran karcinom grkljana kod 301 bolesnika od ukupno 1200 oboljelih od zloćudnih tumora glave i vrata svih sijela. Desetljeće kasnije, broj oboljelih od karcinoma grkljana je iznosio 284 od ukupno 931 bolesnika s dijagnosticiranim karcinomom glave i vrata. Međutim, treba uzeti u obzir da je u 2021. godini Republika Hrvatska imala oko 400 000 stanovnika manje nego desetljeće ranije [3].

Većinom oboljevaju muškarci, u odnosu na žene, a omjer iznosi 5:1. Češće se dijagnosticira iznad šesdesete godine života, a vrlo rijeko u mlađoj životnoj dobi. Nažalost, između 60% do 75% karcinoma se dijagnosticira u uznapreovalom stadiju bolesti što posljedično vodi lošijem preživljenju. Zapravo, petogodišnje preživljenje oboljelih zbog karcinoma grkljana je lošije danas nego prije tri desetljeća, što nije slučaj sa drugim sjelima karcinoma u području glave i vrata [1, 4].

Pušenje i konzumacija alkohola dobro su utvrđeni neovisni etiološki čimbenici rizika za razvoj karcinoma grkljana. Njihova udružena primjena povećava rizik i do petnaest puta u odnosu na populaciju koja ne konzumira alkohol ili duhanske proizvode [5, 6]. Također, bitna je duljina trajanja i doza primjene, a prestanak pušenja ili konzumacije alkohola povezan je s naknadnim smanjenjem rizika, iako ne na početnu razinu [5]. Nadalje, studija Hashibe i suradnika [7]

pokazala je da je učestalost karcinoma koji se mogu pripisati izloženosti duhanu i alkoholu bila najveća u grkljanu od svih sijela glave i vrata. Razlog tome je složena anatomija ljudskog grkljana kojim zrak, a tako i duhanski dim ne prolazi laminarno kao kroz ostale dijelove gornjeg aerodigestivnog sustava. Turbulentan protok kroz relativno uzak dio dišnog puta omogućava taloženje karcinogenih čestica u sluznicu grkljana, prvenstveno prilikom udisaja te dodatno tijekom izdisaja duhanskog dima. Alkohol preko lokalnog djelovanja na sluznicu grkljana povećava propusnost i apsorpciju, a time i taloženje karcinogenih čestica što posljedično najviše šteti supraglotičnim strukturama koje su izložene tijekom akta gutanja [8]. Međutim, oko 5% karcinoma grkljana pojavljuje se kod nepušača i osoba koje ne konzumiraju alkohol, što ukazuje na to da malignoj preobrazbi mogu pridonijeti i drugi čimbenici poput neadekvatne prehrane, gastroezofagealnog refluksa, prethodnog zračenja i izloženosti različitim štetnim česticama iz okoliša [4, 9]. Visoko rizični podtipovi 16 i 18, humanog papiloma virusa (HPV), tj njegove DNK prisutni su u rasponu od 5% do 32% analiziranih uzoraka karcinoma larinksa, a njihova uloga u karcinogenezi i prognozi bolesti ostaje slabije utvrđena nego u orofaringealnim skvamoznim karcinomima [1, 10]. Profesionalna izloženost drvnoj prašini, policikličkim ugljikovodicima i azbestu također je povezana s povećanim rizikom od razvoja karcinoma grkljana [11]. Konačno, ne treba zanemariti niti genetsku predispoziciju za razvoj ovog tipa karcinoma [12].

1.2 Klinička slika

Klinički i anatomski, grkljan je podijeljen u tri podregije: supraglotis, glotis i subglotis. Klinička slika, između ostaloga, ovisi o podregiji smještaja tumora te varira od neprimjetnih i nespecifičnih simptoma pa do jasno izraženih i životno ugrožavajućih kao što je gušenje.

Supraglotični karcinomi čine 30% do 40% karcinoma grkljana [13, 14]. U ranim fazama rasta mogu dugo ostati neprimjetni ili se mogu očitovati nespecifičnim simptomima kao što je grlobolja ili otalgija. Rast tumora i lokalna invazija supraglotičnih struktura uzrokuju otežano i/ili bolno gutanje, aspiraciju u donji dišni put, krvarenja te otežano i čujno disanje. Ukoliko tumor u potpunosti opstruira dišni put, postoji mogućnost gušenja te je neophodna traheotomija. Nije rijetkost da je metastatski čvor vrata prvi znak bolesti kao niti pojava bilateralnih metastaza. Razlog tome je obilna limfna drenaža koja vodi ranom metastaziranju u regionalne limfne čvorove [15]. Osim toga, incidencija metastaziranja ovisi o lokalizaciji, veličini i histološkoj diferencijaciji primarnog tumora te varira od nule do 33% u slučajevima ranih supraglotičnih karcinoma [16]. Posljedica je lošije petogodišnje preživljenje od 60% do 70% što se nije poboljšalo tijekom posljednja tri desetljeća [15, 17].

Glotični karcinomi čini oko 50% do 60% svih slučajeva karcinoma grkljana. Promjena glasa s različitim intenzitetom promuklosti gotovo je univerzalno povezana s tumorima glotisa što dovodi do dijagnoze u ranoj fazi [13]. Ove lezije ne uzrokuju opstrukciju dišnih putova ili poteškoće s gutanjem osim ako napreduju do viših T stadija. Limfno širenje ranog karcinoma glotisa iznimno je rijetko te je incidencija cervikalnih metastaza rijetko prisutna, u svega 0,4-1.8 % slučajeva [18].

Primarni karcinomi koji potječu iz subglotisa su rijetki i čine oko 1% do 5% svih karcinoma grkljana [19, 20]. Puno su češći slučajevi širenja karcinoma iz drugih subregija grkljana subglotično te takve karcinome nazivamo transglotičnim. Obzirom da su primarni subglotički karcinomi u ranim stadijima asimptomatski ili sa blago izraženim simptomima kao što je promuklost [21], otkrivaju se češće kad tumor uznapreduje do razine opstruktivnog stridora koji zahtjeva traheotomiju [20, 22]. Ipak, napredak slikovnih i fiberoptičkih endoskopskih uređaja je doveo do bolje vizualizacije subglotične regije pa se prema nekim studijama subglotični karcinomi mogu dijagnosticirati u 60% do 70% slučajeva u ranom stadiju bolesti (stadij I/II) [19, 23]. Učestalost vratnih metastaza iznosi od 4% do 33%, ovisno o stadiju bolesti [20-22].

1.2.1 Klinička klasifikacija tumora

Karcinomi grkljana se klasificiraju prema TNM klasifikaciji koju je osmislio profesor Pierre Denoix na institutu Gustave Roussy u Francuskoj između 1943. i 1952. godine koristeći veličinu i ekstenziju primarnog tumora, zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova tumorom i prisutnost udaljenih metastaza kako bi klasificirao progresiju tumora [24]. Danas je to opće prihvaćena klasifikacija Međunarodne unije za borbu protiv raka (eng. *Union for International Cancer Control* - IUCC) i Američkog udruženja za rak (eng. *The American Joint Committee on Cancer* - AJCC) te je aktualno osmo izdanje iz 2017. godine [25]. Specifičnost u slučaju grkljana je ta da se primarni tumori različito klasificiraju obzirom na lokalizaciju po podregijama, dok je N i M stadij (Tablica 1) kao i stadij bolesti (Tablica 2) zajednički za sve podregije.

Tablica 1. TNM klasifikacija skvamoznog karcinoma grkljana

Primarni tumor (T)	
Supraglotis	
Tx	Primarni tumor ne može biti određen
Tis	Tumor in situ
T1	Tumor zahvaća jednu podregiju supraglotisa, uredna pomičnost glasnice
T2	Tumor zahvaća više od jedne podregije supraglotisa ili glotisa, ili regiju izvan supraglotisa (sluznice baze jezika, valekule, medijanog zida piriformnog sinusa. Fiksacija grkljana nije prisutna.
T3	Tumor ograničen na grkljan s fiksacijom glasnice i/ili zahvaćenost neke od susjednih podregija: postkrikoidna regija, preepiglotski prostor, paraglotski prostor, i/ili minimalno štitna hrskavica
T4a	Tumor prodire kroz štitnu hrskavicu ili zahvaća tkivo izvan grkljana, npr. traheju, meke strukture vrata, uključujući duboke mišiće jezika, prelaringealnu muskulaturu, štitnjaču ili jednjak
T4b	Tumor zahvaća prevertebralni prostor, medijastinalne strukture ili obuhvaća karotidnu arteriju
Glottis	
Tx	Primarni tumor ne može biti određen
Tis	Tumor in situ
T1a	Tumor zahvaća jednu glasnicu, uz normalnu pomičnost
T1b	Tumor zahvaća obje glasnice, uz normalnu pomičnost
T2	Tumor se širi sa supraglotis ili subglottis, smanjena pokretljivost glasnica
T3	Tumor ograničen na grkljan, s fiksacijom glasnice
T4a	Tumor prodire kroz štitnu hrskavicu ili zahvaća tkivo izvan grkljana, npr. traheju, meke strukture vrata, uključujući duboke mišiće jezika, prelaringealnu muskulaturu, štitnjaču ili jednjak
T4b	Tumor zahvaća prevertebralni prostor, medijastinalne strukture ili obuhvaća karotidnu arteriju
Subglottis	
Tx	Primarni tumor ne može biti određen
Tis	Tumor in situ
T1	Tumor ograničen na subglottis
T2	Tumor se širi na glasnicu ili glasnice sa normalnom ili smanjenom pokretljivošću
T3	Tumor ograničen na grkljan s fiksacijom glasnice
T4a	Tumor prodire kroz štitnu hrskavicu ili zahvaća tkivo izvan grkljana, npr. traheju, meke strukture vrata, uključujući duboke mišiće jezika, prelaringealnu muskulaturu, štitnjaču ili jednjak
T4b	Tumor zahvaća prevertebralni prostor, medijastinalne strukture ili obuhvaća karotidnu arteriju
Regionalni limfni čvorovi (N)	
Nx	Status regionalnih čvorova ne može biti određen
N0	Bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
N1	Metastaze u jednom ipsilateralnom limfnom čvoru, najvećeg promjera do 3 cm, bez ekstrakapsularnog širenja
N2a	Metastaze u jednom ipsilateralnom limfnom čvoru promjera od 3 cm i ne većeg od 6 cm, bez ekstrakapsularnog širenja
N2b	Metastaze u multiplim ipsilateralnim čvorovima, ne većem od 6 cm najvećeg promjera, bez ekstrakapsularnog širenja
N2c	Metastaze u bilateralne ili kontralateralne limfne čvorove, ne veće od 6 cm najvećeg promjera, bez ekstraakapsularnog širenja
N3a	Metastaze u limfne čvorove veće od 6 cm najvećem promjeru, bez ekstrakapsularnog širenja
N3b	Metastaze u bilo kojem čvoru s ekstrakapsularnim širenjem
Udaljene metastaze (M)	
Mx	Status udaljenih metastaza ne može biti određen
M0	Bez udaljenih metastaza
M1	S udaljenim metastazama

Tablica 2. Klinički stadiji karcinoma grkljana

STADIJ	T	N	M
Stadij I	T1	N0	M0
Stadij II	T2	N0	M0
Stadij III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
Stadij IVA	T1-3, T4a	N2 N0 -N2	M0
Stadij IVB	T4b Bilo koji T	Bilo koji N N3	M0
Stadij IVC	Bilo koji T	Bilo koji N	M1

1.2.2 Patohistološke karakteristike tumora

Smatra se da karcinom grkljana nastaje iz prekanceroznih lezija [26]. Prekancerozne lezije karakteriziraju atipične stanične promjene s malignim značajkama (gubitak sazrijevanja stanica, nuklearna atipija, povećana mitotička aktivnost) koje se javljaju kao odgovor na izlaganje kancerogenim tvarima, osobito duhanskom dimu i alkoholu [26]. Prekancerozne lezije uključuju displaziju niskog i visokog stupnja te su, po definiciji, ograničene na epitel s netaknutom bazalnom membranom. Progresija do mikroinvazivnog i invazivnog karcinoma karakterizirana je infiltracijom bazalne membrane i podležeg tkiva.

Histološki, skvamozni karcinomi grkljana (SKG) čine više od 95% primarnih karcinoma grkljana i nastaju iz mnogoslojnog pločastog epitela koji oblaže grkljan [6]. Drugi, rjeđi histološki tipovi primarnog karcinoma grkljana uključuju verukozni karcinom (visoko diferencirana varijanta s niskom učestalošću metastaza), adenokarcinom, karcinom vretenastih stanica, fibrosarkom i hondrosarkom [2]. Neuroendokrini tumori, iako rijetki, najčešći su neskvamozni tumori sa češćom sklonošću prema supraglotičnom larinksu [27].

1.3 Dijagnostika skvamoznog karcinoma grkljana

Svaki pregled bolesnika započinje anamnezom te detaljnim otorinolaringološkim pregledom. U anamnezi se uz trajanje simptoma i njihovu težinu posebno osvrćemo na rizične čimbenike, prije svega pušenje i konzumiranje alkohola. U sklopu kompletnog otorinolaringološkog pregleda značajnu ulogu igra endoskopija grkljana (Slika 1) koja većinom može razlikovati benigne i maligne lezije, a u slučaju sumnje na malignitet procijeniti veličinu tumora, zahvaćenost sijela i podsijela grkljana, pomičnost glasnica, ali i širenje na okolne regije, poput orofarinksa ili hipofarinksa. Dodatnu vrijednost endoskopiji grkljana pridaje uskopojasno snimanje (eng. *narrow-band imaging* – NBI). NBI je metoda kojom vizualiziramo vaskularni uzorak sluznice uskopojasnim svjetlosnim valnim duljinama (415 i 540 nm). Dokazano je da je NBI koristan alat u otkrivanju ranog karcinoma glotisa [28]. Također je pokazano da NBI olakšava kliničko donošenje odluka o liječenju bolesnika s laringealnom leukoplakijom [29]. Premaligne i maligne lezije glotisa karakteriziraju žile koje se pružaju okomito prema površini epitela i definirane su kao "pozitivne NBI lezije" [30]. S druge strane lezije koje nemaju vaskularizaciju ili se žile pružaju paralelno s površinom sluznice su najčešće benigne prirode bez malignog potencijala.



Slika 1. Endoskopski prikaz grkljana; A – polip desne glasnice, B – leukoplakija obje glasnice, C – karcinom lijeve glasnice

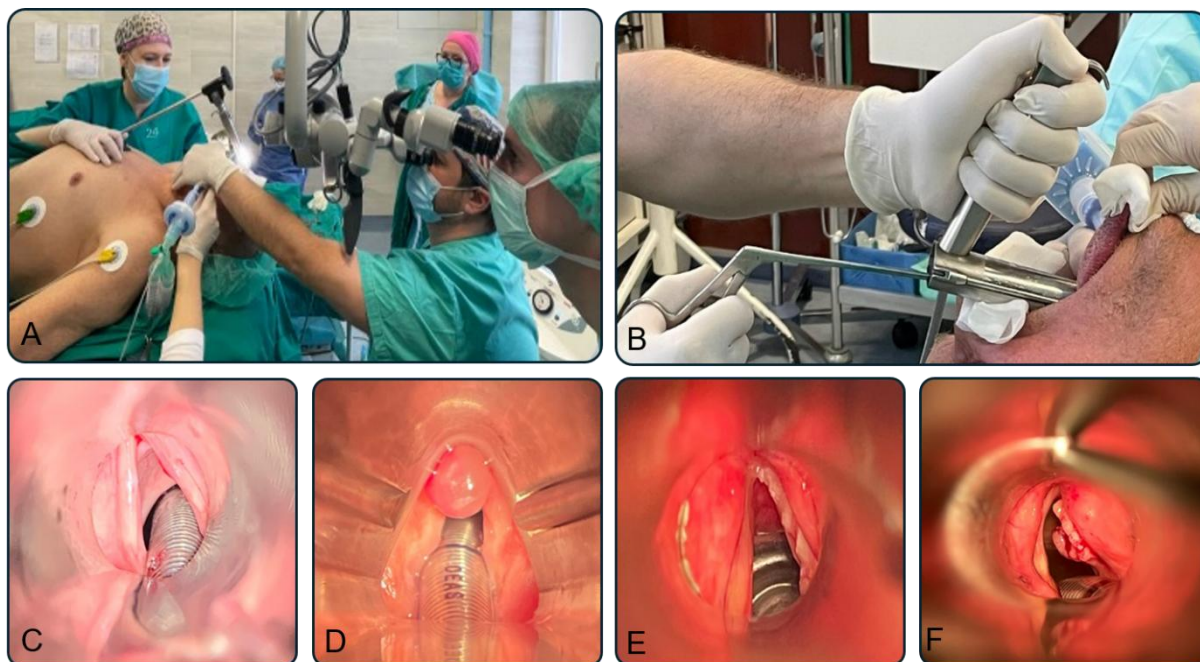
Iako otorinolaringološki pregled daje mnogobrojne korisne informacije često je ograničen u procjeni dubine tumora i prisutnosti nepalpabilnih vratnih metastaza pa ga je potrebno upotpuniti radiološkim oslikavanjem. Snimanje može pružiti ne samo informacije o invaziji hrskavice, širenju u preepiglотиčni i paraglotični prostor i ekstralaringealnom širenju tumora već procijeniti i regionalnu te distalnu proširenost bolesti. Kompjutorizirana tomografija (eng. *Computerised tomography* - CT) vratnih organa je specifičnija za invaziju hrskavice i lakše je dostupna te po nižoj cijeni što ju čini preferiranim modalitetom snimanja u mnogim centrima, ali se ponekad upotunjuje magnetskom rezonancijom (MR), posebno u klinički nejasnim slučajevima.

CT grudnog koša treba razmotriti u svih bolesnika u uznapredovalom stadiju bolesti, osobito pušača, zbog visoke incidencije drugih primarnih malignih tumora pluća ili udaljenog metastaziranja.

Ultrazvuk vrata je također neophodan alat za određivanje prisutnosti regionalnih metastaza, osobito kada su prisutni patološki limfni čvorovi koji su manji od 1 cm ili kad je potrebna citološka punkcija suspektog čvora. Prednosti ultrazvuka su u dostupnosti, neinvazivnosti, cijeni te visoko dokazanoj učinkoviti u identifikaciji patoloških limfnih čvorova ili procjeni zahvaćenosti mekih tkiva vrata patološkim procesom.

Funkcionalno oslikavanje pozitronskom emisijskom tomografijom s kompjutoriziranom tomografijom (PET/CT) razvilo se u bitan način oslikavanja u procjeni uznapredovalog karcinoma larinksa. Iako ima ograničenu korisnost u određivanju proširenosti primarnog tumora zbog niske prostorne rezolucije, postaje standardom u procjeni regionalnih cervikalnih i udaljenih metastaza [31]. Usprkos tome, u Hrvatskoj se koristi samo u određenim indikacijama kod tumora glave i vrata zbog visoke cijene, dugog čekanja te manjka uređaja.

Primarno mjesto tumora se najčešće bioptira tijekom mikrolaringoskopije koja se izvodi u operacijskoj sali u općoj anesteziji te pod kontrolom operacijskog mikroskopa (Slika 2). Mikrolaringoskopija je dio šireg endoskopskog pregleda koji nazivamo panendoskopija te omogućuje istodobno ispitivanje proširenosti tumora, biopsiju suspektnih lezija te planiranje mogućih kirurških postupaka. Ezofagoskopija se izvodi za procjenu zahvaćenosti jednjaka tumorom, preskakajućih ili „skip“ lezija u jednjaku ili drugim primarnim tumorima čija je učestalost prema nekim istraživanjima i do 25% [32]. U novije vrijeme, a zahvaljujući napretku fiberendoskopskih uređaja koji mogu u sebi sadržavati radni kanal, biopsiju je moguće izvesti i u ambulantnim uvjetima, što je izvrsna alternativna mogućnost za bolesnike za koje opća anestezija nosi određeni rizik.



Slika 2. Mikrolaringoskopski prikaz lezije grkljana;

A – namještaj bolesnika i mikroskopa, B – položaj laringoskopa, C – uredan nalaz glasnice, D – polip glasnice, E – leukoplakija glasnice, F – karcinom glasnice

1.4 Mogućnosti liječenja

Generalno je prihvaćeno pravilo da se rani stadiji bolesti liječe unimodalno, a uznapredovali multimodalno. Za rane stadije (T1 i T2) to uključuje kirurški zahvat ili radioterapiju (RT). U slučaju uznapredovalih stadija najčešće se kirurški zahvat upotpunjuje (kemo)radioterapijom ili se primjenjuje konkomitantna kemoradioterapija praćena kirurškim zahvatom u slučaju neuspjeha [33].

U odluci o liječenju karcinoma grkljana primjenjuje se multidisciplinarni pristup. Članovi multidisciplinarnog tima uključuju kirurge glave i vrata, radiologe, onkologe, patologe i logopede, ali i pridružene članove poput psihologa, logopeda, nutricioniste, medicinskih sestara i drugih.

1.4.1 Kirurško liječenje

Kirurške mogućnosti za karcinome ranih stadija kreću se od minimalno invazivnih mikrolaringealnih tehnika endoskopskim pristupom do otvorenih parcijalnih laringektomija. U

recentnije vrijeme sve se veća važnost daje transoralnoj laserskoj mikrokirurgiji (TLM) kao učinkovitom načinu liječenja ranog karcinoma grkljana zbog zadovoljavajućih onkoloških ishoda, niskog morbiditeta, smanjenog boravka u bolnici, skraćenog vremena liječenja i smanjenih troškova u usporedbi s otvorenim tehnikama [34, 35]. Radi svoje preciznosti, nudi maksimalnu poštedu zdravog tkiva uz istodobno postizanje onkološke sigurnosti, odnosno kiruršku resekciju prema točnom opsegu tumora. Nadalje, korištenje laserske kirurgije ne isključuje naknadnu mogućnost liječenja drugim tehnikama (otvorene tehnike ili RT) u slučaju rezidue ili rekurentnosti tumora. TLM i RT su ekvivalentni što se tiče ukupnog preživljenja i preživljenja bez bolesti. Međutim, primijećeno je da su stopa očuvanja larinksa i preživljenje bez laringektomije bili bolji nakon TLM u usporedbi s RT; ovo je u skladu s nekoliko nedavno objavljenih studija [36, 37]. Nadalje, otvorene kirurške tehnike u odnosu na TLM i dalje imaju značajno mjesto u određenom broju pravilno i odabranih bolesnika unatoč usporedivim onkološkim, ali lošijim funkcionalnim, postoperativnim i rehabilitacijskim ishodima [38, 39]. Kirurške mogućnosti liječenja bolesnika sa uznapredovali stadijima karcinoma su drugačije u odnosu na rane stadije. Parcijalni zahvati su mogući u malom i ograničenom broju slučajeva te se većinom izvodi totalna laringektomija (TL).

Tehniku je prvi uspješno izveo Billroth 1873. godine, a poboljšali su je Gluck i Sorenson 1894. godine [40]. Indicirana je za T3 i T4 stadije karcinoma grkljan ali i kao kirurgija spasa po neuspjehu prethodnih opcija liječenja. Međutim, uz lokalnu kontrolu bolesti potrebna je i regionalna. U slučaju klinički pozitivnog vrata (N+) izvode se radikalne, modificirane radikalne ili prošireno radikalne disekcije. Pri odluci za liječenjem kod klinički negativnog vrata (N0) uzima se u obzir vjerojatnost regionalnog metastaziranja, i ako je ona veća od 20% izvode se elektivne disekcije [41]. Kao što je prethodno naglašeno, supraglotični grkljan ima najbogatiju limfnu drenažu, i time i najveću vjerojatnost regionalnog metastaziranja u usporedbi s drugim podregijama grkljana pa se ovdje izvode disekcije već kod ranih T stadija. Nasuprot tome, kod glotičnih karcinoma je malo vjerojatno da će doći do širenja na vrat sve dok primarni tumor ne bude u T3 ili većem stadiju. Vratne regije od najvećeg rizika su regije II do IV i središnja regija VI, a kako je grkljan organ medijane ravnine, profilaktičke disekcije su nerijetko obostrane.

1.4.2 Onkološko liječenje

Zanimanje za ne kiruršku terapiju uznapredovalog karcinoma grkljana raslo je tijekom drugog dijela 20. stoljeća, a Veteran's Affairs istraživanje objavljeno 1991. godine pokazalo je da je radioterapija jednako učinkovita primarna opcija liječenja u odnosu na dotadašnji zlatni standard koji je uključivao TL i adjuvantnu RT [42]. Prema navedenoj studiji, bolesnici sa T3 i

T4 karcinomom grkljana su randomizirani u dvije skupine. Jedna skupina je liječena indukcijskom kemoterapijom nakon čega je slijedila definitivna radioterapija te u slučaju neuspjeha, totalna laringektomija, dok je druga skupina bolesnika liječena totalnom laringektomijom praćenom radioterapijom. Dvogodišnje preživljenje bilo je istovjetno (68%) u obje skupine liječenja, a kod 64% bolesnika je očuvan grkljan. Analiza podskupina pokazala je lošiji ishod u bolesnika s T4 bolešću, iako je važno napomenuti da se to odnosi na raniju definiciju T4 bolesti koje se razlikuju od današnje. Rezultati navedenog istraživanja povijesno su promijenili protokol liječenja bolesnika s uznapredovalim karcinomom i stvorili novu strategiju koju nazivamo strategijom očuvanja organa (eng. *Organ preservation therapy*). Posljedično, interes za primarnu radioterapiju od tada je porastao kao i interes za dodatnim studijama. Drugo važno istraživanje objavljeno je 2003. godine od strane Forastiera i suradnika [43] s uključenih 547 bolesnika s lokalno uznapredovalim karcinomom grkljana. Prema mogućim opcijama liječenja, bolesnici su randomizirani u jednu od tri skupine: indukcijska kemoterapija praćena RT-om, konkomitantna kemoradioterapija i samo RT. Glavni cilj istraživanja bio je odrediti koja je najbolja terapija za očuvanje grkljana. Nakon 2 godine praćenja bolesnika postotak očuvanja iznosio je 88% za grupu liječenu konkomitantnom kemoradioterapijom, 75% za grupu liječenu indukcijskom kemoterapijom praćenu RT-om te 70% za grupu liječenu RT-om. Navedenim istraživanjem su postavljeni novi temelji za liječenje lokalno uznapredovalih karcinoma grkljana te se danas ovaj tip terapije nudi bolesnicima kao jednako učinkovita metoda kirurškom liječenju.

Svakako, potrebno je voditi računa da bolesnici budu svjesni preživljenja i funkcionalnih ishoda povezanih sa svakim modalitetom liječenja. Ako bolesnici odaberu ne kirurške mogućnosti u svrhu očuvanja organa, potrebno je istaknuti rizik moguće nefunkcionalnosti grkljana, koji se pojavljuje čak i do 74% bolesnika [44]. Nadalje, kirurgija spasa u slučaju neuspjeha konkomitantne kemoradioterapije je povezana sa lošijim onkološkim ishodom i visokom stopom morbiditeta [45].

1.4.2.1 Radioterapija

Radioterapija koristi ionizirajuće zračenje za generiranje slobodnih radikala unutar staničnih jezgri, što zauzvrat uzrokuje oštećenje stanica i deoksiribonukleinske kiseline (DNK) što rezultira staničnom smrću. Cilj radioterapije je iskorijeniti tumor uz očuvanje normalnog tkiva. Tipični režim liječenja uključuje primjenu ukupne doze zračenja od 60 do 70 greja (Gy) raspoređenu na manje jednake doze tijekom razdoblja od 6 do 7 tjedana. Radioterapija se

izvodi samostalno u slučajevima ranih stadija karcinoma grkljana, a kombinira s drugim opcijama liječenja u slučaju uznapredovalih karcinoma. Vrat je uključen u polje zračenja ako postoje metastatski limfni čvorovi ili ako postoji vjerojatnost metastaziranja veća od 20%. U današnje vrijeme u brojnim ustanovama se koristi radioterapija modularnog intenziteta (eng. *Intensity-Modulated Radiation Therapy*; IMRT). Prednost ove metode je mogućnost modulacije intenziteta zračenja ovisno o mjestu gdje se želi isporučiti veća ili manja količina zračenja. Time se pošteđuju zdrava tkiva, a najveći intenzitet zračenja isporučuje u ciljano područje tumora [46].

Komplikacije zračenja dijele se na rane i kasne. Rane komplikacije uključuju mukozitis, odinofagiju, disfagiju, oštećenje kože, gubitak okusa i edem (što ponekad može dovesti do akutnog oštećenja dišnih putova). Ove nuspojave mogu trajati 6 tjedana ili dulje nakon završetka zračenja.

Kasne komplikacije radioterapije uključuju kserostomiju i zubni karijes, limfedem, hipotireozu, fibrozu mekog tkiva, stenozu karotidne arterije, stenozu grkljana i jednjaka, hondroradionekrozu te osteoradionekrozu. Hondroradionekroza grkljana javlja se u približno 5% bolesnika liječenih primarnom radioterapijom i može rezultirati kroničnom opstrukcijom dišnih putova, boli i aspiracijom. Najčešće zahvaćena hrskavica je aritenoidna hrskavica, a potom štitna, epiglotis i krikoidna [47]. U teškim slučajevima, neophodna je totalna laringektomija kako bi se ublažili simptomi.

1.4.2.2 Kemoterapija

Kemoterapija se najčešće koristi zajedno s radioterapijom za uznapredovali karcinom grkljana. Kemoterapeutik se koristi kao radiosenzibilizator, a istovremeno pruža sistemski antineoplastični učinak. Dvije najčešće metode kemoterapije su indukcijska i konkomitantna. Indukcijska kemoterapija nakon koje slijedi definitivni režim radioterapije popularnija je u Europi, dok je konkomitantna kemoterapija češća u Sjedinjenim Državama [48]. Adjuvantna kemoterapija se primjenjuje kada su nakon kirurškog zahvata prisutne tumorske stanice na rubovima preparata ili kod ektranodalnog širenja tumora. Najčešće se koriste kemoterapeutici na bazi platine (cisplatina ili karboplatina) koji oštećuju duplikaciju DNK-a kod tumorskih stanica. Uobičajena doza je 100mg/m² u tri ciklusa sa stankama od 3 tjedna.

1.4.2.3 Imunoterapija

Imunoterapija je naziv za vrstu terapije koja koristi vlastiti imunološki sustav u obrani od tumora. Slabija aktivnost imunološkog sustava ima ulogu u razvoju karcinoma povezanih s virusnim infekcijama (HPV, *Epstein-Barrov virus* (EBV), hepatitis C, hepatitis B) [49, 50]. Iako se imunoterapija pokazala kao odlična terapija u određenim slučajevima u bolesnika s malignomima glave i vrata, dosada dostupna istraživanja pokazuju da većina bolesnika ne reagira na imunoterapiju kao jedini oblik liječenja [51].

U tumorima glave i vrata, cetuximab je prvi modalitet imunoterapije koji je uveden 2006. godine. Radi se o monoklonskom protutijelu usmjerenom prema receptoru epidermalnog faktora rasta (eng. *Epidermal growth factor receptor* - EGFR). Indiciran je u liječenju bolesnika sa skvamoznim karcinomima glave i vrata, za lokalno uznapredovalu bolest u kombinaciji s radioterapijom i za recidivirajuću i/ili metastatsku bolest u kombinaciji s kemoterapijom na bazi platine. Ipak, nakon provođenja mnogobrojnih važnih kliničkih ispitivanja faze III, gdje je uporaba cetuksimaba testirana u različitim kliničkim scenarijima i s različitim hipotezama, rezultati definitivno nisu ohrabrujući [52]. Drugim riječima, očekivao se veći doprinos poboljšanom preživljenju. Kako god, istraživanja o učinkovitosti cetuksimaba su i dalje aktualna te će se u budućnosti zasigurno ponovno procijeniti i definirati njegova uloga u svjetlu najnovijih kliničkih dokaza. Jednako tako, istraživanja su usmjerena i drugim molekulama kao što su inhibitori kontrolnih točaka.

