

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Arijan Zubović

POVEZANOST EKSPRESIJE PD-L1, PD-L2 I AKTIVACIJE
INFLAMASOMA NLRP3 U PLANOCELULARNOM KARCINOMU
USNE ŠUPLJINE

Doktorski rad

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Arijan Zubović

POVEZANOST EKSPRESIJE PD-L1, PD-L2 I AKTIVACIJE
INFLAMASOMA NLRP3 U PLANOCELULARNOM KARCINOMU
USNE ŠUPLJINE

Doktorski rad

Mentorica:

Prof.dr.sc. Margita Belušić, dr.med.

UNIVERSITY OF RIJEKA
FACULTY OF MEDICINE

Arijan Zubović

CORRELATION BETWEEN EXPRESSION OF PD-L1, PD-L2
AND ACTIVATION OF THE NLRP3 INFLAMMASOME IN
SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE ORAL CAVITY

Doctoral thesis

Mentor:

Assoc. prof. Margita Belušić, MD, PhD

Mentorica rada: prof.dr.sc. Margita Belušić, dr.med.

Doktorski rad obranjen je dana _____ u/na _____
_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Rad ima _____ stranica

UDK: _____

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1. Etiologija i epidemiologija oralnog planocelularnog karcinoma.....	1
1.2 Klasifikacija oralnog planocelularnog karcinoma.....	3
1.3 Prekancerozne lezije usne šupljine.....	6
1.4 Liječenje oralnog karcinoma.....	7
1.5 Programirani ligand smrti 1 (PD-L1)	9
1.6 Programirani ligand smrti 2 (PD-L2)	11
1.7 NLRP3 inflammasom.....	12
1.8 Povezanost PD-L1 i NLRP3 inflammasoma	14
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	16
2.1 Hipoteza	16
3. ISPITANICI I METODE	17
3.1 Ispitivana skupina	17
3.2 Metode istraživanja.....	20
3.2.1 Metoda tkivnih mikroareja (TMA)	20
3.2.2 Imunohistokemijska analiza.....	21
3.2.3. Analiza imunohistokemijskog bojanja.....	22
3.3 Etički principi u istraživanju	24
3.4 Statistička obrada podataka	24
4. REZULTATI.....	26
4.1.1 Izražaj PD-L1 protutijela u analiziranim skupinama ispitanika	27
Ovi rezultati upućuju na pojačanu imunomodulatornu aktivnost PD-L1 u malignim lezijama u usporedbi s prekanceroznim i benignim promjenama.....	31
4.1.2 Izražaj PD-L2 protutijela u analiziranim skupinama ispitanika	31
4.1.3 Izražaj NLRP3 protutijela u analiziranim skupinama ispitanika	36
4.1.4 Izražaj ASC protutijela u analiziranim skupinama ispitanika	40
4.1.5 Izražaj Caspase 1 protutijela u analiziranim skupinama ispitanika	44
4.2 Rezultati izražaja analiziranih markera između skupina ispitanika	49
4.3 Rezultati istraživanja o povezanosti ekspresije PD-L1 i PD-L2 s kliničkim i patohistološkim osobinama tumora kod bolesnika s OPCC	51

4.4 Rezultati analize ekspresija markera i parametara agresivnosti tumora u skupini ispitanika s OPCC	56
4.5 Povezanosti analiziranih parametara u skupini ispitanika s OPCC	61
4.6 Rezultati analize ekspresije markera i parametara agresivnosti tumora u skupini ispitanika s metastazama OPCC u limfne čvorove vrata	64
4.7 Povezanosti analiziranih parametara u skupini ispitanika s metastazama OPCC u limfne čvorove vrata	69
4.8 Rezultati prognostičke analize	72
4.9 Analiza preživljenja	74
5. RASPRAVA	77
6. ZAKLJUČCI	87
7. LITERATURA	89
POPIS TABLICA	102
POPIS POKRATA	106
ŽIVOTOPIS	109

PREDGOVOR

Istraživanje na kojem se temelji ovaj doktorski rad izrađeno je na Klinici za maksilofacijalnu kirurgiju, a u suradnji sa Kliničkim zavodom za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Rijeka.

ZAHVALE

Želim zahvaliti prof.dr.sc. Margiti Belušić na vodstvu kroz cijelo razdoblje doktorata. Hvala Vam što ste mi ukazali povjerenje na samom početku, te mi svojim iskustvom, znanjem i potporom dali sve potrebno da isti privedem kraju. Hvala što ste vjerovali u mene.

Hvala prof.dr.sc. Gordani Zamolo na pomoći i suradnji, kao i svim djelatnicima Kliničkog zavoda za patologiju.

Veliko hvala mojim roditeljima na podršci i ljubavi koju su mi dali tijekom cijelog razdoblja specijalizacije i doktorata. Hvala mojoj sestri Loreni koja je svojim iskustvom i stručnošću uvelike doprinijela ovom radu.

Na kraju, najveću zahvalu kao i posvetu upućujem svojoj supruzi Heleni koja je svojim strpljenjem i ljubavi najviše pridonijela završetku ovog rada kao i kćeri Nicole za sve prespavane noći kako bi tata mogao pisati doktorat.

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Oralni planocelularni karcinom obilježen je složenim interakcijama tumorskih stanica i imunološkog mikrookruženja, a pouzdani prognostički i prediktivni biomarkeri još uvijek nisu jasno definirani. NLRP3 se ističe kao potencijalni biološki marker i terapijska meta. Cilj ovog istraživanja bio je analizirati ekspresiju PD-L1, PD-L2, NLRP3, ASC i Caspase 1 u planocelularnom karcinomu usne šupljine, metastazama u cervikalne limfne čvorove, leukoplakiji i benignim lezijama te procijeniti njihovu povezanost s kliničko-patološkim obilježjima, parametrima agresivnosti i ishodom bolesti.

Ispitanici i metode: Provedena je retrospektivna kohortna studija na 121 bolesniku liječenom na Klinici za maksilofacijalnu kirurgiju KBC-a Rijeka. Analiziran je 61 uzorak primarnog tumora, 30 metastaza u limfnim čvorovima, 30 leukoplakija, te 30 benignih lezija (papilomi i fibromi). Ekspresija PD-L1, PD-L2, NLRP3, ASC i Caspase 1 određena je imunohistokemijski metodom tkivnih mikroareja (TMA).

Rezultati: Utvrđena je značajno viša ekspresija PD-L1, PD-L2, NLRP3 i Caspase 1 u karcinomima i metastazama u odnosu na leukoplakiju i benigne lezije, dok za ASC nije nađena razlika među skupinama. Nije dokazana statistički značajna povezanost analiziranih biljega s TNM klasifikacijom, stadijem bolesti, progresijom ni sveukupnim preživljenjem, iako trendovi upućuju na moguću povezanost više ekspresije s većom agresivnošću tumora. ROC analiza nije potvrdila njihovu prediktivnu vrijednost za razvoj metastaza. S druge strane, klasični kliničko-patološki parametri (ENE, PNI, LVI te T i N stadij) pokazali su snažnu povezanost s agresivnošću bolesti i lošijim preživljenjem.

Zaključak: PD-L1, PD-L2, NLRP3 i Caspase 1 pokazuju povećanu ekspresiju u planocelularnom karcinomu i metastazama u odnosu na prekancerozne i benigne lezije, što potvrđuje njihovu ulogu u tumorskom mikrookruženju i karcinogenezi. Međutim, njihova prognostička i prediktivna vrijednost ostaje ograničena. Povezanost NLRP3 i ASC s lokalizacijom tumora upućuje na moguću biološku relevantnost, te opravdava daljnja istraživanja njihovog terapijskog potencijala.

Ključne riječi: oralni karcinom; leukoplakia; PD-L1; PD-L2; NLRP3 inflamatom;

ABSTRACT

Objective: Oral squamous cell carcinoma is characterized by complex interactions between tumor cells and the immune microenvironment, while reliable prognostic and predictive biomarkers remain lacking. NLRP3 has emerged as a potential biological marker and therapeutic target. This study aimed to analyze the expression of PD-L1, PD-L2, NLRP3, ASC, and Caspase 1 in oral squamous cell carcinoma, cervical lymph node metastases, leukoplakia, and benign lesions, and to assess their association with clinicopathological features, tumor aggressiveness, and disease outcome.

Patients and Methods: A retrospective cohort study included 121 patients treated at the Department of Maxillofacial Surgery, University Hospital Centre Rijeka. A total of 61 primary tumors, 30 lymph node metastases, 30 leukoplakia samples, and 30 benign lesions were analyzed. Marker expression was evaluated using immunohistochemistry on tissue microarrays.

Results: PD-L1, PD-L2, NLRP3, and Caspase 1 showed significantly higher expression in carcinomas and metastases compared to leukoplakia and benign lesions, while ASC showed no difference. No significant association was found with TNM stage, disease progression, or overall survival, although a trend toward higher expression in more aggressive tumors was observed. ROC analysis did not confirm predictive value for metastasis. In contrast, established clinicopathological parameters (ENE, PNI, LVI, and T and N stage) were strongly associated with disease aggressiveness and poorer survival.

Conclusion: The analyzed markers show increased expression in carcinoma and metastases, supporting their role in the tumor microenvironment and carcinogenesis, but their prognostic and predictive value remains limited. The association of NLRP3 and ASC with tumor localization suggests biological relevance and warrants further investigation of their role in OSCC progression and their potential as therapeutic targets.

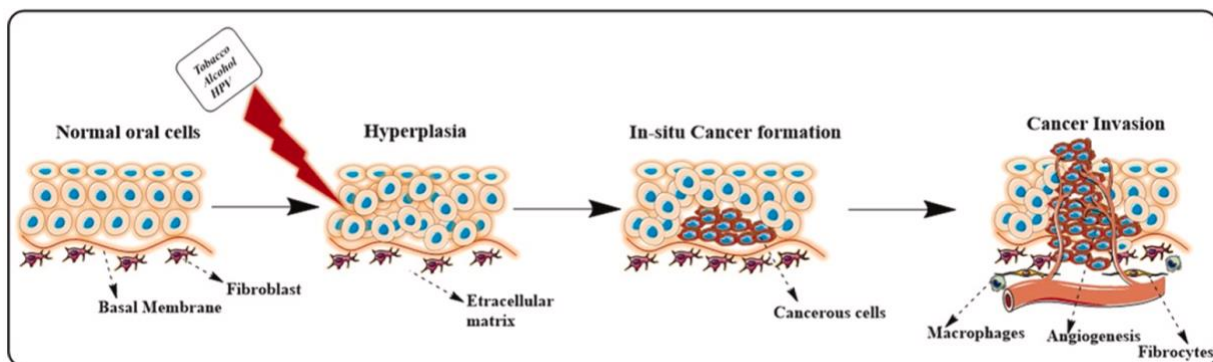
Key words: oral cancer; leukoplakia; PD-L1; PD-L2; NLRP3 protein

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Etiologija i epidemiologija oralnog planocelularnog karcinoma

Karcinom usne šupljine (OPCC) šesnaesti je najčešći zloćudni tumor na svijetu s procijenjenom godišnjom incidencijom od 377000 novooboljelih i smrtnošću od oko 177000 slučajeva [1]. Karcinom usne šupljine u pravilu se češće pojavljuje u osoba starijih od 40 godina u usporedbi s mlađom populacijom. Na globalnoj razini zabilježena je veća učestalost OPCC-a u muškaraca nego u žena s incidencijom od 5,8 naspram 2,3 na 100.000 stanovnika [2]. Definira se kao zloćudna novotvorina usne šupljine, te obuhvaća sljedeće anatomske podregije: bukalnu sluznicu, dno usne šupljine, prednji dio jezika, alveolarne grebene, retromolarni trigon, tvrdo nepce i unutarnju površinu usnica [3]. Oralne premaligne lezije, uključujući leukoplakiju, eritroplakiju i submukoznu fibrozu mogu prethoditi razvoju malignih tumora usne šupljine. Više od 90 % karcinoma usne šupljine potječe iz pločastog epitela, zbog čega se najčešće označava kao planocelularni karcinom usne šupljine (OPCC) [3]. Ukupno petogodišnje preživljenje (OS) i preživljenje specifično za bolest (DSS) u istraživanjima iznose oko 51,2 % odnosno 59,2 % [4]. Duhan, alkohol, te infekcije visokorizičnim tipovima HPV-a osobito HPV 16 i HPV 18 dobro su utvrđeni čimbenici rizika za razvoj raka usne šupljine i orofarinksa [5] (Slika 1.). Pušači imaju 8,4 puta veći rizik za razvoj karcinoma usne šupljine (OPCC) u usporedbi s nepušačima [6]. Prema podacima Međunarodne agencije za istraživanje raka (International Agency for Research on Cancer, IARC), alkohol je klasificiran kao karcinogen 1. skupine. Konzumacija alkohola povezana je s povećanim rizikom razvoja karcinoma usne šupljine, ždrijela, grkljana, jednjaka, jetre, kolorektalnog karcinoma, te karcinoma dojke u žena [20,21]. Mogući mehanizam alkoholom posredovane karcinogeneze uključuje djelovanje enzima alkohol-dehidrogenaze (ADH), koji oksidira etanol u acetaldehid, intermedijarni metabolit sposoban reagirati s DNA i stvarati DNA adukte, te inducirati oksidativni stres i interferirati sa DNA mehanizmima za popravak. Ovi adukti mogu uzrokovati mutacije ili inhibirati sintezu DNA, čime potiču nastanak karcinoma [7]. Alkohol djeluje kao neovisni

rizični čimbenik, no u kombinaciji s pušenjem oba čimbenika djeluju sinergistički, te povećavaju rizik razvoja OPCC-a čak 35 puta [8]. Smatra se da je 2–8 % karcinoma usne šupljine uzrokovano infekcijom humanim papilomavirusom (HPV) [9]. HPV su mali, kružni DNA virusi promjera 52–55 nm, okruženi proteinskom kapsidom. Visokorizični tipovi HPV-a, osobito HPV16 i HPV18, ekspimiraju onkoproteine E6 i E7, koji inaktiviraju ključne tumorsupresorske gene p53 i pRb, što dovodi do nekontrolirane proliferacije stanica i razvoja karcinoma [9].