Inhibitori kontrolnih točaka usmjereni na protein programirane stanične smrti 1 (PD-1) uglavnom se vežu na aktivaciju tumorski orijentiranih antigen-specifičnih T limfocita [53]. Terapije blokade imunoloških kontrolnih točaka značajno su promijenili terapijske protokole za bolesnike s karcinomom glave i vrata općenito, pa tako i za oboljele od laringealnog karcinoma. Prvo su odobrene kod bolesnika s uznapredovalim melanomom [54], a potom primijenjene za različite vrste karcinoma [55], što je dramatično utjecalo na algoritam liječenja u različitim sijelima. Anti-PD-1 lijekovi (nivolumab, pembrolizumab) odobreni su za rekurentne i metastatske (R/M) skvamozne karcinome glave i vrata (SKGV) u prvoj i drugoj liniji liječenja [56-58], a odobrenju su prethodovale mnogobrojne studije.

Pokus III faze Checkmate 141 procijenio je učinak anti-PD-1 (nivolumaba) za bolesnike s R/M SKGV-om [56]. Pozitivni rezultati ove studije potvrdili su primjenu anti-PD-1 za liječenje R/M SKGV-a i dokazali postojanje djelotvornog, učinkovitog imuniteta protiv karcinoma u bolesnika s SKGV-om. Slično, Keynote-040 randomizirano ispitivanje faze III uspoređivalo je učinkovitost pembrolizumaba (anti-PD-1) u odnosu na SOC (metotreksat, docetaksel ili cetuksimab) [57] za bolesnika s R/M SKGV nakon liječenja koje je sadržavalo platinu. Ova su ispitivanja dovela do odobrenja američke *Food and Drug Administration* (FDA) za upotrebu anti-PD-1 (nivolumab

i pembrolizumab) u drugoj liniji za bolesnike s R/M SKGV-om koji su već primili terapiju baziranu na platini [59]. Naknadno je studija Keynote-048, randomizirana multicentrična studija faze III iz 37 zemalja, ispitala pembrolizumab sam ili s kemoterapijom (platina plus fluorouracil) naspram cetuksimaba s kemoterapijom (režim EXTREME [60] za prvu liniju liječenja R/M SKGV-a. [58]. U ovom je ispitivanju monoterapija pembrolizumabom dovela do značajnog poboljšanja ukupnog preživljenja PD-L1 pozitivnih (CPS ≥ 20 ili CPS ≥ 1 , eng. *Combined positive score* - CPS) SKGV-a. CPS je sustava bodovanja koji uključuje PD-L1 pozitivne tumorske stanice i imunološke stanice. Osim toga, bolesnici s R/M SKGV-om liječeni pembrolizumabom uz kemoterapiju imali su značajno produljeno ukupno preživljenje u usporedbi sa skupinom koja je primala cetuksimab s kemoterapijom. Ovo je ispitivanje istaknulo učinkovitost kombinacije imunoterapije i kemoterapije za podskupine bolesnika s SKGV-om. Na temelju KEYNOTE-048, FDA je odobrila upotrebu monoterapije pembrolizumabom u prvoj liniji za R/M SKGV s CPS ≥ 1 i pembrolizumab plus kemoterapiju na bazi platine za one s CPS-om < 1 za R/M SKGV. Prednost imunoterapije naspram kemoterapije očituje se intenzitetu nuspojava. U slučaju imunoterapije one su blažeg intenziteta i lakše se liječe.

1.5 Prognoza i preživljenje

Ukupno petogodišnje preživljenje za sve stadije karcinoma grkljana ovisi o podregiji u kojoj se tumor nalazi pa u skladu s time najbolje preživljenje imaju karcinomi glotisa (81%), potom karcinomi subglotisa (77%), dok ukupno 51% bolesnika preživi pet godina u slučaju supraglotičnog karcinoma [2, 61]. Analiza petogodišnjeg preživljenja po stadijima iznosi 84% za stadij I, 83% za stadij II, 73% za stadij III i nezadovoljavajućih 44% za stadij IV supraglotičnih karcinoma [2, 49]. Nezadovoljavajući je i iznos petogodišnjeg preživljenja kod stadija IV bolesti karcinoma glotične lokalizacije u iznosu od 45%, dok ostali stadiji imaju dobru prognozu; 90% za prvi, 85% drugi i 75% treći stadij [61].

Literaturni podaci preživljenja bolesnika sa subglotičnim karcinomom po stadijima su oskudni te vrlo rijetko prikazani, vjerojatno zbog malog broja bolesnika s karcinomom u ovoj regiji.

1.6 Prekancerozne lezije grkljana

Tijekom posljednjih šezdeset godina učinjen je niz značajnih pokušaja da se uspostavi općeprihvaćena terminologija i histološki sustav ocjenjivanja prekanceroznih lezija grkljana [62]. Upravo iz tih razloga stvoren je čitav niz sinonima kao što su prekanceroza, preinvazivna

lezija, premaligna lezija, intraepitelna lezija, intraepitelna neoplazija ili displazija. Dok je pojam displazije u patologiju vrata maternice uključen još 1953. godine, u laringealnoj patologiji prihvaćen je tek nakon konferencije o karcinomu grkljana u Torontu 1974. godine [62, 63]. Od tada su se stvarali, izmjenjivali i nadopunjavali različiti klasifikacijski sustavi (Tablica 3). Sustav Svjetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organisation* – WHO) ima četiri izdanja (1978., 1991., 2005. i 2017.) te su se u njima vršile izmjene ne samo u terminologiji već i u kategorijama klasificiranja [62]. Bitna promjena između WHO klasifikacija iz 2005. i 2017. je pokušaj pojednostavljenja kako bi sustav ušao u širu upotrebu te bio opće prihvaćen. Ovdje je još bitno istaknuti da su uz WHO klasifikacijske sustave istodobno postojali i drugi sustavi kao što je Ljubljanska klasifikacija [64]. Zapravo, trenutna klasifikacija WHO-a iz 2017. godine se temelji na modificiranoj Ljubljanskoj klasifikaciji, a u svrhu jednostavnijeg klasificiranja predložen je dvoslojni sustav s jasnim histopatološkim kriterijima za dvije skupine: displaziju niskog i visokog stupnja [65].

U literaturi se navodi da 11 do 25% prekanceroznih lezija grkljana maligno alterira, a rizik od maligne alteracije raste s porastom stupnjem displazije [66-68]. Isenberg i suradnici tako opisuju pojavu skvamoznog karcinoma u 10.1% kod blagih i umjerenih te 18.1% kod teških displazija [66]. Van Hulst i suradnici u sistemskom pregledu literature zaključuju da blage displazije alteriraju u 0 do 41.7%, umjerene u 0 do 48% te teške u 14.3 do 44.4% slučajeva [68]. Ne postoje jasni morfološki pokazatelji o tome hoće li neka od prekanceroznih lezija napredovati do skvamoznog karcinoma grkljana i, ako hoće, unutar kojeg vremenskog razdoblja. Terapija i praćenje laringealnih displazija izazovni su jer svaka nova biopsija rezultira ožiljkom na tkivu, što kasnije uzrokuje promuklost.

S druge strane, patolozi se također moraju nositi sa subjektivnostima, nesigurnostima i varijabilnošću između promatrača. Nadalje, postojanje višestrukih sustava klasifikacije koji su se istodobno koristili u različitim institucijama otežavalo je usporedbu podataka i odgađalo razvoj jasnih smjernica i konsenzusa. Na temelju prethodno spomenutih podataka, evidentno je da su potrebni novi molekularni markeri potrebni za predviđanje progresije laringealne displazije u skvamozni karcinom grkljana. Stoga je od iznimne važnosti identificirati dodatne morfološke, imunohistokemijske ili molekularne pokazatelje koji bi olakšali preciznu procjenu prekanceroznih lezija koje će vjerojatno napredovati u karcinom.

Razina izražaja PD-L1 i njegov značaj u skvamoznim epitelnim lezija grkljana nije dovoljno istražena, a praktički ne postoje radovi u kojima se uspoređivao izražaj PD-L1 u prekancerozama koje su progredirale u karcinom s onima koje nisu. Slična istraživanja na prekanceroznim lezijama usne šupljine pokazala su da je veći PD-L1 izražaj kod prekanceroza koje su progredirale u usporedbi s onima koje nisu [69].

Obzirom na uvođenje i dostupnost imunoterapije u liječenju karcinoma glave i vrata od iznimne je važnosti detaljnije istražiti izražaj PD-L1 kod skvamoznih epitelih grkljana.

Tablica 3. Najčešće korišteni klasifikacijski sustavi za prekancerozne lezije

Stupanj abnormalne maturacije	WHO klasifikacija iz 2005	SIN klasifikacija	Ljubljanska klasifikacija	Modificirana Ljubljanska klasifikacija	WHO klasifikacija iz 2017
Nije izražen	Skvamozna hiperplazija	Skvamozna hiperplazija	Skvamozna hiperplazija	SIL niskog stupnja	Displazija niskog stupnja
Donja 1/3 epitela	Blaga displazija	SIN 1	Bazalna/parabazalna hiperplazija		
Donja 1/3 - 1/2 epitela		SIN 1 ili SIN 2			
Gornja 1/2-3/4 epitela	Umjerena displazija	SIN 2	Atipična hiperplazija	SIL visokog stupnja	Displazija visokog stupnja
Puna debljina epitela	Teška displazija				
	CIS		CIS	CIS	

1.7 Programirani ligand smrti 1 (PD-L1)

Protein programirane stanične smrti 1 (eng. *Programmed cell death protein* - PD-1) membranski je protein na površini T i B limfocita koji ima ulogu u reguliranju staničnog odgovora imunološkog sustava. Zapravo, on smanjuje odgovor imunološkog sustava i promiče toleranciju na vlastite antigene suzbijanjem upalne aktivnosti T limfocita. Na taj način, sprečava nastanak autoimunih bolesti što je pozitivan učinak. Negativan učinak se očituje u sprečavanju imunološkog sustava u borbi protiv tumorskih stanica [70]. PD-1 je imunološka kontrolna točka i štiti kroz dva mehanizma. Prvo, potiče apoptozu antigen-specifičnih T-limfocita u limfnim čvorovima. Drugo, smanjuje apoptozu u regulatornim T limfocitima (protuupalne, supresivne T stanice) [70]. Na PD-1 se vežu dva liganda, programirani ligand smrti 1 (eng. *Programmed death ligand 1* - PD-L1) i programirani ligand smrti 2 (eng. *Programmed death ligand 2* - PD-L2). PD-L1 je transmembranski protein od 40 kDa za koji se nagađa da igra glavnu ulogu u suzbijanju adaptivne ruke imunološkog sustava tijekom određenih događaja kao što su trudnoća, transplantacija tkiva, autoimune bolesti i druga bolesna stanja. U normalnim uvjetima imunološki sustav se brani od stranih, tumorskih stanica pomoću brojnih, dobro poznatih mehanizama. Vezanjem PD-L1 na PD-1 protein smješten na površini CD8 citotoksičnih limfocita započinje niz kaskadnih reakcija koje naposljetku dovode

do smanjene proliferacije, aktivacije i sekrecije citokina CD8 limfocita te smanjenog odgovora imunološkog sustava (Slika 3) [71]. Nažalost brojne tumorske stanice koriste taj mehanizam te pretjerano izražavaju PD-L1 i na taj način izbjegavaju odgovor imunološkog sustava. Klinička važnost ovog proteina leži u činjenici da već postoji dostupna imunoterapija. Istraživanja provedena na tumorima pluća, mokraćnog mjehura i bubrega pokazala su lošije preživljenje bolesnika i češće udaljeno metastaziranje ukoliko su tumori imali visoki izražaj PD-L1 [71]. U studijama Wanga i suradnika te Kowalskog i suradnika istraživan je izražaj PD-L1 po TNM stadiju bolesnika s karcinomom grkljana; PD-L1 je bio prekomjerno izražen u uznapređovalom karcinomu (stadij III i IV) s metastazama u regionalnim limfnim čvorovima [72, 73]. Verro i suradnici nisu pronašli povezanost PD-L1 izražaja i veličine primarnog tumora; međutim, pronađena je statistički značajna povezanost između CPS-a i zahvaćenosti vratnih limfnih čvorova [74].

Postoje i oprečne studije koje povezuju pojačani izražaj PD-L1 sa boljim imunološkim odgovorom te posljedičnim duljim preživljenjem [71, 75, 76]. Razne studije dokazale su porast sistemnog upalnog odgovora kod PD-L1 pozitivnog tumora [74, 77]. Verro i suradnici pronašli su statistički značajnu pozitivnu korelaciju između vrijednosti CPS-a i C-reaktivnog proteina u krvi, potvrđujući aktivaciju imunološkog sustava kod karcinoma grkljana [74]. Franz i suradnici proučavali su korelaciju između PD-L1 izraženog kao CPS i omjera krvnih neutrofila i limfocita te su dokazali značajnu povezanost između ovih čimbenika [77]. Time su prikazali odnos između sistemskog upalnog odgovora i laringealnog imunološkog mikrokoliša. Rezultati istraživanja Alessandrini i suradnika ukazuju na to da je $CPS \geq 1$ pozitivan prognostički čimbenik, u smislu rijeđe pojave recidiva bolesti i duljeg preživljena bez bolesti, što je u skladu s drugim dokazima o vjerojatnoj ulozi PD-L1 kao markera učinkovitijeg antitumorskog imunološkog odgovora [71, 78, 79]. U njihovoj skupini bolesnika, bolji klinički ishod i histopatološke karakteristike (u smislu bogatijeg infiltrata limfocita) su nađeni kod PD-L1 pozitivnih karcinoma grkljana.

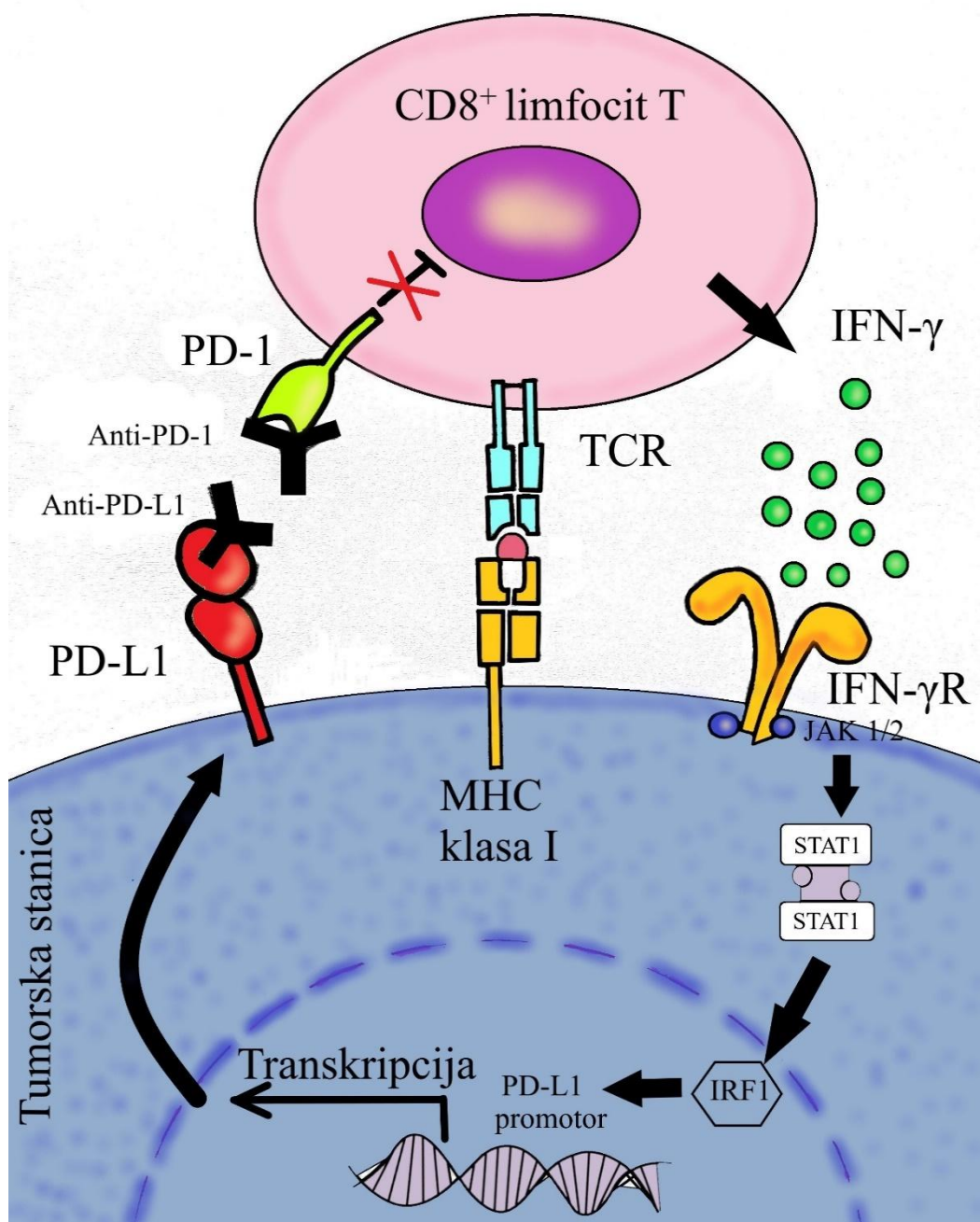
Korištenje PD-L1 kao biomarkera u skvamoznim karcinomima glave i vrata za predviđanje razvitka metastaza ili recidiva bolesti veliki je izazov zbog njegovog heterogenog intratumorskog izražaja i razlika u načinu očitavanja. U upotrebi su različiti klonovi protutijela (22C3, SP142 i SP263) i različiti sustavi bodovanja koji mogu uključivati same tumorske stanice (eng. *Tumor proportion score* – TPS) ili tumorske stanice i imunološke stanice (CPS). Nadalje, još nije sasvim jasno definirana granična vrijednost PD-L1 izražaja koja bi se koristila za procjenu imunohistokemijskog bojenja kao pozitivnog.

Također, u literaturi nedostaje radova o usporedbi PD-L1 izražaja između displazija i karcinoma, ali i displazija i benignih promjena grkljana. U jednom od rijetkih radova pronađen

je statistički značajno veći izražaj kod karcinoma grkljana u usporedbi s displazijama [80]. Treba napomenuti da je u navedenom istraživanju uključeno samo 10 bolesnika s displazijom te nije istraživao izražaj PD-L1 u benignim lezijama.

Čini se da se izražaj PD-L1 oslanja na složenu interakciju između stanica tumora i imunoloških stanica u tumorskom mikrokolišu te je njegov izražaj u tumorskim stanicama također pojačan kao rezultat sekrecije IFN- γ (interferon gamma) putem T limfocita [71]. U tom smislu, pojačani izražaj PD-L1 u tumorskim stanicama mogao bi se objasniti antitumorskim, imunološkim pritiskom posredovanim limfocitima koji infiltriraju tumor (eng. *Tumor-infiltrating lymphocytes* - TILs). Ako je tako, bolesnici s tumorima bogatim T limfocitima koji snažno izražavaju PD-L1 vjerojatno će razviti snažniji imunološki odgovor i posljedično mogu imati bolju prognozu [71, 81].

Budući da se PD-L1 može smatrati i inhibitorom imunološkog odgovora i markerom imunološkog pritiska, upitno je kako bi njegov izražaj i tumorski mikrokoliš mogli biti povezani s karcinomom glave i vrata [82]. Malo je radova koji sistematski istražuju izražaj PD-L1 u tumorskim stanicama kao i stanicama mikrokoliša samo kod skvamoznih lezija grkljana idući od pre-invazivnih lezija skvamoznog epitela do invazivnih (invazivnog skvamoznog karcinoma), a rezultati malog broja dostupnih studija su također nerijetko oprečni. Rezultati nedavno objavljenje meta-analize koja je uključivala premaligne lezije usne šupljine, su pokazali da je izražaj PD-L1 slabiji u pre-invazivnim skvamoznim lezijama nego kod invazivnog skvamoznog karcinoma [83]. Druga pak studija nije uspjela dokazati razlike u izražaju PD-L1 u pre-invazivnim i invazivnim skvamoznim lezijama usne šupljine i grkljana [84].



Slika 3. PD-1/PD-L1 signalni put

CD8 pozitivan limfocit T se aktivira nakon prepoznavanja tumorskog antigena predstavljenog od molekule MHC klase I i otpušta IFN- γ koji se veže na receptor, te posljedično inducira pojačan izražaj PD-L1 na tumorskim stanicama. PD-L1 se veže na PD-1 na površini T limfocita, izazivajući inhibicijski učinak PD-1/PD-L1 osi. Anti-PD-1 ili anti-PD-L1 protutijela blokiraju interakciju PD-1 i PD-L1 i ukidaju inhibiciju CD8 pozitivnih limfocita T čime se pojačava antitumorska aktivnost.

1.8 Tumorski mikrookoliš

Tumorski mikrookoliš (eng. *Tumor microenvironment*) složen je sustav neoplastičnih stanica i njima bliske okoline. Čine ga promijenjene tumorske stanice i nepromijenjene stromalne stanice te ekstracelularni matriks koji objedinjuje sustav. Tumorski mikrookoliš privlači interes u vidu razvoja novih biomarkera, posebice onih s mogućim prognostičkim i terapijskim implikacijama [81]. Među stanicama tumorskog mikrookoliša posebno su zanimljivi T limfociti kao i makrofazi zbog velike uloge u interakciji s tumorskim stanicama koja još uvijek nije dovoljno istražena.

1.8.1 T limfociti

Dobro je poznato da su CD4 pozitivni T limfociti vrlo bitni u postizanju optimalnog antitumorskog imuniteta te da zajedno s CD8 pozitivnim T limfocitima imaju sinergističku ulogu u imunološkom odgovoru [85].

U studiji Wolfa i suradnika [86] dokazano je da je veća infiltracija CD4 pozitivnih limfocita intraepitelno povezana s duljim preživljenjem bez bolesti kao i ukupnim preživljenjem. S druge strane, gledajući stromalni izražaj CD4 pozitivnih limfocita dobiven je suprotan rezultat, niži izražaj je bio povezan s duljim preživljenjem bez bolesti. Treba napomenuti da je u navedenoj studiji bilo uključeno samo 40 bolesnika s heterogenom skupinom karcinoma glave i vrata (usna šupljina, orofarinks, hipofarinks, grkljan i maksilarni sinus). Nekoliko je studija od tada potvrdilo i proširilo moguću prognostičku ulogu CD4 pozitivnih limfocita, pokazujući da CD4 pozitivni limfociti koreliraju s preživljenjem u različitim karcinomima glave i vrata [87, 88]. Međutim, većina su istraživanja rađena na heterogenoj skupini karcinoma glave i vrata i nisu se posebno bavile karcinomom grkljana.

CD8+ limfociti ističu se svojim antitumorskim svojstvima, te njihov veći izražaj dovodi do boljih ishoda kod različitih vrsta karcinoma [89-91]. Objavljena istraživanja uglavnom se baziraju na izražaju PD-L1 kao glavnom pokazatelju odgovora bolesnika na anti PD-1/PD-L1 terapiju. Izražaj PD-L1 pozitivno korelira s CD8+ limfocitima te rezultati raznih istraživanja sugeriraju kako bi se CD8+ limfociti trebali uključivati u studije koje se bave istraživanjem biomarkera kod bolesnika liječenih inhibitorima kontrolnih točaka [81, 92]. Isto je učinjeno u jednoj studiji u kojoj je uključeno više tumora različitih lokalizacija (karcinom bubrega, pluća, melanom) liječenih nivolumabom [93]. U ovoj studiji, izražaj tumorskog PD-L1 pokazao se kao najvažniji prediktor odgovora na nivolumab, ali je moguće da bi model koji kombinira i CD8+ limfocite i PD-L1 mogao još bolje predvidjeti odgovor na inhibitore kontrolnih točaka. Studije koje procjenjuju

prognostičku vrijednost podskupine limfocita T u melanomu pokazale su da je postotak CD8+ stanica neovisan prediktor za poboljšano preživljenje [92]. Stoga je moguće da podskupine T limfocita imaju različit učinak na prognozu i predviđanje odgovora na inhibitore kontrolnih točaka PD-1/PD-L1. Balermipas i suradnici [94] također su izvijestili da je snažna infiltracija tumora CD3+ i CD8+ T limfocitima povezana s boljom prognozom kod bolesnika s karcinomom glave i vrata koji su primarno liječeni kemoradioterapijom. Prognostička važnost tumorske infiltracije CD3+ i CD8+ T limfocitima dokazana je kod karcinoma dojke, jednjaka, pluća, jajnika, debelog crijeva i anusa [95]. Nadalje, Balermipas i suradnici [94] pokazali su da intratumoralna lokalizacija TIL-a (u neposrednoj blizini tumorskih stanica, u stromi tumora) utječe na njihov prognostički učinak. Nedavne studije Taubea i suradnika [93] i Tumea i suradnika [96] također su pokazale da je lokacija T limfocita i stanica koje izražavaju PD-L1 unutar tumora od posebne važnosti; otkrivanje CD8+ T limfocita i PD-L1 pozitivnih stanica na invazivnom rubu tumora bilo je povezano s boljim odgovorom na imunoterapiju.

1.8.2 Makrofazi

Novija istraživanja ukazuju da je PD-L1 prekomjerno izražen u tumorskom mikrookolišu i povezan s infiltracijom s tumorom-povezanim makrofazima (eng. *tumor-associated macrophages* - TAMs) kod tumora glave i vrata [97]. Makrofazi pokreću imunološki odgovor nakon međudjelovanja s antigenima i usmjeravaju djelovanje izvršnih stanica imunološkog sustava prema proupalnom (M1 orijentacija) ili protuupalnom odgovoru (M2 orijentacija - TAM). Međudjelovanje aktiviranih M2 makrofaga s okolnim limfocitima T od posebnog je značaja za podešavanje lokalnog imunološkog odgovora [98].

CD68 je najčešći marker za sve makrofage, dok je CD163 najčešće korišten marker za M2 polarizirane makrofage. Makrofazi koji infiltriraju tumorsko tkivo uključeni su u karcinogenezu kod različitih sijela. Prisutni su s različitom učestalošću u tumorima, a česti su u skvamoznim karcinomima glave i vrata [99]. Sukladno tome, studije na različitim tipovima tumora pokazale su da se TAM-ovi mogu povezati s pozitivnom, ali i negativnom prognozom [100]. TAM-ovi su općenito usmjereni na poticanje rasta tumora i angiogeneze te suzbijanje adaptivnog imuniteta te također imaju važnu ulogu u migraciji tumorskih stanica, invaziji i metastaziranju [101]. Malo je studija istraživalo utjecaj mikrookoliša kod karcinoma glave i vrata te povezanost s progresijom tumora [102]. Nekoliko izvješća sugeriralo je da su TAM-ovi povezani s rastom tumora, napredovanjem bolesti i lošijom prognozom kod nekih karcinoma [103, 104]. Unatoč napretku u razumijevanju međudjelovanja imunološkog sustava i tumorskih stanica, važna pitanja ostaju neodgovorena. Nije poznato utječu li CD68+ makrofazi na preživljenje bolesnika

s karcinomom grkljana te bi li mogli biti važni prognostički markeri kod bolesnika s karcinomom grkljana.

Pojedine studije pokazuju kako su se određeni imunološki markeri pokazali kao superiorniji prognostički čimbenici u odnosu na TNM klasifikaciju [105]. Imunološke stanice koje infiltriraju tumor identificirane su kao prognostički čimbenici u karcinomu pluća [106], kolorektalnom karcinomu [107] i karcinomu dojke [108]. Također, histološki bogat limfocitni odgovor domaćina pokazao se kao dobar prognostički čimbenik u karcinomima glave i vrata kako u uzorcima kirurške ekscizije, tako i u uzorcima biopsije [109, 110]. Nadalje, otkriveno je da je to čimbenik koji predviđa bolji odgovor na indukcijsku kemoterapiju [110]. Međutim, točna interakcija između imunoloških i protuimunoloških čimbenika nije jasno proučena u skvamoznom karcinomu grkljana, niti njihova prognostička ili prediktivna uloga. Osim samog tipa imunoloških stanica, poznato je da je bitna lokalizacija samih imunoloških stanica unutar tumora [111]. Naime, potrebno je odrediti nalaze li se pojedine imunološke stanice unutar samih tumorskih odjeljaka ili je veća koncentracija smještena u stromalnom odjeljku. Usporedba lokalne koordinacije različitih imunoloških odjeljaka idući od benignih promjena preko prekanceroznih lezija do invazivnog karcinoma do danas nije sveobuhvatno analizirana u bolesnika sa skvamoznim lezijama grkljana.

1.9 Humani papiloma virus (HPV)

U zadnje vrijeme sve se više pažnje pridaje povezanosti HPV infekcije s malignim tumorima glave i vrata [112, 113]. Poznato je da bolesnici s HPV pozitivnim karcinomom orofarinksa imaju značajno bolje preživljenje u odnosu na HPV negativne bolesnike [113]. Međutim, takva povezanost nije dokazana u slučaju zloćudnih tumora grkljana, a i sam raspon HPV pozitivnih tumora vrlo je širok te se kreće od 0 do 75% [113, 114]. Razlog tome se krije u zemljopisnim raznolikostima, ali i različitim metodama HPV detekcije korištenim u istraživanjima [115, 116]. HPV infekcija ima važnu ulogu u regrutiranju imunoloških stanica unutar tumora grkljana. Međutim, mehanizmi kojima HPV-tumorske stanice pogoduju infiltraciji specifičnih imunoloških stanica nisu još uvijek potpuno poznati. Lyford-Pike i suradnici [117] pokazali su da interakcija PD-1/PD-L1 igra važnu ulogu u HPV pozitivnom orofaringealnom karcinomu stvaranjem pogodnih, imunosupresivnih uvjeta za početnu virusnu infekciju i imunološku otpornost podupirući tezu za terapijsku blokadu PD-1/PD-L1 puta u bolesnika s HPV pozitivnim karcinomom glave i vrata. Osim toga, utvrđeno je da su T limfociti koji pojačano izražavaju PD-1 pozitivan prognostički čimbenik u HPV pozitivnom orofaringealnom karcinomu [118]. Imunološki odgovor je vrlo dinamičan proces koji zahtijeva procjenu svih subpopulacija

imunoloških stanica, kako bi se razumjelo njihovo međusobno djelovanje i posljedice na prognozu bolesnika suočenih s HPV pozitivnim karcinomom grkljana, što će zasigurno biti interes znanstvenika u budućim studijama [116].

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Većina istraživanja o izražaju PD-L1 i staničnom mikrookolišu provedena su na heterogenoj skupini tumora koja uključuje različita sijela u području glave i vrata. Homogenost lokalizacije karcinoma je ključna obzirom da se onkogeni i tumor supresorski geni mogu ponašati vrlo različito [70], a trenutno dostupne studije koje su provedene na karcinomima grkljana pokazuju proturječne rezultate [71, 75, 76].

2.1 Hipoteza

Hipoteza istraživanja je da će se povećani izražaj PD-L1 uočiti u karcinomu grkljana u odnosu na prekancerozne lezije te da će veći izražaj korelirati s boljim preživljenjem.

Glavni cilj istraživanja je imunohistokemijski analizirati razinu izražaja PD-L1 u skvamoznom karcinomu grkljana i u pre-invazivnim lezijama.

Specifični ciljevi istraživanja:

1. U istim lezijama će se imunohistokemijski istražiti udio CD4+, CD8+, CD68+ i CD163+ stanica te će se učiniti analiza prevalencije HPV-a.
2. Usporediti razinu izražaja PD-L1 kao i mikrookoliš u skupini bolesnika s prekanceroznim lezijama koje su progredirale u karcinom sa skupinom bolesnika kod kojih nije došlo do progresije.
3. Rezultati analize razine izražaja PD-L1 te mikrookoliša (udio CD4+, CD8+, CD68+ i CD163+ stanica) u ispitivanim skupinama će se analizirati s obzirom na kliničko patološke karakteristike, prisutnost HPV-a te preživljenje bolesnika.