Slika 1. Shematski prikaz karcinogeneze. *Preuzeto iz rada Chamoli i sur. [2]*

1.2 Klasifikacija oralnog planocelularnog karcinoma

Tradicionalno je najveća dimenzija tumora bila najvažnija karakteristika za određivanje T-stadija u karcinomu usne šupljine. Budući da je pokazano kako dubina invazije (DOI) ima značajnu prognostičku vrijednost, pri čemu dublji tumori nose povećan rizik metastaza u limfne čvorove i lošije preživljenje specifično za bolest, ovaj je parametar uključen u kategorizaciju T-stadija u 8. izdanju AJCC-a (Tablica 1.) [10]. Klinička procjena točne dubine invazije može biti zahtjevna, no u rukama iskusnih kirurga glave i vrata obično je moguće razlikovati tanke (≤ 5 mm), srednje debele (> 5 mm i ≤ 10 mm) i debele (> 10 mm) tumore.

U prošlosti su usnice također bile uključene među primarne tumore usne šupljine. Danas se usnica dijeli na sluznični (mukozni) i kožni dio, pri čemu se sluznični dio ubraja u usnu šuplinu. Kategorija N također je izmijenjena u 8. izdanju AJCC-a. Pokazano je da ekстранodalna ekstenzija (ENE) ima snažan utjecaj na prognozu većine karcinoma glave i vrata s iznimkom tumora povezanih s HPV-om, te je stoga uključena u N-kategoriju [11]. ENE je jedan od najvažnijih prognostičkih čimbenika u karcinomima glave i vrata. Kako bi se bolest klinički klasificirala kao ENE+, moraju postojati nedvosmisleni klinički znakovi ENE-e, potkrijepljeni jasnim radiološkim dokazima. Valja napomenuti da se nakon što se klinički utvrdi ENE, bolest klasificira kao cN3b. U slučaju sumnje, treba dodijeliti nižu kategoriju (ENE-) [12].

Tablica 1. TNM klasifikacija oralnog planocelularnog karcinoma

TX	Primarni tumor se ne može procijeniti
Tis	Karcinom in situ
T1	Tumor ≤ 2 cm i dubina invazije (DOI) ≤ 5 mm
T2	Tumor ≤ 2 cm s DOI > 5 mm i ≤ 10 mm ili tumor > 2 cm i ≤ 4 cm s DOI ≤ 10 mm
T3	Tumor > 4 cm ili bilo koji tumor s DOI > 10 mm
T4 T4a T4b	Tumor zahvaća susjedne strukture (npr. prodor kroz kortikalnu kost mandibule ili maksile ili zahvaćanje maksilarnog sinusa ili kože lica) Tumor zahvaća žvačni prostor, pterigoidne ploče ili bazu lubanje i/ili obuhvaća unutarnju karotidnu arteriju
NX	Regionalni limfni čvorovi se ne mogu procijeniti
N0	Nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
N1	Metastaza u jednom ipsilateralnom limfnom čvoru, ≤ 3 cm i bez ekстранodalne ekstenzije (ENE–)
N2 N2a N2b N2c	Metastaza u jednom ipsilateralnom limfnom čvoru > 3 cm i ≤ 6 cm i bez ekстранodalne ekstenzije (ENE–) Metastaze u više ipsilateralnih limfnih čvorova, ≤ 6 cm i bez ekстранodalne ekstenzije (ENE–) Metastaze u bilateralnim ili kontralateralnim limfnim čvorovima, ≤ 6 cm i bez ekстранodalne ekstenzije (ENE–)
N3 N3a N3b	Metastaza u limfnom čvoru > 6 cm i bez ekстранodalne ekstenzije (ENE–) Metastaze u bilo kojem limfnom čvoru s klinički prisutnom ekстранodalnom ekstenzijom (ENE+)
Mx	Status udaljenih metastaza ne može biti određen
M0	Bez udaljenih metastaza
M1	S udaljenim metastazama

Tablica 2. Klinički stadij oralnog planocelularnog karcinoma

Stadij 0	Tis	N0	M0
Stadij I	T1	N0	M0
Stadij II	T2	N0	M0
Stadij III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Stadij IVA	T4a	N0	M0
	T4a	N1	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N2	M0
Stadij IVB	Bilo koji T	N3	M0
	T4b	Bilo koji N	M0
Stadij IVC	Bilo koji T	Bilo koji N	M1

1.3 Prekancerozne lezije usne šupljine

Klinička definicija temelji se na kliničkom pregledu i uključuje leukoplakiju (bijela promjena oralne sluznice), eritroplakiju (crvena promjena oralne sluznice), lihen planus, te oralnu submukoznu fibrozu, koju karakterizira ireverzibilna fibroza submukoznog tkiva. Histopatološka definicija temelji se na prisutnosti epitelne displazije [13]. Značajan dio slučajeva OPCC-a povezan je s klinički evidentnom oralnom leukoplakijom (OL) koja je najčešća prekanceroza usne šupljine [14]. Oralna leukoplakija pokazuje svjetsku prevalenciju od 1,5–4,3%, sa stopom maligne transformacije u rasponu od 5 do 18% u različitim epidemiološkim studijama [15]. Oralni karcinomi najčešće prethodno nastaju iz oralnih prekanceroznih lezija, koje se definiraju klinički i histopatološki.

Oralna leukoplakija definira se kao bijela promjena sluznice koja se ne može odstraniti struganjem, te se ne može pripisati nijednom drugom patološkom procesu. Naziv potječe od grčkih riječi *leuko* (bijelo) i *plakia* (ploča) [16]. Leukoplakija može biti tanka ili debela, a prema kliničkom izgledu dijeli se na homogenu (dobro ograničena, blago uzdignuta ili naborana površina) i nehomogenu (pjegava ili nodularna promjena) [17]. Procijenjena globalna prevalencija oralne leukoplakije iznosi između 0,5 % i 3,4 %, dok se prosječna stopa maligne transformacije procjenjuje na približno 1 % [16]. Ipak, u literaturi je zabilježen širok raspon stope maligne transformacije, od 0,13 % do 17,5 % [18]. Prisustvo epitelne displazije smatra se najznačajnijim prediktorom maligne transformacije, pri čemu se stope progresije navode između 15 % i 30 % tijekom duljeg razdoblja praćenja [18]. Rizik maligne transformacije ovisi o stupnju displazije; lezije s visokim stupnjem displazije imaju približno 4,5 puta veći rizik maligne preobrazbe u usporedbi s lezijama blagog stupnja displazije [19].

Eritroplakija oralne sluznice definira se kao jarko crvena, baršunasta promjena koja se klinički ne može svrstati u nijedno drugo prepoznatljivo stanje [20]. Može se pojaviti u neposrednoj blizini leukoplakije, a za takve miješane lezije uveden je pojam eritroleukoplakija. Iako je eritroplakija znatno rjeđa od leukoplakije, znatno češće sadrži planocelularni karcinom in situ ili invazivni karcinom. Većina leukoplakijskih lezija histološki pokazuje hiperkeratozu ili epitelnu hiperplaziju, dok je kod eritroplakije

najčešći nalaz displazija ili karcinom in situ. Većina studija o prevalenciji eritroplakije provedena je u jugoistočnoj Aziji, gdje se prevalencija kreće u rasponu od 0,02 % do 0,83 %. U usporedbi s ostalim potencijalno malignim oralnim lezijama, eritroplakija nosi najveći rizik maligne transformacije [18]. Zbog visokog rizika da je karcinom već prisutan u trenutku dijagnoze, kao i zbog izraženog potencijala za malignu progresiju, preporuka za liječenje eritroplakije je široka lokalna ekscizija [21].

Kod OPCC-a, kojem često prethodi premaligna lezija, različiti molekularni putevi i signalni proteini igraju glavnu ulogu u malignim transformacijama. PD-1/PD-L1 put sudjeluje u imunološkom izbjegavanju tumora. Identifikacija PD-1 i PD-L1 puta u oralnim premalignim lezijama može dovesti do novijih spoznaja ne samo za bolje razumijevanje molekularne patogeneze i maligne transformacije, već i za buduće modalitete liječenja [22].

1.4 Liječenje oralnog karcinoma

Kirurška resekcija s rekonstrukcijom ili bez nje uz adjuvantnu terapiju prema indikaciji predstavlja temelj liječenja oralnog karcinoma kada je tumor resektabilan. Kirurško liječenje temelji se ponajprije na veličini tumora, prema kojoj se određuje odgovarajući opseg operacije. Osobito u bolesnika s karcinomom jezika, kirurški zahvati mogu rezultirati značajnim poremećajima funkcija hranjenja i govora [23]. Radioterapija predstavlja oblik lokalnog liječenja, pri čemu može doći do oštećenja kože i sluznice u području zračenja, uključujući radijacijski dermatitis i mukozitis [24]. Kemoterapija se primjenjuje kao sistemska terapija, te može dovesti do pancitopenije i izraženih gastrointestinalnih nuspojava, poput mučnine i povraćanja [19]. Uvođenje adjuvantne sistemske terapije cisplatinom u kombinaciji s adjuvantnom radioterapijom dovelo je do poboljšanja u ishodu liječenja, no ti rezultati i dalje nisu zadovoljavajući [25] [26]. Neresektabilni oralni karcinomi liječe se uglavnom s palijativnom namjerom, primjenom palijativne sistemske terapije ili palijativne radioterapije [27].

Unatoč dostupnosti navedenih terapijskih pristupa, i dalje postoji nedostatak sigurnih i učinkovitih strategija liječenja oralnog karcinoma, što je u velikoj mjeri posljedica

složenosti tumorskog mikrookruženja [28]. Tumorsko mikrookruženje usko je povezano s nastankom, progresijom, metastaziranjem i recidivom malignih tumora, te se sastoji od komponenti izvanstaničnog matriksa i celularnih komponenti, uključujući fibroblaste, angiogene stanice, imunološke stanice, limfne endotelne stanice i cirkulirajuće endotelne stanice [29]. Tumorski mikrookoliš omogućuje prijenos signala putem autokrinih i parakrinih signalnih putova, čime regulira proliferaciju, invaziju i metastaziranje tumorskih stanica [30]. Osim toga, tumorsko mikrookruženje može inhibirati proliferaciju i aktivnost tumor-specifičnih citotoksičnih T limfocita, te poticati regulatorne T stanice (Treg), što dovodi do smanjene sekrecije imunološki aktivirajućih citokina, poput tumorskog nekroza faktora alfa (TNF- α) i interferona gama (IFN- γ), uz istodobno povećano lučenje imunosupresivnih citokina, kao što su interleukin-10 (IL-10) i transformirajući čimbenik rasta beta (TGF- β) [19].

Imunoterapija temeljena na blokadi imunoloških kontrolnih točaka (immune checkpoint blockade, ICB), osobito usmjerena na programirani receptor smrti 1 (programmed death-1, PD-1) i njegov ligand (PD-L1), pokazala je potencijal u jačanju antitumorskog imunskog odgovora inhibicijom njihove međusobne interakcije [31]. U kliničkim ispitivanjima zabilježeni su ohrabrujući rezultati primjene ovih terapijskih agensa, osobito u bolesnika rezistentnih na terapiju platinom [32]. Više monoklonalnih protutijela usmjerenih na PD-1/PD-L1 signalni put odobreno je ili se trenutačno ispituje u liječenju oralnog karcinoma, uključujući cemiplimab (NCT04398524), nivolumab (NCT03021993), sintilimab (NCT05000892) i toripalimab (NCT04825938) [33] [34]. Unatoč tome, ukupna stopa odgovora na terapiju monoklonalnim protutijelima i dalje je ograničena, te zahtijeva daljnje unaprjeđenje terapijskih strategija. Monoklonalna protutijela pokazala su potencijal i u prevenciji oralnog karcinoma. Oralna proliferativna verukozna leukoplakija rijetka je i terapijski rezistentna leukoplakija koja se smatra prekanceroznom lezijom s visokim rizikom progresije u oralni planocelularni karcinom ili verukozni karcinom. Nivolumab je pokazao potencijal u smanjenju bijelih lezija usne šupljine i smanjenju rizika razvoja karcinoma te se trenutačno ispituje u kliničkom ispitivanju za prevenciju OPVL-a (NCT03692325) [19].

Razvoj tumorske imunoterapije donio je novu nadu u liječenju malignih tumora, osobito u uznapredovalim stadijima bolesti. Zbog postojanja imunološke memorije, imunoterapija može ostvariti dugotrajan antitumorski učinak, čime ne samo da učinkovito suzbija primarni tumor, već može i smanjiti rizik recidiva te inhibirati metastaziranje. Stoga se imunoterapija smatra jednim od rijetkih terapijskih pristupa s potencijalom dugotrajne kontrole bolesti. Međutim, tumorska imunoterapija i dalje se suočava s brojnim izazovima, uključujući nisku stopu odgovora na liječenje te nedostatak učinkovitih i pouzdanih prediktivnih biomarkera terapijskog učinka. Upravo ti nedostaci predstavljaju jedan od najvećih izazova u postizanju precizne i personalizirane imunoterapije.