3. ISPITANICI I METODE

U ovoj studiji provelo se retrospektivno istraživanje na uzorcima tkiva iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju, Kliničkog bolničkog centra Rijeka. Koristili su se bioptički uzorci bolesnika upućenih s Klinike za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata KBC-a Rijeka u razdoblju od 2010. do 2019. godine.

3.1 Ispitivana skupina

U istraživanje je uključeno 179 bolesnika, a od toga 102 s dijagnozom skvamoznog karcinoma grkljana, njih 41 s displazijom epitela grkljana te 36 s polipima glasnica (kontrolna skupina). Svi bolesnici uključeni u istraživanje primarno su kirurški liječeni. Bolesnici s karcinomom su nakon zahvata prikazani na sastanku multidisciplinarnog tima za tumore glave i vrata te su, ovisno o stadiju bolesti i određenim kliničko-patološkim osobinama tumora, dalje liječeni radio-ili kemoradioterapijom ili su samo redovito praćeni. U studiju nisu bili uključeni bolesnici koji su prethodno bili podvrgnuti onkološkom liječenju ili bolesnici koji su imali maligne tumore neke druge lokalizacije. Demografski podaci, podaci o funkcijama i navikama, kliničko-patološkim osobinama tumora te praćenju bolesnika dobiveni su iz bolesnikove medicinske dokumentacije uključujući Integrirani Bolnički Informacijski Sustav (IBIS). Za kliničko određivanje stadija bolesti korišteno je osmo izdanje AJCC/UICC TNM sustava dok se za klasifikaciju displazija koristila klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije iz 2017. godine. [25, 119, 120]. Tablica 4 prikazuje demografske značajke skupine bolesnika s karcinomom grkljana. Prema preliminarnim rezultatima PD-L1 izražaja u bolesnika s karcinomom grkljana, izračunali smo veličinu uzorka (ukupna veličina uzorka $n=92$) za usporedbu veličine uzorka udjela na razini statističke značajnosti $p < 0,05$ sa statističkom snagom analize od 80% korištenjem opcije "Izračun veličine uzorka" u MedCalc za Windows, verzija 19.1 (*MedCalc Statistical Software bvba, Ostend, Belgija*).

Tablica 4. Demografske značajke skupine bolesnika s karcinomom grkljana

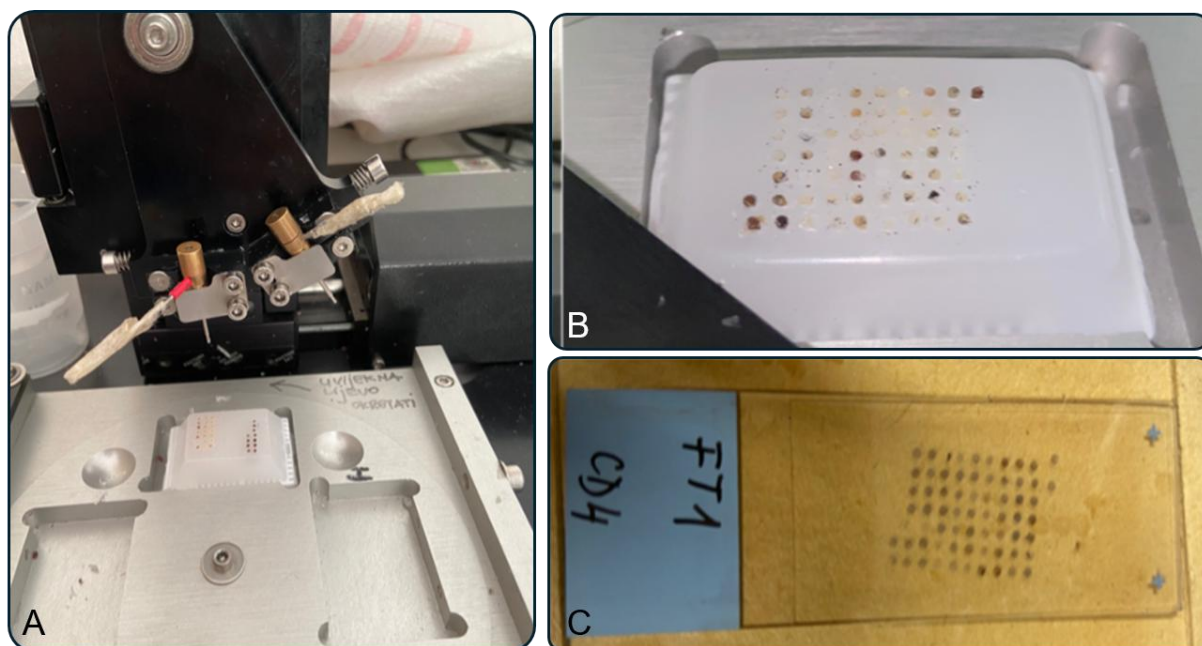
Karakteristike bolesnika sa SKG-om N=102		Broj bolesnika (%)
Dob (godine); medijan (raspon)		63.0 (43.9-83.6)
Spol	Ženski	7 (6.9)
	Muški	95 (93.1)
Pušenje	Ne	25 (24.5)
	Da	77 (75.5)
Alkohol	Ne	54 (52.9)
	Da	48 (47.1)
T klasifikacija	1	26 (25.5)
	2	17 (16.7)
	3	40 (39.2)
	4	19 (18.6)
Klinički stadij	I	26 (25.5)
	II	18 (17.6)
	III	34 (33.3)
	IV	24 (23.5)
N klasifikacija	0	87 (85.3)
	1	10 (9.8)
	2	5 (4.9)
Lokalizacija tumora	Supraglotični	9 (8.8)
	Glotični	72 (70.6)
	Subglotični	3 (2.9)
	Transglotični	18 (17.6)
Histološki gradus	G1	21 (21.4)
	G2	56 (54.4)
	G3	19 (18.4)
	Nepoznato	6 (5.8)
Invazija limfnih žila	Ne	46 (45.6)
	Da	39 (37.9)
	Nepoznato	17 (16.5)
Invazija krvnih žila	Ne	46 (45.6)
	Da	38 (37.3)
	Nepoznato	17 (17.1)
Perineuralna invazija	Ne	73 (71.8)
	Da	11 (10.7)
	Nepoznato	18 (17.5)
Resekcijski rubovi	R0	90 (88.2)
	R1	12 (11.8)
Recidiv	Ne	76 (74.5)
	Da	26 (25.5)
CPS	<1	27 (26.5)
	≥ 1	66 (64.7)
	Nepoznato	9 (8.8)
TPS	<1	56 (54.9)

	≥ 1	37 (36,3)
	Nepoznato	9 (8,8)
Mjeseci do recidiva		
Medijan (raspon)		15.3 (2.3-43.3)
Praćenje (mjeseci)		
Medijan (raspon)		56.2 (0.1-179.5)
Umrli od karcinoma		21 (20.4)
Pojava novog primarnog tumora		26 (25.2)

Skraćenice: SKG – skvamozni karcinom grkljana, CPS – *Combined positive score*, TPS – *Tumor proportion score*

3.2 Tkivne mikroareje (TMA)

Bioptički materijal polipa glasnica, laringealnih displazija te skvamoznih karcinoma grkljana, fiksiran je u neutralnom 10% puferiranom formalinu (Kemika, Zagreb, Hrvatska), uklopljen u parafin i obojan hemalaun eozinom (HE) radi patohistološke analize. Doktorand je uz pomoć mentora patologa označio područja od interesa na HE staklima te potom na formalin-fiksiranim parafinskim blokovima (blok donor), odakle su se šupljom iglom (promjera 1 mm) uzimali cilindri tkiva za izradu tkivnih mikroareja (eng. *Tissue microarray* - TMA) pomoću uređaja MTA Booster OI (Alphelys, Plaisir, Francuska) (Slika 4A). Cilindri s odabranim tkivom (3-4 cilindra po uzorku) su se postavljali u novi parafinski blok (blok primatelj) u točno određenom nizu (Slika 4B). Parafinski blok primatelj se potom ostavio preko noći u termostatu na 45°C da bi se cilindri sa bloka davatelja povezali i uklopili u blok primatelj. Slijedilo je narezivanje pomoću mikrotoma, postavljanje na predmetno stakalce i standardna histološka analiza te imunohistokemijske analize (Slika 4C). Svaki blok može se izrezati na 100 – 500 rezova, koji se mogu podvrgnuti neovisnim ispitivanjima. TMA u kombinaciji s imunohistokemijom preferirana je metoda za proučavanje i analizu izražaja različitih biomarkera, a glavne prednosti ove tehnike su ušteda reagensa te vremena očitavanja uz osiguravanje istovjetnih analitičkih uvjeta za sve ispitivane uzorke. Zbog heterogenosti izražaja unutar tumorskog tkiva i prostorne distribucije ispitivanih markera ova se metoda ponekad ne smatra prikladnom no mnoge studije koje su ispitivale izražaj PD-L1 i imunoloških stanica u karcinomima glave i vrata su također koristile TMA [121-123].



Slika 4. Postupak izrade tkivnih mikroareja

A – uređaj za izradu tkivnih mikroareja, B – parafinski blok primatelj, C – predmetno stakalce

3.3 Metodologija rada

3.3.1 Imunohistokemijsko bojanje

TMA parafinski blokovi su konstruirani na način da se po bioptičkom uzorku uzelo tri ili četiri cilindra tkiva promjera od 1 mm ovisno o veličini bioptičkog materijala ili lezije. Osim korištenja više cilindara tkiva prilikom izrade TMA, da bi osigurali što bolji uvid u prostornu raspodjelu ispitivanih markera, TMA kocke su serijski narezivane i bojane za pojedine markere. Tijekom imunohistokemijskih postupaka neki od cilinara tkiva su ili izgubljeni, ili fragmentirani ili su imali suboptimalno obojanje; stoga se broj pregledanih uzoraka ponekad razlikovao između pojedinih analiza. Protutijela korištena u ovom istraživanju su sljedeća (Tablica 5):

- zečje monoklonalno (IgG) anti-PD-L1 (klon SP263, Ventana, Tucson, SAD) [124];
- mišje monoklonalno (IgG) anti-p16^{INK4a} (klon E6H4, Ventana, Tucson, SAD) [125];
- zečje monoklonalno (IgG) anti-CD4 (klon SP35, Cell Marque, Rocklin, SAD) [126];

- mišje monoklonalno (IgG1) anti-CD8 (klon C8/144B, DakoAgilent, Santa Clara, SAD) [127];
- mišje monoklonalno (IgG) anti-CD68 (klon PG-M1, DakoAgilent, Santa Clara, SAD) [128];
- mišje monoklonalno (IgG1) anti-CD163 (klon 10D6, Leica Biosystems, Buffalo Grove, SAD) [129].

Za procjenu izražaja PD-L1 se osim protutijela SP263 još koriste i klonovi 22C3 te SP142. U literaturi postoje radovi koji su uspoređivali izražaj PD-L1 upotrebom različitih klonova protutijela [130, 131]. Najčešće se u retrospektivnim istraživanjima koriste formalin fiksirane parafinske kocke te se pokazalo da postoji značajna razlika u izražaju PD-L1 koristeći različita protutijela kad se uspoređuju “svježiji” preparati te oni koji su skladišteni dulji niz godina. Za parafinske kocke koje su skladištene dulje vrijeme najadekvatniji izražaj se dobije korištenjem klona SP263, dok bi se korištenjem klona 22C3 mogao podcijeniti izražaj PD-L1.

S TMA parafinskog bloka narezali su se rezovi debljine 3-4 μ m i prebacili na predmetna stakla sa pozitivno nabijenom površinom za bolju adheziju tkiva (DakoREAL™, Glostrup, Danska). Da bi se dodatno poboljšala adhezija tkiva za staklo, stakalca su ostavljena u termostatu preko noći na 37°C. Postupak deparafinizacije, rehidracije i otkrivanja antigenskih epitopa se za CD4, CD8, CD68 i CD163 odvijao u uređaju PT Link (Agilent, SAD), dok je za PD-L1 i p16^{INK4a} cijeli postupak imunohistokemijske analize bio automatiziran i odvijao se u uređaju BenchMark Ultra (Ventana, SAD). Postupak nakon sušenja predmetnih stakalaca u uređajima je sljedeći: preparati su se deparafinizirali u ksilenu (Tissue clear, Sakura, UK), 3 puta po 7 minuta, te su se 2 puta isprala u 100% (Kemig d.o.o., Sesvete, Hrvatska) etanolu da bi se uklonio ostatak ksilena. Potom su se preparati rehidrirali u 96% i 70% etanolu (4 minute ispiranja u svakom gradijentu etanola).

Za otkrivanje antigenskih epitopa primijenjeni su različiti postupci ovisno o protutijelu (Tablica 4). Na predmetnim staklima s tkivnim rezovima za dokazivanje PD-L1 i p16^{INK4a} koristio se postupak otkrivanja epitopa pomoću topline (heat induced epitope retrieval-HIER) u CC1 puferu (pufer na bazi Tris-a pH 8.0-8.5) i to 64 minute za PD-L1, a 48 minuta za p16^{INK4a}, u uređaju BenchMark Ultra (Ventana, SAD). Predmetna stakla s tkivnim rezovima za dokazivanje CD4, CD8, CD68, CD163 uranjala su se u gotovu otopinu za otkrivanje epitopa (engl. *Target retrieval solution*, Dako, Glostrup, Danska) uz korištenje PT Link instrumenta (Agilent, SAD), 20 minuta na temperaturi od 97°C. Nakon pre-tretmana slijedila je inkubacija primarnim protutijelima koja je za PD-L1 iznosila 16 minuta, a za p16^{INK4a} 12 minuta, na

temperaturi od 36°C u uređaju BenchMark Ultra (Ventana, SAD). Za CD4, CD8, CD68 i CD163 inkubacija primarnim protutijelima je bila sat vremena na sobnoj temperaturi.

Nakon deparafinizacije te razotkrivanja antigena postupak imunohistokemijskog bojanja se za CD4, CD8, CD68 i CD163 načinio u automatskom imunobojaču (Dako Autostainer Plus, DakoCytomation Colorado Inc, Fort Collins, CO, SAD). Daljnji postupak u uređaju odvijao se na slijedeći način: dodala su se primarna protutijela u odgovarajućem razrjeđenju, a stakalca su se inkubirala kako je gore navedeno za pojedina protutijela te u odgovarajućim uređajima. Potom su se stakla nakapala sa 3% H₂O₂ (Peroxidase-Blocking Solution, DakoREAL™, Glostrup, Danska) i inkubirala 6 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se blokirala endogena peroksidaza te su se potom isprala 2 puta u puferu za ispiranje (Dako Wash Buffer 10x, Glostrup, Danska; 0.5 M Tris-HCl, 1.5M NaCl, 0.5% Tween 20, pH 7.6 (± 0.1) koji se prethodno razrijedio sa destiliranom vodom u omjeru 1:10. Nakon toga uslijedila je primjena vizualizacijskog sistema DakoREAL™ EnVision™ Detection System, Rabbit/Mouse (30 minuta), a potom DakoREAL™ DAB+ Chromogen (sadržan u EnVision™ kitu), koji je korišten kao kromogen. Kada se diaminobenzidin (DAB) dodao na stakla čekalo se otprilike 10 minuta da dođe do promjene boje. Stakalca su se potom isprala u ddH₂O. Nakon primjene vizualizacijskog sistema slijedilo je bojanje kroz 1 minutu, sa DakoREAL™ Hematoxylin (DakoREAL™, Glostrup, Danska) HE-om, ispiranje u vodi iz slavine, dehidracija u etanolu, ispiranje u ksilenu i pokrivanje GLC Mounting Medium (Sakura, UK). Kao negativne kontrole u svim imunohistokemijskim bojanjima korišteni su histološki rezovi na koje je umjesto primarnih protutijela nanescena puferska otopina. Također, kod PD-L1 i p16^{INK4a} imunohistokemije korišten je OptView DAB IHC vizualizacijski sistem prema preporuci proizvođača i u uređaju BenchMark Ultra (Ventana, SAD).

Tablica 5. Karakteristike korištenih primarnih protutijela za imunohistokemijsko bojanje

Protutijelo, klon, porijeklo, izotip	Proizvođač	Razrjeđenje protutijela	Pre-tretman i otkrivanje epitopa
PD-L1, SP263, zečje monoklonalno (IgG)	Ventana, Tucson, SAD	Originalno razrjeđenje ^a	BenchMark Ultra (Ventana, SAD), otkrivanje epitopa pomoću topline u CC1 puferu ^b
CD4, SP35, zečje monoklonalno (IgG)	Cell Marque, Rocklin, SAD	1:75	PT Link (Agilent, SAD), Tris/EDTA, pH 9
CD8, C8/144B, mišje monoklonalno (IgG1)	DakoAgilent, Santa Clara, SAD	Originalno razrjeđenje ^a	PT Link (Agilent, SAD), Tris/EDTA, pH 9
CD68, PG-M1, mišje monoklonalno (IgG)	DakoAgilent, Santa Clara, SAD	1:100	PT Link (Agilent, SAD), Tris/EDTA, pH 9
CD163, MRQ-26, mišje monoklonalno (IgG1)	Cell Marque, Rocklin, SAD	1:25	PT Link (Agilent, SAD), Tris/EDTA, pH 9
p16 ^{INK4a} , E6H4, mišje monoklonalno (IgG)	Ventana, Tucson, SAD	Originalno razrjeđenje ^a	BenchMark Ultra (Ventana, SAD), otkrivanje epitopa pomoću topline u CC1 puferu ^b

^aPripremljeno za upotrebu od strane proizvođača (eng. "ready to use")

^bCC1 je pufer na bazi Tris-a, pH 8.0-8.5 (pripremljeno za upotrebu od strane proizvođača, eng. "ready to use")

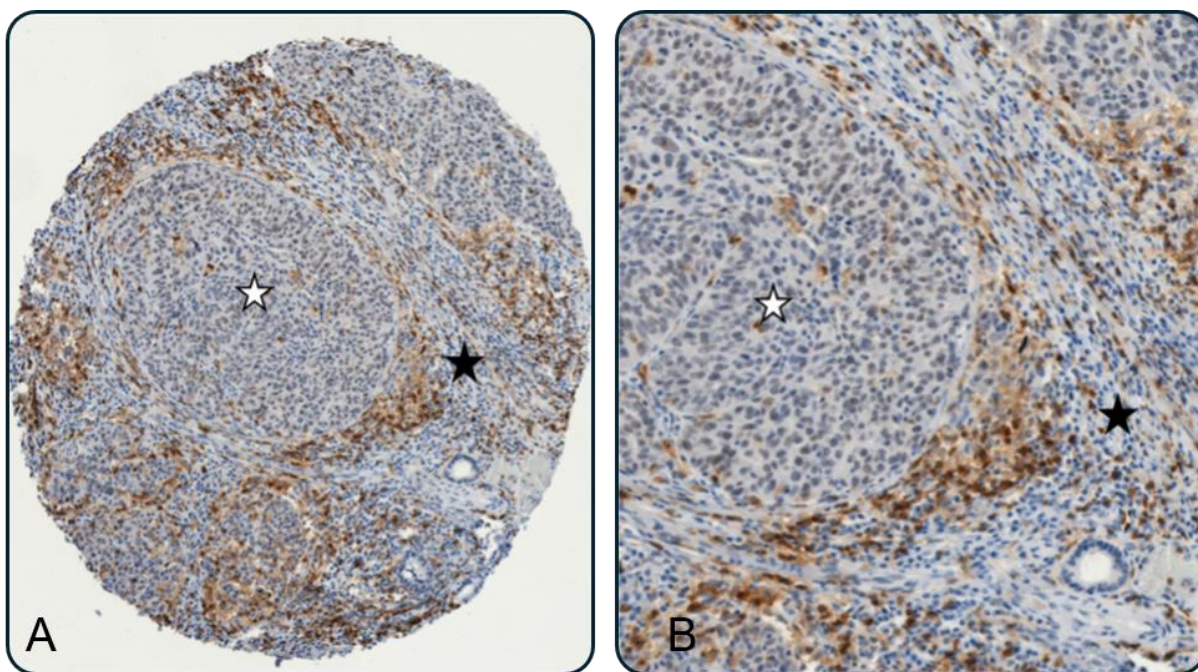
3.3.2 Evaluacija imunohistokemijskog bojenja

Procjenu izražaja istraživanih biomarkera proveli su doktorand, mentor i komentor neovisno jedni o drugima, a odstupanja u rezultatima riješena su diskusijom i zajedničkim slaganjem. Kombinirani pozitivni rezultat (eng. *Combined positive score* - CPS) i rezultat proporcije tumora (eng. *Tumor proportion score* - TPS) korišteni su za procjenu razine izražaja PD-L1, pri čemu su $CPS < 1$ i $TPS < 1$ označavali negativan, a $CPS \geq 1$ i $TPS \geq 1$ pozitivan izražaj. CPS je izračunat na sljedeći način: broj PD-L1-pozitivnih stanica, uključujući tumorske stanice, makrofage i limfocite, podijeljen je s ukupnim brojem viabilnih tumorskih stanica i zatim pomnožen s 100 [83, 132]. TPS je izračunat brojem PD-L1-pozitivnih tumorskih stanica podijeljenim s ukupnim brojem viabilnih tumorskih stanica i zatim pomnožen s 100 [133, 134].

Tumorske stanice su se smatrale PD-L1 pozitivnim ako je pronađeno membransko bojanje bilo kojeg intenziteta s parcijalnim ili bojanjem membrane cijelom cirkumferencijom dok su se upalne stanice smatrale pozitivnim u slučaju bojanja membrane ili citoplazme [135]. TMA cilindri koje su sadržavale manje od 100 viabilnih tumorskih stanica bili su isključeni.

Metoda procjene korištena za CD4+, CD8+, CD68+ i CD163+ stanice izvedena je iz Smjernica za procjenu tumor infiltrirajućih limfocita u solidnim tumorima, a po preporuci međunarodne radne skupine za imunoonkološke biomarkere [85, 105]. Evaluacija je uključivala procjenu imunokompetentnih stanica pri povećanju od 200 puta u dvije različite regije: intratumorski epitelni odjeljak, koji se sastoji od gnijezda tumorskih stanica, i stromalni odjeljak tumora, koji se odnosi na tkivo smješteno između gnijezda stanica karcinoma unutar tumora (Slika 5). Prosječna gustoća određenih stanica kvantificirana je kao kontinuirana varijabla izračunavanjem udjela površine koju zauzimaju imunohistokemijski pozitivne stanice u specifičnom odjeljku (bilo gnijezda tumorskih stanica ili tumorske strome) u odnosu na ukupno intratumoralno odnosno intraepitelno ili stromalno područje. Na primjer, intraepitelni postotak CD4 stanica određen je dijeljenjem površine koju zauzimaju CD4 stanice u gnijezdima tumorskih stanica s ukupnom površinom gnijezda tumorskih stanica. Dodatno, gustoća određenih stanica izračunata je brojem ukupnih pozitivnih stanica u cijelom uzorku u odnosu na broj svih viabilnih stanica tumora. Sveobuhvatna procjena regije tumora provedena je na svakom stakalcu, uz isključivanje iz analize onih regija koje pokazuju ulceracije i nekrozu.

Za potvrdu HPV infekcije, u praksi se najčešće koristi surogat biljeg p16 protein koji se određuje imunohistokemijski [112]. Pozitivna prediktivna vrijednost određivanja p16 proteina imunohistokemijski iznosi 93%, dakle postoje određeni tumori koji su p16 pozitivni, a zapravo su HPV negativni [112]. Iz tog razloga se još uz imunohistokemiju učinila i detekcija HPV-a pomoću metode lančane reakcije polimerazom (eng. *Polymerase Chain Reaction* – PCR), a također se odredio i genotip HPV-a. Imunoreaktivnost za p16^{NK4a} dihotomizirana je u negativno (vrijednost 0) naspram pozitivnog (vrijednost 1), a pozitivnost se definirala jakom nuklearnom i citoplazmatskom imunoreaktivnošću u najmanje 70% stanica ispitivanog tkiva, kao što je prethodno opisano [112, 136].



Slika 5. Primjer imunohistokemijskog izražaja CD4+ stanica u dva različita odjeljka. Intraepitelni odjeljak s iCD4+ stanicama (gnijezda tumorskih stanica označena s bijelom zvjezdicom) i stromalni odjeljak sa sCD4+ stanicama (označen crnom zvjezdicom) (A): 100× povećanje; (B): 300× povećanje (iCD4+: intraepitelno; sCD4+: stromalno).

3.3.3 Ekstrakcija DNA i lančana reakcija polimerazom (PCR)

Metoda lančane reakcije polimerazom (eng. *Polymerase Chain Reaction* – PCR) omogućuje brzo stvaranje milijuna do milijardi kopija određenog segmenta deoksiribonukleinske kiseline (DNA), omogućujući istraživačima dovoljno materijala za analizu. U našem istraživanju koristili smo PCR analizu kod imunohistokemijski p16 pozitivnih uzoraka kako bi se dokazao genotip HPV-a.

Ukupna DNA izolirana je iz uzoraka fiksiranih u formalinu i uklopljenih u parafin, a da bi se izbjegla kontaminacija između uzoraka velika je pozornost posvećena narezivanju tkiva. Ovisno o količini biopsičkog materijala uklopljenog u parafin, upotrebjeno je 4 do 10 rezova (5 µm debljine) koji su potom stavljeni na predmetno stakalce za makrodisekciju. Na odgovarajućim HE stakalcima područje s dovoljnom količinom tumorskog tkiva označeno je flomasterom, a zatim je odabrano područje od interesa preneseno i zaokruženo na neobojanim presjecima za makrodisekciju i naknadnu izolaciju DNA. Dijelovi odabranog tumorskog tkiva izrezani su s predmetnih stakalca i stavljeni u 2mL epruvetu. Postrugani fragmenti tkiva su

deparafinizirani dodavanjem 1 mL ksilena i zagrijavanjem na 55°C tijekom 30 minuta, nakon čega je uslijedilo centrifugiranje i naknadno uklanjanje supernatanta. Nakon deparafinizacije s tri ispiranja ksilenom, dodan je 1 mL 100% etanola da se ukloni zaostali ksilen. Tkiva su sušena na 37°C tijekom 30 minuta, a postupak DNA ekstrakcije potom je učinjen pomoću NucleoSpin Tissue kit-a (Macharey-Nagel, Duren, Njemačka) prema uputama proizvođača.

Kako bi se procijenila kvaliteta ekstrahirane DNA, učinjen je PCR za kontrolni β -globinski gen korištenjem četiri kombinacije početnica u rasponu od 110, 250, 345 i 408 bp (Takara Biomedicals, Japan). Za detekciju HPV DNA korištenie su početnice koje ciljaju regije unutar *L1* i *E6/E7* HPV gena. To uključuje GP5⁺/GP6⁺¹⁵ i SPF 10 početnice (INNO-LiPA Genotyping, Innpgenetics N.V., Ghent, Belgija) iz *L1* regije i početnice iz Human Papillomavirus Typing Set-a (Takara Biomedicals, Japan), koje umnožavaju sekvence unutar *E6* i *E7* gena. Tipovi HPV-a u pozitivnim uzorcima dodatno su genotipizirani pomoću PCR analiza koristeći početnice specifične za HPV-16, 18, 31, 33 i 45 unutar *E6* i *E7* HPV gena (Human Papillomavirus Detection Set, Takara Biomedicals, Japan).

3.4 Etički aspekti istraživanja

Ovim istraživanjem osiguralo se poštivanje temeljnih etičkih i bioetičkih principa – osobni integritet, pravednost, dobročinstvo i neškodljivost za ispitanika. U prikupljanju i prikazivanju podataka čuvala se privatnost ispitanika kao i njihov identitet. Pri znanstvenom istraživanju pridržavali smo se preporuka Helsinške deklaracije i njezinih revizija, Kodeksa medicinske etike i deontologije (NN 55/08), Pravilnika o kliničkim ispitivanjima i dobroj kliničkoj praksi (NN 121/2007, NN 175/2003) koji je u skladu sa Smjernicama Europske medicinske agencije i njenog tijela *Committee for Proprietary Medicinal Products* (*»Note for Guidance on Good Clinical Practice«* - CPMP/ICH/135/95). Tijekom ispitivanja poštivali su se i drugi pravni akti RH (Zakon o lijekovima, NN 71/07; Zakon o lijekovima i medicinskim proizvodima NN 121/03; Zakon o liječništvu NN 121/03; Statut Hrvatske liječničke komore) te druge preporuke.

3.5 Statistička obrada rezultata

Statistička analiza provedena je korištenjem MedCalc za Windows, verzija 19.1 (*MedCalc Statistical Software bvba, Ostend, Belgija*). Razlike u učestalosti nominalnih varijabli provedene su Fisherovim egzaktnim testom i χ^2 testom. Usporedba korelacije između PD-L1

i imunoloških stanica izračunata je pomoću Spearmanove analize korelacije ranga. Za rezultate Spearmanove analize definirane kategorije koeficijenta korelacije su $r = 0-0.29$ niska razina korelacije, $r = 0.3-0.49$ umjerena razina korelacije te $r = 0.5-1$ visoka razina korelacije. Za analizu predviđanja recidiva bolesti korištena je logistička regresija. Kumulativne vjerojatnosti preživljavanja izračunate su Kaplan–Meierovom metodom. Razlike između stopa preživljenja testirane su log-rank testom. Svi testovi bili su dvostrani i $P < 0,05$ se smatrao statistički značajnim rezultatom.

Krivulja odnosa specifičnosti i osjetljivosti (eng. *Receiver operating characteristic* - ROC) generirana je za CD4, CD8, CD68 i CD163 kako bi se procijenila sposobnost ovih biomarkera kao pokazatelja ishoda bolesnika i stvorile optimalne statističke granične vrijednosti. Stoga su ROC krivulja i Youdenov indeks izračunati kako bi se maksimizirala osjetljivost i specifičnost pojedinačnog markera za ukupno preživljenje specifično za bolest u univarijantnom modelu. Područje ispod krivulje (eng. *Area under the ROC curve* - AUC) za model rezultata s 95% intervalom pouzdanosti (CI) izmjeren je kako bi se procijenila kvaliteta prediktivnog modela.

ROC analiza pokazala je statistički značajne granične vrijednosti od $>2.7\%$ za CD68 intraepitelni ($p=0.004$, $AUC=0.702$), $>5.5\%$ za CD68 ukupni ($p=0.042$, $AUC=0.644$) i $>2\%$ za CD163 intraepitelni ($p=0.01$, $AUC=0.689$) (Tablica 6). Preživljenje specifično za bolest (eng. *Disease specific survival* - DSS) izraženo je kao broj mjeseci od dijagnoze do pojave smrti povezane s bolešću. Preživljenje bez bolesti (eng. *Disease free survival* - DFS) definirano je kao vremenski interval od datuma dijagnoze do datuma dokumentiranog prvog recidiva bolesti. Ako nije bilo recidiva, preživljenje bez bolesti određeno je kao datum zadnjeg praćenja.

Tablica 6. Granične vrijednosti za stanice tumorskog mikrookoliša

Prediktori	Granična vrijednost	P vrijednost	AUC
CD4 intraepitelni	> 0.4	0.268	0.582
CD4 stromalni	> 6.5	0.197	0.594
CD4 ukupni	>11.5	0.37	0.568
CD8 intraepitelni	≤2	0.131	0.605
CD8 stromalni	>12	0.571	0.542
CD8 ukupni	≤23	0.972	0.503
CD68 intraepitelni	>2.7	0.004	0.702
CD68 stromalni	>4.5	0.174	0.593
CD68 ukupni	>5.5	0.042	0.644
CD163 intraepitelni	>2	0.01	0.689
CD163 stromalni	>18.3	0.516	0.549
CD163 ukupni	≥27.3	0.29	0.581

AUC – područje ispod krivulje (eng. Area under the curve)

4. REZULTATI

4.1 Usporedba izražaja PD-L1, CD4, CD8, CD68 i CD163 u benignim lezijama, displazijama i skvamoznim karcinomima grkljana

Post-hoc analiza pokazala je statistički značajnu razliku između sve tri analizirane skupine za medijan izražaja CPS i TPS PD-L1, CD4 stromalni i ukupni, CD8 stromalni i ukupni, CD68 intraepitelni i CD163 intraepitelni i stromalni odjeljak. Nadalje, dobivena je statistički značajna razlika za udio CD4 i CD8 limfocita za intraepitelni odjeljak između kontrolne skupine u usporedbi s LD-om i SKG-om zajedno. Za makrofage, dobivena je statistički značajna razlika za CD68 stromalni i ukupni odjeljak te CD163 ukupni odjeljak u usporedbi između SKG-a te kontrolne skupine i LD-a zajedno (Tablica 7).

Tablica 7. Usporedba PD-L1 izražaja i tumorskog mikrookoliša u laringealnim lezijama

Varijabla, medijan (raspon)		Kontrolna skupina	Displazije	Karcinomi	p vrijednost
N=179		N=36	N=41	N=102	
Dob (godine)		40.5 (26.0-78.0)	56.9 (24.7-79.7)	63.0 (43.9-83.6)	<0.0001*
Spol	ženski	4 (11.1)	8 (19.5)	7 (6.9)	0.129 [±]
	muški	32 (88.9)	33 (80.5)	95 (93.1)	
CD4	intraepitelni	0 (0.0-2.0)	0.5 (0.0-11.0)	1.0 (0.0-20.0)	<0.0001*
	stromalni	0 (0.0-5.0)	1.5 (0.0-35.0)	9.4 (0.0-40.3)	<0.0001*
	ukupni	0.5 (0.0-5.0)	2.6 (0.0-40.0)	10 (0.0-53.3)	<0.0001*
CD8	intraepitelni	1.0 (0.0-7.0)	2.13 (0.0-14.0)	2.75 (0.0-30.0)	0.002*
	stromalni	1.0 (0.0-8.0)	2.0 (0.0-17.0)	7.05 (0.0-37.3)	<0.0001*
	ukupni	2.5 (0.0-12.0)	5.0 (0.0-21.25)	11.1 (0.2-60.0)	<0.0001*
CD68	intraepitelni	0.0 (0.0-6.0)	0.73 (0.0-11.25)	2.2 (0.0-10.0)	<0.0001*
	stromalni	3.0 (0.0-20.0)	4.0 (0.0-50.0)	7.5 (0.1-30.0)	<0.0001*
	ukupni	3.0 (0.0-30.0)	4.0 (0.0-100.0)	9.5 (0.3-50.0)	<0.0001*
CD163	intraepitelni	0.0 (0.0-2.0)	0.2 (0.0-3.0)	1.5 (0.0-12.0)	<0.0001*
	stromalni	2.0 (0.0-17.5)	5.45 (0.0-60.0)	14.6 (0.0-50.0)	<0.0001*
	ukupni	2.0 (0.0-21.5)	5.25 (0.5-100.0)	15.0 (0.0-50.0)	<0.0001*
CPS		0 (0.0-10.0)	0 (0.0-75.0)	7.5(0.0-80.0)	<0.0001*
TPS		0 (0.0-10.0)	0 (0.0-75.0)	2.7(0.0-76.7)	<0.0001*
CPS	NA	8 (22.2)	6 (14.6)	9 (8.7)	<0.0001[±]

	< 1	27 (75.0)	23 (56.1)	27 (26.2)	
	1-20	1 (2.8)	8 (19.5)	38 (36.9)	
	≥20	0 (0)	4 (9.8)	29 (28.2)	
CPS	< 1	27 (75.0)	23 (56.1)	27 (26.2)	<0.0001 [±]
	≥ 1	1 (2.8)	12 (29.3)	67 (65.0)	
	NA	8 (22.2)	6 (14.6)	9 (8.7)	

Skraćenice: CPS – *Combined positive score*, TPS – *Tumor proportion score*

* *Kruskal-Wallis test*, *post-hoc učinjena je s Conover testom*, [±] *χ² test*

4.2 Humani papiloma virus u laringealnim lezijama

Izražaj p16 proteina se pokazao pozitivnim kod 3 bolesnika sa SKG-om (2.9%), kod 4 bolesnika s LD-om (4/41=9.8%), a kod bolesnika s benignim promjenama grkljana p16 izražaj je bio negativan u svim slučajevima. U slučaju pozitivnog izražaja p16 proteina učinjena je PCR analiza za dodatnu potvrdu HPV DNA te određivanje genotipa HPV virusa. U svim slučajevima dokazan je visokorizični genotip HPV 16. Zbog malog broja bolesnika s karcinomom grkljana kod kojih je dokazano prisustvo HPV genoma daljnje usporedbe, korelacije te analize preživljenja nisu rađene.

4.3 Laringealne displazije

4.3.1 Usporedba izražaja PD-L1, CD4, CD8, CD68 i CD163 u displazijama niskog i visokog stupnja

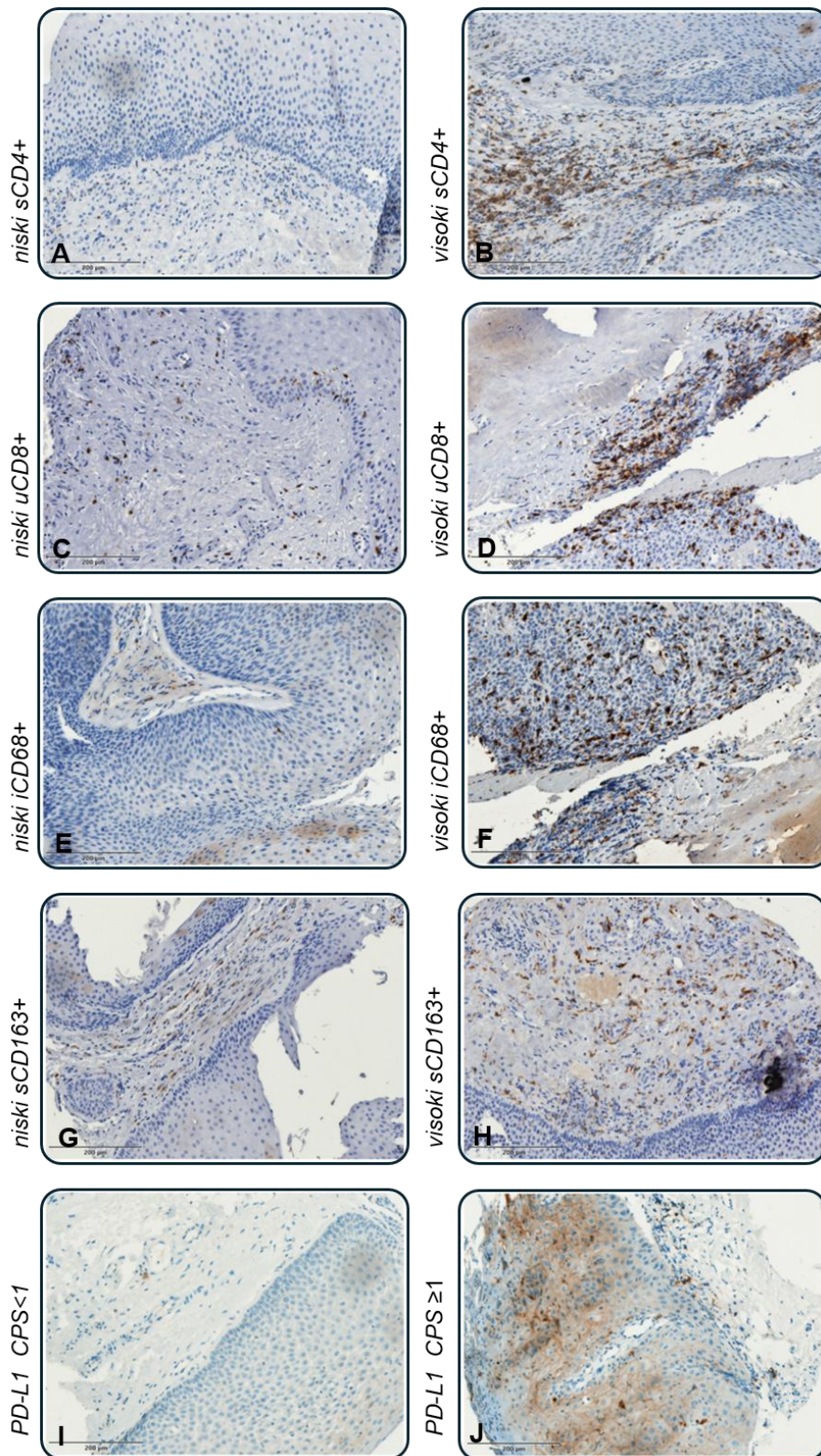
Uspoređujući displaziju niskog i visokog stupnja, nađen je statistički značajno viši izražaj u lezijama visokog stupnja za CD4 intraepitelni (p=0.025), stromalni (p=0.002) i ukupni (p=0.003), CD8 stromalni (p=0.019) i CD163 stromalni (p=0.015) odjeljak. Nadalje, veći izražaj također je nađen u displazijama visokog stupnja za CD8 ukupni (p=0.066), za CD68 stromalni i ukupni (p=0.079 i p=0.078) odjeljak te za CPS medijan (p=0.061), međutim p vrijednost je bila na razini statističkog trenda (tablica 8). Na slici 6 prikazani su primjeri imunohistokemijskog bojanja ispitivanih markera LD-a.

Tablica 8. Usporedba izražaja PD-L1 i tumorskog mikrookoliša između displazija niskog i visokog stupnja

Varijabla, medijan (raspon)		Displazija niskog stupnja	Displazija visokog stupnja	p vrijednost
N=41		N= 19	N=22	
CD4	intraepitelni	0.2 (0.0-3.0)	0.85 (0.0-11.0)	0.025[¶]
	stromalni	0.5 (0.0-5.5)	5.0 (0.0-35.0)	0.002[¶]
	ukupni	0.7 (0.0-5.15)	6.5 (0.0-40.0)	0.003[¶]
CD8	intraepitelni	1.88 (0.0-10.0)	3.0 (0.5-14.0)	0.224 [¶]
	stromalni	1.0 (0.0-8.0)	3.5 (0.25-17.0)	0.019[¶]
	ukupni	3.0 (0.0-15.0)	6.0 (1.5-21.25)	0.066 [¶]
CD68	intraepitelni	0.53 (0.0-4.0)	0.85 (0.0-11.25)	0.703 [¶]
	stromalni	2.63 (0.0-7.0)	4.5 (0.0-50.0)	0.079 [¶]
	ukupni	2.13 (0.0-10.0)	4.75 (0.3-100.0)	0.078 [¶]
CD163	intraepitelni	0.2 (0.0-0.7)	0.2 (0.0-3.0)	0.502 [¶]
	stromalni	4.0 (0.0-15.0)	7.5 (2.5-60.0)	0.015[¶]
	ukupni	3.0 (0.5-17.0)	5.5 (1.0-100.0)	0.199 [¶]
CPS		0.0 (0.0-7.0)	0.5 (0.0-75.0)	0.061 [¶]
TPS		0.0 (0.0-7.5)	0.3 (0.0-75.0)	0.108 [¶]
CPS	< 1	12 (63.2)	11 (50.0)	0.476 [§]
	≥ 1	4 (21.1)	8 (36.4)	
	NA	3 (15.8)	3 (13.6)	
CPS	NA	3 (15.8)	3 (13.6)	0.149 [±]
	< 1	12 (63.2)	11 (50.0)	
	1-20	4 (21.1)	4 (18.2)	
	≥20	0 (0)	4 (18.2)	

Skraćenice: CPS – *Combined positive score*, TPS – *Tumor proportion score*

[¶]Mann-Whitney test; [§] Fisher's exact test; [±]χ² test



Slika 6. Niski i visoki izražaj imunohistokemijskog bojenja CD4+ (A,B), CD8+ (C,D), CD68+ (E,F), CD163+ (G,H) i PD-L1-negativnih i -pozitivnih CPS/TPS (I, J) u displazijama grkljana. s-stromalni; u-ukupni; i-intraepitelni.

4.3.2 Korelacija izražaja PD-L1 s CD4, CD8, CD68 i CD163 u laringealnim displazijama

Razina izražaja PD-L1 procijenjena kao CPS i TPS pokazala je statistički značajnu pozitivnu korelaciju u usporedbi s intraepitelnim odjeljkom CD163 ($r_s=0.356$, $p=0.049$ za CPS i $r_s=0.439$, $p=0.013$ za TPS). Nadalje, dobivena je statistički značajna pozitivna korelacija između CPS-a i CD8 stromalnog odjeljka ($r_s=0.402$, $p=0.02$), dok su TPS i CD8 stromalni odjeljak pokazali pozitivnu korelaciju na razini statističkog trenda ($r_s=0.323$, $p=0.066$) (Tablica 9).

Tablica 9. Korelacija PD-L1 (CPS i TPS) s intraepitelnim i stromalnim CD4, CD8, CD68 i CD163 pozitivnim stanicama u laringealnim displazijama

			CD4	CD8	CD68	CD163
intraepitelni	CPS	r _s	0.107	0.100	0.156	0.356
		P	0.558	0.579	0.387	0.049
	TPS	r _s	0.047	0.158	0.159	0.439
		P	0.798	0.379	0.378	0.013
			CD4	CD8	CD68	CD163
stromalni	CPS	r _s	0.259	0.402	0.226	0.067
		P	0.153	0.020	0.207	0.719
	TPS	r _s	0.090	0.323	0.090	0.031
		P	0.623	0.066	0.617	0.869

Skraćenice: CPS – *Combined positive score*, TPS – *Tumor proportion score*

4.3.3 Usporedba izražaja PD-L1, CD4, CD8, CD68 i CD163 displazija koje su progredirale u karcinom s displazijama koje nisu progredirale

Uspoređujući displazije koje su progredirale u karcinom s onima koje nisu, nije dobivena statistički značajna razlika ni u jednom od ispitivanih markera (Tablica 8). Međutim, veći izražaj stromalnog CD163 nađen je u displazijama koje su progredirale u SKG ($p=0.07$). S druge strane, za intraepitelni CD68, veći izražaj je nađen kod displazija koje nisu progredirale u SKG ($p=0.078$). Rezultati su prikazani u tablici 10.

Također, izračunat je omjer izgleda (eng. *Odds ratio* - OR) za prediktore progresije laringealnih displazija. Utvrđeno je da su se vrijednosti CD4 ukupnog >6 ($p=0.034$, AUC=0.694), CD68 intraepitelnog $\leq 0,5$ ($p=0.043$, AUC=0.709), CD68 ukupnog ≤ 3 ($p=0.043$, AUC=0.709) i CD163 stromalnog $>7,5$ ($p=0.02$, AUC=0.729) pokazale kao dobar prediktor progresije displazija u SKG (Tablica 11).

Tablica 10. Usporedba izražaja ispitivanih markera u displazijama s i bez progresije u karcinom

Varijabla		Bez progresije	Progresija	p vrijednost
N=41		N=32	N=9	
Dob (godine); medijan (raspon)		56.1(24.7-79.7)	61.9 (46.2-78.8)	0.244 [†]
Spol	ženski	8 (25.0)	0 (0)	0.164 [§]
	muški	24 (75.0)	9 (100)	
Stupanj	niski	17 (53.1)	2 (22.2)	0.140 [§]
	visoki	15 (46.9)	7 (77.8)	
CPS	NA	6 (18.8)	0 (0)	0.679 [±]
	< 1	18 (56.2)	5 (55.6)	
	1-20	5 (15.6)	3 (33.3)	
	≥ 20	3 (9.4)	1 (11.1)	
CPS	< 1	18 (56.2)	5 (55.6)	0.685 [§]
	≥ 1	8 (25.0)	4 (44.4)	
	NA	6 (18.8)	0 (0)	
Varijabla, medijan (raspon)				
CPS		0.0 (0.0-75.0)	0.5 (0.0-25.0)	0.329 [†]
TPS		0.0 (0.0-75.0)	0.3 (0.0-25.0)	0.456 [†]
CD4	intraepitelni	0.25 (0.0-11.0)	0.5 (0.0-11.0)	0.223 [†]
	stromalni	1.38 (0.0-35.0)	5.0 (0.0-10.00)	0.504 [†]

	ukupni	2.3 (0.0-17.5)	7.0 (0.0-40.0)	0.293 [¶]
	intraepitelni	2.0 (0.0-11.0)	3.0 (0.5-14.0)	0.754 [¶]
CD8	stromalni	2.0 (0.0-17.0)	4.0 (0.5-10.0)	0.469 [¶]
	ukupni	5.0 (0.0-21.25)	5.0 (2.0-20.0)	0.611 [¶]
	intraepitelni	1.0 (0.0-11.25)	0.3 (0.0-1.0)	0.078 [¶]
CD68	stromalni	4.0 (0.0-12.0)	4.0 (0.1-50.0)	0.583 [¶]
	ukupni	4.5 (0.0-17.0)	2.25 (0.1-100.0)	0.204 [¶]
	intraepitelni	0.2 (0.0-3.0)	0.1 (0.0-2.0)	0.733 [¶]
CD163	stromalni	5 (0.0-25.0)	9.5 (1.0-60.0)	0.070 [¶]
	ukupni	5 (0.5-17.0)	6.25 (0.5-100.0)	0.571 [¶]

Skraćenice: CPS – *Combined positive score*, TPS – *Tumor proportion score*

¶Mann-Whitney test; § Fisher's exact test; ± χ^2 test

Tablica 11. Prediktori za progresiju displazija u karcinom

	Prediktori	OR	95% CI	p value	AUC
	intratepitelni > 0.2	8.00	0,86- 74,21	0.067	0.694
CD4	stromalni >4.3	3.75	0,75-18,7	0.103	0.653
	ukupni >6	6.25	1,14-34,12	0.034	0.694
	intraepitelni >2.5	1.88	0,4-8,74	0.423	0.578
CD8	stromalni >0.3	NP	NP	0.981	0.620
	ukupni >7.5	2.06	0,43-9,97	0.370	0.582
	intraepitelni ≤0.5	0.161	0,03-0,95	0.043	0.709
CD68	stromalni >0	NP	NP	0.998	0.600
	ukupni ≤3	0.161	0,03-0,95	0.043	0.709
	intraepitelni ≤0.4	0.429	0,04-4,23	0.468	0.563
CD163	stromalni >7.5	8.33	1,39-49,88	0.020	0.729
	ukupni >4.5	2.54	0,42-15,21	0.308	0.604
	CPS (<1, ≥1)	1.80	0,38-8,54	0.459	0.568
	CPS >0 (medijan)	2.73	0,56-13,37	0.216	0.622
	TPS >0 (medijan)	2.36	0,5-11,05	0.275	0.605

Skraćenice: CPS – *Combined positive score*, TPS – *Tumor proportion score*, OR – omjer izgleda (eng. Odds ratio), AUC – područje ispod krivulje (eng. Area under the curve), NP – nije primjenjivo

* Omjer izgleda je izračunat na temelju graničnih vrijednosti i posljedičnom razvrstavanju u više i niže skupine.

4.4. Skvamozni karcinom grkljana (SKG)

4.4.1. Ispitivana skupina

Uključeno je 102 bolesnika sa SKG od kojih je 95 bilo muškog i 8 ženskog spola dok je medijan dobi iznosio 63 godine (raspon 43.9-83.6 godina). Većina karcinoma je bilo dobro ili srednje diferencirano (G1-21.4% i G2-54.4%), a udio slabo diferenciranih (G3) karcinoma je iznosio 18.4%. Nadalje, grupa karcinoma se sastojala od 26 (25.5%) T1, 17 (16.7%) T2, 40 (39.2%) T3 i 19 (18.6%) T4 tumora, dok su pozitivni čvorovi na vratu pronađeni u 15 (14.7%) bolesnika. Četrdeset četiri (43.1%) bolesnika je klasificirano u rani (stadij I i II), a 58 (56.8%) bolesnika u uznapredovali stadij bolesti (stadij III i IV). Postoperativna radioterapija primijenjena je u 54 (52.9%) bolesnika.

4.4.2. Izražaj PD-L1, CD4, CD8, CD68 i CD163 u SKG-u i usporedba između ranog i uznapredovalog stadija karcinoma

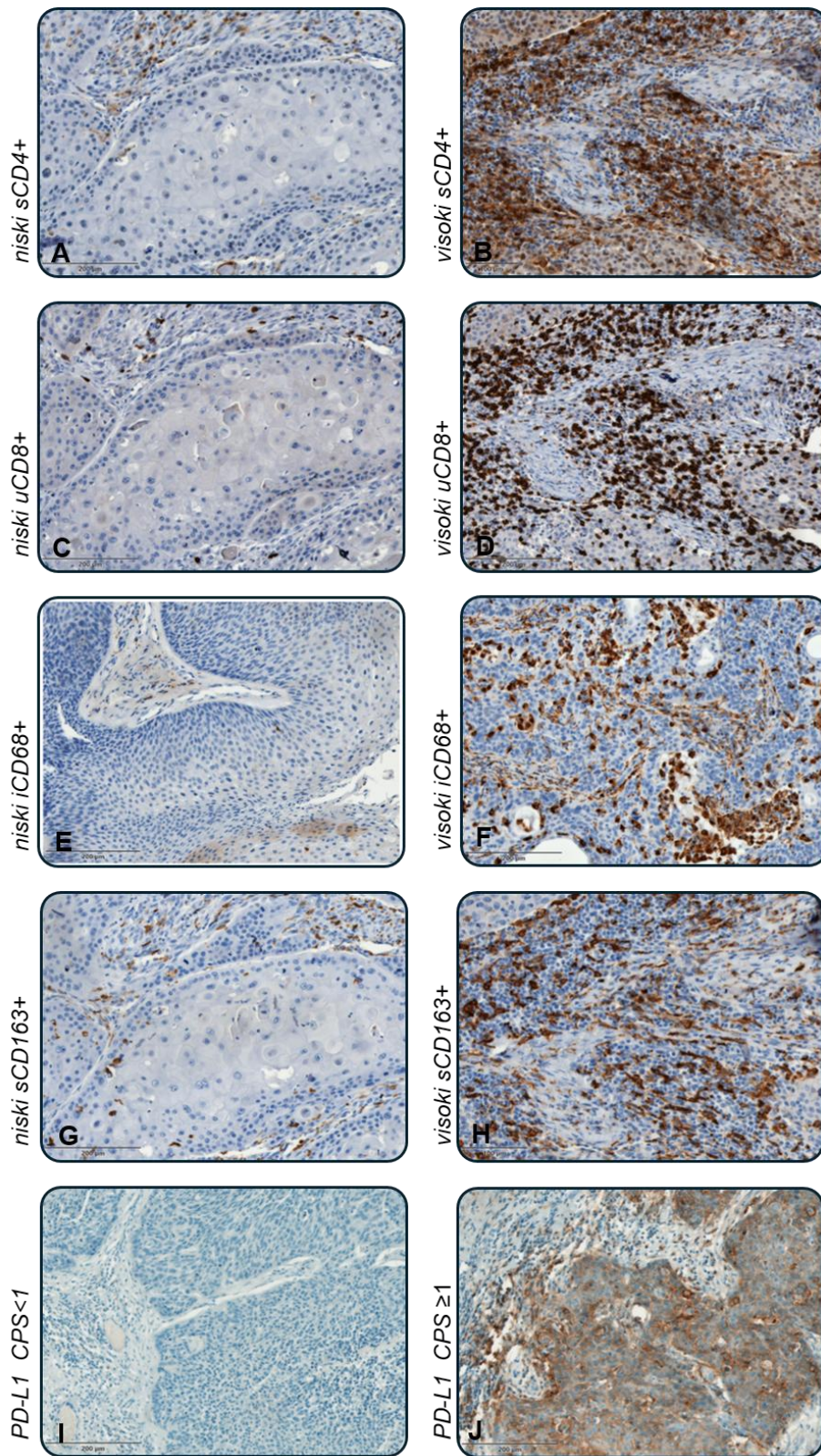
U cijeloj ispitivanoj skupini SKG-a, većina tumora bila je pozitivna na PD-L1 (64.7%) kada se gleda CPS rezultat, dok PD-L1 TPS je bio pozitivan u 36.3% slučajeva. Pri usporedbi izražaja CPS-a i TPS-a između ranog i uznapredovalog stadija SKG-a nismo pronašli statistički značajnu razliku ($p=0.363$ i $p=0.714$). Međutim, gledajući izražaj CD8 stromalni i CD68 ukupni pronađen je statistički značajno veći izražaj pozitivnih stanica u uznapredovalom stadiju SKG-a ($p=0.031$ i $p=0.027$) (Tablica 12). Također, kada se promatra CD68 stromalni i CD163 intraepitelni izražaj, pronašli smo veći izražaj pozitivnih stanica u uznapredovalom stadiju, ali je bila na razini statističkog trenda ($p=0.059$ i $p=0.084$). To bi vjerojatno doseglo statističku značajnost u slučaju veće skupine ispitanika. Na slici 7 prikazani su primjeri imunohistokemijskog bojenja ispitivanih markera SKG-a.

Tablica 12. Usporedba izražaja PD-L1, CD4, CD8, CD68 i CD163 između ranog i uznapredovalog stadija karcinoma

Varijabla, medijan (raspon)		Rani stadij	Uznapredovali stadij	p vrijednost
N=102		N= 44	N=58	
CD4	Intraepitelni	1.5 (0.0-20.0)	1.0 (0.0-6.7)	0.619 [¶]
	stromalni	8.0 (0.0-25.7)	10.0 (0.0-40.3)	0.263 [¶]
	ukupni	10.0 (0.0-50.0)	10.5 (0.0-53.3)	0.639 [¶]
CD8	Intraepitelni	2.5 (0.0-18.3)	3.0 (0.0-30.0)	0.846 [¶]
	stromalni	5.3 (0.0-25.3)	10.0 (0.0-37.3)	0.031[¶]
	ukupni	8.0 (0.2-40.0)	13.5 (0.5-60.0)	0.109 [¶]
CD68	Intraepitelni	2.0 (0.0-9.3)	2.5 (0.0-10.0)	0.280 [¶]
	stromalni	7.0 (1.5-30.0)	8.5 (0.1-27.5)	0.059 [¶]
	ukupni	8.0 (1.0-45.0)	12 (0.3-50.0)	0.027[¶]
CD163	Intraepitelni	1.25 (0.0-9.0)	2.0 (0.0-12.0)	0.084 [¶]
	stromalni	15.0 (0.0-50.0)	13.7 (0.0-35.0)	0.348 [¶]
	ukupni	13.5 (0.0-50.0)	15.8 (0.0-50.0)	0.165 [¶]
TPS		3.9 (0.0-76.7)	2.7 (0.0-72.5)	0.714 [¶]
CPS	< 1	13 (29.5)	14 (25.5)	0.363 [§]
	≥ 1	25 (56.9)	41 (74.5)	
	NA	6 (13.6)	3 (5.2)	

Skraćenice: CPS – *Combined positive score*, TPS – *Tumor proportion score*

[¶]Mann-Whitney test; [§] Fisher's exact test



Slika 7. Niski i visoki izražaj imunohistokemijskog bojenja CD4+ (A,B), CD8+ (C,D), CD68+ (E,F), CD163+ (G,H) i PD-L1-negativnih i -pozitivnih CPS/TPS (I, J) u karcinomu grkljana. s-stromalni; u-ukupni; i-intraepitelni.

4.4.3. Korelacija izražaja PD-L1 s CD4, CD8, CD68 i CD163 u skvamoznom karcinomu grkljana

Izražaj PD-L1 procijenjen kao CPS i TPS pokazao je pozitivnu korelaciju u usporedbi s CD8 i CD68 u oba odjeljka, intraepitelnom ($r_s=0.202$, $p=0.056$; $r_s=0.342$, $p=0.001$ za CPS i $r_s=0.198$, $p=0.003$; $r_s=0.311$, $p=0.003$ za TPS, slijedom) i stromalnom ($r_s=0.251$, $p=0.017$; $r_s=0.259$, $p=0.014$ za CPS i $r_s=0.210$, $p=0.047$; $r_s=0.208$, $p=0.049$ za TPS, slijedom). Nadalje, postoji statistički značajna pozitivna korelacija između CPS-a i CD163 u intraepitelnom i stromalnom odjeljku ($r_s=0.273$, $p=0.008$ za intraepitelni i $r_s=0.280$, $p=0.007$ za stromalni), kao i TPS i CD163 stromalni odjeljak ($r_s=0.257$, $p=0.013$). S druge strane, statistički značajna pozitivna korelacija između PD-L1 i CD4 pronađena je samo između CPS i CD4 stromalnog izražaja ($r_s=0.269$, $p=0.011$) (Tablica 13).

Tablica 13. Korelacija CPS-a i TPS-a s intraepitelnim i stromalnim CD4, CD8, CD68 i CD163 pozitivnim stanicama u skvamoznom karcinomu grkljana

			CD4	CD8	CD68	CD163
Intraepitelni	CPS	r_s	0.194	0.202	0.342	0.273
		P	0.069	0.056	0.001	0.008
	TPS	r_s	0.124	0.198	0.311	0.182
		P	0.249	0.003	0.003	0.081
Stromalni	CPS	r_s	0.269	0.251	0.259	0.280
		P	0.011	0.017	0.014	0.007
	TPS	r_s	0.182	0.210	0.208	0.257
		P	0.088	0.047	0.049	0.013

Skraćenice: CPS – *Combined positive score*, TPS – *Tumor proportion score*

4.4.4. Povezanost izražaja PD-L1 te stanica tumorskog mikrookoliša s kliničko patološkim karakteristikama u skvamoznom karcinomu grkljana

Uspoređujući kliničke i histopatološke značajke SKG-a s izražajem PD-L1 u ovoj studiji, nismo pronašli statistički značajnu korelaciju (Tablica 14). No uspoređujući stanice mikrookoliša s kliničko-histopatološkim karakteristikama nađena je kod bolesnika sa prisutnim regionalnim metastazama statistički značajno veća vrijednost CD68 pozitivnih stanica u intraepitelnom odjeljku ($p=0.027$). Nadalje, bolesnici s povišenim vrijednostima CD4 i CD8 pozitivnih stanica ukupno, imali su statistički značajno češće prisutnu invaziju limfnih i krvnih žila ($p=0.017$ i $p=0.038$). Korelacija sa ostalim kliničkim i histopatološkim karakteristikama prikazana je u tablicama 15 i 16.