1.5 Programirani ligand smrti 1 (PD-L1)

Uloga imunološkog mikrokruženja u određivanju razvoja tumora i utjecaju na ishode i odgovore na liječenje dovela je do novog doba u liječenju raka [35] [36]. Imunološki odgovor je učinkovito manipuliran korištenjem raznih novih imunoterapeutskih lijekova, blokade imunoloških kontrolnih točaka, koji se primjenjuju samostalno ili u kombinaciji s drugim lijekovima, s ciljem spašavanja i/ili poticanja aktivacije već postojećeg antitumorskog imunološkog odgovora [37]. Izbjegavanje imunološkog odgovora je stanje koje omogućuje neoplastičnim stanicama preživljavanje, proliferaciju i širenje, te se pojavljuje kao prepoznati znak karcinoma [38]. Glavna strategija imunološke otpornosti tumorskih stanica iskorištava ekspresiju liganada programirane stanične smrti 1 i 2 (PD-L1 i PD-L2) za ciljanje receptora programirane stanične smrti 1 (PD-1) u aktiviranim T stanicama [39]. Tumori manipuliraju imunološkim kontrolnim točkama poput PD-1 kako bi omogućili rast tumora koji imunološki sustav ne kontrolira. PD-1 je imunološki receptor koji je dobro okarakteriziran kao negativna regulatorna molekula imunocita na imunološkim kontrolnim točkama. PD-1 ligandi pripadaju obitelji molekula B7 i uključuju PD-L1 (B7-H1) i PD-L2 (B7-DC) [40]. Prekomjerna ekspresija PD-L1 od strane tumorskih stanica može aktivirati put kontrolnih točaka PD-1 i njegovih liganda, vezanjem na PD-1 receptor i slabljenjem imunološkog odgovora. Vezanje antitijela koja ciljaju imunološke kontrolne točke, poput vezanja PD-1 na njegove ligande, može

izazvati imunološki odgovor protiv tumora blokadom PD-1/PD-L1 interakcije, te time reaktivacijom T-stanica [41]. Ekspresija PD-L1 je pojačana u raznim solidnim tumorima, te njegovo vezanje na PD-1 receptore T stanica inhibira citotoksičnost i proizvodnju citokina [42]. Štoviše, lokalna sekrecija interferona- γ od strane aktiviranih T stanica pojačava ekspresiju PD-L1 od strane tumorskih stanica, makrofaga, stanica koje prezentiraju antigen i T stanica, potičući daljnju imunosupresiju [43]. S uspjehom antitijela koja blokiraju interakciju između programirane stanične smrti 1 (PD-1) i liganda programirane stanične smrti 1 (PD-L1), u posljednjem desetljeću došlo je do revolucije u terapiji raka, što je rezultiralo odobrenjima od strane američke Agencije za hranu i lijekove (FDA) za liječenje raka pluća, raka bubrega, raka mjehura, melanoma, Hodgkinovog limfoma i drugih vrsta tumora poput raka dojke [44-46].

Unatoč dobro poznatoj ulozi PD-L1 u patogenezi oralnog planocelularnog karcinoma (OPCC), njegova uloga kao prognostičkog biomarkera nije utvrđena. Prethodne studije povezale su prekomjernu ekspresiju PD-L1 sa smanjenim [47] [48] ili produljenim preživljenjem [41]. Nasuprot tome, druga istraživanja nisu pronašla prognostički značaj ekspresije PD-L1 [49] [50]. Studije za procjenu ekspresije PD-L1 kao prediktora imunoterapijskog odgovora također su dale oprečne rezultate. Klinička ispitivanja pembrolizumaba istaknula su poboljšane stope preživljenja kod PD-L1-pozitivnih pacijenata [51], dok studije drugih monoklonalnih antitijela poput nivolumaba nisu pokazale prognostičku vrijednost PD-L1 ekspresije [52]. Različiti rezultati mogu se djelomično pripisati nedostatku standardiziranih metoda za imunohistokemiju PD-L1, npr. upotreba različitih antitijela i tehnika koje se koriste za detekciju i procjenu, zatim alternativne definicije pozitivnosti (npr. membransko ili citoplazmatsko bojenje), te varijacijama u graničnim vrijednostima testa [53]. Nadalje, aspekti tumorske biologije poput intertumorske i intratumorske ekspresije PD-L1 u tumorskim stanicama i tumor-infiltrirajućim imunološkim stanicama mogu također rezultirati neusklađenim podacima [54]. Nedavne studije izvještavaju da je 18,5–64,9 % slučajeva bilo obilježeno PD-L1 izražajem u ≥ 5 % tumorskih stanica uz upotrebu monoklonalnih protutijela [55] [47] [56]. Što se tiče praga za određivanje potencijala za primjenu PD-1/PD-L1 terapije, za HNSCC (planocelularni karcinom glave i vrata) još uvijek nije predložen odlučujući prag

PD-L1 pozitivnosti u tumorskim stanicama. U odvojenim kliničkim ispitivanjima koja su uključivala primjenu Nivolumaba i Pembrolizumaba za rekurentne/metastatske HNSCC-e, ukupna stopa odgovora (ORR) iznosila je 17,0–17,9 % među pacijentima s PD-L1 ekspresijom ≥ 1 %, dok se učinkovitost poboljšala na 27,1–27,9 % kod selekcije pacijenata s PD-L1 ekspresijom ≥ 10 –50 % [57] [51]. S obzirom na pozitivnu korelaciju između PD-L1 ekspresije i učinkovitosti blokade PD-1/PD-L1 osi u kliničkim ispitivanjima, postavljanje praga za stopu PD-L1 pozitivnosti radi izdvajanja populacije čini se otežanim. Nedavne studije su pokazale da PD-L1 ekspresija može biti potencijalni prognostički biljeg za primarni planocelularni karcinom glave i vrata (HNSCC). Kod velikog broja pacijenata, PD-L1 ekspresija u HNSCC-u bila je značajno povezana s metastazama u limfne čvorove i nepovoljnim ishodima [47] [58]. Iako neka istraživanja daju ohrabrujuće rezultate, potrebno je navesti da oko 80 % pacijenata s uznapredovalim karcinomom usne šupljine ne reagira na anti-PD-1 liječenje [59].

1.6 Programirani ligand smrti 2 (PD-L2)

U usporedbi s glavnim ligandom PD-L1 koji se sve više proučava, fiziološka i patofiziološka relevantnost PD-L2 je za sada slabo istražena [60]. Trenutno ne postoji pouzdan prediktivni marker za odabir pacijenata koji će imati koristi od imunoterapije blokiranjem kontrolnih točaka i za sada nije dana službena preporuka za testiranje ekspresije PD-L1 kod oralnog karcinoma prije liječenja inhibitorima kontrolnih točaka [61]. Jedno od mogućih objašnjenja za učinkovitost blokiranja PD-1 kod PD-L1 negativnih tumora moglo bi biti inhibicija interakcije PD-L1/PD-1 u cirkulirajućim imunološkim stanicama [62]. Drugo objašnjenje moglo bi biti aktivacija PD-1 drugim ligandima poput PD-L2 [63]. Međutim, profil ekspresije PD-L2 kod pacijenata s OPCC-om usne šupljine je slabo istražen i potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdio utjecaj na imunomodulaciju. PD-L2 je prvi put opisan 2001. godine kao drugi ligand za PD-1 receptor [59]. Ekspresija PD-L2 je ograničena na stanice koje prezentiraju antigen i ne pokazuje fiziološki relevantnu ekspresiju u aktiviranim T stanicama ili keratinocitima [64]. PD-L2 je ligand programirane stanične smrti

ekspimiran u stanicama koje prezentiraju antigen, uključujući dendritične stanice, makrofage, B stanice i tumorske stanice [65] [66]. Poput PD-L1, zabilježeno je da se PD-L2 veže na PD-1, što rezultira izbjegavanjem tumorskih stanica iz imunološkog sustava [67]. Nedavno je otkriveno da se distribucija liganada programirane stanične smrti (PD-L) razlikuje ovisno o vrsti planocelularnog karcinoma glave i vrata (HNSCC) [68, 69]. Kod pacijenata s HNSCC-om, zabilježeno je da je ekspresija PD-L2 veća od one kod PD-L1 [63]. Osim toga, zabilježeno je da interakcije PD-1/PD-L2 imaju različitu kinetiku asocijacije/disocijacije, pokazujući 2-6 puta veći afinitet u usporedbi s interakcijama PD-1/PD-L1 [70]. PD-L2 je manje istražen nego PD-L1, ali potencijalno važan u složenoj mreži imunološke tolerancije na tumor i odgovora na imunoterapiju. U prethodnim istraživanjima je pokazano značajno povećano preživljavanje pacijenata s PD-L2 pozitivnim karcinomom pločastih stanica glave i vrata liječenih PD-1 inhibitorom pembrolizumabom [63]. Kod hepatocelularnog karcinoma i adenokarcinoma želuca, povećana ekspresija PD-L1 i PD-L2 bila je povezana s lošijom prognozom što ukazuje na ulogu PD-L2 kao imunosupresivne i kancerogene signalne molekule [71] [72]. Kod tumora žlijezda slinovnica, povećana ekspresija PD-L2 pokazala se povezanom s relapsom bolesti [71]. Kod Hodgkinovog limfoma, PD-L2 je bio ekspimiran u manjem broju slučajeva od PD-L1. Međutim, bio je ekspimiran u nekim PD-L1 negativnim slučajevima [73]. Kod planocelularnog karcinoma usne šupljine, nedostaje sustavna procjena ekspresije PD-L2 [74].

1.7 NLRP3 inflamasom

Imunološki sustav identificira i uništava patogene suradnjom urođenog imunološkog sustava i stečenog imunološkog sustava [75]. Urođeni imunološki sustav djeluje kao početna linija obrane koja se implementira u prisutnosti molekularnih obrazaca povezanih s oštećenjem stanica (DAMP) sa ili bez prisutnosti infekcije [76]. Ove multifunkcionalne molekule uključuju proteine toplinskog šoka (HSP), jednolančanu glasničku RNA (ssRNA) i male fragmente izvanstaničnog matriksa koji se oslobađaju u izvanstanično okruženje nakon oštećenja tkiva i stanica [77]. Nadalje, urođeni imunološki sustav detektira molekularne obrasce povezane s patogenima (PAMP) [76],

nastale iz patogena putem receptora za prepoznavanje obrazaca (PRR) koje eksprimiraju stanice urođenog imunološkog sustava koje prepoznaju mikroorganizme na mjestu infekcije i prezentiraju antigene stečenom imunološkom sustavu [78] [79]. Godine 2002. otkriven je prvi multiproteinski kompleks aktiviran PRR (inflammasom). Među njima je NLRP3 inflammasom najbolje opisan kao pirinska domena koja sadrži protein 3 [80]. Receptori bogati leucinom koji sadrže ponavljajuće sekvence (NLR) čine obitelj intracelularnih urođenih imunoloških receptora koji igraju ključnu ulogu u upalnom odgovoru i urođenom imunološkom sustavu [81]. Kao odgovor na različite intracelularne podražaje, NLR-i se aktiviraju, potičući sastavljanje multiproteinskih kompleksa poznatih kao inflammasomi [49]. Kao član obitelji inflammasoma, NLRP3 je najproučavaniji i najbolje karakterizirani inflammasom, a pokazalo se da je uključen u nekoliko patologija, uključujući neurodegenerativne bolesti, aterosklerozu i karcinom [49] [82]. NLRP3 inflammasom, putem proteina (ASC) povezanog s apoptozom, tj. adapterskog proteina, aktivira caspasu-1, koja zauzvrat potiče oslobađanje proupalnih citokina, interleukina (IL)-1 β i IL-18, te na taj način doprinosi urođenom imunološkom odgovoru [82]. Međutim, pretjerana i aberantna aktivacija NLRP3 inflammasoma može dovesti do progresije karcinoma [82]. Nekoliko inflammasoma, uključujući NLRP3, NLRP6, NLRC4, NLRP1 i AIM2, mogu imati patogenu ulogu u tumorogenezi modulacijom urođenog i adaptivnog imuniteta, apoptoze, diferencijacije i crijevne mikrobiote [83]. Postoje podaci koji sugeriraju da su polimorfizmi inflammasoma NLRP3 povezani s različitim malignim tumorima poput raka debelog crijeva i melanoma [84]. Precizna klinička funkcija NLRP3 u ulozi inicijacije i promocije različitih neoplazmi također ističe terapijski potencijal inflammasoma i prognostičkih markera.

Nedavne studije pokazale su da je put NLRP3 inflammasoma pojačano reguliran u životinjskim modelima OPCC-a i pacijentima s OPCC-om, što sugerira njegovu uključenost u patogenezu oralnog karcinoma [85]. U mehanizmu oralne karcinogeneze, apoptoza također igra ključnu ulogu [86]. Apoptoza je programirani proces stanične smrti koji potiče uklanjanje stresnih, oštećenih, transformiranih ili zaraženih stanica [86]. Međutim, abnormalnosti u putu apoptoze mogu rezultirati raznim ljudskim bolestima, uključujući karcinom [87]. Stoga bi dublje studije mehanizma apoptoze mogle pružiti

novu priliku za otkrivanje i razvoj novih proteina koji bi mogli povećati osjetljivost stanica tumora na apoptozu ili resetirati njihov apoptotski prag [88]. Mnoge su skupine opisale ulogu NLRP3 proteina kao senzora za signale opasnosti koje potječu od patogena putem stanica koje prezentiraju antigen u urođenom imunološkom sustavu. Međutim, relativno se malo zna o doprinosu NLRP3 u tumorogenezi, a njegova uloga u modulaciji tumorskih odgovora na imunoterapiju je slabo istražena [89].

Adapter inflammasoma ASC (protein sličan apoptozi koji sadrži CARD, PYCARD) neophodan je za izlučivanje IL-1 β , a njegovo oslobađanje aktivira Caspase 1. Ova upalna, neapoptotička caspasa proteolitički se obrađuje citosolnim multiproteinskim kompleksima koji se nazivaju inflammasomi. Mijeloidne stanice kojima nedostaje ASC pokazuju smanjeno izlučivanje IL-1 β i IL-1 α nakon aktivacije inflammasoma NLRP3 ili AIM2. Međutim, osim svoje uloge u aktivaciji Caspase 1, ASC funkcionira kao gen za supresiju tumora. Smanjenje ekspresije ASC aberantnom metilacijom opisano je kod brojnih karcinoma, uključujući melanom i rak dojke [90, 91]. ASC je platformski protein inflammasoma, koji putem svoje PYD domene interagira s receptorima za prepoznavanje uzoraka (npr. NLRP3), a putem svoje CARD domene s pro-Caspase 1, što dovodi do aktivacije Caspase 1. Ova aktivacija potiče sazrijevanje IL-1 β i IL-18 [90]. Sazrijevanje IL-1 β aktiviranim inflammasomom važan je mehanizam u patogenezi tumora kod melanoma, kolorektalnog karcinoma i nazofaringealnog karcinoma [92] [93] [94]. Akumulirani podaci sugeriraju da ASC može imati višestruke uloge u raku: može djelovati kao tumorski supresor, a njegova ekspresija može biti smanjena metilacijom promotora u karcinomima poput melanoma, raka dojke, raka debelog crijeva i hepatocelularnog karcinoma; također je opisana njegova uključenost u progresiju melanoma [95] [96] [97] [98] [99].