Tablica 14. Korelacija izražaja PD-L1 u tumorskim i upalnim stanicama (CPS) s kliničko patološkim parametrima u skvamoznom karcinomu grkljana

N=93	CPS		p vrijednost
	<1 (N=27)	≥ 1 (N=66)	
Pušenje			
ne	7 (25.9)	16 (24.2)	p=1.00 ^s
da	20 (74.1)	50 (75.8)	
Alkohol			
ne	15 (55.6)	32 (48.5)	p=0.649 ^s
da	12 (44.4)	34 (51.5)	
Histološki gradus			
G1	4 (14.8)	13 (20.9)	χ ² =0.888 DF=2 p=0.641
G2	17 (63.0)	36 (53.7)	
G3	4 (14.8)	13 (20.9)	
nepoznato	2 (7.4)	4 (4.5)	
T klasifikacija			
T1	6 (22.2)	15 (22.4)	χ ² =2.766 DF=4 p=0.598
T2	7 (25.9)	9 (13.4)	
T3	10 (37.0)	27 (41.8)	
T4	4 (14.8)	15 (22.4)	
N klasifikacija			
N0	25 (92.6)	55 (83.3)	p=0.335 ^s
N1 i N2	2 (7.4)	11 (16.7)	

Klinički stadij			
1	6 (22.2)	15 (22.4)	$\chi^2=2.245$ DF=4 p=0.691
2	7 (25.9)	10 (14.9)	
3	9 (33.3)	23 (35.8)	
4	5 (18.5)	18 (26.9)	
Invazija limfnih žila			
ne	13 (48.1)	28 (43.3)	p=0.806 [§]
da	10 (37.0)	27 (40.3)	
nepoznato	4 (14.8)	11 (16.4)	
Invazija krvnih žila			
ne	13 (48.1)	29 (44.8)	p=0.807 [§]
da	10 (37.0)	26 (38.8)	
nepoznato	4 (14.8)	11 (16.4)	
Perineuralna invazija			
ne	19 (70.4)	48(73.1)	p=0.474 [§]
da	4 (14.8)	6 (9.0)	
nepoznato	4 (14.8)	12 (17.9)	
Recidiv			
ne	21 (77.8)	48 (72.7)	p=0.795 [§]
da	6 (22.2)	18 (27.3)	
Mjeseci do recidiva, medijan (raspon)	22.6 (5.97-30.53)	13.1 (2.27-36.07)	p=0.274 [¶]
Umrli od karcinoma			
ne	21 (77.8)	52 (78.8)	p=1.00 [§]
da	6 (22.2)	14 (21.2)	
Praćenje u mjesecima, medijan (raspon)	72.3 (0.1-129.0)	47.2 (5.8-179.5)	p=0.324 [¶]

Skraćenice: CPS – *Combined positive score*

[¶]Mann-Whitney test; [§]Fisher's exact test, ⁺ χ^2 test

Tablica 15. Korelacija stanica tumorskog mikrookoliša s pušenjem, histološkim gradusom, statusom regionalnih limfnih čvorova i limfovaskularnom invazijom u skvamoznom karcinomu grkljana

Varijabla	Pušenje			Histološki gradus				N status			Invazija limfnih i krvnih žila		
	Ne (N= 25)	Da (N=77)	p	G1 (N=21)	G2 (N=56)	G3 (N=19)	P	N- (N=87)	N+ (N=15)	p	Ne (N= 42)	Da (N=36)	p
CD4 intraepitelni	1.65 (0-6.7)	1 (0-20)	0.795	1 (0-6.7)	1.4 (0-20)	0.9 (0-6.2)	0.984	1 (0-20)	1.65 (0-6.7)	0.624	0.9 (0-20)	1.5 (0-6.7)	0.056
CD4 stromalni	9.5 (0-29)	9.5 (0-40.3)	0.332	9.25 (0-29)	10 (0-40.3)	9.5 (4-29.3)	0.744	9 (0-40.3)	10.9 (4-29.3)	0.276	8 (0-40.3)	10.4 (0-38.3)	0.069
CD4 ukupni	9.4 (0-40)	10 (0-53.3)	0.301	8.75 (0-38)	10 (0-53.3)	12 (2.7-35)	0.659	10 (0-53.3)	13.5 (2.7-38)	0.349	6.55 (0-53.3)	12.9 (0-50)	0.017
CD8 intraepitelni	3 (0.2-17)	2.75 (0-30)	0.883	3.5 (0.8-12.7)	2.5 (0-30)	3.55 (0-10.3)	0.869	2.5 (0-30)	3.8 (0-17)	0.801	2.5 (0.1-15)	3 (0-30)	0.327
CD8 stromalni	9 (0-30)	7.05 (0-37)	0.759	6.5 (0-30)	8.3 (0-37.3)	9.5 (0-29)	0.583	7 (0-37.3)	10 (1.3-29)	0.353	6 (0-37.3)	9 (0-30)	0.061
CD8 ukupni	13.5 (1.3-30)	10.1 (0.2-60)	0.975	8.5 (1.3-34)	15 (0.2-60)	10 (1-28.7)	0.554	12 (0.2-60)	11.35 (2.5-45)	0.695	7.5 (0.2-58.3)	15 (2.5-60)	0.038
CD68 intraepitelni	2 (0-7.7)	2.5 (0-10)	0.792	1.8 (0-9.3)	2.5 (0-9.0)	2.75 (0-10)	0.676	2 (0-9.3)	4.3 (0-10)	0.027	2 (0-9.3)	2.6 (0-10)	0.475
CD68 stromalni	7 (1.5-27.5)	8 (0.1-30)	0.376	6.25 (0.1-20)	8.15 (0.8-30)	7.55 (1.0-15)	0.369	7.3 (0.1-30)	8.3 (2.5-16)	0.609	8 (0.1-27.5)	9 (0-30)	0.429
CD68 ukupni	8 (2-50)	10 (0.3-45)	0.271	7.9 (0.3-37.5)	9.55 (1.0-50)	9.9(4.5-17.3)	0.442	9.1 (0.3-50)	9.5 (5.8-26.3)	0.358	9.3 (0.3-50)	9.85 (1.5-45)	0.661
CD163 intraepitelni	2 (0-33.3)	1.5 (0-12)	0.426	0.8 (0-6.3)	2 (0-9)	1.0 (0-12)	0.227	1.5 (0-10)	2.5 (0-12)	0.674	1.5 (0-7)	1.7 (0-12)	0.668
CD163 stromalni	15 (0-40)	12.5 (0-50)	0.442	10 (0-27.3)	15 (0-50)	12.5 (1.5-33.3)	0.396	15 (0-50)	11.7 (2-33.3)	0.657	12.5 (0-35)	15 (0-35)	0.539
CD163 ukupni	14.5 (0-40)	15 (0-50)	0.835	13.5 (0-39.3)	17 (0-50)	15 (3.3-35)	0.151	15 (0-50)	14.5 (5-39.3)	0.972	14 (0-47.5)	15.8 (0-50)	0.181

Skraćenice: N status – status vratnih limfnih čvorova

Tablica 16. Korelacija stanica tumorskog mikrookoliša s kliničkim stadijem skvamoznog karcinoma grkljana

Varijabla		Klinički stadij				p vrijednost
N=96		Stadij I	Stadij II	Stadij III	Stadij IV	
CD4 intraepitelni	<	5	6	10	7	0.917
	>	15	11	21	16	
CD4 stromalni	<	8	7	9	6	0.642
	>	12	10	22	17	
CD4 ukupni	<	11	11	18	11	0.751
	>	9	6	13	12	
CD8 intraepitelni	<	9	7	13	11	0.887
	>	12	11	19	11	
CD8 stromalni	<	15	14	21	10	0.149
	>	6	4	11	12	
CD8 ukupni	<	17	15	26	13	0.188
	>	4	3	6	9	
CD68 intraepitelni	<	14	10	19	10	0.535
	>	8	7	13	13	
CD68 stromalni	<	6	7	9	2	0.124
	>	16	10	23	21	
CD68 ukupni	<	8	6	7	2	0.113
	>	14	11	25	21	
CD163 intraepitelni	<	16	13	18	11	0.171
	>	6	5	15	13	
CD163 stromalni	<	16	12	21	15	0.883
	>	6	6	12	9	
CD163 ukupni	<	19	15	25	15	0.235
	>	3	3	8	9	

4.4.5. Analiza preživljenja

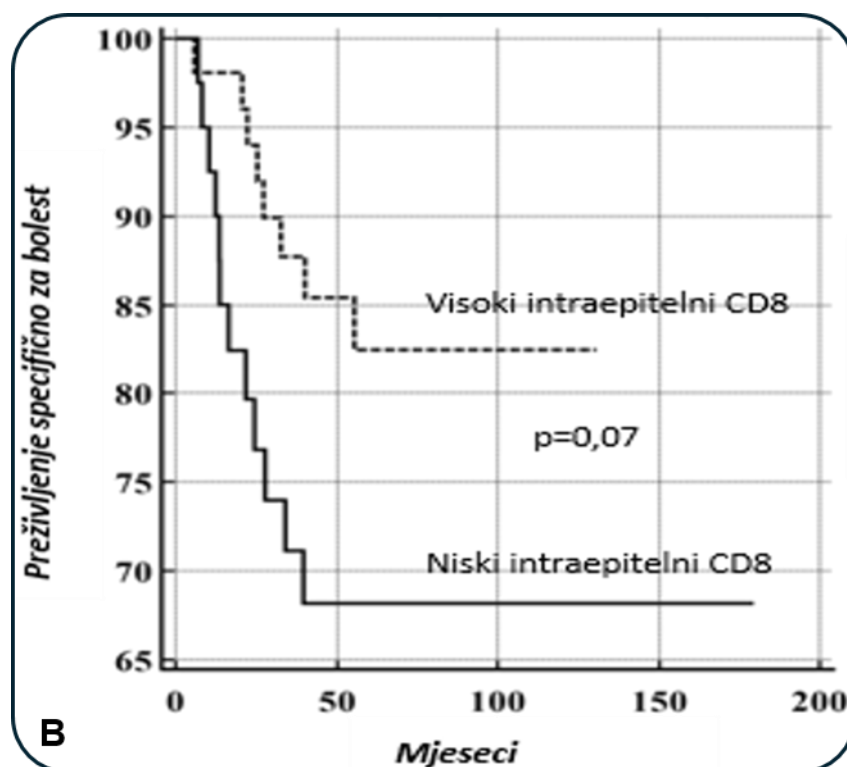
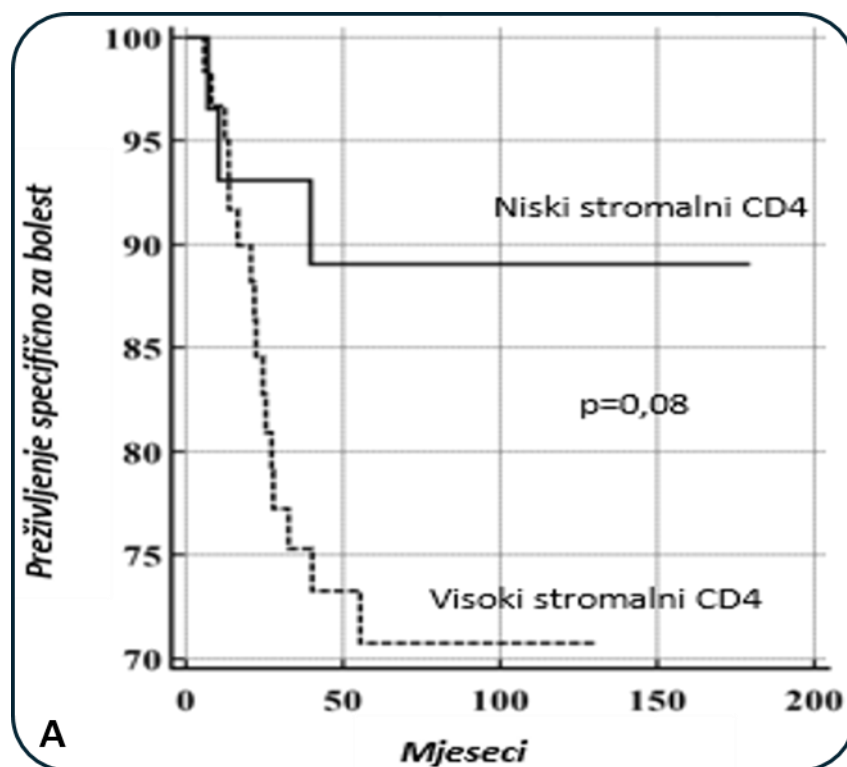
Log rank analiza DSS-a pomoću Kaplan-Meierove metode nije pokazala statistički značajan rezultat za intraepitelni, stromalni ili ukupni izražaj CD4 u cijeloj studijskoj skupini SKG-a. Međutim, bolesnici s nižim izražajem stromalnog CD4 imali su dulji DSS ($p=0.08$), a grafikoni preživljenja pokazali su odstupanje krivulje što sugerira da bi rezultat mogao biti značajan u slučaju veće ispitivane skupine (Slika 8). Slični rezultati dobiveni su s intraepitelnim izražajem CD8 u cijeloj skupini ($p=0.07$) kao i skupini uznapredovalih karcinoma ($p=0.08$), ali veći izražaj bio je povezan s duljim DSS-om u ovom slučaju (Tablica 17 i slika 8). Gledajući cijelu skupinu karcinoma grkljana, bolesnici s visokim izražajem CD68 ($p=0.0005$) i CD163, intraepitelno ($p=0.006$) imali su statistički značajno kraći DSS. Slični rezultati dobiveni su za CD68 ukupno, ali su rezultati bili na razini statističkog trenda ($p=0.054$). Također, bolesnici s višim ukupnim CD163 izražajem imali su kraći DSS ($p=0.04$). Nadalje, kraći DSS nađen je u bolesnika s visokim intraepitelnim izražajem CD68, u bolesnika s uznapredovalim karcinomom ($p=0.021$) (Tablica 17 i slika 9). U analizi preživljenja za izražaj PD-L1 (procijenjen kao CPS i TPS) upotrijebili smo tri različite granične vrijednosti (CPS i TPS ≥ 1 ili < 1 , medijan i ROC analiza), ali nijedna od njih nije pokazala statistički značaj za DSS ili DFS u cijeloj skupini karcinoma ili uznapredovalog stadija SKG-a.

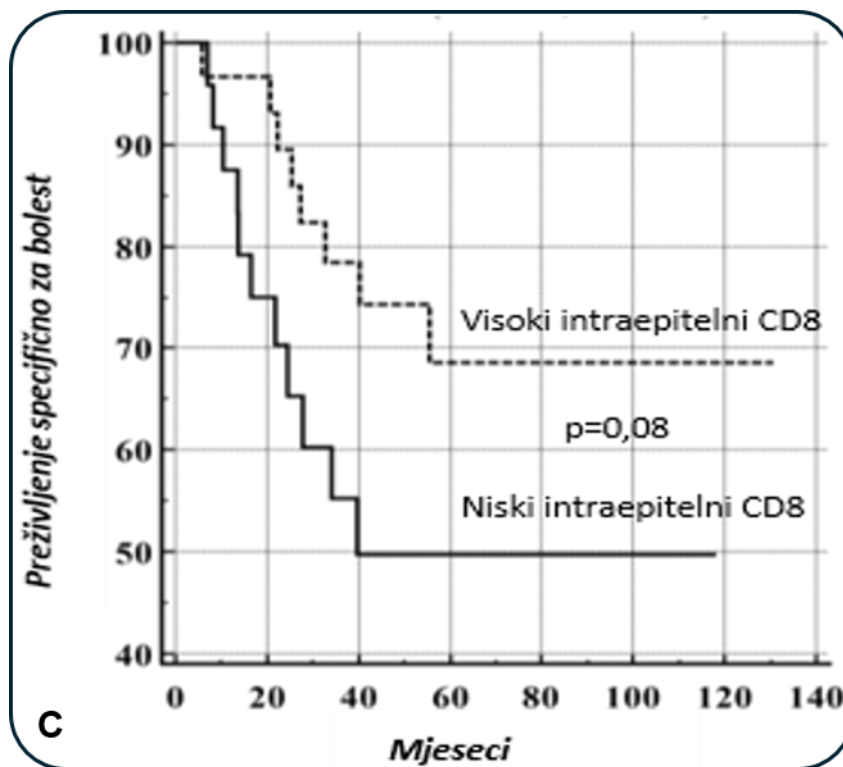
Kaplan-Meierovi dijagrami pokazuju statistički kraće vrijeme do pojave recidiva za bolesnike s visokim izražajem CD8 ukupno ($p=0.049$) i CD68 intraepitelno ($p=0.011$). Štoviše, gledajući samo skupinu uznapredovalih karcinoma, bolesnici s visokim intraepitelnim CD68 imali su kraće vrijeme do pojave recidiva ($p=0.019$). Podaci su prikazani na slici 10. Nakon multivarijantne analize pokazalo se da je samo visoki izražaj CD68 intraepitelno neovisan prediktor za DSS ($p=0.0395$) (Tablica 18).

Također, stratificirali smo bolesnike u četiri skupine prema PD-L1 izražaju (koristeći i CPS < 1 =negativan, CPS ≥ 1 =pozitivan, i TPS < 1 =negativan, TPS ≥ 1 =pozitivan) i CD8 intraepitelnom izražaju (CD8 $\leq 2\%$ =nizak i CD8 $> 2\%$ =visok): PD-L1 pozitivan/CD8 visok, PD-L1 negativan/CD8 nizak, PD-L1 pozitivan/CD8 nizak i PD-L1 negativan/CD8 visok. Skupina CPS negativan/CD8 nizak imala je kraći DSS u usporedbi s ostalim skupinama zajedno (petogodišnji DSS od 63.6% naspram 77.3%). Štoviše, skupina TPS negativan/CD8 nizak imala je još kraće preživljenje (petogodišnji DSS od 60% naspram 77.9%), međutim nije postignuta statistička značajnost ($p=0.3188$ za CPS i $p=0.1497$ za TPS). Podaci su prikazani na slici 11.

Nadalje, izračunat je omjer izgleda (eng. *Odds ratio* - OR) za predikciju recidiva u skupini bolesnika s karcinomom grkljana. Statistička značajnost dobivena je samo za visoki izražaj CD8 ukupno (CD8 $> 23\%$) i CD68 intraepitelno (CD68 $> 2,7\%$). Bolesnici koji su imali visoki izražaj ukupnog CD8 imali su 3.11 puta veći rizik od pojave recidiva nego bolesnici s

niskom CD8 izražajem ($p=0.028$, $OR=3.11$). Slično, bolesnici koji su imali visoki CD68 intraepitelni izražaj imali su 3.13 puta veći rizik od pojave recidiva od bolesnika s niskim intraepitelnim izražajem CD68 ($p=0.019$, $OR=3.13$) (Tablica 19).





Slika 8. Preživljenje specifično za bolešt;

A – CD4 stromalni u svih bolesnika s karcinomom,

B – CD8 intraepitelni u svih bolesnika s karcinomom,

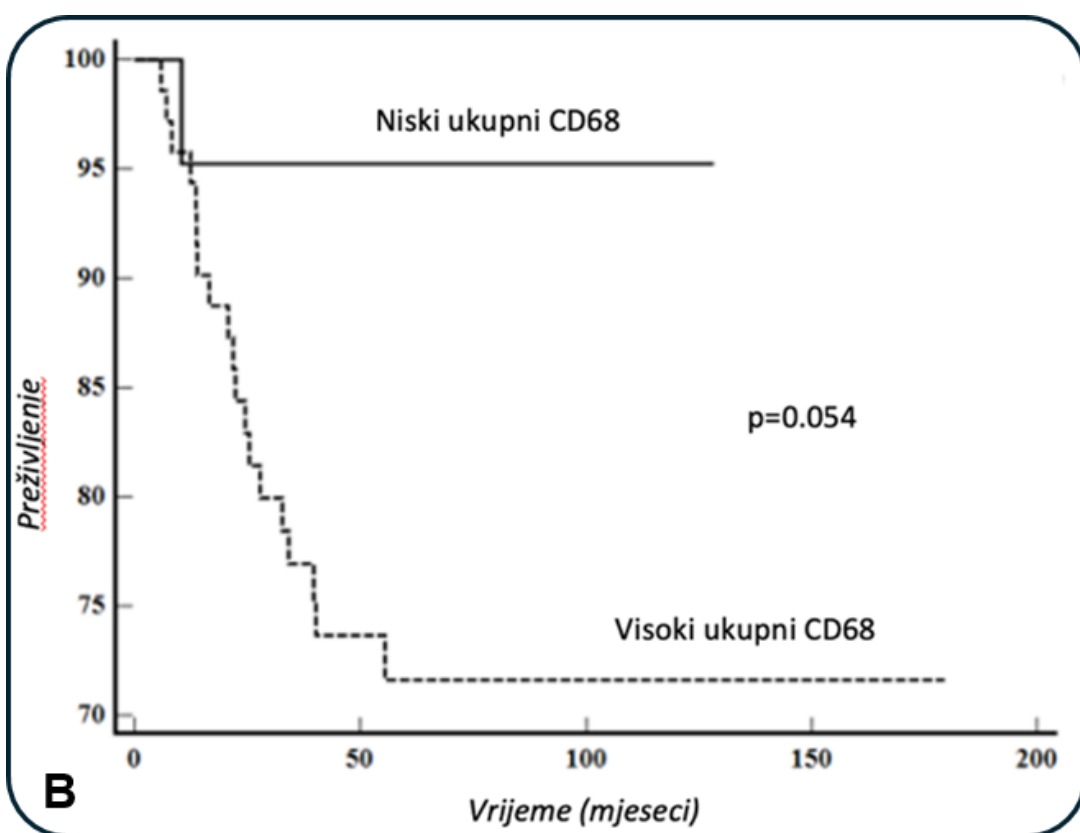
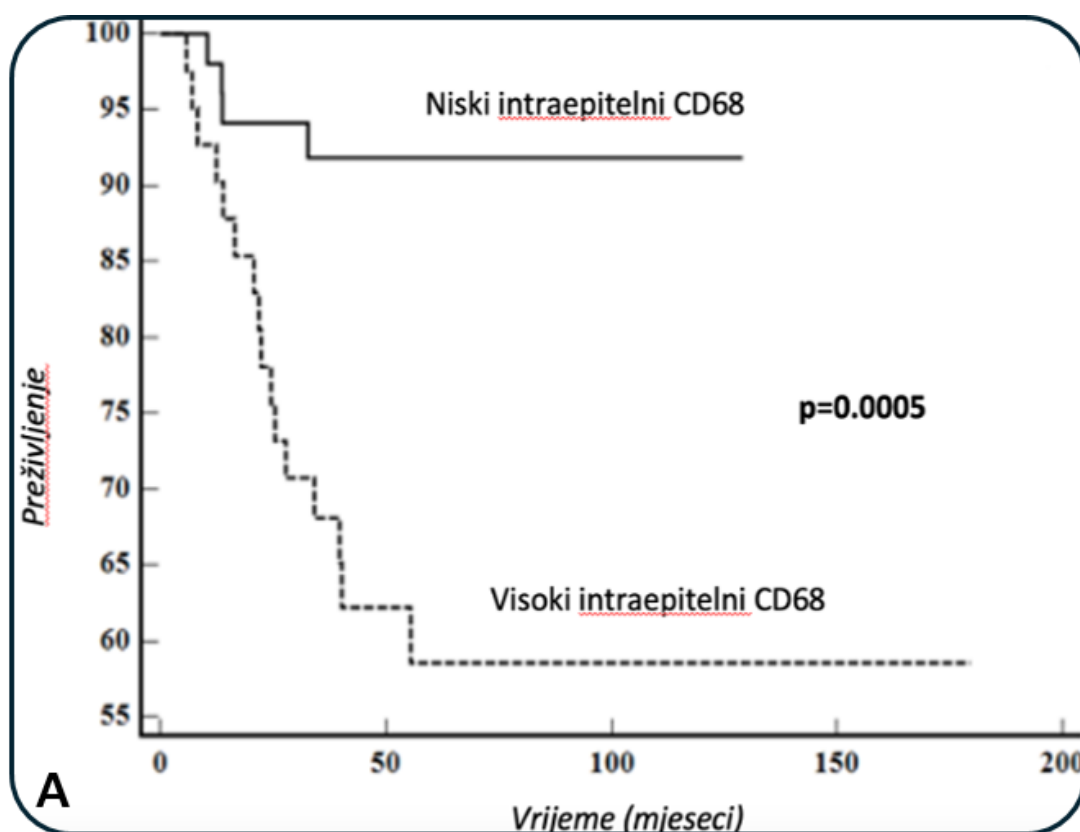
C – CD8 intraepitelni u bolesnika s uznapredovalim karcinomom

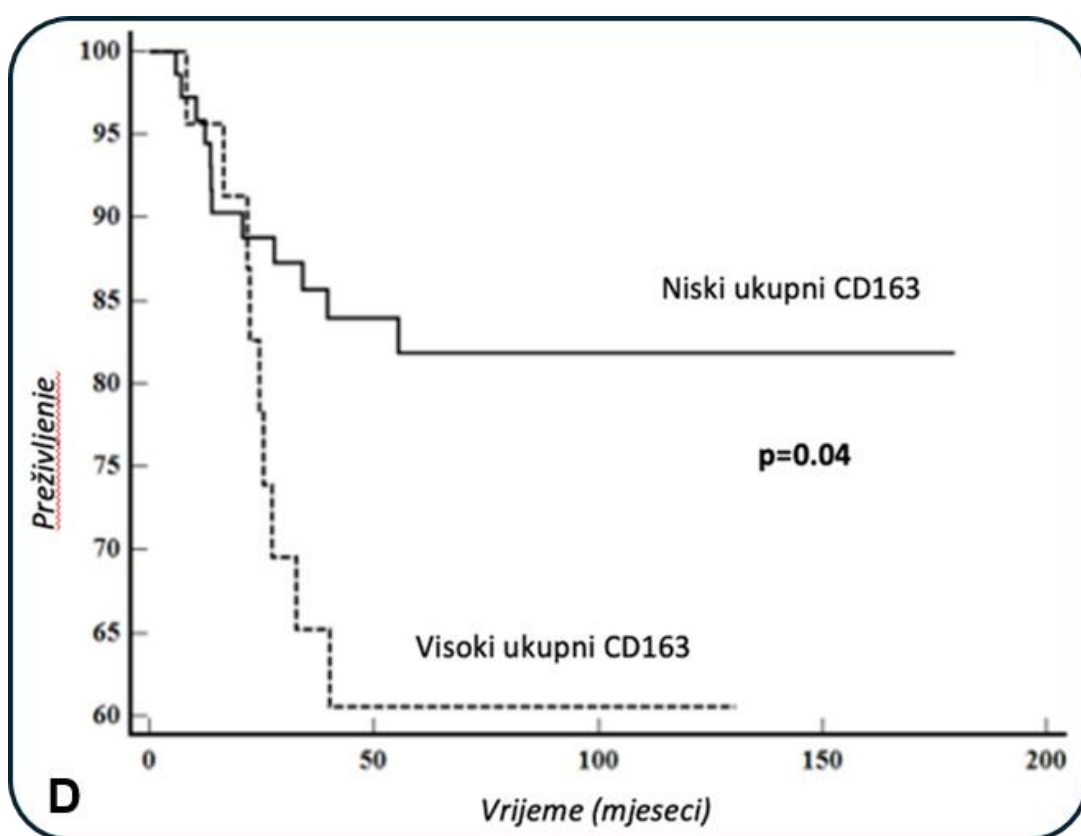
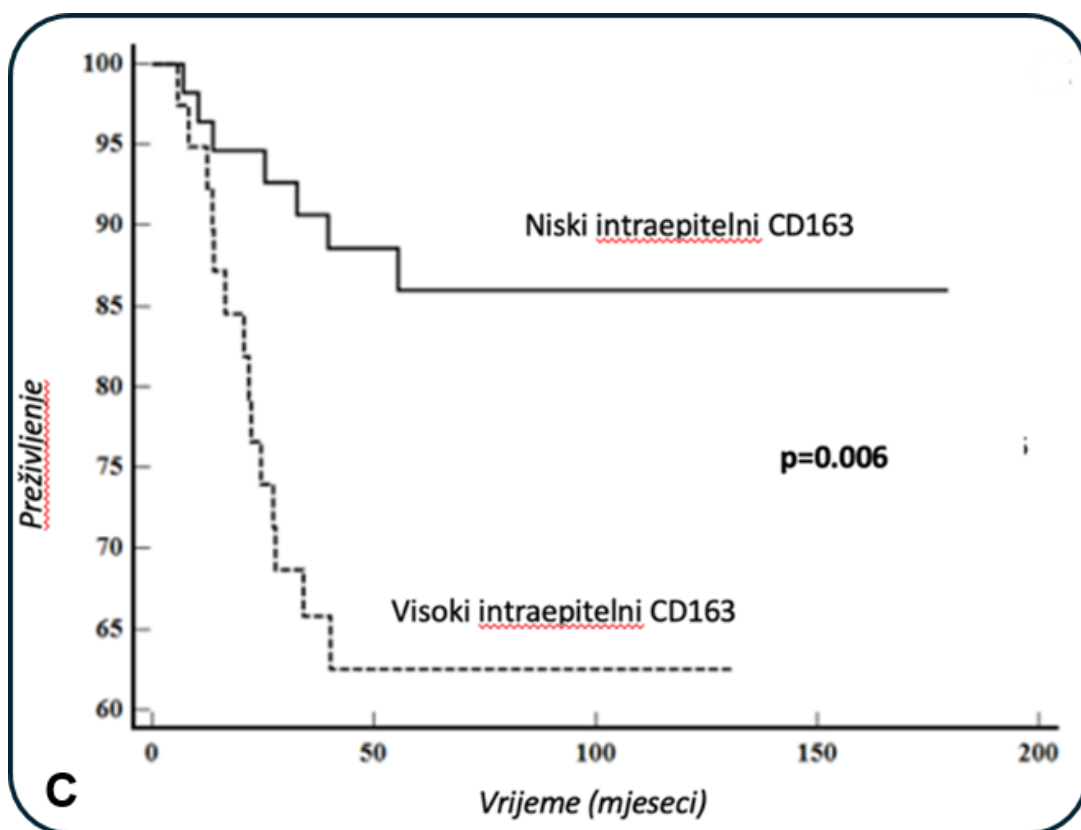
Tablica 17. Univarijatna analiza preživljavanja za cijelu i uznapredovalu skupinu karcinoma grkljana