1.8 Povezanost PD-L1 i NLRP3 inflammasoma

Dobro je poznato da se imunološki sustav sastoji od mnogih inhibicijskih puteva negativne povratne sprege koji služe za suzbijanje razvoja pretjerano izraženih imunoloških odgovora kako bi se izbjegla autoimuna patologija. Slični mehanizmi

vjerojatno će poslužiti kao molekularna osnova za razvoj adaptivne rezistencije na imunoterapiju anti-PD-1 protutijelima i predstavljaju ključne puteve interesa za budući razvoj poboljšanih strategija kombinatorne imunoterapije [100]. Nedavne studije su pokazale da i pojačana regulacija receptora CSF1 ovisna o CD8⁺ T stanicama i IFN ovisna u melanomu i receptora CD38 u raku pluća potiče adaptivnu rezistenciju na blokadu kontrolnih točaka anti-PD-1 [101] [55]. Koristeći nekoliko pretkliničkih modela uz kliničke uzorke, Theivanthiran i suradnici karakterizirali su PD-L1–ovisni, tumorski intrinzični signalni put koji izravno povezuje aktivnost CD8⁺ T stanica s privlačenjem mieloidnih stanica u tumorsko područje kao odgovor na imunoterapiju protutijelima protiv PD-1. Ovaj signalni slijed predstavlja adaptivni mehanizam otpornosti koji, kada se blokira, može povećati učinkovitost imunoterapije inhibitorima kontrolnih točaka pomoću protutijela protiv PD-1. Nakon što su primijetili dosljedno povećanje mijeloidnih stanica u tumorskim tkivima nakon izbjegavanja djelovanja protutijela protiv PD-1 u nekoliko tumorskih modela, pratili su osnovni mehanizam do procesa koji uključuje PD-L1–ovisnu aktivaciju NLRP3 inflammasoma u tumorskim tkivima. Ovi podaci zajedno ističu nekoliko potencijalnih farmakoloških ciljeva koji bi mogli povećati učinkovitost imunoterapije, kao i obećavajuće biomarkere koji bi mogli pridonijeti boljoj selekciji i vođenju liječenja pacijenata s rakom koji primaju imunoterapiju [102].

Na temelju istraživanja koje opisuje uzvodnu signalizaciju koja regulira ekspresiju PD-L1, najveći naglasak je na mehanizmima pomoću kojih NLRP3 inflammasom preko IL-18 povećava ekspresiju PD-L1 [103]. U tumorskom mikrokruženju, tumorske stanice mogu iskoristiti upalne signalne putove, čime pojačavaju ekspresiju PD-L1 [104]. Općenito se smatra da je signalizacija putem interferona gama (IFN- γ) najistaknutiji induktor PD-L1 [103, 105]. Vezanjem IFN- γ za njegov receptor dolazi do aktivacije interferon-odgovarajućih faktora (IRF) putem JAK-STAT puta, koji potom posreduje u ekspresiji PD-L1 [105]. Budući da je poznato da je IL-18 snažan induktor IFN- γ , zanimljivo je spekulirati da potencijalni NLRP3–IL-18–IFN- γ –PD-L1 put može predstavljati poveznicu između aktivacije NLRP3 inflammasoma i ekspresije PD-L1 [106]. Unatoč značajnom utjecaju kojim je imunoterapija inhibitorima kontrolnih točaka imala u kliničkoj onkologiji, većina pacijenata s tumorom još uvijek nema koristi od ove metode liječenja [73].

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

NLRP3 se smatra novim potencijalnim biološkim markerom, te potencijalna meta za biološku terapiju u liječenju planocelularnog karcinoma usne šupljine i orofarinksa. Ukoliko se dokaže pojačana ekspresija NLRP3, ASC i Caspase 1 u tkivima tumora, može se terapijski ciljati na inflamason i njegove proteine (npr. NLRP3), na taj način direktno sudjelovati u regulaciji ekspresije PD-L1 i PD-L2, te poboljšati odgovor na imunoterapiju.

2.1 Hipoteza

Hipoteza istraživanja je da ćemo uočiti povećanu ekspresiju PD-L1, PD-L2 i komponenti inflamasona NLRP3 (NLRP3, ASC i Caspase 1) kod primarnih tumora i metastaza u odnosu na benigne lezije, te da će povećana ekspresija korelirati sa parametrima invazivnosti (DOI, PNI, LVI, ENE).

Glavni cilj istraživanja

Glavni cilj ovog istraživanja je imunohistokemijskom analizom parafinskih tkivnih blokova istražiti ekspresiju PD-L1 i PD-L2 kao potencijalnih biomarkera planocelularnog karcinoma usne šupljine, te usporediti njihovu ekspresiju s NLRP3, ASC i Caspase 1 na uzorcima primarnog planocelularnog karcinoma usne šupljine, metastazama OPCC-a, leukoplakiji i benignim lezijama zdrave sluznice usne šupljine.

Specifični ciljevi istraživanja su :

1. Povezati ekspresiju PD-L1 i PD-L2 s inflamasonom NLRP3 i povezanih proteina (ASC, Caspase-1) u planocelularnog karcinoma, te kroz univarijantnu i multivarijantnu analizu usporediti ekspresiju s kliničko-patološkim karakteristikama tumora. (TNM klasifikacija, stadij, status l.č. vrata, perineuralno širenje, komorbiditeti itd.)
2. Usporediti ekspresiju PD-L1, PD-L2 i komponenti inflamasona NLRP3 (NLRP3, ASC i Caspase 1) sa preživljenjem bolesnika

3. ISPITANICI I METODE

3.1 Ispitivana skupina

Za ovo istraživanje provedena je retrospektivna kohortna studija. Korišteni su formalin-fiksirani parafinski blokovi (FFPE) od 121 pacijenata koji su prethodno liječeni na Klinici za maksilofacijalnu kirurgiju, KBC Rijeka. Ukupno je analiziran 151 uzorak tkiva i to 61 uzorak primarnog planocelularnog karcinoma usne šupljine, 30 uzoraka leukoplakije te 30 uzoraka metastaza u limfne čvorove vrata. Uzorci metastaza potjecali su od istih pacijenata kod kojih je analiziran i primarni tumor, što objašnjava veći broj uzoraka u odnosu na ukupan broj uključenih ispitanika. Kontrolnu skupinu činilo je 30 uzoraka benignih lezija usne šupljine (papilomi i fibromi). Kriterij za odabir pacijenata bila je dijagnoza invazivnog planocelularnog karcinoma usne šupljine koji prethodno nije bio liječen kemoterapijom ili radioterapijom. Pacijenti s planocelularnim karcinomom usne, orofarinksa ili drugog primarnog tumora bili su isključeni iz istraživanja. Kriterij za odabir kontrolne skupine bila je patohistološki potvrđena benigna lezija koja nije prethodno bila podvrgnuta liječenju.

Studija je dobila odobrenje Etičkog povjerenstva KBC Rijeka. Podaci su obrađeni elektronički, a glavni istraživač i njegovi suradnici pridržavali su se interne procedure za zaštitu medicinskih podataka. Ispitanici su bili upisani u bazu podataka pomoću koda, a njihovi identiteti nisu bili otkriveni. Pristup dokumentaciji, uz istraživače, imali su i predstavnici etičkih povjerenstava Kliničkog bolničkog centra Rijeka i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

Klinički podaci (uključujući spol, dob, gradus, lokalizaciju, pušenje, konzumaciju alkohola, TNM klasifikaciju, stadij, postoperativnu radioterapiju, perineuralnu i limfovaskularnu invaziju, dubinu invazije, krvnu grupu, ASA status, vrstu operativnog zahvata, te Clavien-Dindo klasifikaciju) prikupljeni su iz Integriranog Bolničkog informacijskog sustava (IBIS) (Tablica 3.).

Tablica 3. Klinički podaci pacijenata sa planocelularnim karcinomom usne šupljine

	Pacijenti sa OPCC	Postotak
	n=61	
Spol		
Zene	15	24.6%
Muškarci	46	75.4%
Godine		
<44	1	1.6%
45-54	7	11.5%
55-64	24	39.3%
65-74	20	32.8%
>75 godina	9	14.8%
T klasifikacija		
T1	8	13.1%
T2	22	36.1%
T3	21	34.4%
T4	10	16.4%
N klasifikacija		
N0	24	39.3%
N1	8	13.1%
N2	27	44.3%
N3	2	3.3%
Stadij		
1	8	13.1%
2	5	8.2%
3	16	26.2%
4	32	52.5%
Gradus		
1	18	29.5%
2	36	59.0%
3	7	11.5%
Lokalizacija tumora		
dno usne šupljine	11	18.0%
retromolarno	5	8.2%
jezik	23	37.7%

gingiva mandibule	13	21.3%
obraz	4	6.6%
gingiva maksile	5	8.2%
Perineuralna invazija		
Da	17	27.9%
Ne	44	72.1%
Limfovaskularna invazija		
Da	28	45.9%
Ne	33	54.1%
Ekstranodalna ekstenzija		
Da	9	14.8%
Ne	52	85.2%
Dubina invazije		
<5 mm	7	11.5%
5-10mm	26	42.6%
>10 mm	28	45.9%
Radioterapija		
Da	39	63.9%
Ne	22	36.1%
Disekcija		
bez disekcije	13	21.3%
selektivna	31	50.8%
radikalna	17	27.9%
ASA klasifikacija		
ASA 1	2	3.3%
ASA 2	22	36.1%
ASA 3	33	54.1%
ASA 4	4	6.6%
Preživljenje		
medijan praćenja	44 mjeseci	
umrli od karcinoma	28/61	45.9%
progresija bolesti	27/61	44.3%
medijan progresije	15 mjeseci	

3.2 Metode istraživanja

3.2.1 Metoda tkivnih mikroareja (TMA)

Formalin-fiksirani parafinski uzorci preuzeti su sa Zavoda za patologiju KBC Rijeka. Imunohistokemijska analiza provedena je na formalin-fiksiranim, parafinom uklopljenim uzorcima tkiva primjenom metode tkivnih mikroareja (Tissue Microarray, TMA). Ova tehnika nam omogućuje paralelnu analizu većeg broja uzoraka na manjoj površini, uz racionalno korištenje biološkog materijala i reagensa. Za odabir reprezentativnih područja tumora korišteni su standardni hematoksilin-eozinom (HE) obojeni rezovi(kocke), na kojima su prethodno oba patologa označila vitalna tumorska područja bez nekroze. Na temelju tih oznaka, iz parafinskih blokova izdvojeni su cilindri tkiva promjera 1 mm, koji su potom preneseni u parafinski blok primatelj pomoću uređaja MTA Booster OI (Alphelys, Plaisir, Francuska). Za svaki uzorak ugrađeni su cilindri tumorskog tkiva u unaprijed definirani raspored, uz razmak od 0,5 mm između pojedinih cilindara. Nakon izrade, TMA blokovi inkubirani su preko noći u termostatu na 45 °C zbog stabilizacije TMA strukture. Iz pripremljenih blokova izrađeni su serijski rezovi, koji su potom postavljeni na predmetna stakalca, te korišteni za standardnu histološku i imunohistokemijsku analizu. Prethodna istraživanja pokazala su dobru podudarnost rezultata dobivenih TMA metodom s analizama provedenima na punim histološkim rezovima [30].

3.2.2 Imunohistokemijska analiza

Imunohistokemijska analiza provedena je na TMA cilindrima. Iz TMA parafinskih blokova izrađeni su serijski rezovi debljine 3–4 μm , koji su postavljeni na predmetna stakalca s pozitivno nabijenom površinom radi bolje adhezije tkiva. Stakalca su sušena preko noći u termostatu na 37 °C prije daljnje obrade. Rezovi su deparafinizirani u ksilenu te rehidrirani pomoću padajućih koncentracija etanola (100 %, 96 % i 70 %) do destilirane vode. Nakon rehidracije provedeno je otkrivanje antigenskih epitopa primjenom topline induciranog razotkrivanja epitopa (heat-induced epitope retrieval, HIER). Demaskiranje je provedeno u Tris-EDTA puferu (pH 9.0) zagrijavanjem stakalaca prema standardnom laboratorijskom protokolu, nakon čega su rezovi ostavljeni da se ohlade na sobnoj temperaturi i isprani u fosfatnom puferu (PBS). Endogena peroksidazna aktivnost blokirana je inkubacijom rezova s 3 % vodikovim peroksidom tijekom 10 minuta, nakon čega su rezovi isprani u PBS-u. Nespecifično vezanje smanjeno je inkubacijom u odgovarajućem proteinskom blokirajućem mediju. Rezovi su zatim inkubirani s primarnim protutijelima (Tablica 4.): anti-PD-L1, anti-PD-L2, anti-NLRP3, anti-ASC i anti-Caspase-1, pri razrjeđenjima navedenima u tablici protutijela, tijekom 60 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije s primarnim protutijelima, rezovi su isprani u PBS-u. Detekcija vezanih protutijela provedena je pomoću polimer-baziranog HRP detekcijskog sustava, uz primjenu 3,3'-diaminobenzidina (DAB) kao kromogena. Razvoj boje praćen je mikroskopski, a reakcija je zaustavljena ispiranjem u destiliranoj vodi. Na kraju postupka rezovi su kontrastno obojeni hematoksilinom, isprani u vodi, dehidrirani kroz rastuće koncentracije etanola, pročišćeni u ksilenu i pokriveni trajnim medijem za montažu. Kao negativne kontrole korišteni su rezovi na kojima je primarno protutijelo izostavljeno i zamijenjeno odgovarajućim puferom. Pozitivne kontrole uključivale su tkiva za koja je poznato da eksprimiraju ispitivane markere.