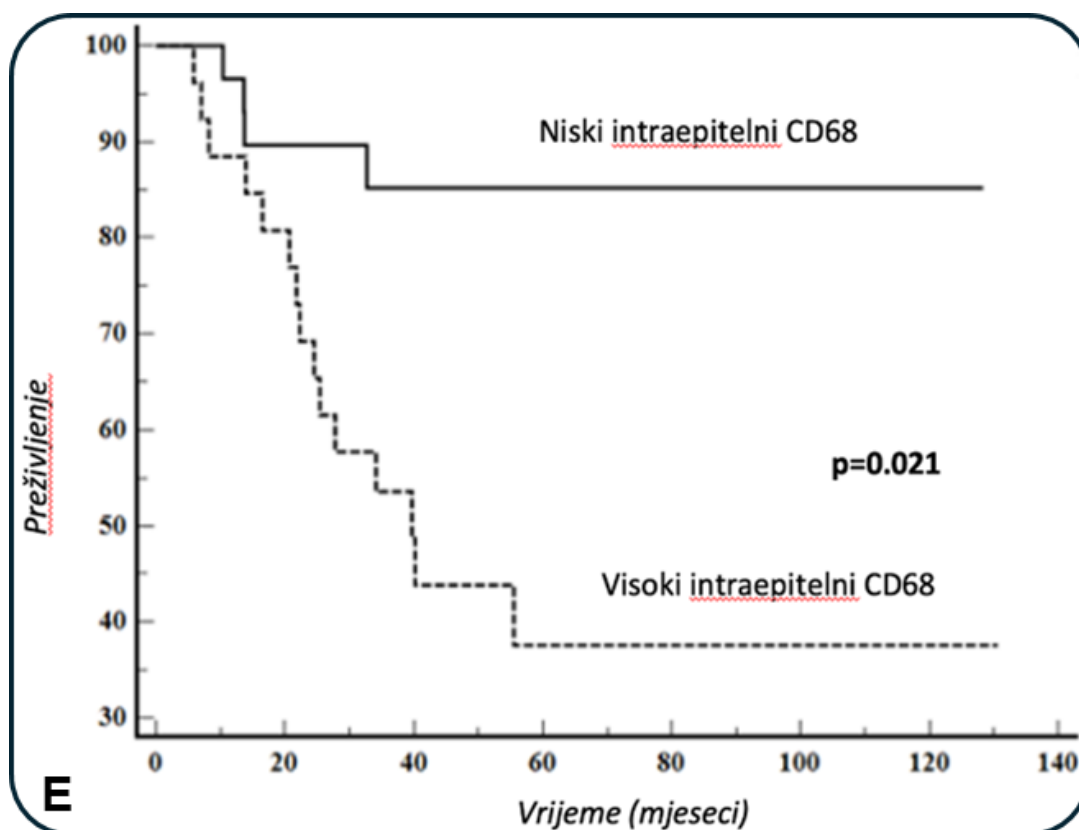
	Varijabla (granična vrijednost; %)	N	Umrli od tumora	Smrtnost (%)	AS±SD	95% CI	χ²	Log-Rank Test (P)
Cijela skupina karcinoma	CD4 intraepitelni (>0.4) Niski Visoki	28 63	3 16	10.71 25.40	160.7±10.16 99.5±6.33	140.82-180.65 87.1-111.92	2.55	0.11
	CD4 stromalni (>6.5) Niski Visoki	30 61	3 16	10 26,3	162.06±9.52 99.52±6.6	143.39-180.73 86.57-112.46	3.04	0.08
	CD4 ukupni (>11.5) Niski Visoki	51 40	8 11	15.69 27.5	151.37±9.07 99.29±7.99	133.58-169.15 83.62-114.97	1.46	0.23
Uznappedovala skupina karcinoma	CD4 intraepitelni (>0.4) Niski Visoki	17 37	3 15	17.65 40.54	108.5±11.3 82.11±9.12	86,33-130,66 64.24-99.99	2.62	0.10
	CD4 stromalni (>6.5) Niski Visoki	15 39	3 15	20 38.46	96.72±11 84.91±9.06	75.16-118.28 67.16-102.66	1.35	0.25
	CD4 ukupni (>11.5) Niski Visoki	29 25	8 10	27.59 40	93.66±10.37 84.27±11.12	73.34-113.98 62.48-106.06	0.6	0.44
Cijela skupina karcinoma	CD8 intraepitelni (≤2) Niski Visoki	40 53	12 8	30 15.1	128.67±12.2 113.04±5.68	104.75-152.59 101.9-124.17	3.28	0.07
	CD8 stromalni (>12) Niski Visoki	60 33	11 9	18.33 27.27	147.53±8.67 98.73±8.32	130.54-164.51 82.43-115.03	0.59	0.44
	CD8 ukupni (>23) Niski Visoki	71 22	13 7	18.31 31.82	147.27±8.02 95.52±10.27	131.55-163 75.4-115.64	1.07	0.3
Uznappedovala skupina karcinoma	CD8 intraepitelni (≤2) Niski Visoki	24 30	11 8	45.83 26.67	69.17±10.63 99.3±9.33	48,33-90.01 81.01-117.59	3.04	0.08
	CD8 stromalni (>12) Niski Visoki	31 23	10 9	32.26 39.13	91.54±10.09 84.26±11.08	71.76-111.32 62.54-105.98	0.08	0.77
	CD8 ukupni (>23) Niski Visoki	39 15	12 7	30.77 46.67	92.4±9.03 80.22±13.33	74.71-110-1 54.1-106.34	0.48	0.49
Cijela skupina karcinoma	CD68 intraepitelni (>2.7) Niski Visoki	53 41	4 16	7.55 39.02	119.94±4.35 115.39±12.48	111.42-128.46 90.93-139.84	11.9 7	0.0005
	CD68 stromalni (>4.5) Niski Visoki	24 70	2 18	8.33 25.71	118.17±6.85 135.92±8.79	104.74-131.59 118.69-153.15	2.67	0.1

	CD68 ukupni (>5.5) Niski Visoki	23 71	1 19	4.35 26.76	122.69±5.48 135.37±8.64	111.95-133.43 118.44-152.3	3.7	0.054
Uznappedovala skupina karcinoma	CD68 intraepitelni (>2.7) Niski Visoki	29 26	4 15	13.79 57.69	112.04±7.54 65.3±10.8	97.27-126.82 44.12-86.47	9.44	0.021
	CD68 stromalni (>4.5) Niski Visoki	11 44	2 17	18.18 38.64	107.01±13.5 9 84.61±8.58	80.37-133.65 67.79-101.42	1.34	0.25
	CD68 ukupni (>5.5) Niski Visoki	9 46	1 18	11.11 39.13	115.2±12.35 85.18±8.25	90.99-139.41 69.01-101.35	1.57	0.21
Cijela skupina karcinoma	CD163 intraepitelni (>2) Niski Visoki	58 39	7 14	12.07 35.9	158.33±7.46 89.6±8.75	143.71-172.96 72.46-106.74	7.6	0.006
	CD163 stromalni (>18.3) Niski Visoki	64 33	11 10	17.99 30.3	148.88±8.37 98.57±8.49	132.48-165.27 81.93-115.21	1.16	0.28
	CD163 ukupni (>27.3) Niski Visoki	74 23	12 9	16.22 39.13	151.12±7.46 88.73±10.93	136.5-165.75 67.32-110.15	4.2	0.04
Uznappedovala skupina karcinoma	CD163 intraepitelni (>2) Niski Visoki	29 28	7 13	24.14 46.43	83.84±8.07 78.9±10.52	68.03-99.65 58.29-99.51	2.21	0.14
	CD163 stromalni (>18.3) Niski Visoki	36 21	10 10	27.78 47.62	94.02±9.15 80.07±11.61	76.08-111.96 57.3-102.83	0.99	0.32
	CD163 ukupni (>27.3) Niski Visoki	40 17	11 9	27.5 52.94	78.28±8.5 73.67±13.05	78.28-111.58 48.08-99.26	2.13	0.14

Skraćenice: AS – aritmetička sredina, SD – standardna devijacija







Slika 9. Preživljenje specifično za bolest;

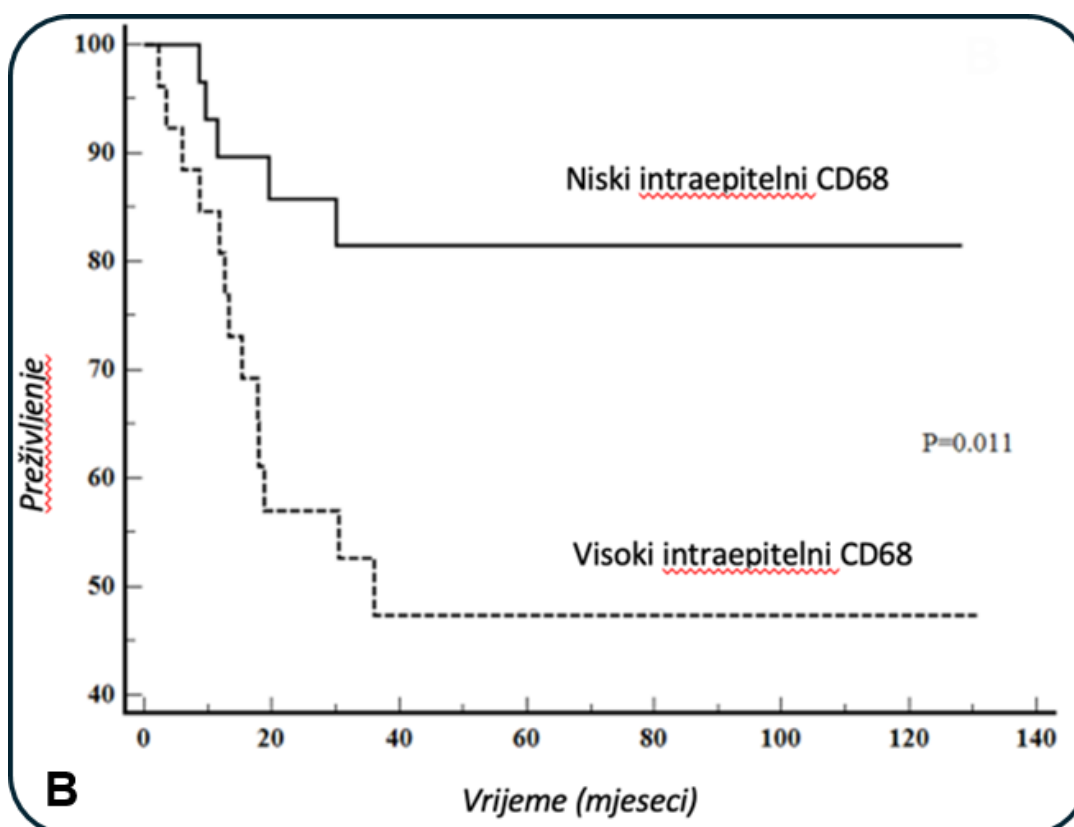
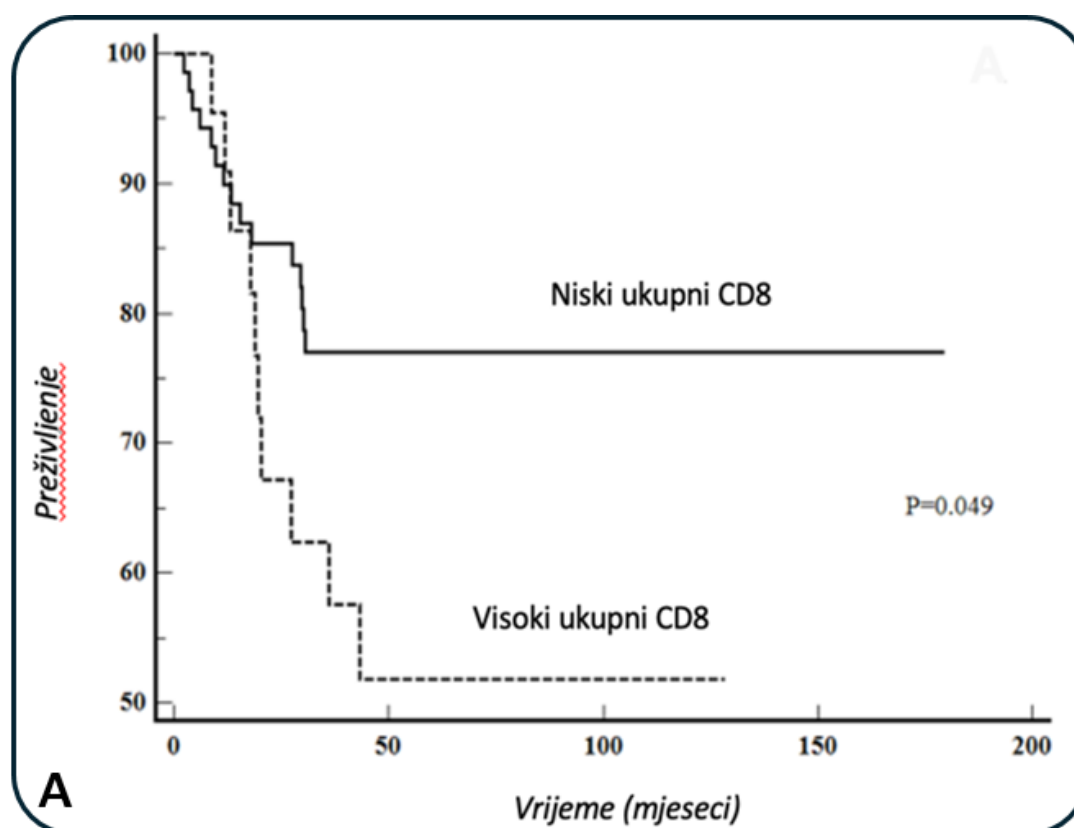
A – CD68 intraepitelni u svih bolesnika s karcinomom,

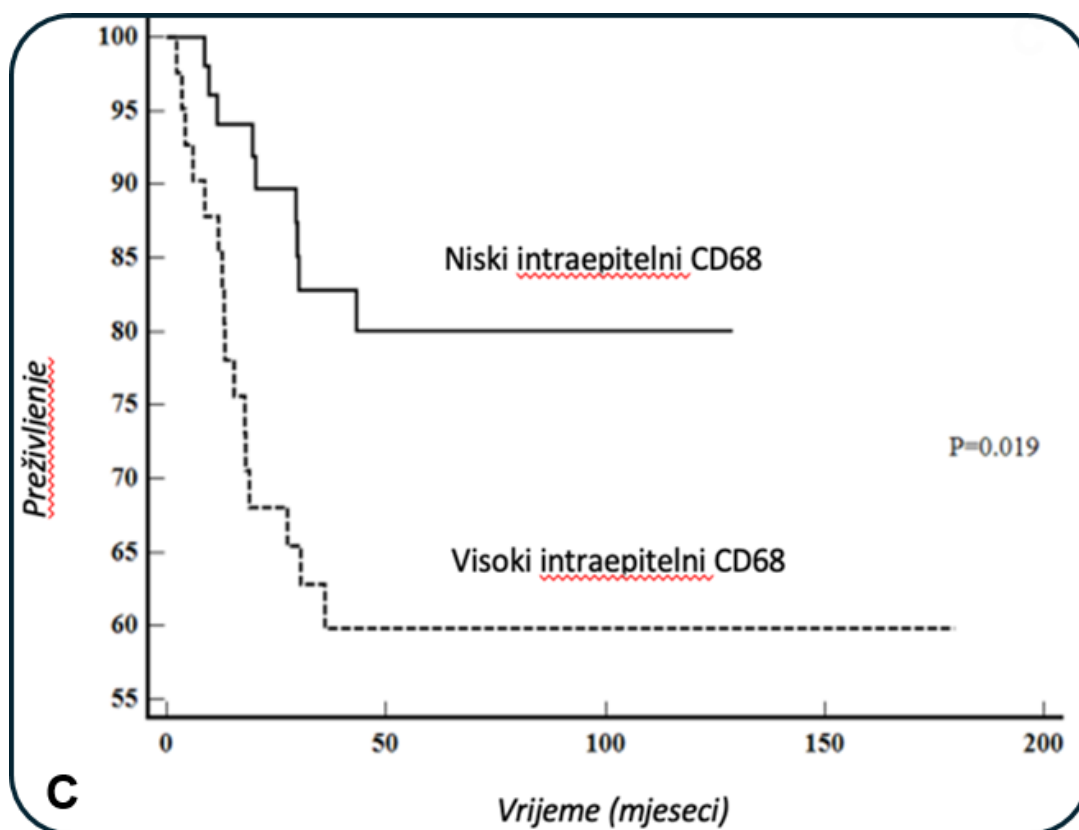
B – CD68 ukupni u svih bolesnika s karcinomom,

C – CD163 intraepitelni u svih bolesnika s karcinomom,

D – CD163 ukupni u svih bolesnika s karcinomom,

E – CD68 intraepitelni u bolesnika s uznapredovalim karcinomom





Slika 10. Preživljenje bez bolesti;

A – CD8 ukupni u svih bolesnika s karcinomom,

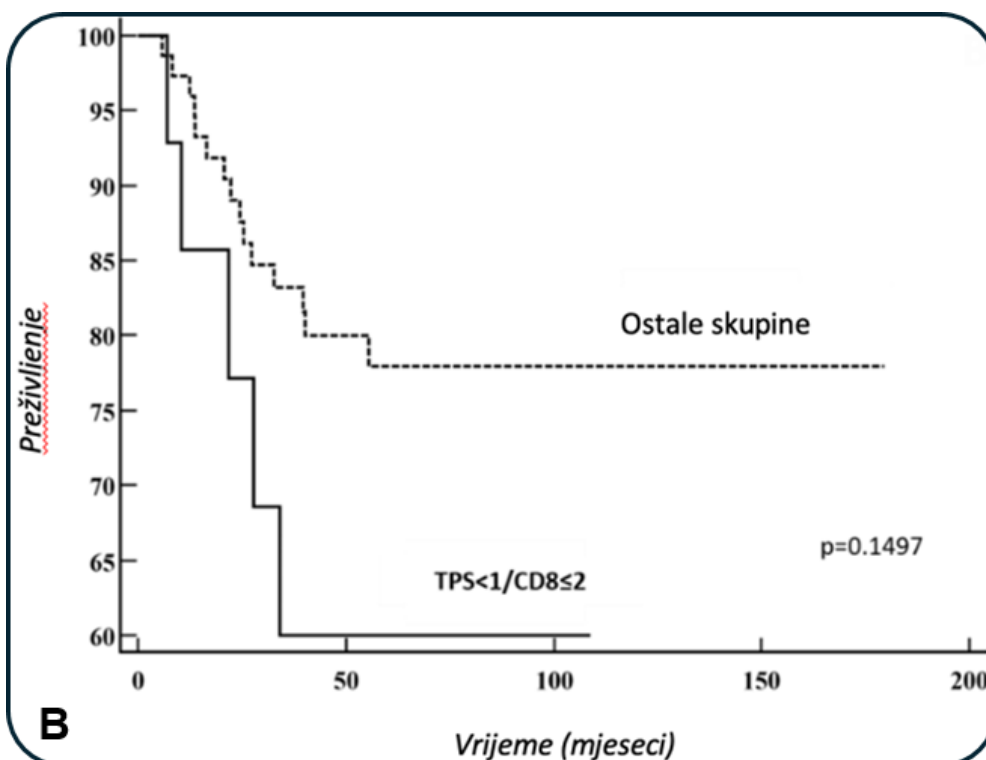
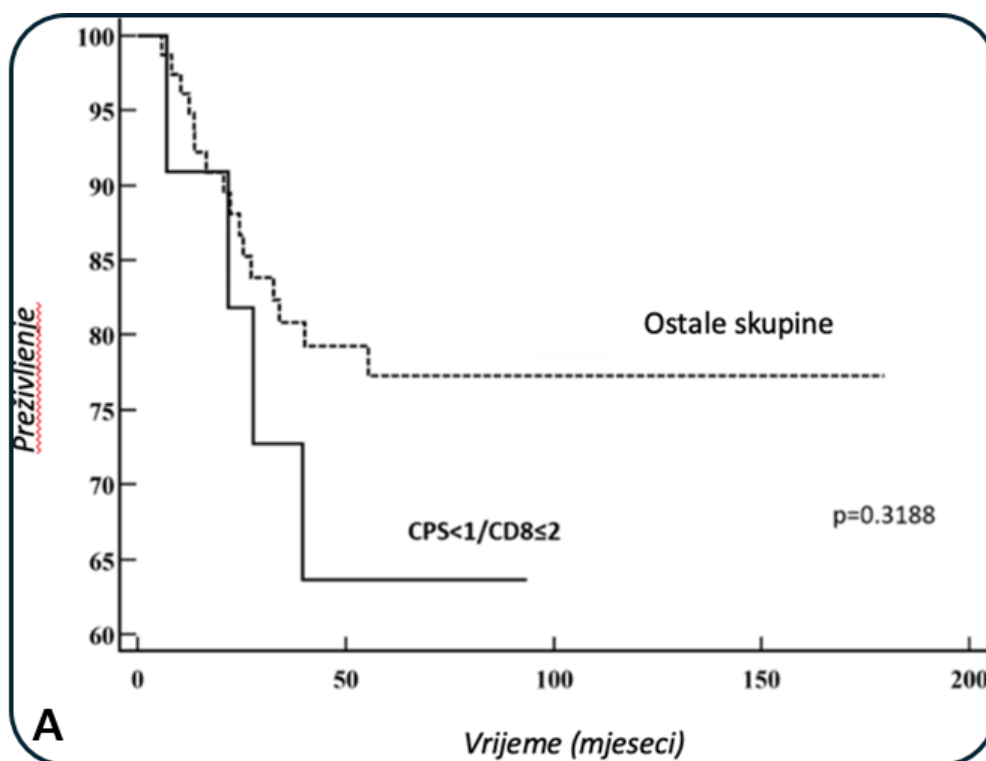
B – CD68 intraepitelni u svih bolesnika s karcinomom,

C – CD68 intraepitelni u bolesnika s uznapredovalim karcinomom grkljana

Tablica 18. Multivarijatna analiza za cijelu skupinu karcinoma grkljana

Preživljenje specifično za bolest			
Varijabla (granična vrijednost; %)	HR	95% CI	p vrijednost
CD68 intraepitelni (>2.7)	3.66	1.06 – 12.57	0.0395
CD68 ukupni (>5.5)	2.36	0.28 – 20.03	0.4319
CD163 intraepitelni (>2)	1.47	0.51 – 4.21	0.4727
CD163 ukupni (>27.3)	1.20	0.46 – 3.15	0.7087
Preživljenje bez bolesti			
CD8 ukupni (>23)	1.68	0.73 – 3.91	0.2249
CD68 intraepitelni (>2.7)	2.20	0.95 – 5.10	0.0665

Skraćenice: HR – omjer rizika (eng. *Hazard ratio*)



Slika 11. Preživljenje specifično za bolest;

A – PD-L1⁻CD8 nizak u odnosu na druge skupine (PD-L1⁺CD8 visok, PD-L1⁺CD8 nizak i PD-L1⁻CD8 visok) koristeći CPS za izražaj PD-L1,

B – PD-L1⁻CD8 nizak u odnosu na druge skupine (PD-L1⁺CD8 visok, PD-L1⁺CD8 nizak i PD-L1⁻CD8 visok) koristeći TPS za izražaj PD-L1

Tablica 19. Prediktori za recidiv karcinoma grkljana

Prediktori; granična vrijednost (%)		OR*	95% CI	p vrijednost	AUC
CD4	intraepitelni > 0.4	2.59	0.79-8.49	0.116	0.590
	stromalni >6.5	1.16	0.42-3.24	0.765	0.517
	ukupni >11.5	1.56	0.60-4.03	0.360	0.555
CD8	intraepitelni ≤2	0.76	0.30-1.91	0.556	0.534
	stromalni >12	2.07	0.81-5.28	0.129	0.586
	ukupni >23	3.11	1.13-8.58	0.028	0.612
CD68	intraepitelni >2.7	3.13	1.21-8.11	0.019	0.639
	stromalni >4.5	2.14	0.65-7.04	0.209	0.565
	ukupni >5.5	2.99	0.80-11.14	0.102	0.585
CD163	intraepitelni >2	1.73	0.69-4.29	0.236	0.567
	stromalni >18.3	1.63	0.65-4.13	0.299	0.557
	ukupni >27.3	2.16	0.79-5.84	0.131	0.574
CPS (<1, ≥1)		1.31	0.46-3.78	0.614	0.527
CPS ≤7.5 (medijan)		1.68	0.41-2.83	0.467	0.541
TPS ≤2.7 (medijan)		1.03	0.41-2.61	0.951	0.504

Skraćenice: OR – omjer izgleda (eng. Odds ratio), AUC – područje ispod krivulje (eng. Area under the curve)

* Omjer izgleda je izračunat na temelju graničnih vrijednosti i posljedičnom razvrstavanju u više i niže skupine.

5. RASPRAVA

Još u pedesetim godinama prošlog stoljeća uočena je uloga imunološkog sustava u sprečavanju nastanka tumora [137]. U fiziološkim uvjetima, imunološki odgovor domaćina na tumorske antigene može biti dovoljno snažan u uništenju tumorskih stanica prije nego se razviju detektabilni tumori. Iako imunološki sustav na ovaj način uništava mnogobrojne tumore u ljudskom organizmu, drugi nastavljaju rasti, postaju invazivniji te konačno metastaziraju na udaljena sijela. Sam proces putem kojeg tumorske stanice izbjegavaju imunološki odgovor domaćina je kompleksan te uključuje mnogobrojne mehanizme i različite signalne putove, od kojih nisu svi dovoljno istraženi [138]. U zadnjim desetljećima, velika važnost se pridodaje putu programirane stanične smrti (PD-1/PDL-1) i stanicama mikrookoliša [71].

PD-L1, također poznat kao B7-H1, je transmembranski glikoprotein tipa I koji igra ključnu ulogu u imunitetu tumora te je njegov izražaj prisutan u imunološkim, epitelnim i tumorskim stanicama [139]. Visoka razina izražaja PD-L1 u tumorskim stanicama omogućuje im da izbjegnu imunološki odgovor domaćina i pogoduje progresiji tumora [140]. S druge strane, izražaj PD-L1 reguliran je izlučivanjem IFN- γ iz T limfocita [140]. U tom slučaju, tumori koji imaju visoku infiltraciju limfocita T imat će naknadno bolji imunološki odgovor, što rezultira većim izražajem PD-L1 u tumorskim stanicama i boljim ishodom bolesti uz primjenu imunoterapije. Posljedično, PD-L1 se može promatrati biomarkerom stalnog imunološkog pritiska, ali i kao inhibitorom imunološkog odgovora [123]. PD-L1 izražaj slabo je istražen u skvamoznim lezijama grkljana, a posebno u displazijama gdje bi mogao pridonijeti u detekciji onih promjena koje progrediraju u skvamozni karcinom, što bi bilo od iznimne kliničke važnosti.

5.1 Displazije

Glavna svrha otkrivanja prekanceroznih lezija leži u sprečavanju njihove daljnje maligne transformacije. Izuzev toga, ove lezije značajno pridonose kliničkoj problematici, počevši od dijagnostike preko liječenja do praćenja. Dijagnostika zahtjeva biopsiju, a biopsija ostavlja ožiljne promjene na grkljanu koje su najizraženije u glotičnoj regiji radi promjene boje glasa i posljedične promuklosti. Jednako je zahtjevan i izbor modaliteta liječenja. Najveći broj bolesnika liječi se kirurškim metodama, a danas i u većini europskih ustanova transoralna laserska mikrokirurgija se smatra standardom [120]. Nasuprot tome, u nekim centrima se koristi radioterapija i to najčešće u slučajevima rekurentnih displazija [141]. Drugi modaliteti poput fotodinamske terapije ili retinoične kiseline rijetko su zastupljeni [141]. Širok spektar opcija i nedostatak jasnog konsenzusa ili smjernica u liječenju, rezultirali su time da je tretiranje laringealnih displazija vrlo zahtjevno i često kontroverzno [120]. Jednako je zahtjevno i

praćenje, a posebice radi nepredvidivog kliničkog tijeka. Za sada je histološka klasifikacija najznačajniji prognostički čimbenik za predviđanje biološkog ponašanja bolesti i usmjeravanje kliničara u procesu tretiranja displazija [65]. No, postavlja se pitanje je li to dovoljno u doba precizne medicine?

Ovisno o težini, displazije ne moraju napredovati do karcinoma ili to čine u do 48% slučajeva [68]. Obzirom na tako širok raspon i drastičnu različitost u biološkom ponašanju, liječenje je za sve displazije jednako i zahtjeva jednako agresivan pristup. Posljedično, ulažu se značajni istraživački napor u utvrđivanju mogućih pokazatelja progresije. Velik je interes posvećen imunološkim stanicama koje čine mikrookruženje i njihovom odnosu s PD-L1 proteinom. Znanstvena istraživanja PD-1/PD-L1 signalnog puta su rezultirala stvaranjem antitijela na PD-1 i PD-L1 koja su u kliničkoj upotrebi i koriste se za liječenje karcinoma [142]. Nasuprot tome, uloga ovog puta u displazijama je općenito nedovoljno istražena, a posebno nedostaju radovi vezani uz displazije grkljana. Stoga su primarni ciljevi ove studije bili procijeniti razinu izražaja PD-L1 u različitim stadijima karcinogeneze, u rasponu od benignih lezija preko laringealnih displazija niskog i visokog stupnja i konačno do skvamoznih karcinoma grkljana. Uočili smo statističku značajnu razliku između ispitivanih skupina ($p < 0.0001$) što je u skladu s rezultatima recentnije meta-analize koju su proveli Girolami i suradnici. Prema njihovom istraživanju sastavljenom od studija s lezijama svih sijela glave i vrata, izražaj PD-L1 je veći u displazijama u usporedbi s normalnom sluznicom ($p = 0.3$), a manji nego u invazivnom skvamoznom karcinomu ($p = 0.1$), ali nije pronađena statistički značajna razlika između skupina [83]. Na temelju iste studije, prevalencija PD-L1 u displaziji iznosila je 45.04%, što je u skladu s našim rezultatom od 34.3% ($n = 12/35$) u slučajevima CPS-a ≥ 1 . Za razliku od navedenog revijalnog prikaza, naša studija je uspoređivala izražaj CPS-a kod displazije visokog stupnja u odnosu na displaziju niskog stupnja ($8/22 = 36.4\%$ naspram $4/19 = 21.1\%$), ali nismo utvrdili statistički značajnu razliku, osim usporedbom medijana gdje je razlika na razini statističkog trenda ($p = 0.061$). Moguće je da bi se pri analizi većeg broja slučajeva uočile statistički značajne razlike. Nadalje, obzirom da je samo 3.6% bolesnika u kontrolnoj skupini ($n = 1/28$) imalo CPS ≥ 1 , ova studija je time potvrdila značajno manji izražaj PD-L1 u zdravoj sluznici grkljana u usporedbi s prekanceroznim lezijama, što je u skladu sa dosadašnjim spoznajama [143-145]. Nažalost, pokušaj razlikovanja laringealnih displazija koje će progredirati u karcinom u odnosu na one koje neće, na temelju izražaja PD-L1 kao CPS i TPS, nije rezultirao statističkom značajnošću. Unatoč tome, klinički značaj izražaja PD-L1 u prekanceroznim lezijama ne bi trebao biti zanemaren, jer kako su se inhibitori kontrolnih točaka pokazali učinkovitima u borbi protiv karcinoma koji izražavaju PD-L1, postoji mogućnost potencijalne upotrebe i kod displastičnih lezija. Naravno, za navedeno su potrebna dodatna istraživanja jer očito je da displastične stanice koriste nekoliko načina u svojoj progresiji do karcinoma, a jedan od njih je

izbjegavanje imunološki posredovane eliminacije. Iz tog razloga, naša studija je uključila i stanice mikrokoliša te analizirala prisutnost i brojnost CD4, CD8, CD68 i CD163 pozitivnih stanica ukupno te pojedinačno u stromalnim i intraepitelnim odjeljcima. Rezultati su pokazali statistički značajno povećanje izražaja svih navedenih stanica od kontrolne skupine, preko displazija do SKG-a. Drugim riječima, najniži izražaj zabilježen je kod benignih lezija dok je najveći izražaj pronađen kod SKG-a. Ovaj je obrazac primijećen u ukupnoj analizi te pojedinačno u intraepitelnim i stromalnim odjeljcima (Tablica 7) što je u skladu s prethodnim istraživanjima na lezijama u usnoj šupljini [143, 146]. Nadalje, izražaj ispitivanih stanica statistički je značajno viši kod displazija visokog u odnosu na niski stupanj za CD4 stanice u ukupnoj, intraepitelnoj i stromalnoj analizi, dok se značajnost za CD8 i CD163 pozitivne stanice iskazala samo na stromalnoj razini. Analiza korelacije PD-L1 i stanica mikrokoliša pokazala je pozitivitet i statističku značajnost između PD-L1 (procijenjen kao CPS i TPS) i CD163 u intraepitelnom odjeljku te između PD-L1 (procijenjen kao CPS) i CD8 u stromalnom odjeljku. Zbog nedostatka radova na ovu temu u laringealnim displazijama, rezultate smo usporedili s rezultatima izražaja opisanih stanica u oralnim prekanceroznim lezijama. U rezultatima studije Stasikowska-Kanicke i suradnika prikazana je statistički značajna negativna korelacija između broja PD-L1 pozitivnih stanica i broja CD8 pozitivnih stanica u oralnom karcinomu, te pozitivna korelacija između broja PD-L1 pozitivnih stanica i CD163 stanica u skupinama displazija i karcinoma, što je slično našim rezultatima [146]. U radu Yagyuua i suradnika povećani izražaj subepitelih CD163 pozitivnih stanica kao i povećani izražaj epitelnog i subepitelnog PD-L1 je statistički značajno povezan s malignom transformacijom oralnih displazija [147]. Koristeći multivarijatnu logističku regresiju dokazali su da je povećanje broja subepitelih CD163 pozitivnih stanica značajno povezano s prisutnošću displazije visokog stupnja, bez obzira na broj subepitelih CD8 pozitivnih stanica, izražaj PD-L1 na epitelnim i subepitelnim stanicama i mjesto lezije što također podupire naš rezultat statistički značajno većeg izražaja CD163 pozitivnih stanica u displazijama visokog stupnja. Ova pojava sugerira da se povećani broj TAM-ova (eng. *tumor-associated macrophage*) regrutira u površinsku laminu propriju s povećanjem stupnja epitelne displazije [148]. Rekrutiranje TAM-ova može biti potaknuto displastičnim epitelnim stanicama putem kemokina, kao što je „faktor 1 koji stimulira kolonije“ (eng. *Colony stimulating factor-1* - CSF1) [148, 149]. Tumorom-povezani makrofazi se smatraju staničnim medijatorima imunosupresivnog tumorskog mikrokruženja koji mogu imati ključnu ulogu u progresiji epitelne displazije [117, 150].