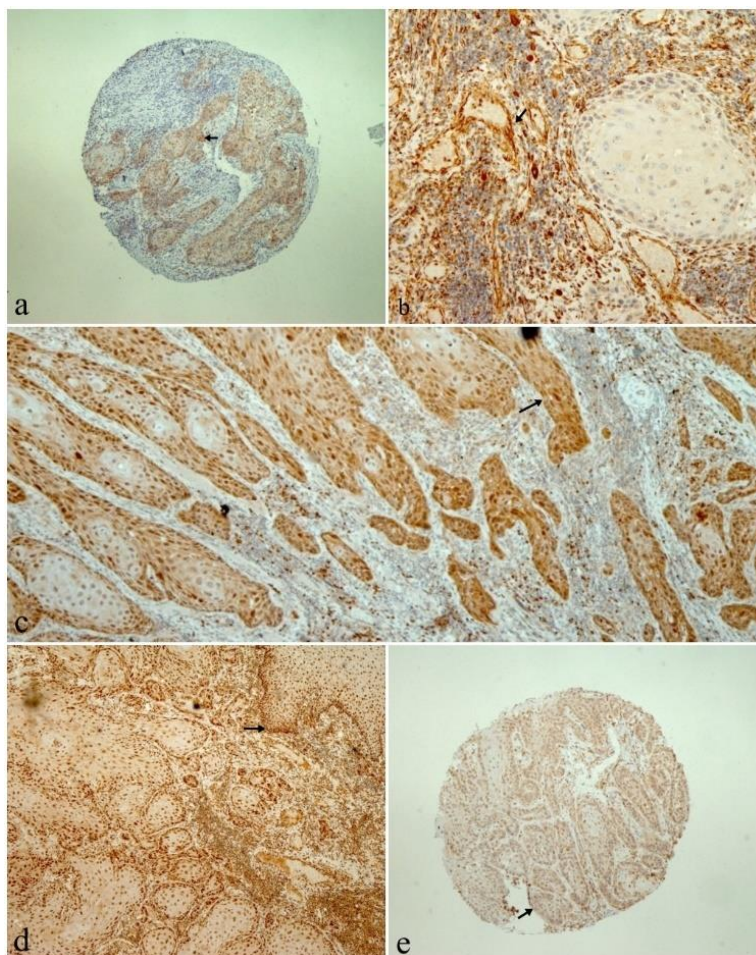
Tablica 4. Karakteristike korištenih primarnih protutijela za imunohistokemijsko bojanje

Protutijelo i kat.broj	Proizvođač	Razrijeđenje protutijela	Demaskiranje
Anti-PD-L1 (Rabbit polyclonal, Cat. No. A700-020)	Bethyl Laboratories Montgomery, TX, USA	1:200	Tris/EDTA, pH 9
Anti-PD-L2 (Rabbit polyclonal, Cat. No. PA582484)	Invitrogen, Waltham, MA, USA	1:200	Tris/EDTA, pH 9
Anti-NLRP3 (Rabbit polyclonal, Cat. No. PA579740,	Invitrogen, Waltham, MA, USA	1:200	Tris/EDTA, pH 9
Anti-ASC (Rabbit monoclonal, Cat. No. ab180799)	Abcam, Cambridge, UK	1:500	Tris/EDTA, pH 9
Anti-Caspase-1 (Mouse monoclonal, Cat. No. MA5-16215)	Invitrogen, Waltham, MA	1:100	Tris/EDTA, pH 9

3.2.3. Analiza imunohistokemijskog bojanja

Imunohistokemijski obilježeni preparati analizirani su svjetlosnim mikroskopom. Karakteristični dijelovi fotografirani su kamerom na mikroskopu pomoću odgovarajućeg računalnog programa (Slika 1). Analizu imunohistokemijskog bojanja provela su dva nezavisna patologa bez uvida u kliničke podatke pacijenata. Procjena je provedena pomoću dva sustava bodovanja, kojima su se vrednovali intenzitet imunohistokemijskog bojenja i udio obojenih stanica. Intenzitet bojenja za svako antitijelo bodovan je kao 1 (bez bojenja), 2 (slabo bojenje), 3 (umjereno bojenje) i 4 (jako bojenje). Udio obojenih stanica ocijenjen je kao 1 (0 %), 2 (0–33 %), 3 (33–66 %) i 4 (>66 %). Za svaki uzorak izračunata je medijanska vrijednost bodova obaju patologa, a umnožak bodova

intenziteta i udjela korišten je za izračun imunoreaktivnog skora (IRS), u rasponu od 0 do 16. Vrijednosti IRS-a zatim su razvrstane u tri kategorije: 0 – bez ekspresije, 1–4 – niska ekspresija i 5–16 – visoka ekspresija. IHK obojenje na NLRP3, ASC i Caspasu 1 očitavano je u citoplazmi tumorskih stanica, dok se ekspresija PD-L1 i PD-L2 procjenjivala na staničnim membranama.



Slika 2. Fotomikrografije prikazuju obrasce imunohistokemijske ekspresije u oralnom planocelularnom karcinomu: **a)** Pozitivna ekspresija protutijela PD-L1 u tumorskim stanicama na invazivnom dijelu karcinoma (400×) (crne strelice). **b)** Ekspresija CD273 (PD-L2) s nižom razinom izražaja u dobro diferenciranim tumorskim komponentama te izraženim bojenjem u invazivnim tumorskim stanicama (400×) (crne strelice). **c)** Ujednačeno i snažno bojenje protutijelom NLRP3 u in situ i invazivnim tumorskim komponentama (400×) (crne strelice). **d)** Intenzivno bojenje ASC (TMS1) u tumorskim stanicama (400×) (crne strelice). **e)** Intenzivno bojenje Caspase 1 u TMA presjeku tumorskog tkiva (400×) (crne strelice)

3.3 Etički principi u istraživanju

Ovim istraživanjem osigurano je poštivanje osnovnih etičkih i bioetičkih načela, uključujući osobni integritet ispitanika, načela pravednosti, dobročinstva i neškodljivosti. Tijekom prikupljanja, obrade i prikazivanja podataka osigurana je zaštita privatnosti ispitanika i očuvanje njihove anonimnosti. Uzorci su bili označeni jedinstvenim šiframa te su kao takvi korišteni tijekom cijelog tijeka istraživanja. Provedba znanstvenog istraživanja bila je u skladu s načelima Helsinške deklaracije i njezinim kasnijim izmjenama, Kodeksom medicinske etike i deontologije (NN 55/08), kao i Pravilnikom o kliničkim ispitivanjima i dobroj kliničkoj praksi (NN 121/2007, NN 175/2003), koji je usklađen sa Smjernicama Europske medicinske agencije i njezina tijela Committee for Proprietary Medicinal Products (»Note for Guidance on Good Clinical Practice« – CPMP/ICH/135/95). Tijekom istraživanja poštivani su i važeći zakonski propisi Republike Hrvatske, uključujući 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, kao i druge preporuke.

3.4 Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka učinjena je računalnim statističkim programom MedCalc, verzija 12.5.0 (MedCalc Software, Ostend, Belgija; <https://www.medcalc.org>), a dobiveni rezultati su prikazani tablično i grafički. Vrijednosti kontinuiranih varijabli prikazani su kao srednja vrijednost +/- standardna devijacija. Kategorijski (kvalitativni) podaci prikazani su frekvencijama i postotno. Analizom raspodjele mjerenih varijabli (Kolmogorov- Smirnov test) utvrdi se različitost u raspodjeli pojedinih varijabli; normalnost razdiobe se razlikuje od parametra do parametra, stoga su korišteni one way ANOVA test (za podatke s normalnom razdiobom) te neparametrijski Kruskal-Wallis test za usporedbu više od dvije skupine ispitanika. Za testiranje razlika između skupina primijenjen je post hoc Student-Newman-Keulsov ili Conoverov test. Ispitane su povezanosti (korelacije) između pojedinih parametara korištenjem Pearsonova odnosno Spearmanova testa te regresijskog modela, ovisno o normalnosti razdiobe podataka. Za testiranje razlika

nominalnih varijabli korišten je Fisherov egzaktni ili χ^2 test. Potencijalna prognostička vrijednost analiziranih biomarkera procijenjena je ROC (eng. *Receiver Operating Characteristic*) analizom. Prilikom analize preživljenja prvo je određen utjecaj parametara na sveukupno preživljenje Kaplan-Meier-ovom metodom, a razlika između krivulja preživljavanja utvrđena je pomoću log-rank testa. Rezultati testova su smatrani značajnima ukoliko je $p < 0.05$

4. REZULTATI

Da bismo pokazali izraženost navedenih markera i imunohistokemijskim metodama utvrdili njihov stupanj izraženosti u uključenim skupinama analizirali smo izraženost Caspase 1, PD-L2, NLRP3, ASC i PD-L1 proteina.

Zasebno su analizirane četiri skupine ispitanika; (a) ispitanici sa planocelularnim karcinomom usne šupljine (n=61, 40.4%), (b) ispitanici sa metastazama planocelularnog karcinoma u limfne čvorove vrata od istih bolesnika kojima je analiziran primarni karcinom (n=30, 19.9%), (c) ispitanici sa leukoplakijom (n=30, 19.9%), i (d) ispitanici sa papilomima i fibromima (n=30, 19.9%).

U prvoj skupini ispitanika, sa oralnim planocelularnim karcinomom (OPCC) uključeno je 46 muških (75.4%) i 15 (24.6%) ženskih ispitanika podijeljenih u sljedeće dobne skupine: <44 godine 1 (1.6%) ispitanik, 45-54 godina 7 (11.5%) ispitanika, 55-64 godine 24 (39.3%) ispitanika, 65-74 godine 20 (32.8%) ispitanika te >75 godina 9 (14.8%) ispitanika.

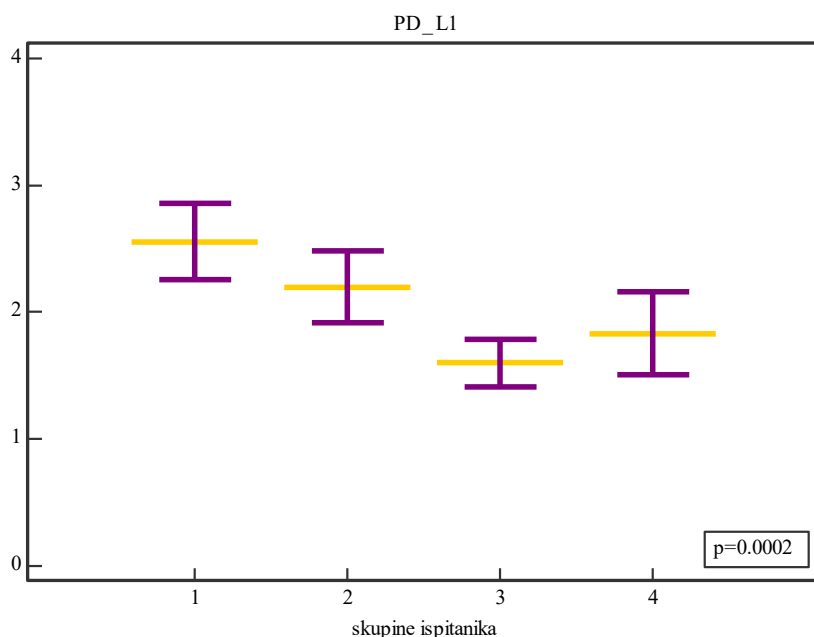
U drugoj skupini ispitanika, sa metastazama OPCC u limfne čvorove vrata uključeno je 21 muški (72.4%) i 9 (27.6%) ženskih ispitanika podijeljenih u sljedeće dobne skupine: <44 godine 0 (0%) ispitanika, 45-54 godina 6 (20.7%) ispitanika, 55-64 godine 9 (31.0%) ispitanika, 65-74 godine 13 (41.4%) ispitanika te >75 godina 2 (6.9%) ispitanika.

Za svako analizirano protutijelo analizirali smo intenzitet bojanja (jačina bojanja determinirana kao 1 - bez bojanja, 2 – blago bojanje, 3 – srednje bojanje, 4-jako bojanje), udio pozitivnih stanica (broj obojanih stanica determinirana kao 1 = 0%, 2 = 0%-33%, 3 = 33-66%, 4 = >66%) te IRS faktor (jačina bojanja x broj obojenih stanica podijeljeni u sljedeće grupe: 0 - nema ekspresije, 1-4 niska ekspresija, 5-16 visoka ekspresija).

4.1.1 Izražaj PD-L1 protutijela u analiziranim skupinama ispitanika

Evaluacija PD-L1 imunohistokemijske analize provedena je na 151 uzorku. Intenzitet bojanja PD-L1 protutijela u skupini ispitanika sa OPCC i skupini ispitanika sa metastazama OPCC u limfne čvorove vrata je značajno izraženija u odnosu na skupinu ispitanika s leukoplakijom te skupine ispitanika sa papilomima/fibromima ($p=0.0002$) (Slika 3).

Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na PD-L1 s obzirom na intenzitet bojanja stanica u analiziranim skupinama ispitanika je prikazan u Tablici 5.



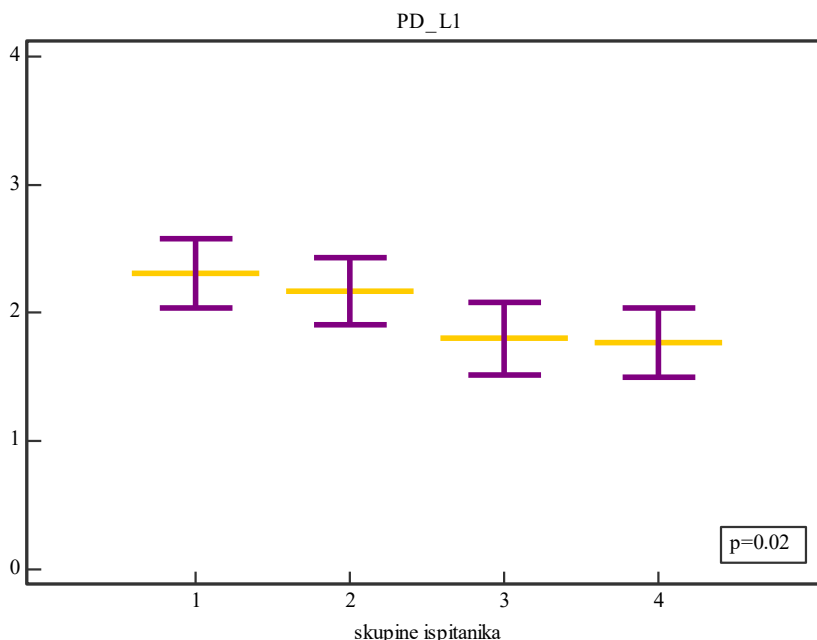
Slika 3. Intenzitet bojanja PD-L1 protutijela između analiziranih skupina bolesnika. Intenzitet bojanja PD-L1 protutijela je značajno izraženiji u skupini bolesnika s OPCC i skupini bolesnika sa metastazama planocelularnog karcinoma u limfne čvorove vrata u odnosu na ispitanike sa leukoplakijom te papilomima i fibromima ($p=0.0002$). Vodoravne linije označavaju srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; p, razina značajnosti označena na grafu Kruskal-Wallis, post-hoc analiza po Conover-u.

Tablica 5. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na PD-L1 s obzirom na intenzitet bojanja stanica u analiziranim skupinama ispitanika.

	Broj analiziranih uzoraka				Ukupan broj (%)
	OPCC	Metastaze	Leukoplakije	Papilomi i fibromi	
1	16 (26.2%)	5 (16.7%)	12 (40.0%)	13 (43.3%)	46 (30.46%)
2	12 (19.7%)	15 (50.0%)	18 (60.0%)	10 (33.3%)	55 (36.42%)
3	16 (26.2%)	9 (30.0%)	0 (0.0%)	6 (20.0%)	31 (20.53%)
4	17 (27.9%)	1 (3.3%)	0 (0.0%)	1 (3.3%)	19 (12.58%)
Ukupno	61 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	151 (100%)

Rezultat proporcije PD-L1 protutijela u skupini ispitanika sa OPCC vrata i skupini ispitanika sa metastazama OPCC u limfne čvorove je značajno izraženiji u odnosu na skupinu ispitanika sa leukoplakijom i skupinu ispitanika sa papilomima/fibromima; ta razlika je statistički značajna ($p=0.02$) (Slika 4).

Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na PD-L1 s obzirom na broj obojenih stanica u analiziranim skupinama ispitanika je prikazan u Tablici 6.



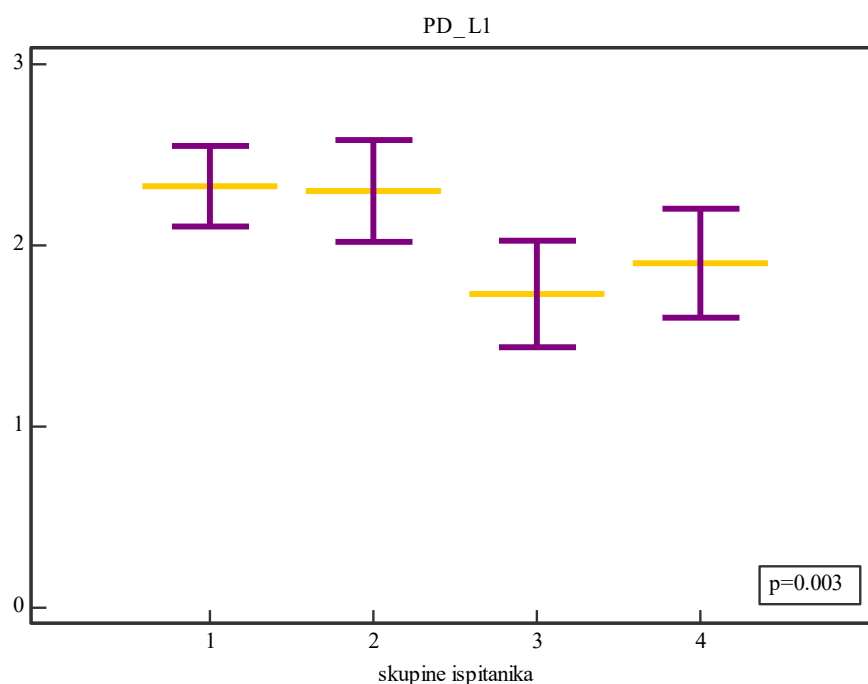
Slika 4. Rezultat proporcije PD-L1 protutijela između analiziranih skupina bolesnika. Rezultat proporcije PD-L1 protutijela je značajno izraženiji u skupini ispitanika s OPCC i skupini ispitanika sa metastazama OPCC u limfne čvorove vrata u odnosu na ispitanike sa leukoplakijom te papilomima i fibromima ($p=0.02$). Vodoravne linije označavaju srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; p, razina značajnosti označena na grafu Kruskal-Wallis, post-hoc analiza po Conover-u.

Tablica 6. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na PD-L1 s obzirom na broj obojenih stanica u analiziranim skupinama ispitanika.

	Broj analiziranih uzoraka				Ukupan broj (%)
	OPCC	Metastaze	Leukoplakije	Papilomi i fibromi	
1	16 (26.2%)	5 (16.7%)	12 (40.0%)	11 (36.7%)	44 (29.14%)
2	21 (34.4%)	15 (50.0%)	12 (40.0%)	16 (53.3%)	64 (42.38%)
3	13 (21.3%)	10 (33.3%)	6 (20.0%)	2 (6.7%)	31 (20.53%)
4	11 (18.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (3.3%)	12 (7.95%)
Ukupno	61 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	151 (100%)

Analiza IRS faktora PD-L1 protutijela u skupini ispitanika s OPCC-om vrata i skupini ispitanika sa metastazama OPCC-a u limfne čvorove pokazala je statistički značajniju ekspresiju u odnosu na skupinu ispitanika sa leukoplakijom i skupinu ispitanika sa papilomima/fibromima ($p=0.003$) (Slika 5).

Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na PD-L1 s obzirom na IRS faktor u analiziranim skupinama ispitanika je prikazan u Tablici 7.



Slika 5. IRS faktor PD-L1 protutijela između analiziranih skupina bolesnika. IRS faktor PD-L1 protutijela pokazuje statističku značajnost između skupine ispitanika sa OPCC i skupine ispitanika sa metastazama OPCC u limfne čvorove u odnosu na skupinu ispitanika sa leukoplakijom i skupinu ispitanika sa papilomima/fibromima ($p=0.003$). Vodoravne linije označavaju srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; p, razina značajnosti označena na grafu Kruskal-Wallis, post-hoc analiza po Conover-u.

Tablica 7. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na PD-L1 s obzirom na IRS faktor u analiziranim skupinama ispitanika.

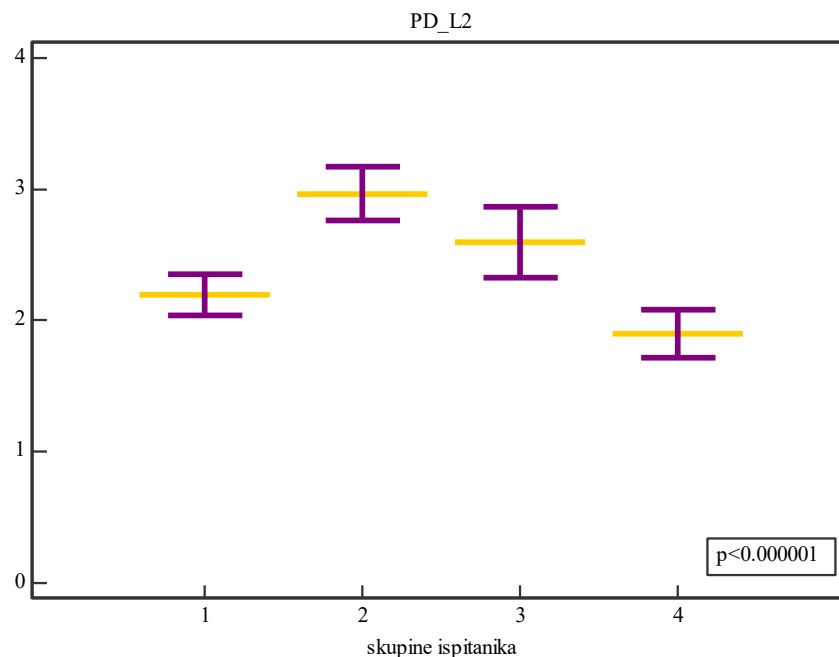
	Broj analiziranih uzoraka				Ukupan broj (%)
	OPCC	Metastaze	Leukoplakije	Papilomi i fibromi	
1	16 (26.2%)	5 (16.7%)	14 (46.7%)	11 (36.7%)	46 (30.46%)
2	9 (14.8%)	11 (36.7%)	10 (33.3%)	11 (36.7%)	41 (27.15%)
3	36 (59.0%)	14 (46.7%)	6 (20.0%)	8 (26.7%)	64 (42.38%)
Ukupno	61 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	151 (100%)

Ovi rezultati upućuju na pojačanu imunomodulatornu aktivnost PD-L1 u malignim lezijama u usporedbi s prekanceroznim i benignim promjenama.

4.1.2 Izražaj PD-L2 protutijela u analiziranim skupinama ispitanika

Evaluacija PD-L2 imunohistokemijske analize provedena je na 151 uzorku. Intenzitet bojanja PD-L2 protutijela pokazuje statističku značajnost ($p < 0.000001$) između svih analiziranih skupina: skupine ispitanika sa OPCC, skupine ispitanika sa metastazama OPCC u limfne čvorove vrata, skupine bolesnika s leukoplakijom te skupine ispitanika sa papilomima/fibromima (Slika 6).

Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na PD-L2 s obzirom na intenzitet bojanja stanica u analiziranim skupinama ispitanika je prikazan u Tablici 8.



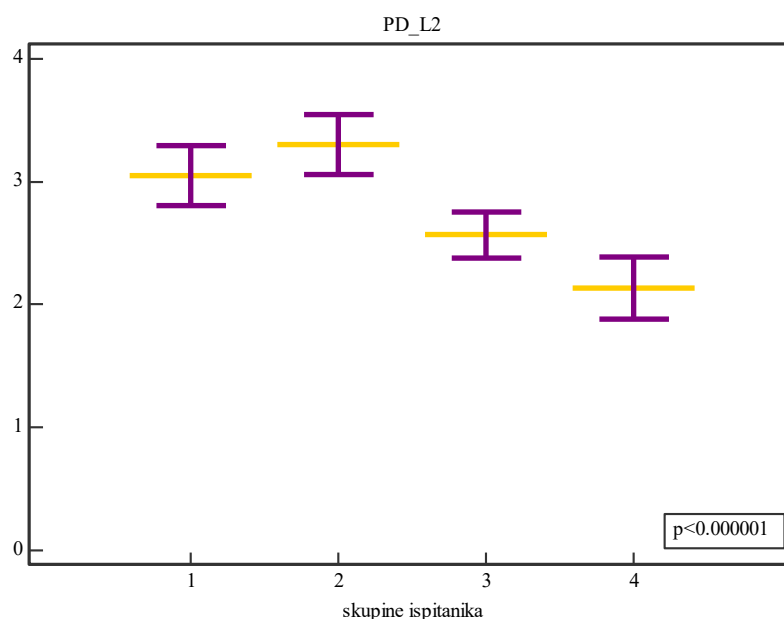
Slika 6. Intenzitet bojanja PD-L2 protutijela između analiziranih skupina bolesnika. Intenzitet bojanja PD-L2 protutijela pokazuje statističku značajnost između svih analiziranih skupina ($p < 0.000001$). Vodoravne linije označavaju srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; p, razina značajnosti označena na grafu Kruskal-Wallis, post-hoc analiza po Conover-u.

Tablica 8. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na PD-L2 s obzirom na intenzitet bojanja stanica u analiziranim skupinama ispitanika.

	Broj analiziranih uzoraka				Ukupan broj (%)
	OPCC	Meta	Leukoplakije	Papilomi i fibromi	
1	4 (6.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	5 (16.7%)	9 (5.96%)
2	43 (70.5%)	5 (16.7%)	16 (53.3%)	23 (76.7%)	87 (57.62%)
3	12 (19.7%)	21 (70.0%)	10 (33.3%)	2 (6.7%)	45 (29.81%)
4	2 (3.3%)	4 (13.3%)	4 (13.3%)	0 (0.0%)	10 (6.63%)
Ukupno	61 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	151 (100%)

Rezultat proporcije PD-L2 protutijela u skupini ispitanika sa OPCC i skupini ispitanika sa metastazama OPCC u limfne čvorove vrata je značajno izraženiji u odnosu na skupinu ispitanika sa leukoplakijom i skupinu ispitanika sa papilomima/fibromima; ta razlika je statistički značajna ($p < 0.000001$) (Slika 7).

Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na PD-L2 s obzirom na broj obojenih stanica u analiziranim skupinama ispitanika je prikazan u Tablici 9.



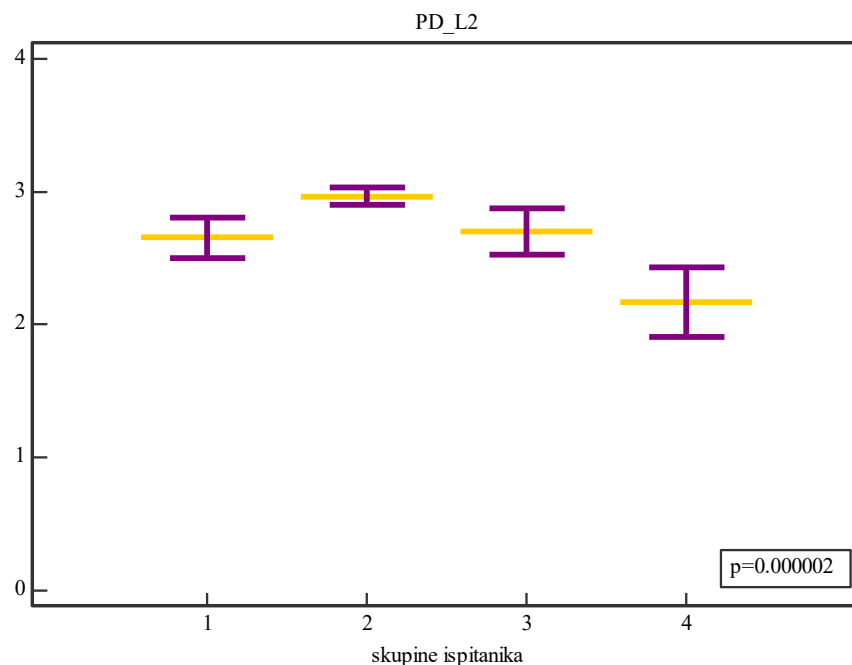
Slika 7. Rezultat proporcije PD-L2 protutijela između analiziranih skupina bolesnika. Rezultat proporcije PD-L2 protutijela je značajno izraženiji u skupini ispitanika sa OPCC i skupini ispitanika sa metastazama OPCC u limfne čvorove vrata u odnosu na skupinu ispitanika sa leukoplakijom i skupinu ispitanika sa papilomima/fibromima ($p < 0.000001$). Vodoravne linije označavaju srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; p, razina značajnosti označena na grafu Kruskal-Wallis, post-hoc analiza po Conover-u.