U ovom istraživanju nije pronađena statistički značajna razlika u izražaju bilo kojih ispitivanih markera između progredirajućih i neprogredirajućih displazija. Izražaj CD163 pozitivnih stanica u stromalnom odjeljku bio je viši u displazijama koje su progredirale, ali je rezultat bio na razini statističkog trenda ($p=0.07$). Nedostatak naše analize je relativno mali broj bolesnika s

displazijama koje su progredirale u karcinom te su svakako potrebna daljnja istraživanja jer bi potencijalni rezultati mogli biti značajni što bi u konačnici dovelo i do promjena u terapiji laringealnih displazija.

5.2 Skvamozni karcinomi grkljana

U ovom istraživanju, 64.7% tumora je imalo pozitivan PD-L1 CPS rezultat, ali nismo pronašli utjecaj izražaja PD-L1 na preživljenje. Slični rezultati dobiveni su i u drugim studijama [121, 132, 151]. Hirshoren i suradnici uključili su 26 bolesnika sa oralnim karcinomom skvamoznih stanica i 10 bolesnika sa SKG-om i nisu pronašli utjecaj CPS-a na ukupno preživljenje ($p=0.45$), preživljenje specifično za bolest ($p=0.31$) ili preživljenje bez progresije ($p=0.88$) [151]. Slično tome, Batur i suradnici pri analizi 52 bolesnika sa SKG-om također nisu uočili povezanost CPS rezultata i ukupnog preživljenja ($p=0.413$) [121]. Korelaciju između CPS rezultata i ukupnog preživljenja ili preživljenja bez progresije koristeći granične vrijednosti CPS-a od 1 ili 20 nije dokazala niti studija Wusimana i suradnika na 119 bolesnika s karcinomom glave i vrata [132]. Međutim, njihova ispitivana skupina uključivala je samo 40 bolesnika sa SKG-om, a analiza preživljenja učinjena je na ukupnoj, heterogenoj skupini bolesnika, koja je uključivala i druga sijela glave i vrata, pa je teško pretpostaviti što je s utjecajem na preživljenje kod bolesnika s karcinomom grkljana.

Limfociti koji infiltriraju tumore (TIL) imaju prognostički značaj u bolesnika s raznim zloćudnim tumorima [152]. Među imunološkim stanicama ističu se CD8 pozitivni limfociti zbog svog antitumorskog odgovora koji dovodi do bolje prognoze bolesti s duljim DSF-om i poboljšanim ukupnim preživljenjem (eng. *Overall survival* - OS) kod različitih tipova karcinoma [89-91]. Smanjeni broj TIL-ova rezultat je vezanja PD-L1 na PD-1, što zauzvrat uzrokuje smrt CD8+ T limfocita u tumorskom tkivu.

Prema rezultatima ove studije CD8 pozitivni T limfociti u oba odjeljka, intratumorskom i stromalnom, pozitivno su korelirali s izražajem PD-L1 procijenjenom kao TPS. Također, postoji statistički značajna pozitivna korelacija između stromalnog odjeljka CD8 pozitivnih T limfocita i CPS-a. Nadalje, veća intratumorska distribucija CD8 pozitivnih T limfocita ($CD8+ \leq 2\%$ granična vrijednost) bila je povezana s boljim DSS-om ($p=0.07$ za cijelu i $p=0.08$ za uznapređovalu SKG skupinu), što je u skladu s dosadašnjim spoznajama [111]. Također, u našoj studiji utvrđeno je da je visoka razina ukupne infiltracije CD8 pozitivnih T limfocita ($CD8+ > 23\%$ granična vrijednost) dobar prediktor za recidiv SKG-a ($p=0.028$, $OR=3.11$) i povezana je s lošijim DFS-om. Nadalje, povišena vrijednost CD8 pozitivnih limfocita bila je povezana sa češćom invazijom limfnih i krvnih žila ($p=0.028$). Ta dva rezultata, visoka CD8 infiltracija i bolji DSS, ali u isto vrijeme lošiji DFS, su suprotni i to može biti posljedica iscrpljenosti T limfocita.

Trenutne studije, koje ispituju prognostički učinak infiltracije CD8 pozitivnih T limfocita kod karcinoma, nedosljedne su ukazujući na heterogenost intratumorskih citotoksičnih T limfocita [153]. Za razliku od konvencionalno aktiviranih CD8 pozitivnih T limfocita koje djeluju kao imunološki efektori, trajna antitigenska stimulacija može dovesti do disfunkcionalnog stanja tzv. iscrpljenosti T limfocita [154]. Studije na tu temu pokazuju da izražaj PD-L1 značajno korelira s prisutnošću PD-1+ TIL-ova [155]. PD-1, ključni marker za inhibiciju aktivacije T limfocita, tipično je prekomjerno izražen na iscrpljenim T limfocitima, tako da su obilni PD-1+CD8+ TIL-ovi povezani s lošijom prognozom i oslabljenim antitumorskim odgovorom kod mnogih zloćudnih bolesti [156-158]. Nalazi iz ove studije gdje viša CD8+ infiltracija ide u prilog recidiva i lošijeg DFS-a u karcinomu grkljana su u skladu sa studijom Ahmadvanda i suradnika gdje se očekuje da će PD-1+ CD8+ T limfociti biti u stanju hiporeakcije, ali su u isto vrijeme reprezentativne za formiranje antitumorskog imunološkog odgovora [155].

CD68 je najpoznatiji kao generički marker za sve makrofage, dok je CD163 najčešće korišten marker za razlikovanje M2 polariziranih makrofaga [128, 129]. Makrofazi imaju potencijal pospješiti metastaziranje i proliferaciju tumora putem različitih mehanizama [159]. Također, imaju sposobnost poticanja angiogeneze i pojačavanja invazije, pokretljivosti i intravazacije tumorskih stanica unutar primarnog tumora [160]. Uobičajeno je da CD163 pozitivna podskupina makrofaga privlači efektorske T limfocite koji ne mogu razviti zaštitni antitumorski imunološki odgovor. To se postiže otpuštanjem određenih interleukina kao što su IL-4, IL-13 i IL-10 i drugih imunosupresivnih citokina [111]. Koristeći niz različitih načina, makrofazi mogu potisnuti odgovore citotoksičnih T-limfocita [161]. Prema Kuangu i suradnicima, makrofazi su odgovorni za proizvodnju IL-10, što zauzvrat potiče monocite da izražavaju PD-L1 i smanjuje citotoksične T-limfocitne odgovore [162]. U karcinomu jajnika, kemokin makrofaga poznat kao CCL22 kontrolira dotok regulatornih T-limfocita koji su odgovorni za suzbijanje citotoksičnih T-limfocitnih odgovora [162].

Trenutni terapijski izazov je potaknuti aktivaciju antitumorskih svojstva makrofaga uz blokiranje njihovih imunosupresivnih karakteristika [159]. Usmjeravanje na makrofage moglo bi izazvati snažan odgovor zbog njihovog opsežnog sudjelovanja u karcinogenezi te djelovanju u različitim fazama tijekom onkogeneze. Također, imaju potencijal poslužiti kao terapijska intervencija za različite vrste malignih tumora. S obzirom da je petogodišnje preživljenje uznapređovalog SKG-a samo 50%, neophodno je istražiti CD68 i CD163 pozitivne makrofage kao potencijalno terapijsko sredstvo za skvamozne karcinome grkljana.

Ovo istraživanje je pokazalo da viša razina CD68 (>2,7% granična vrijednost, $p=0.0005$) i CD163 (>2% granična vrijednost, $p=0.006$), intratumoralno povezana s lošijim DSS-om, a bolesnici koji su imali povišenu vrijednost CD68 pozitivnih stanica intratumoralno su češće imali prisutne regionalne metastaze ($p=0.027$). Štoviše, veća CD68 intratumorska infiltracija

također je povezana s lošijim DFS-om i utvrđena je kao dobar prediktor za recidiv SKG-a ($p=0.019$, $OR=3.13$). Nadalje, multivarijatna analiza cijele SKG studijske grupe, u ovom istraživanju, pokazala je da je visoki intratumorski izražaj CD68 neovisni prediktivni marker DSS-a (Tablica 18). Ovi se rezultati mogu objasniti ranije navedenim protumorskim i imunosupresivnim svojstvima makrofaga. Rezultati naše studije pokazuju da je razina infiltracije CD68 i CD163 makrofaga značajan prediktivni čimbenik za bolesnike sa SKG-om. Teng i suradnici predložili su model koji klasificira mikrookruženje tumora u četiri različite kategorije na temelju izražaja PD-L1 i gustoće TIL-a: tip I (PD-L1+TILs+), tip II (PD-L1-TILs-), tip III (PD-L1+TILs-) i tip IV (PD-L1-TILs+) [163]. Pokazalo se da pojedinci kojima je dijagnosticiran tip I imaju najveću vjerojatnost da će doživjeti bolji odgovor na anti-PD-1/PD-L1 terapiju [163]. Kim i suradnici također su istaknuli važnost evaluacije izražaja PD-L1 i TIL-ova pri odabiru bolesnika za anti-PD-1/PD-L1 terapiju, budući da to pomaže identificirati one za koje postoji veća vjerojatnost da će pozitivno reagirati na liječenje [164]. U ovoj studiji nismo pronašli statistički značajnu razliku u DSS ili DFS između skupina PD-L1 pozitivan/CD8 visok, PD-L1 negativan/CD8 nizak, PD-L1 pozitivan/CD8 nizak i PD-L1 negativan/CD8 visok. Međutim, kada se uspoređuju CPS negativan/CD8 nizak skupina ($p=0.3188$) i TPS negativan/CD8 nizak ($p=0.1497$) skupina s drugim skupinama, otkrili smo da su te skupine imale lošije preživljenje. Ove skupine vjerojatno ne bi imale mnogo koristi od samo anti-PD-1/PD-L1 terapije s obzirom na nedostatak već postojećih CD8 pozitivnih T limfocita. Prema Tengui veliki broj bolesnika (40%) s melanomom ima PD-L1-TILs- (tip II) histološki tip [163] te je bez obzira na oblik liječenja, ova skupina bolesnika imala vrlo nepovoljnu prognozu. Međutim, utvrđivanje PD-L1 izražaja kao i gustoće TIL-ova prije početka terapije pomoglo bi u određivanju treba li primijeniti kombiniranu imunoterapiju koja ima potencijal preokrenuti ovo stanje u određenim slučajevima. Daljnja istraživanja na ovu temu svakako su opravdana jer 40-45% bolesnika ne uspije odgovoriti na anti-PD-1/PD-L1 inhibitornu terapiju [155]. Stoga, da bi se odredilo koji bolesnici sa SKG-om će imati koristi od anti-PD-1/PD-L1 inhibitora, ključno je razjasniti odnos između izražaja PD-L1, distribucije imunoloških stanica i prognoze u onkologiji laringealnih bolesnika.

Konačno, potrebno je razjasniti ulogu HPV-a u karcinogenezi laringelnog karcinoma, posebice jer je njegova uloga dobro poznata i utvrđena u orofaringealnim karcinomima [165]. Ang i suradnici su 2010. godine pokazali značajno bolje trogodišnje ukupno preživljenje kod HPV pozitivnih (82%) u odnosu na HPV negativne (57%) orofaringealne karcinome [166]. Sukladno tome prema zadnjoj NCCN-ovoj klasifikaciji orofaringealni karcinomi se dijele na HPV pozitivne i HPV negativne tumore, odnosno p16 pozitivne i p16 negativne jer se prekomjerno izražen p16 protein pokazao kao odličan surogat marker za HPV infekciju [113, 167]. U SAD-u HPV pozitivni orofaringealni karcinomi češći su u odnosu na HPV negativne (70% naspram 30%),

dok je u Hrvatskoj i dalje više bolesnika s HPV negativnim karcinomom orofarinksa, koji su najčešće uzrokovani pušenjem i konzumiranjem alkohola [168, 169]. Bolesnici s HPV pozitivnim orofaringealnim karcinomom obično su mlađi, seksualno aktivni te ne konzumiraju alkohol niti puše. Odlika HPV pozitivnih orofaringealnih karcinoma je da odlično reagiraju na onkološku terapiju te je sve više radova o manje intenzivnoj terapiji, tj. primjeni manje doze zračenja uz postizanje istog preživljenja [170].

Unatoč spoznajama o HPV pozitivnom orofaringealnim karcinomima, postoji nedostatak konsenzusa o utjecaju HPV infekcije te prekomjernog p16 izražaja kod karcinoma grkljana [171]. Neke studije sugeriraju da bolesnici s p16 pozitivnim tumorima imaju bolje prognozu, manje invazivno ponašanje tumora i smanjen rizik od regionalnih i udaljenih metastaza [172]. Nasuprot tome, druga istraživanja nisu pokazala značajnu razliku u ishodima između p16 pozitivnih i p16 negativnih bolesnika s karcinomom grkljana [173]. Ove se razlike mogu pripisati ograničenjima u metodologiji istraživanja, neadekvatnim veličinama uzorka i heterogenosti populacije bolesnika. U istraživanju Liua i suradnika povišen izražaj p16 proteina dokazan je u 13.8% bolesnika sa SKG-om [174], a pozitivnost p16 markera nije pokazala statistički značajnu korelaciju s prosječnom dobi, pušenjem, konzumiranjem alkohola, stadijem tumora, regionalnim metastaziranjem ili preživljenjem. U našem istraživanju, p16 izražaj zabilježen je u 3 od 102 (2.9%) bolesnika radi čega nije implementiran u većinu analiza ove studije. Neovisno o našem rezultatu, kao i činjenici da dosadašnja istraživanja pokazuju da HPV infekcija vjerojatno ne igra važnu ulogu u laringealnoj karcinogenezi, potrebna su daljnja istraživanja u svrhu detekcije takvih slučajeva te moguće promjene terapijskih opcija.

Glavna snaga ove studije je homogenost skupine bolesnika s laringealnim karcinomom jer većina studija uključuje različita sijela tumora iz područja glave i vrata. Nadalje, ispitivana skupina u ovom istraživanju imala je ujednačen terapijski pristup te su svi bolesnici bili podvrgnuti primarnoj kirurgiji grkljana nakon koje je uslijedila kemoradioterapija ili samo radioterapija. Ono što je također važno, procijenjeni su samo konačni kirurški uzorci karcinoma, dok male, probne biopsije nisu uključene. Bitno je istaknuti da smo u ovoj studiji koristili PD-L1 protutijelo, klon SP263, Ventana, Tucson, SAD zbog njegove učinkovitosti i očuvanog izražaja i na starijim uzorcima arhiviranog tkiva koji su fiksirani u formalinu i uklopljeni u parafin, osobito kada su parafinski blokovi bili stariji od 3 godine, za razliku od klona 22C3 koji bi, kada se koristi, mogao dovesti do podcjenjivanja statusa PD-L1, osobito u ovim uvjetima [130, 131]. De Ruiter i suradnici pokazali su da je SP263 obojio veći postotak stanica pri korištenju CPS-a ili TPS-a, no nisu uzeli u obzir duljinu pohrane tkiva što bi mogao biti razlog nepodudarnog rezultata pri korištenju klona 22C3 [175]. Nadalje, koristili smo opće priznat CPS i TPS sustav evaluacije izražaja PD-L1, a kako u u literaturi ne postoji stav o graničnim vrijednostima, pokušali smo koristiti različite opcije po uzoru na druga istraživanja.

Pri analizi stanica mikrookoliša kao što su CD4, CD8, CD68 i CD163 uzeli smo u obzir ne samo ukupan broj stanica već i distribuciju u intratumorskom i stromalnom odjeljku, što je detaljnije i preciznije u odnosu na većinu dostupnih studija [176, 177]. Također, CD68 i CD163 korišteni su kao najčešće upotrebljavani markeri za sve odnosno M2 makrofage [111]. Studija je uključila relativno jednak broj bolesnika s ranim i uznapredovalim stadijem karcinoma s dugim medijanom vremena praćenja. Primarno ograničenje ovog istraživanja je retrospektivni karakter studije s relativno malim brojem ispitanih slučajeva i korištenje TMA, iako upotrebom tri do četiri tkivna cilindra promjera od 1 mm te serijskim narezivanjem istih TMA cilindra smo pokušali umanjiti navedeni nedostatak.

Zaključno, u literaturi nedostaju ili su rijetke studije koje istražuju PD-L1, tumorski mikrookoliš te njihov međusobni odnos i utjecaj na preživljenje kod karcinoma grkljana ili progresiju kod prekarcenoznih lezija grkljana. Naši rezultati ukazuju da su stanice mikrookoliša tumora značajni prognostički čimbenici kod skvamoznog karcinoma grkljana, a pojačani izražaji CD68 i CD163 prediktori su lošijeg preživljenja. Nažalost, nismo dokazali povezanost PD-L1 s kliničkim i patohistološkim čimbenicima te utjecaj na preživljenje kao niti statistički značajnu razliku ispitivanih markera između progredirajućih i neprogredirajućih displazija. Obzirom na relativno mali uzorak te retrospektivni karakter studije, potrebna su dodatna istraživanja koja će razjasniti znanstvene nepoznanice i implementirati ih u kliničke protokole, a s ciljem preciznije dijagnostike, adekvatnijeg praćenja, ciljanog liječenja, te konačno boljeg ishoda bolesnika oboljelih od ovih bolesti.

6. ZAKLJUČCI

1. PD-L1 izražaj kao i izražaj stanica tumorskog mikrookoliša (CD4, CD8, CD68 i CD163) statistički je značajno veći u karcinomima grkljana u odnosu na displazije kao i u displazijama u odnosu na benigne lezije.
2. U karcinomu grkljana PD-L1 izražaj statistički je značajno pozitivno korelirao sa svim stanicama tumorskog mikrookoliša izuzev s CD4 pozitivnim stanicama u intraepitelnom odjeljku.
3. Nije dokazana povezanost PD-L1 izražaja te preživljenja bolesnika s karcinomom grkljana kao niti korelacija s kliničko patološkim karakteristikama.
4. U uznapređovalom stadiju statistički je značajno veći izražaj CD8 stromalnog kao i CD68 ukupnog u odnosu na rani stadij karcinoma grkljana. Kod bolesnika s prisutnim regionalnim metastazama pronađena je statistički značajno veća vrijednost CD68 pozitivnih stanica u intraepitelnom odjeljku. Nadalje, bolesnici s povišenim vrijednostima CD4 i CD8 pozitivnih stanica ukupno imali su statistički značajno češće prisutnu invaziju limfnih i krvnih žila.
4. Visoki izražaji CD68 i CD163 pozitivnih makrofaga značajni su negativni prediktivni čimbenici kod bolesnika sa skvamoznim karcinomom grkljana.
5. Bolesnici s visokim izražajem ukupnog CD8 te intraepitelnog CD68 imali su oko 3 puta veći rizik za razvoj recidiva karcinoma grkljana.
6. Nije nađena statistički značajna razlika u PD-L1 izražaju niti u izražaju stanica tumorskog mikrookoliša između displazija koje su progredirale u karcinom i onih koje nisu.
7. Uspoređujući displaziju niskog i visokog stupnja, primijećen je statistički značajno viši izražaj u lezijama visokog stupnja u ukupnom broju CD4 stanica kao i u intraepitelnom i stromalnom odjeljku dok je izražaj CD8 i CD163 veći stromalno.
8. Dokazana je niska incidencija HPV infekcije kod karcinoma (2.9%) i prekanceroznih lezija grkljana (4/41=9.8%).

7. LITERATURA

1. Nocini R, Molteni G, Mattiuzzi C, Lippi G. Updates on larynx cancer epidemiology. *Chin J Cancer Res.* 2020;32(1):18-25.
2. Rosen CA. *Bailey's head and neck surgery: otolaryngology*: Lippincott Williams & Wilkins; 2022, str. 2252.
3. Hrvatski zavod za javno zdravstvo RZRH. Incidencija raka u Hrvatskoj Zagreb; 2022.
4. Steuer CE, El-Deiry M, Parks JR, Higgins KA, Saba NF. An update on larynx cancer. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(1):31-50.
5. Talamini R, Bosetti C, La Vecchia C i sur. Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer Causes Control.* 2002;13(10):957-64.
6. Marioni G, Marchese-Ragona R, Cartei G, Marchese F, Staffieri A. Current opinion in diagnosis and treatment of laryngeal carcinoma. *Cancer Treat Rev.* 2006;32(7):504-15.
7. Hashibe M, Brennan P, Chuang SC i sur. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(2):541-50.
8. Menach P, Oburra HO, Patel A. Cigarette smoking and alcohol ingestion as risk factors for laryngeal squamous cell carcinoma at kenyatta national hospital, kenya. *Clin Med Insights Ear Nose Throat.* 2012;5:17-24.
9. Baumann JL, Cohen S, Evjen AN i sur. Human papillomavirus in early laryngeal carcinoma. *Laryngoscope.* 2009;119(8):1531-7.
10. Wittekindt C, Wuerdemann N, Gattenlohner S i sur. The role of high-risk human papillomavirus infections in laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2017;274(11):3837-42.
11. Purdue MP, Jarvholm B, Bergdahl IA, Hayes RB, Baris D. Occupational exposures and head and neck cancers among Swedish construction workers. *Scand J Work Environ Health.* 2006;32(4):270-5.
12. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature.* 2015;517(7536):576-82.
13. Hoffman HT, Porter K, Karnell LH i sur. Laryngeal cancer in the United States: changes in demographics, patterns of care, and survival. *Laryngoscope.* 2006;116(9 Pt 2 Suppl 111):1-13.
14. Karatzanis AD, Psychogios G, Zenk J i sur. Evaluation of available surgical management options for early supraglottic cancer. *Head Neck.* 2010;32(8):1048-55.
15. Patel TD, Echanique KA, Yip C i sur. Supraglottic Squamous Cell Carcinoma: A Population-Based Study of 22,675 Cases. *Laryngoscope.* 2019;129(8):1822-7.

16. Yuce I, Cagli S, Bayram A, Guney E. Occult metastases from T1-T2 supraglottic carcinoma: role of primary tumor localization. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2009;266(8):1301-4.
17. van der Woerd B, Patel KB, Nichols AC, Fung K, Yoo J, MacNeil SD. Functional outcomes in early (T1/T2) supraglottic cancer: a systematic review. *J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2018;47(1):76.
18. Tachibana T, Orita Y, Marunaka H i sur. Neck metastasis in patients with T1-2 supraglottic cancer. *Auris Nasus Larynx*. 2018;45(3):540-5.
19. Dahm JD, Sessions DG, Paniello RC, Harvey J. Primary subglottic cancer. *Laryngoscope*. 1998;108(5):741-6.
20. Smee RI, Williams JR, Bridger GP. The management dilemmas of invasive subglottic carcinoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2008;20(10):751-6.
21. Garas J, McGuirt WF, Sr. Squamous cell carcinoma of the subglottis. *Am J Otolaryngol*. 2006;27(1):1-4.
22. Ferlito A, Rinaldo A. The pathology and management of subglottic cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2000;257(3):168-73.
23. Yu H, Tao L, Zhou L i sur. Results of surgical treatment alone for primary subglottic carcinoma. *Acta Otolaryngol*. 2019;139(5):432-8.
24. Denoix P. Enquete permanente dans les centres anticancereaux. *Bull Inst Natl Hyg*. 1946;1(1):70-5.
25. Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C, Control UfIC. TNM classification of malignant tumours, 8th Edition. Oxford, UK ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc; 2017.
26. Hrelec C. Management of Laryngeal Dysplasia and Early Invasive Cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2021;22(10):90.
27. Strosberg C, Ferlito A, Triantafyllou A i sur. Update on Neuroendocrine Carcinomas of the Larynx. *Am J Clin Pathol*. 2019;152(6):686-700.
28. Klimza H, Jackowska J, Piazza C, Banaszewski J, Wierzbicka M. The role of intraoperative narrow-band imaging in transoral laser microsurgery for early and moderately advanced glottic cancer. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2019;85(2):228-36.
29. Stanikova L, Satankova J, Kucova H, Walderova R, Zelenik K, Kominek P. The role of narrow-band imaging (NBI) endoscopy in optical biopsy of vocal cord leukoplakia. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2017;274(1):355-9.
30. Arens C, Piazza C, Andrea M i sur. Proposal for a descriptive guideline of vascular changes in lesions of the vocal folds by the committee on endoscopic laryngeal imaging of the European Laryngological Society. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2016;273(5):1207-14.
31. Chu MM, Kositwattanarerk A, Lee DJ i sur. FDG PET with contrast-enhanced CT: a critical imaging tool for laryngeal carcinoma. *Radiographics*. 2010;30(5):1353-72.

32. Marijic B, Tudor F, Janik S i sur. Long-Term Care and Follow-Up in Laryngeal Cancer Patients: A Multicenter Retrospective Analysis. *J Pers Med*. 2023;13(6).
33. Networks NCC. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®), Head and Neck Cancers, Version 4.2024 — May 1, 2024: NCCN; 2024 [Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/head-and-neck.pdf].
34. Pearson BW, Salassa JR. Transoral laser microresection for cancer of the larynx involving the anterior commissure. *Laryngoscope*. 2003;113(7):1104-12.
35. Mandelbaum RS, Abemayor E, Mendelsohn AH. Laryngeal Preservation in Glottic Cancer: A Comparison of Hospital Charges and Morbidity among Treatment Options. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2016;155(2):265-73.
36. Kennedy JT, Paddle PM, Cook BJ, Chapman P, Iseli TA. Voice outcomes following transoral laser microsurgery for early glottic squamous cell carcinoma. *J Laryngol Otol*. 2007;121(12):1184-8.
37. Woo SH. Preoperative and operative endoscopic evaluation in larynx cancer. *Medical Lasers; Engineering, Basic Research, and Clinical Application*. 2024;13(3):119-22.
38. Tang D, Tao L, Zhou L i sur. Retrospective analysis of 659 laryngeal squamous cell carcinoma patients treated with open laryngeal function-preserving operations. *Acta Otolaryngol*. 2018;138(11):1043-50.
39. Tudor F, Čuš N, Klemar A i sur. Funkcionalni i onkološki ishodi bolesnika liječenih frontolateralnom laringektomijom. *Medica Jadertina*. 2022;52(3):171-7.
40. Mudry A, Laccourreye O. 2023: Total laryngectomy's 150th anniversary! *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. 2023;140(1):1.
41. Obid R, Redlich M, Tomeh C. The Treatment of Laryngeal Cancer. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2019;31(1):1-11.
42. Group* DoVALCS. Induction chemotherapy plus radiation compared with surgery plus radiation in patients with advanced laryngeal cancer. *New England Journal of Medicine*. 1991;324(24):1685-90.
43. Forastiere AA, Goepfert H, Maor M i sur. Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. *New England Journal of Medicine*. 2003;349(22):2091-8.
44. Al-Mamgani A, Navran A, Walraven I, Schreuder WH, Tesselaar ME, Klop WMC. Organ-preservation (chemo) radiotherapy for T4 laryngeal and hypopharyngeal cancer: is the effort worth? *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2019;276:575-83.
45. Grasl S, Schmid E, Heiduschka G i sur. A New Classification System to Predict Functional Outcome after Laryngectomy and Laryngopharyngectomy. *Cancers (Basel)*. 2021;13(6).

46. Gultekin M, Sari SY, Ozyigit G i sur. Salivary gland. Radiation Therapy for Head and Neck Cancers: A Case-Based Review. 2015:187-99.
47. Zbären P, Caversaccio M, Thoeny HC, Nuyens M, Curschmann J, Stauffer E. Radionecrosis or tumor recurrence after radiation of laryngeal and hypopharyngeal carcinomas. *Otolaryngology—Head and Neck Surgery*. 2006;135(6):838-43.
48. Forastiere AA, Weber RS, Trotti A. Organ preservation for advanced larynx cancer: issues and outcomes. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(29):3262-8.
49. Prgomet D. Tumori glave i vrata: Medicinska naklada; 2019.
50. Prgomet D. Karcinom glave i vrata—trenutne mogućnosti i perspektive u liječenju. *Liječnički vjesnik*. 2021;143(7-8):284-93.
51. Qian JM, Schoenfeld JD. Radiotherapy and Immunotherapy for Head and Neck Cancer: Current Evidence and Challenges. *Front Oncol*. 2020;10:608772.
52. Krishnamurthy S, Ahmed I, Bhise R i sur. The dogma of Cetuximab and Radiotherapy in head and neck cancer—A dawn to dusk journey. *Clinical and Translational Radiation Oncology*. 2022;34:75-81.
53. Gubin MM, Zhang X, Schuster H i sur. Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature*. 2014;515(7528):577-81.
54. Hamid O, Robert C, Daud A i sur. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2013;369(2):134-44.
55. Powles T, Park SH, Voog E i sur. Avelumab maintenance therapy for advanced or metastatic urothelial carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2020;383(13):1218-30.
56. Ferris RL, Blumenschein Jr G, Fayette J i sur. Nivolumab for recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(19):1856-67.
57. Cohen EE, Soulières D, Le Tourneau C i sur. 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. *The Lancet*. 2019;393(10167):156-67.
58. Soulières D, Gilberto de Castro M, Psyrri A i sur. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study.
59. Cohen EE, Bell RB, Bifulco CB i sur. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC). *Journal for immunotherapy of cancer*. 2019;7:1-31.
60. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F i sur. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *New England Journal of Medicine*. 2008;359(11):1116-27.

61. Shah JP, Wong RJ. Head and neck surgical oncology. *Journal of surgical oncology*. 2022;126(5):860-4.
62. Hellquist H, Ferlito A, Makitie AA i sur. Developing Classifications of Laryngeal Dysplasia: The Historical Basis. *Adv Ther*. 2020;37(6):2667-77.
63. Olson C, Alexander R, Stinnett S. Dysplastic Lesions of the Larynx. *Otolaryngologic Clinics of North America*. 2023;56(2):233-46.
64. Gale N, Kambic V, Michaels L i sur. The Ljubljana classification: a practical strategy for the diagnosis of laryngeal precancerous lesions. *Advances in anatomic pathology*. 2000;7(4):240-51.
65. Gale N, Cardesa A, Hernandez-Prera JC, Slootweg PJ, Wenig BM, Zidar N. Laryngeal dysplasia: persisting dilemmas, disagreements and unsolved problems—a short review. *Head and Neck Pathology*. 2020;14:1046-51.
66. Isenberg JS, Crozier DL, Dailey SH. Institutional and comprehensive review of laryngeal leukoplakia. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2008;117(1):74-9.
67. Watkinson J, Clarke R. Scott-Brown's Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery: Volume 3: Head and Neck Surgery, Plastic Surgery: CRC Press; 2018, str. 241.
68. Van Hulst AM, Kroon W, Van Der Linden ES i sur. Grade of dysplasia and malignant transformation in adults with premalignant laryngeal lesions. *Head & neck*. 2016;38(S1):E2284-E90.
69. Dave K, Ali A, Magalhaes M. Increased expression of PD-1 and PD-L1 in oral lesions progressing to oral squamous cell carcinoma: a pilot study. *Scientific Reports*. 2020;10(1):9705.
70. Syn NL, Teng MW, Mok TS, Soo RA. De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting. *The Lancet Oncology*. 2017;18(12):e731-e41.
71. Alessandrini L, Franz L, Ottaviano G i sur. Prognostic role of programmed death ligand 1 (PD-L1) and the immune microenvironment in laryngeal carcinoma. *Oral Oncol*. 2020;108:104836.
72. Wang J, Lun L, Jiang X i sur. APE1 facilitates PD-L1-mediated progression of laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Int Immunopharmacol*. 2021;97:107675.
73. Kowalski A, Malinowska K, Olszewski J, Zielinska-Blizniewska H. Expression of Programmed Death Receptor 1 (PD-1) Gene and Its Ligand (PD-L1) in Patients with Laryngeal Cancer. *Biomolecules*. 2021;11(7).
74. Verro B, Saraniti G, Ottoveggio G, Saraniti C. Cancer and immune response: The role of PD-1/PD-L1 checkpoint in laryngeal carcinoma. Preliminary results. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2024;281(10):5411-7.