Tablica 9. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na PD-L2 s obzirom na broj obojenih stanica u analiziranim skupinama ispitanika.

	Broj analiziranih uzoraka				Ukupan broj (%)
	OPCC	Metastaze	Leukoplakije	Papilomi i fibromi	
1	4 (6.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	5 (16.7%)	9 (5.96%)
2	14 (23.0%)	3 (10.0%)	13 (43.3%)	16 (53.3%)	46 (30.46%)
3	18 (29.5%)	15 (50.0%)	17 (56.7%)	9 (30.0%)	59 (39.07%)
4	25 (41.0%)	12 (40.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	37 (24.51%)
Ukupno	61 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	151 (100%)

Analiza IRS faktora PD-L2 protutijela pokazuje statističku značajnost između svih analiziranih skupina: u skupini ispitanika sa OPCC, skupini ispitanika sa metastazama OPCC u limfne čvorove vrata, skupini bolesnika s leukoplakijom te skupini ispitanika sa papilomima/fibromima ($p=0.000002$) (Slika 8).

Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na PD-L2 s obzirom na IRS faktor u analiziranim skupinama ispitanika je prikazan u Tablici 10.



Slika 8. IRS faktor PD_L2 protutijela između analiziranih skupina bolesnika. IRS faktor PD-L2 protutijela pokazuje statističku značajnost između svih analiziranih skupina ($p=0.000002$). Vodoravne linije označavaju srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; p, razina značajnosti označena na grafu Kruskal-Wallis, post-hoc analiza po Conover-u.

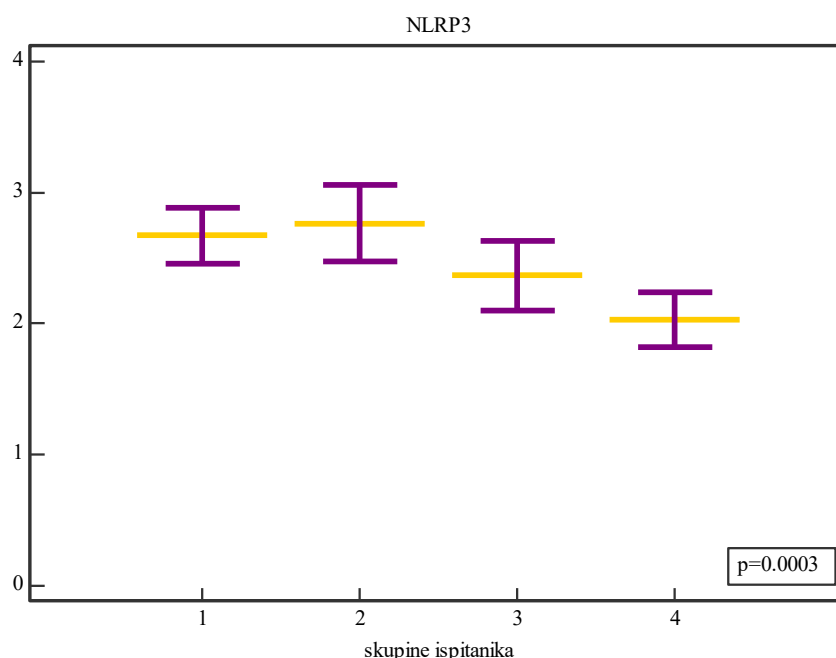
Tablica 10. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na PD-L2 s obzirom na IRS faktor u analiziranim skupinama ispitanika.

	Broj analiziranih uzoraka				Ukupan broj (%)
	OPCC	Metastaze	Leukoplakije	Papilomi i fibromi	
1	4 (6.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	5 (16.7%)	9 (5.96%)
2	13 (21.3%)	1 (3.3%)	9 (30.0%)	15 (50.0%)	38 (25.16%)
3	44 (72.1%)	29 (96.7%)	21 (70.0%)	10 (33.3%)	104 (68.88%)
Ukupno	61 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	151 (100%)

4.1.3 Izražaj NLRP3 protutijela u analiziranim skupinama ispitanika

Evaluacija NLRP3 imunohistokemijske analize provedena je na 151 uzorku. Intenzitet bojanja NLRP3 protutijela pokazuje statističku značajnost ($p=0.0003$) između svih analiziranih skupina: skupine ispitanika sa OPCC, skupine ispitanika sa metastazama OPCC u limfne čvorove vrata, skupine bolesnika s leukoplakijom te skupine ispitanika sa papilomima/fibromima (Slika 9).

Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na NLRP3 s obzirom na intenzitet bojanja stanica u analiziranim skupinama ispitanika je prikazan u Tablici 11.



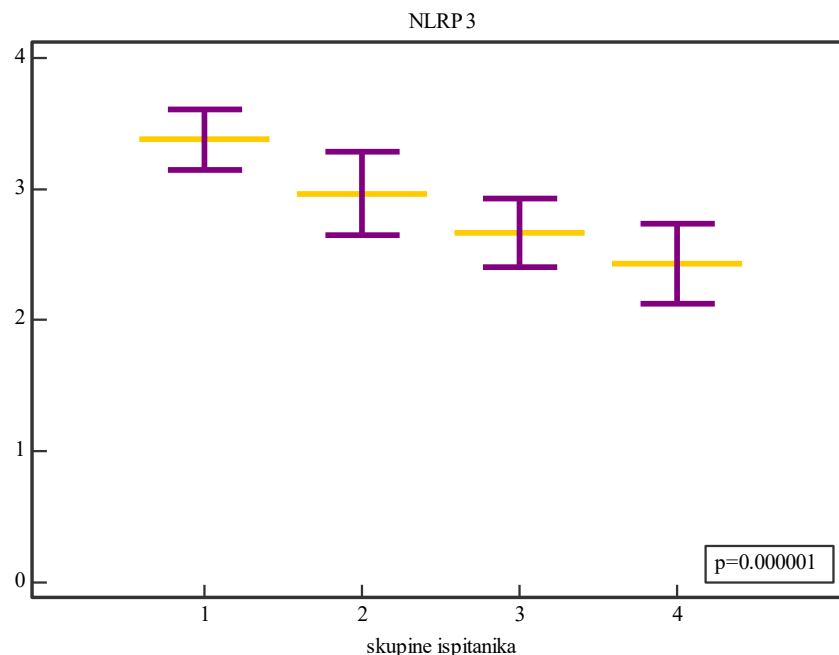
Slika 9. Intenzitet bojanja NLRP3 protutijela između analiziranih skupina bolesnika. Intenzitet bojanja NLRP3 protutijela pokazuje statističku značajnost između svih analiziranih skupina ($p=0.0003$). Vodoravne linije označavaju srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; p, razina značajnosti označena na grafu Kruskal-Wallis, post-hoc analiza po Conover-u.

Tablica 11. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na NLRP3 s obzirom na intenzitet bojanja stanica u analiziranim skupinama ispitanika.

	Broj analiziranih uzoraka				Ukupan broj (%)
	OPCC	Metastaze	Leukoplakije	Papilomi i fibromi	
1	4 (6.6%)	1 (3.3%)	2 (6.7%)	4 (13.3%)	11 (7.29%)
2	22 (36.1%)	10 (33.3%)	17 (56.7%)	21 (70.0%)	70 (46.36%)
3	25 (41.0%)	14 (46.7%)	9 (30.0%)	5 (16.7%)	53 (35.09%)
4	10 (16.4%)	5 (16.7%)	2 (6.7%)	0 (0.0%)	17 (11.26%)
Ukupno	61 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	151 (100%)

Rezultat proporcije NLRP3 protutijela u skupini ispitanika sa OPCC i skupini ispitanika sa metastazama OPCC u limfne čvorove vrata je značajno izraženiji u odnosu na skupinu ispitanika sa leukoplakijom i skupinu ispitanika sa papilomima/fibromima; ta razlika je statistički značajna ($p=0.000001$) (Slika 10).

Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na NLRP3 s obzirom na broj obojenih stanica u analiziranim skupinama ispitanika je prikazan u Tablici 12.



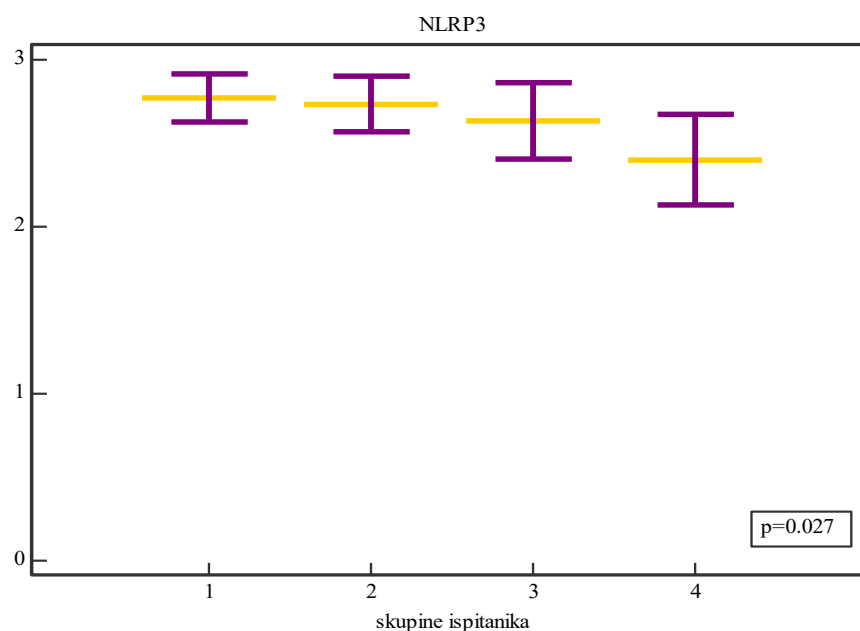
Slika 10. Rezultat proporcije NLRP3 protutijela između analiziranih skupina bolesnika. Rezultat proporcije NLRP3 protutijela je značajno izraženiji u skupini bolesnika s OPCC sa ostalim skupinama te u skupini bolesnika sa metastazama planocelularnog karcinoma u limfne čvorove vrata u odnosu na ispitanike sa leukoplakijom te papilomima i fibromima ($p=0.000001$). Vodoravne linije označavaju srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; p , razina značajnosti označena na grafu Kruskal-Wallis, post-hoc analiza po Conover-u.

Tablica 12. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na NLRP3 s obzirom na broj obojenih stanica u analiziranim skupinama ispitanika.

	Broj analiziranih uzoraka				Ukupan broj (%)
	OPCC	Metastaze	Leukoplakije	Papilomi i fibromi	
1	4 (6.6%)	1 (3.3%)	2 (6.7%)	4 (13.3%)	11 (7.29%)
2	6 (9.8%)	8 (26.7%)	8 (26.7%)	11 (36.7%)	33 (21.86%)
3	14 (23.0%)	12 (40.0%)	18 (60.0%)	13 (43.3%)	57 (37.75%)
4	37 (60.7%)	9 (30.0%)	2 (6.7%)	2 (6.7%)	50 (33.12%)
Ukupno	61 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	151 (100%)

Analiza IRS faktora NLRP3 protutijela u skupini ispitanika sa OPCC je značajno izraženija u odnosu na skupinu ispitanika sa papilomima/fibromima ($p=0.027$) (Slika 11).

Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na NLRP3 s obzirom na IRS faktor u analiziranim skupinama ispitanika je prikazan u Tablici 13.



Slika 11. IRS faktor NLRP3 protutijela između analiziranih skupina bolesnika. IRS faktor NLRP3 protutijela je značajno izraženiji u skupini bolesnika s OPCC u odnosu na ispitanike sa papilomima i fibromima ($p=0.027$). Vodoravne linije označavaju srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; p, razina značajnosti označena na grafu Kruskal-Wallis, post-hoc analiza po Conover-u.

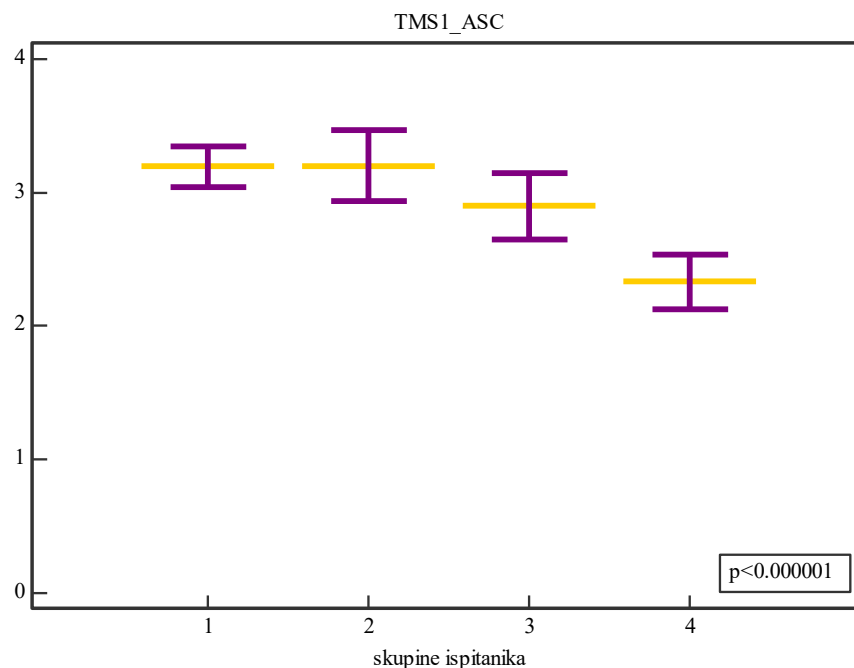
Tablica 13. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na NLRP3 s obzirom na IRS faktor u analiziranim skupinama ispitanika.