75. Yang S-M, Wu M, Han F-Y, Sun Y-M, Yang J-Q, Liu H-X. Role of HPV status and PD-L1 expression in prognosis of laryngeal squamous cell carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2021;14(1):107.
76. Müller T, Braun M, Dietrich D i sur. PD-L1: a novel prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(32):52889.
77. Franz L, Alessandrini L, Fasanaro E i sur. Prognostic impact of neutrophils-to-lymphocytes ratio (NLR), PD-L1 expression, and tumor immune microenvironment in laryngeal cancer. *Ann Diagn Pathol*. 2021;50:151657.
78. Taube JM, Anders RA, Young GD i sur. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med*. 2012;4(127):127ra37.
79. Vassilakopoulou M, Avgeris M, Velcheti V i sur. Evaluation of PD-L1 Expression and Associated Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2016;22(3):704-13.
80. Yu D, Cheng J, Xue K, Zhao X, Wen L, Xu C. Expression of Programmed Death-Ligand 1 in Laryngeal Carcinoma and its Effects on Immune Cell Subgroup Infiltration. *Pathol Oncol Res*. 2019;25(4):1437-43.
81. Vassilakopoulou M, Avgeris M, Velcheti V i sur. Evaluation of PD-L1 expression and associated tumor-infiltrating lymphocytes in laryngeal squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(3):704-13.
82. Tang H, Zhou X, Ye Y, Zhou Y, Wu C, Xu Y. The different role of PD-L1 in head and neck squamous cell carcinomas: A meta-analysis. *Pathology-Research and Practice*. 2020;216(1):152768.
83. Girolami I, Pantanowitz L, Munari E i sur. Prevalence of PD-L1 expression in head and neck squamous precancerous lesions: A systematic review and meta-analysis. *Head & Neck*. 2020;42(10):3018-30.
84. Aló PL, Ciciarelli M, De Felice F, Quintiliani C, Corsi A, Polimeni A. Immunohistochemical differences in squamous precancerous and cancerous lesions of the oral cavity and the larynx: preliminary data. *Applied Sciences*. 2021;11(5):2048.
85. Tay RE, Richardson EK, Toh HC. Revisiting the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy—new insights into old paradigms. *Cancer gene therapy*. 2021;28(1):5-17.
86. Wolf GT, Hudson JL, Peterson KA, Miller HL, McClatchey KD. Lymphocyte subpopulations infiltrating squamous carcinomas of the head and neck: correlations with extent of tumor and prognosis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1986;95(2):142-52.
87. Badoual C, Hans S, Rodriguez J i sur. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res*. 2006;12(2):465-72.

88. Wansom D, Light E, Thomas D i sur. Infiltrating lymphocytes and human papillomavirus-16--associated oropharyngeal cancer. *Laryngoscope*. 2012;122(1):121-7.
89. Hu Z, Gu X, Zhong R, Zhong H. Tumor-infiltrating CD45RO(+) memory cells correlate with favorable prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *J Thorac Dis*. 2018;10(4):2089-99.
90. Shimizu S, Hiratsuka H, Koike K i sur. Tumor-infiltrating CD8+ T-cell density is an independent prognostic marker for oral squamous cell carcinoma. *Cancer medicine*. 2019;8(1):80-93.
91. Vihervuori H, Autere T, Repo H i sur. Tumor-infiltrating lymphocytes and CD8+ T cells predict survival of triple-negative breast cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2019;145:3105-14.
92. Kluger HM, Zito CR, Barr ML i sur. Characterization of PD-L1 Expression and Associated T-cell Infiltrates in Metastatic Melanoma Samples from Variable Anatomic Sites. *Clin Cancer Res*. 2015;21(13):3052-60.
93. Taube JM, Klein A, Brahmer JR i sur. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res*. 2014;20(19):5064-74.
94. Balermipas P, Rodel F, Liberz R i sur. Head and neck cancer relapse after chemoradiotherapy correlates with CD163+ macrophages in primary tumour and CD11b+ myeloid cells in recurrences. *Br J Cancer*. 2014;111(8):1509-18.
95. Gooden MJ, de Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2011;105(1):93-103.
96. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH i sur. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*. 2014;515(7528):568-71.
97. Zandberg DP, Strome SE. The role of the PD-L1: PD-1 pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral oncology*. 2014;50(7):627-32.
98. Zhang P, Zhang Y, Wang L, Lou W. Tumor-regulated macrophage type 2 differentiation promotes immunosuppression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Life Sciences*. 2021;267:118798.
99. Jang JY, Lee JK, Jeon YK, Kim CW. Exosome derived from epigallocatechin gallate treated breast cancer cells suppresses tumor growth by inhibiting tumor-associated macrophage infiltration and M2 polarization. *BMC Cancer*. 2013;13:421.
100. Duray A, Demoulin S, Hubert P, Delvenne P, Saussez S. Immune suppression in head and neck cancers: a review. *Clin Dev Immunol*. 2010;2010:701657.

101. Bostrom MM, Irjala H, Mirtti T i sur. Tumor-Associated Macrophages Provide Significant Prognostic Information in Urothelial Bladder Cancer. PLoS One. 2015;10(7):e0133552.
102. Li H, Zhang J, Chen SW i sur. Cancer-associated fibroblasts provide a suitable microenvironment for tumor development and progression in oral tongue squamous cancer. J Transl Med. 2015;13:198.
103. Kim S, Cho SW, Min HS i sur. The expression of tumor-associated macrophages in papillary thyroid carcinoma. Endocrinol Metab (Seoul). 2013;28(3):192-8.
104. Pirila E, Vayrynen O, Sundquist E i sur. Macrophages modulate migration and invasion of human tongue squamous cell carcinoma. PLoS One. 2015;10(3):e0120895.
105. Bindea G, Mlecnik B, Fridman W-H, Galon J, editors. The prognostic impact of anti-cancer immune response: a novel classification of cancer patients. Seminars in immunopathology; 2011: Springer.
106. Kadota K, Nitadori J-i, Ujiie H i sur. Prognostic impact of immune microenvironment in lung squamous cell carcinoma: tumor-infiltrating CD10+ neutrophil/CD20+ lymphocyte ratio as an independent prognostic factor. Journal of Thoracic Oncology. 2015;10(9):1301-10.
107. Dahlin AM, Henriksson ML, Van Guelpen B i sur. Colorectal cancer prognosis depends on T-cell infiltration and molecular characteristics of the tumor. Modern Pathology. 2011;24(5):671-82.
108. Adams S, Gray RJ, Demaria S i sur. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. Journal of clinical oncology. 2014;32(27):2959-66.
109. Karpathiou G, Monaya A, Forest F i sur. p16 and p53 expression status in head and neck squamous cell carcinoma: a correlation with histological, histoprognostic and clinical parameters. Pathology. 2016;48(4):341-8.
110. Karpathiou G, Giroult J-B, Forest F i sur. Clinical and histologic predictive factors of response to induction chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. American Journal of Clinical Pathology. 2016;146(5):546-53.
111. Zhou L, Li Y, Gao W i sur. Assessment of tumor-associated immune cells in laryngeal squamous cell carcinoma. Journal of cancer research and clinical oncology. 2019;145:1761-72.
112. Fauzi FH, Hamzan NI, Rahman NA, Suraiya S, Mohamad S. Detection of human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinoma. J Zhejiang Univ Sci B. 2020;21(12):961-76.

113. Machczynski P, Majchrzak E, Niewinski P, Marchlewska J, Golusinski W. A review of the 8th edition of the AJCC staging system for oropharyngeal cancer according to HPV status. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2020;277(9):2407-12.
114. Al-Qudah MA, Al-Shaikh AaF, Haddad HK i sur. Prevalence and detection of sexually transmitted cases of laryngeal carcinoma. *Head and Neck Pathology*. 2020;14:909-14.
115. Lechien JR, Descamps G, Seminerio I i sur. HPV involvement in the tumor microenvironment and immune treatment in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancers*. 2020;12(5):1060.
116. Lechner M, Liu J, Masterson L, Fenton TR. HPV-associated oropharyngeal cancer: epidemiology, molecular biology and clinical management. *Nature reviews Clinical oncology*. 2022;19(5):306-27.
117. Lyford-Pike S, Peng S, Young GD i sur. Evidence for a role of the PD-1:PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2013;73(6):1733-41.
118. Badoual C, Hans S, Merillon N i sur. PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer Res*. 2013;73(1):128-38.
119. Odell E, Eckel HE, Simo R i sur. European Laryngological Society position paper on laryngeal dysplasia Part I: aetiology and pathological classification. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2021;278:1717-22.
120. Eckel HE, Simo R, Quer M i sur. European Laryngological Society position paper on laryngeal dysplasia Part II: diagnosis, treatment, and follow-up. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2021;278:1723-32.
121. Batur S, Kain ZE, Gozen ED, Kepil N, Aydin O, Comunoglu N. Programmed Death Ligand 1 Expression in Laryngeal Squamous Cell Carcinomas and Prognosis. *Clin Pathol*. 2020;13:2632010X20964846.
122. Heng Y, Zhu X, Lin H i sur. CD206(+) tumor-associated macrophages interact with CD4(+) tumor-infiltrating lymphocytes and predict adverse patient outcome in human laryngeal squamous cell carcinoma. *J Transl Med*. 2023;21(1):167.
123. Pakkanen P, Ilmarinen T, Halme E i sur. Programmed death-ligand 1 and tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) - low TIL density may predict poorer long-term prognosis in T1 laryngeal cancer. *Virchows Arch*. 2023.
124. Smith J, Robida MD, Acosta K i sur. Quantitative and qualitative characterization of two PD-L1 clones: SP263 and E1L3N. *Diagnostic pathology*. 2016;11:1-9.

125. Kim KY, Lewis Jr JS, Chen Z. Current status of clinical testing for human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *The Journal of Pathology: Clinical Research*. 2018;4(4):213-26.
126. van der Kamp MF, Hiddingh E, de Vries J i sur. Association of Tumor Microenvironment with Biological and Chronological Age in Head and Neck Cancer. *Cancers*. 2023;15(15):3834.
127. Nojima Y, Shimizu K, Saisho S i sur. Tumor PD-L1 and VEGF expression, and CD8 T cell infiltration predict clinical response to immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer. *Anticancer Research*. 2021;41(11):5469-75.
128. Falini B, Flenghi L, Pileri S i sur. PG-M1: a new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant epitope on the macrophage-restricted form of the CD68 molecule. *The American journal of pathology*. 1993;142(5):1359.
129. Lau SK, Chu PG, Weiss LM. CD163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples. *American journal of clinical pathology*. 2004;122(5):794-801.
130. Kim SY, Kim TE, Park CK i sur. Comprehensive Comparison of 22C3 and SP263 PD-L1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer Using Routine Clinical and Conditioned Archives. *Cancers (Basel)*. 2022;14(13).
131. Crosta S, Boldorini R, Bono F i sur. PD-L1 Testing and Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: A Multicenter Study on the Diagnostic Reproducibility of Different Protocols. *Cancers (Basel)*. 2021;13(2).
132. Wusiman D, Guo L, Huang Z i sur. The clinicopathological significance of PD-L1 expression assessed by the combined positive score (CPS) in head and neck squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2022;236:153934.
133. Ito T, Okamoto I, Tokashiki K i sur. PD-L1 Expression and Survival Rates Using TPS and CPS for Nivolumab-treated Head-and-Neck Cancer. *Anticancer Res*. 2022;42(3):1547-54.
134. Tseng P-H, Liao X-Y, Lin J-T i sur., editors. Artificial intelligence assisted determination of Tumor Proportion Score (TPS) in HNSCC patients. *Photonic Therapeutics and Diagnostics in Dentistry, Head and Neck Surgery, and Otolaryngology*; 2021: SPIE.
135. Akhtar M, Rashid S, Al-Bozom IA. PD-L1 immunostaining: what pathologists need to know. *Diagn Pathol*. 2021;16(1):94.
136. Farzanehpour M, Muhammadnejad A, Akhavan S i sur. P16INK4A immunohistochemistry as a gold standard for cervical cancer and precursor lesions screening. *Iranian Journal of Public Health*. 2020;49(2):312.
137. Abbott M, Ustoyev Y, editors. *Cancer and the immune system: the history and background of immunotherapy*. Seminars in oncology nursing; 2019: Elsevier.

138. M Candeias S, S Gaip U. The immune system in cancer prevention, development and therapy. *Anti-cancer agents in Medicinal Chemistry (formerly current Medicinal Chemistry-Anti-cancer agents)*. 2016;16(1):101-7.
139. Ghosh C, Luong G, Sun Y. A snapshot of the PD-1/PD-L1 pathway. *J Cancer*. 2021;12(9):2735-46.
140. Munari E, Mariotti FR, Quatrini L i sur. PD-1/PD-L1 in Cancer: Pathophysiological, Diagnostic and Therapeutic Aspects. *Int J Mol Sci*. 2021;22(10).
141. Sadri M, McMahon J, Parker A. Management of laryngeal dysplasia: a review. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2006;263(9):843-52.
142. Burtneess B, Harrington KJ, Greil R i sur. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*. 2019;394(10212):1915-28.
143. Chen XJ, Tan YQ, Zhang N, He MJ, Zhou G. Expression of programmed cell death-ligand 1 in oral squamous cell carcinoma and oral leukoplakia is associated with disease progress and CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes. *Pathol Res Pract*. 2019;215(6):152418.
144. Sievilainen M, Passador-Santos F, Almahmoudi R i sur. Immune checkpoints indoleamine 2,3-dioxygenase 1 and programmed death-ligand 1 in oral mucosal dysplasia. *J Oral Pathol Med*. 2018;47(8):773-80.
145. Kouketsu A, Sato I, Oikawa M i sur. Expression of immunoregulatory molecules PD-L1 and PD-1 in oral cancer and precancerous lesions: A cohort study of Japanese patients. *J Craniomaxillofac Surg*. 2019;47(1):33-40.
146. Stasikowska-Kanicka O, Wagrowska-Danilewicz M, Danilewicz M. CD8+ and CD163+ infiltrating cells and PD-L1 immunoexpression in oral leukoplakia and oral carcinoma. *APMIS*. 2018;126(9):732-8.
147. Yagyu T, Hatakeyama K, Imada M i sur. Programmed death ligand 1 (PD-L1) expression and tumor microenvironment: Implications for patients with oral precancerous lesions. *Oral Oncol*. 2017;68:36-43.
148. DeNardo DG, Barreto JB, Andreu P i sur. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell*. 2009;16(2):91-102.
149. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010;141(1):39-51.
150. Mori K, Haraguchi S, Hiori M, Shimada J, Ohmori Y. Tumor-associated macrophages in oral premalignant lesions coexpress CD163 and STAT1 in a Th1-dominated microenvironment. *BMC Cancer*. 2015;15:573.

151. Hirshoren N, Al-Kharouf I, Weinberger JM i sur. Spatial Intratumoral Heterogeneity Expression of PD-L1 Antigen in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Oncology*. 2021;99(7):464-70.
152. Hendry S, Salgado R, Gevaert T i sur. Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method From the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the Host Immune Response, TILs in Invasive Breast Carcinoma and Ductal Carcinoma In Situ, Metastatic Tumor Deposits and Areas for Further Research. *Adv Anat Pathol*. 2017;24(5):235-51.
153. Romain P, Schlossman S. Human T lymphocyte subsets. Functional heterogeneity and surface recognition structures. *The Journal of clinical investigation*. 1984;74(5):1559-65.
154. Yu K, Gu Y, Zhang P i sur. Intratumoral PD-1(+)CD8(+) T cells associate poor clinical outcomes and adjuvant chemotherapeutic benefit in gastric cancer. *Br J Cancer*. 2022;127(9):1709-17.
155. Ahmadvand S, Norouzi LA, Mohammadi Y i sur. Negative prognostic behaviour of PD-L1 expression in tongue and larynx squamous cell carcinoma and its significant predictive power in combination with PD-1 expression on TILs. *BMC Immunol*. 2024;25(1):7.
156. Kim HD, Song GW, Park S i sur. Association Between Expression Level of PD1 by Tumor-Infiltrating CD8(+) T Cells and Features of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2018;155(6):1936-50 e17.
157. Han J, Duan J, Bai H i sur. TCR Repertoire Diversity of Peripheral PD-1(+)CD8(+) T Cells Predicts Clinical Outcomes after Immunotherapy in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Immunol Res*. 2020;8(1):146-54.
158. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M i sur. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(9):3360-5.
159. De Palma M, Lewis CE. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer Cell*. 2013;23(3):277-86.
160. Ouban A, Raddaoui E, Bakir M. The Clinical Significance of CD163+ Tumor-Associated Macrophages (TAMs) in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Cureus*. 2023;15(3):e36339.
161. Morrison C. Immuno-oncologists eye up macrophage targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15(6):373-4.
162. Kuang DM, Zhao Q, Peng C i sur. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *J Exp Med*. 2009;206(6):1327-37.

163. Teng MW, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res.* 2015;75(11):2139-45.
164. Kim TK, Herbst RS, Chen L. Defining and Understanding Adaptive Resistance in Cancer Immunotherapy. *Trends Immunol.* 2018;39(8):624-31.
165. Lechner M, Liu J, Masterson L, Fenton TR. HPV-associated oropharyngeal cancer: epidemiology, molecular biology and clinical management. *Nat Rev Clin Oncol.* 2022;19(5):306-27.
166. Ang KK, Harris J, Wheeler R i sur. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *New England Journal of Medicine.* 2010;363(1):24-35.
167. Golusinski P, Pazdrowski J, Szewczyk M i sur. Is immunohistochemical evaluation of p16 in oropharyngeal cancer enough to predict the HPV positivity? *Rep Pract Oncol Radiother.* 2017;22(3):237-42.
168. Preissner SH, Nahles S, Preissner S, Heiland M, Koerdt S. Influence of sex on survival rates of HPV-positive oropharyngeal cancers. *Front Oncol.* 2022;12:917890.
169. Nemeth Blažić T, editor Značenje HPV-udruženih karcinoma u Hrvatskoj i svijetu- usporedba epidemioloških parametara. „Humani papiloma virus (HPV) i HPV-udruženi karcinomi “; 2024.
170. Fakhry C, Westra WH, Li S i sur. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(4):261-9.
171. Salazar CR, Anayannis N, Smith RV i sur. Combined P16 and human papillomavirus testing predicts head and neck cancer survival. *International journal of cancer.* 2014;135(10):2404-12.
172. Allegra E, Bianco MR, Mignogna C, Caltabiano R, Grasso M, Puzzo L. Role of p16 expression in the prognosis of patients with laryngeal cancer: a single retrospective analysis. *Cancer Control.* 2021;28:10732748211033544.
173. Dahm V, Haitel A, Kaider A, Stanisz I, Beer A, Lill C. Cancer stage and pack-years, but not p16 or HPV, are relevant for survival in hypopharyngeal and laryngeal squamous cell carcinomas. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology.* 2018;275:1837-43.
174. Liu C, Mann D, Sinha UK, Kokot NC. The molecular mechanisms of increased radiosensitivity of HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC): an extensive review. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2018;47(1):59.
175. de Ruiter EJ, Mulder FJ, Koomen BM i sur. Comparison of three PD-L1 immunohistochemical assays in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Mod Pathol.* 2021;34(6):1125-32.

176. Zhou L, Li Y, Gao W i sur. Assessment of tumor-associated immune cells in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2019;145(7):1761-72.
177. Shimizu S, Hiratsuka H, Koike K i sur. Tumor-infiltrating CD8(+) T-cell density is an independent prognostic marker for oral squamous cell carcinoma. *Cancer Med*. 2019;8(1):80-93.

POPIS SLIKA

Slika 1. Endoskopski prikaz grkljana; A – polip desne glasnice, B – leukoplakija obje glasnice, C – karcinom lijeve glasnice

Slika 2. Mikrolaringoskopski prikaz lezije grkljana; A – namještaj bolesnika i mikroskopa, B – položaj laringoskopa, C – uredan nalaz glasnica, D – polip glasnice, E – leukoplakija glasnice, F – karcinom glasnice

Slika 3. PD-1/PD-L1 signalni put

Slika 4. Postupak izrade tkivnih mikroareja

Slika 5. Primjer imunohistokemijskog izražaja CD4⁺ stanica u dva različita odjeljka. Intraepitelni odjeljak s iCD4⁺ stanicama (gnijezda tumorskih stanica označena s bijelom zvjezdicom) i stromalni odjeljak sa sCD4⁺ stanicama (označen crnom zvjezdicom) (A): 100× povećanje; (B): 300× povećanje (iCD4⁺: intraepitelno; sCD4⁺: stromalno).

Slika 6. Niski i visoki izražaj imunohistokemijskog bojenja CD4⁺ (A,B), CD8⁺ (C,D), CD68⁺ (E,F), CD163⁺ (G,H) i PD-L1-negativnih i -pozitivnih CPS/TPS (I, J) u displazijama grkljana. s-stromalni; u-ukupni; i-intraepitelni.

Slika 7. Niski i visoki izražaj imunohistokemijskog bojenja CD4⁺ (A,B), CD8⁺ (C,D), CD68⁺ (E,F), CD163⁺ (G,H) i PD-L1-negativnih i -pozitivnih CPS/TPS (I, J) u karcinomu grkljana. s-stromalni; u-ukupni; i-intraepitelni.

Slika 8. Preživljenje specifično za bolest; A – CD4 stromalni u svih bolesnika s karcinomom, B – CD8 intraepitelni u svih bolesnika s karcinomom, C – CD8 intraepitelni u bolesnika s uznapredovalim karcinomom

Slika 9. Preživljenje specifično za bolest; A – CD68 intraepitelni u svih bolesnika s karcinomom, B – CD68 ukupni u svih bolesnika s karcinomom, C – CD163 intraepitelni u svih bolesnika s karcinomom, D – CD163 ukupni u svih bolesnika s karcinomom, E – CD68 intraepitelni u bolesnika s uznapredovalim karcinomom

Slika 10. Preživljenje bez bolesti; A – CD8 ukupni u svih bolesnika s karcinomom, B – CD68 intraepitelni u svih bolesnika s karcinomom, C – CD68 intraepitelni u bolesnika s uznapredovalim karcinomom grkljana

Slika 11. Preživljenje specifično za bolest; A – PD-L1-CD8 nizak u odnosu na druge skupine (PD-L1+CD8 visok, PD-L1+CD8 nizak i PD-L1-CD8 visok) koristeći CPS za izražaj PD-L1, B – PD-L1-CD8 nizak u odnosu na druge skupine (PD-L1+CD8 visok, PD-L1+CD8 nizak i PD-L1-CD8 visok) koristeći TPS za izražaj PD-L1

POPIS TABLICA

Tablica 1. TNM klasifikacija skvamoznog karcinoma grkljana

Tablica 2. Klinički stadiji karcinoma grkljana

Tablica 3. Najčešće korišteni klasifikacijski sustavi za prekancerozne lezije

Tablica 4. Demografske značajke skupine bolesnika s karcinomom grkljana

Tablica 5. Karakteristike korištenih primarnih protutijela za imunohistokemijsko bojanje

Tablica 6. Granične vrijednosti za stanice tumorskog mikrookoliša

Tablica 7. Usporedba PD-L1 izražaja i tumorskog mikrookoliša u laringealnim lezijama

Tablica 8. Usporedba izražaja PD-L1 i tumorskog mikrookoliša između displazija niskog i visokog stupnja

Tablica 9. Korelacija PD-L1 (CPS i TPS) s intraepitelnim i stromalnim CD4, CD8, CD68 i CD163 pozitivnim stanicama u laringealnim displazijama

Tablica 10. Usporedba izražaja ispitivanih markera u displazijama s i bez progresije u karcinom

Tablica 11. Prediktori za progresiju displazija u karcinom

Tablica 12. Usporedba izražaja PD-L1, CD4, CD8, CD68 i CD163 između ranog i uznapredovalog stadija karcinoma

Tablica 13. Korelacija CPS-a i TPS-a s intraepitelnim i stromalnim CD4, CD8, CD68 i CD163 pozitivnim stanicama u skvamoznom karcinomu grkljana

Tablica 14. Korelacija CPS-a s kliničko patološkim parametrima u skvamoznom karcinomu grkljana

Tablica 15. Korelacija stanica tumorskog mikrookoliša s pušenjem, histološkim gradusom, statusom regionalnih limfnih čvorova i limfovaskularnom invazijom u skvamoznom karcinomu grkljana

Tablica 16. Korelacija stanica tumorskog mikrookoliša s kliničkim stadijem skvamoznog karcinoma grkljana

Tablica 17. Univarijatna analiza preživljavanja za cijelu i uznapredovalu skupinu karcinoma grkljana

Tablica 18. Multivarijatna analiza za cijelu skupinu karcinoma grkljana

Tablica 19. Prediktori za recidiv karcinoma grkljana

POPIS POKRATA

AJCC – eng. *The American Joint Committee on Cancer*, Američko udruženje za rak

AUC – eng. *Area under the ROC curve*, područje ispod ROC krivulje

CPS – eng. *Combined Positive Score*, kombinirani pozitivni rezultat

CSF1 – eng. *Colony stimulating factor-1*, faktor 1 koji stimulira kolonije

CT – eng. *Computerised tomography*, računalna tomografija

DFS – eng. *Disease free survival*, preživljenje bez bolesti

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

DSS – eng. *Disease specific survival*, preživljenje specifično za bolest

EGFR – eng. *Epidermal growth factor receptor*, receptor epidermalnog faktora rasta

FDA – eng. *Food and Drug Administration*, agencija za hranu i lijekove

HE – eng. *Hematoxylin and eosin*, hemalaun eozin

HPV – humani papilloma virus

IBIS - Integrirani bolnički informacijski sustav

IMRT – eng. *intensity-modulated radiation therapy*, radioterapija modularnog intenziteta

LD – laringealna displazija

MR – magnetska rezonancija

NCCN smjernice – eng. *National Cancer Comprehensive Network*, smjernice za liječenje raka

OR – eng. *Odds ratio*, omjer izgleda

OS – eng. *Overall survival*, ukupno preživljenje

PCR – eng. *Polymerase Chain Reaction*, lančana reakcija polimerazom

PD-L1 – eng. *Programmed death ligand 1*, programirani ligand smrti 1

PD-L2 - eng. *Programmed death ligand 2*, programirani ligand smrti 2

PD-1 – eng. *Programmed cell death protein 1*, receptor programirane stanične smrti 1

PET/CT - pozitronska emisijska tomografija s kompjutoriziranom tomografijom

ROC – eng. *Receiver operating characteristic*, krivulja radne karakteristike prijemnika

RT – radioterapija

SAD – Sjedinjene Američke Države

SD – eng. *Standard deviation*, standardna devijacija

SKG – skvamozni karcinom grkljana

SKGV – skvamozni karcinomi glave i vrata

TAM – eng. *Tumor-associated macrophage*, tumorom povezani makrofagi

TIL – eng. *Tumor-infiltrating lymphocytes*, limfociti koji infiltriraju tumor

TLM – transoralna laserska mikrokirurgija

TMA – eng. *Tissue microarrays*, tkivne mikroareje

TNM klasifikacija – eng. *Tumor, Node, Metastases classification*, Tumor, nodus, metastaza klasifikacija

TPS – eng. *Tumor proportion score*, rezultat proporcije tumoraž

WHO - eng. *World Health Organisation*, Svijetska zdravstvena organizacija

ŽIVOTOPIS

- Ime i prezime: Filip Tudor
- Adresa: Ede Jardaša 42, 51000 Rijeka, Croatia
- Telefonski broj: +385 91 212 41014
- Mail: filipt8@gmail.com
- Datum rođenja: 21/02/1995
- Državljanstvo: Republike Hrvatske

Radno iskustvo

- 12/2019 - Specijalizant otorinolaringologije, Klinika za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata, Klinički bolnički centar Rijeka
- 1/2021 – Naslovni asistent na Katedri za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

Edukacija i usavršavanja

- 2001 – 2005 Osnovna škola Gelsi, Rijeka
- 2005 – 2009 Osnovna škola Podmurvice, Rijeka
- 2009 – 2013 Gimnazija Andrije Mohorovičića Rijeka
- 2013 – 2019 Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
- 7.8.2017. – 2.8.2017. Graz, Austria Medical University of Graz Observership Program
- 9.5.2018. - EMSOS training day 2018., Amsterdam, The Netherlands
- 6.8 – 24.8.2018. Medical University of Graz Observership Program, Graz, Austria
- ALS tečaj, Rijeka, 22.11.2019.-24.11.2019.
- 31.1 i 1.2 2020. Tečaj: Novi šivaći materijali, transplantati i lokalni režnjevi - Osnovni tečaj, KB Dubrava, Zagreb,
- 43rd Annual Meeting of the European Academy of Facial Plastic Surgery (1st Virtual Meeting of EAFPS, September 19-20, 2020).
- 82nd International Course for Stepwise Flap Raising Aachen 15th February – 17th February 2024
- 24th International Course on Reconstructive and Aesthetic Surgery of the Nose and Face June 12-14, 2024
- Comprehensive head and neck dissection course Ljubljana 23rd - 25th October 2024
- „6th International Comprehensive Microsurgery Course“ December 15th – December 17th 2024

Članstva

- Hrvatska liječnička komora
- Hrvatsko društvo za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata
- Hrvatski zbor učitelja i trenera sportova na snijegu

Poglavlja u knjigama

- Suradnik u sveučilišnom udžbeniku - Anton Tudor, Tomislav Mađarević. Kuk. Zagreb: Medicinska naklada; 2018
- Jedan od autora udžbenika Alpsko skijanje. Zagreb: Znanje; 2017

Znanstveni, pregledni i stručni radovi

- Tudor F, Marijić B, Babarović E, Hadžisejdić I. Significance of PD-L1 and Tumor Microenvironment in Laryngeal Squamous Cell Cancer. *Cancers (Basel)*. 2024 Jul 25;16(15):2645.
- Tudor F, Košec A, Pegan A. Internal jugular vein thrombosis caused by invasive pharyngeal cancer: a case report and literature review. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2024 Jul-Aug;90(4):101425.
- Manestar D, Malvic G, Velepich M, Vukelic J, Vrebac I, Tudor F, Vukelic I, Braut T. Perioperative substitution testosterone therapy in patients with advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2023 Aug;188:104062.
- Marijić B, Tudor F, Janik S, Grasl S, Frommlet F, Maržić D, Hadžisejdić I, Vukelić J, Braut T, Velepich M, Erovc BM. Long-Term Care and Follow-Up in Laryngeal Cancer Patients: A Multicenter Retrospective Analysis. *J Pers Med*. 2023 May 31;13(6):927.
- Marijić B, Braut T, Tudor F, Filipović N, Hadžisejdić I, Šitum M, Crnarić I. Giant rhinophyma with olfactory and breathing dysfunction successfully treated by shave excision and electrocautery. *Dermatol Ther*. 2021 Sep;34(5):e15029.
- Maržić D, Marijić B, Braut T, Janik S, Avirović M, Hadžisejdić I, Tudor F, Radobuljac K, Čoklo M, Erovc BM. IMP3 Protein Overexpression Is Linked to Unfavorable Outcome in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2021 Aug 26;13(17):4306.
- Marijić B, Pegan A, Lukinović J, Tudor F. Smjernice za evaluaciju čvora na vratu. *Medica Jadertina [Internet]*. 2020 [pristupljeno 03.12.2024.];50(3):213-218.
- Tudor F, Čuš N, Klemar A, Malvić G, Hadžisejdić I, Velepich M i sur. Funkcionalni i onkološki ishodi bolesnika liječenih frontolateralnom laringektomijom. *Medica Jadertina [Internet]*. 2022 [pristupljeno 03.12.2024.];52(3):171-177.