	Broj analiziranih uzoraka				Ukupan broj (%)
	OPCC	Metastaze	Leukoplakije	Papilomi i fibromi	
1	4 (6.6%)	0 (0.0%)	2 (6.7%)	4 (13.3%)	10 (6.63%)
2	6 (9.8%)	8 (26.7%)	7 (23.3%)	10 (33.3%)	31 (20.53%)
3	51 (83.6%)	22 (73.3%)	21 (70.0%)	16 (53.3%)	110 (72.85%)
Ukupno	61 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	151 (100%)

4.1.4 Izražaj ASC protutijela u analiziranim skupinama ispitanika

Evaluacija ASC imunohistokemijske analize provedena je na 151 uzorku. Intenzitet bojanja ASC protutijela u skupini ispitanika sa OPCC i skupini ispitanika sa metastazama OPCC u limfne čvorove vrata je značajno izraženija u odnosu na skupinu ispitanika s leukoplakijom te skupine ispitanika sa papilomima/fibromima ($p < 0.000001$) (Slika 12).

Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na ASC s obzirom na intenzitet bojanja stanica u analiziranim skupinama ispitanika je prikazan u Tablici 14.



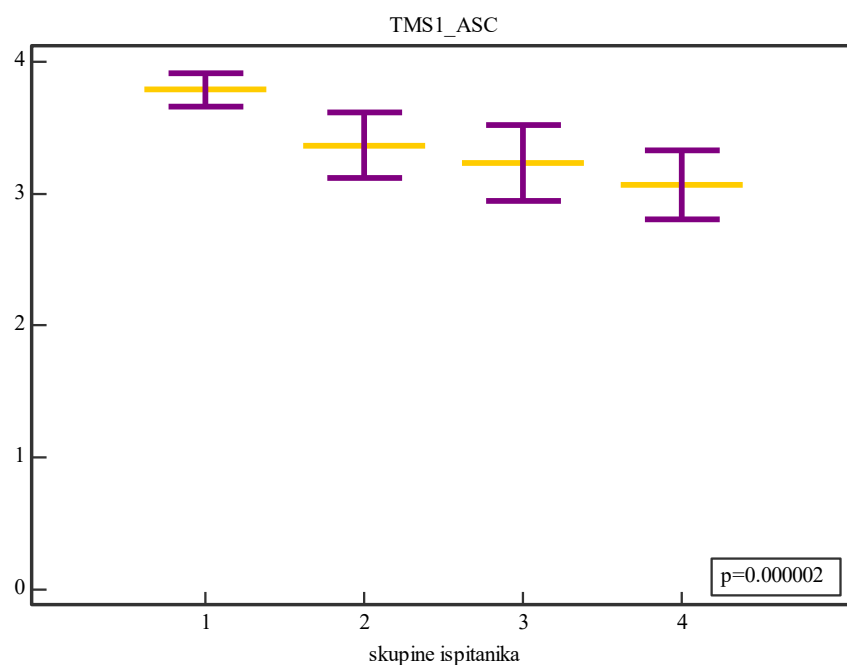
Slika 12. Intenzitet bojanja ASC protutijela između analiziranih skupina bolesnika. Intenzitet bojanja ASC protutijela je značajno izraženiji u skupini bolesnika s OPCC i skupini bolesnika sa metastazama planocelularnog karcinoma u limfne čvorove vrata u odnosu na ispitanike sa leukoplakijom te papilomima i fibromima ($p < 0.000001$). Vodoravne linije označavaju srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; p, razina značajnosti označena na grafu Kruskal-Wallis, post-hoc analiza po Conover-u.

Tablica 14. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na ASC s obzirom na intenzitet bojanja stanica u analiziranim skupinama ispitanika.

	Broj analiziranih uzoraka				Ukupan broj (%)
	OPCC	Metastaze	Leukoplakije	Papilomi i fibromi	
1	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.00%)
2	6 (9.8%)	5 (16.7%)	8 (26.7%)	21 (70.0%)	40 (26.49%)
3	37 (60.7%)	14 (46.7%)	17 (56.7%)	8 (26.7%)	76 (50.33%)
4	18 (29.5%)	11 (36.7%)	5 (16.7%)	1 (3.3%)	35 (23.18%)
Ukupno	61 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	151 (100%)

Rezultat proporcije ASC protutijela u skupini ispitanika sa OPCC vrata je značajno izraženiji u odnosu na skupinu ispitanika sa metastazama OPCC u limfne čvorove, skupinu ispitanika sa leukoplakijom i skupinu ispitanika sa papilomima/fibromima; ta razlika je statistički značajna ($p=0.000002$) (Slika 13).

Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na ASC s obzirom na broj obojenih stanica u analiziranim skupinama ispitanika je prikazan u Tablici 15.



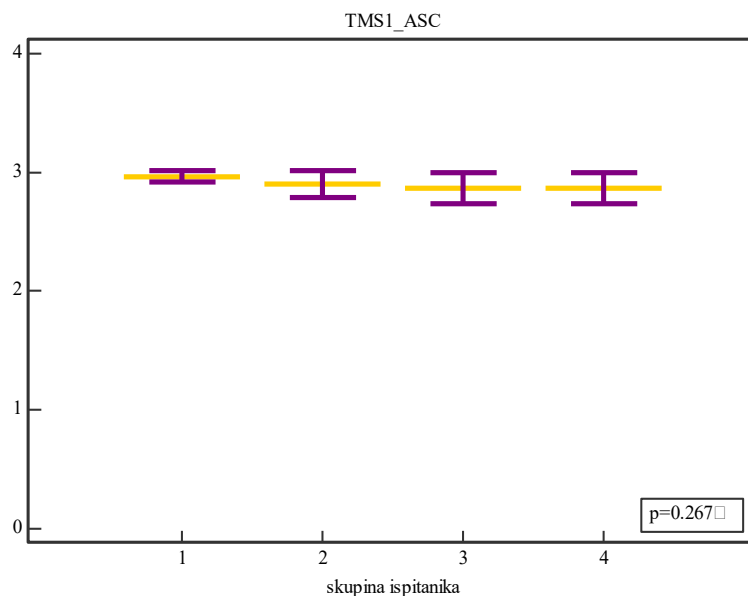
Slika 13. Rezultat proporcije ASC protutijela između analiziranih skupina bolesnika. Rezultat proporcije ASC protutijela je značajno izraženiji u skupini bolesnika s OPCC u odnosu na ispitanike u skupini sa metastazama planocelularnog karcinoma u limfne čvorove vrata u odnosu na ispitanike sa leukoplakijom te papilomima i fibromima ($p=0.000002$). Vodoravne linije označavaju srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; p, razina značajnosti označena na grafu Kruskal-Wallis, post-hoc analiza po Conover-u.

Tablica 15. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na ASC s obzirom na broj obojenih stanica u analiziranim skupinama ispitanika.

	Broj analiziranih uzoraka				Ukupan broj (%)
	OPCC	Metastaze	Leukoplakije	Papilomi i fibromi	
1	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.00%)
2	2 (3.3%)	3 (10.0%)	6 (20.0%)	6 (20.0%)	17 (11.26%)
3	9 (14.8%)	13 (43.3%)	11 (36.7%)	16 (53.3%)	49 (32.45%)
4	50 (82.0%)	14 (46.7%)	13 (43.3%)	8 (26.7%)	85 (56.29%)
Ukupno	61 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	151 (100%)

Analiza IRS faktora ASC protutijela ne pokazuje statisticku znacajnost između ispitivanih skupina ($p=0.267$) (Slika 14), unatoč razlikama u rezultatu proporcije i intenziteta bojanja.

Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na ASC s obzirom na IRS faktor u analiziranim skupinama ispitanika je prikazan u Tablici 16.



Slika 14. IRS faktor ASC protutijela između analiziranih skupina bolesnika. IRS faktor ASC protutijela ne pokazuje statističku značajnosti između ispitivanih skupina ($p=0.267$). Vodoravne linije označavaju srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; p, razina značajnosti označena na grafu Kruskal-Wallis, post-hoc analiza po Conover-u.

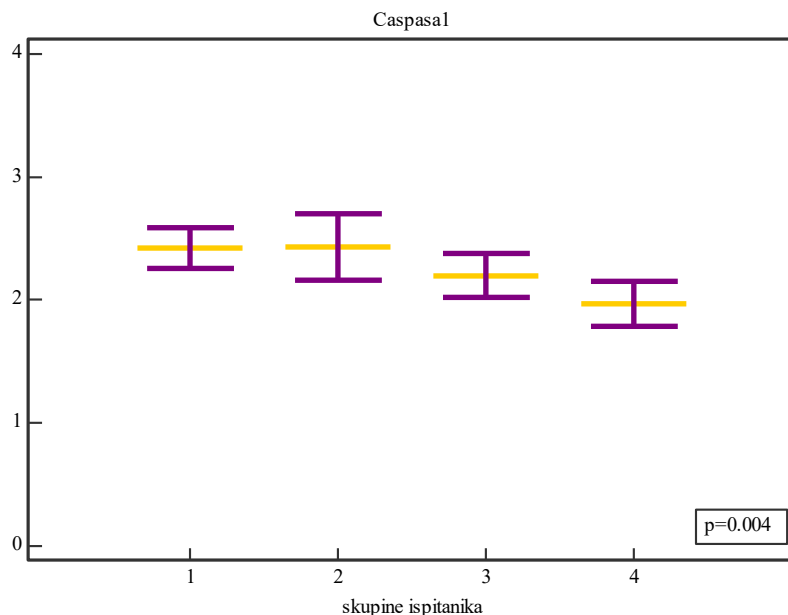
Tablica 16. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na ASC s obzirom na IRS faktor u analiziranim skupinama ispitanika.

	Broj analiziranih uzoraka				Ukupan broj (%)
	OPCC	Metastaze	Leukoplakije	Papilomi i fibromi	
1	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
2	2 (3.3%)	3 (10.0%)	4 (13.3%)	4 (13.3%)	13 (8.61%)
3	59 (96.7%)	27 (90.0%)	26 (86.7%)	26 (86.7%)	138 (91.39%)
Ukupno	61 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	151 (100%)

4.1.5 Izražaj Caspase 1 protutijela u analiziranim skupinama ispitanika

Evaluacija Caspase 1 imunohistokemijske analize provedena je na 151 uzorku. Intenzitet bojanja Caspase 1 protutijela u skupini ispitanika sa OPCC i skupini ispitanika sa metastazama OPCC u limfne čvorove vrata je značajno izraženiji u odnosu na skupinu ispitanika sa papilomima/fibromima; ta razlika je statistički značajna ($p=0.004$), dok nije uočena statistički značajna razlika između skupine ispitanika s leukoplakijom i drugih analiziranih skupina ispitanika (Slika 15).

Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na Caspase 1 s obzirom na intenzitet bojanja stanica u analiziranim skupinama ispitanika je prikazan u Tablici 17.



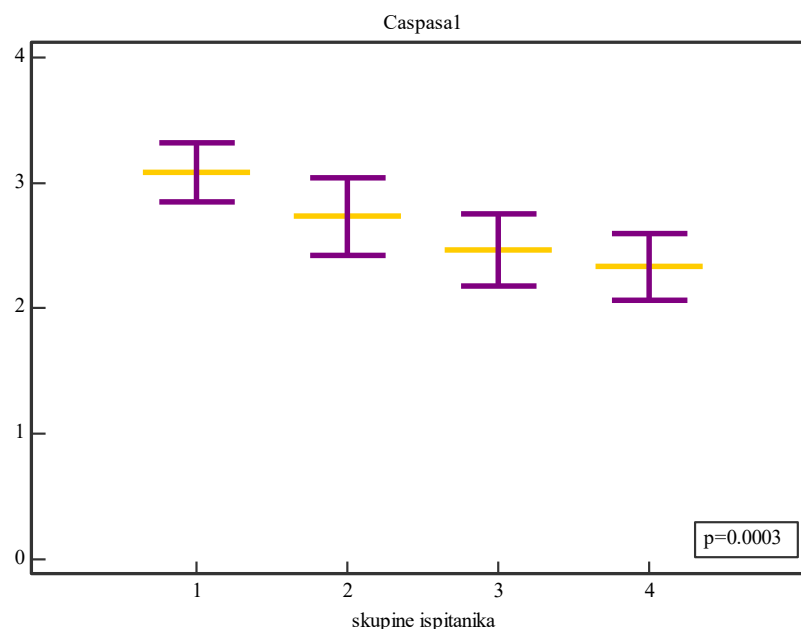
Slika 15. Intenzitet bojanja Caspase 1 protutijela između analiziranih skupina bolesnika. Intenzitet bojanja Caspase 1 protutijela je značajno izraženiji u skupini ispitanika s OPCC i skupini ispitanika sa metastazama OPCC u limfne čvorove vrata u odnosu na ispitanike sa papilomima i fibromima ($p=0.004$). Vodoravne linije označavaju srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; p, razina značajnosti označena na grafu Kruskal-Wallis, post-hoc analiza po Conover-u.

Tablica 17. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na Caspase 1 s obzirom na intenzitet bojanja stanica u analiziranim skupinama ispitanika.

	Broj analiziranih uzoraka				Ukupan broj (%)
	OPCC	Metastaze	Leukoplakije	Papilomi i fibromi	
1	3 (4.9%)	2 (6.7%)	1 (3.3%)	4 (13.3%)	10 (6.63%)
2	31 (50.8%)	15 (50.0%)	22 (73.3%)	23 (76.7%)	91 (60.27%)
3	25 (41.0%)	11 (36.7%)	7 (23.3%)	3 (10.0%)	46 (30.46%)
4	2 (3.3%)	2 (6.7%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	4 (2.64%)
Ukupno	61 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	151 (100%)

Rezultat proporcije Caspase 1 protutijela u skupini ispitanika sa OPCC je značajno izraženiji u odnosu na skupinu ispitanika sa leukoplakijom i skupinu ispitanika sa papilomima/fibromima; ta razlika je statistički značajna ($p=0.003$), dok nije uočena statistički značajna razlika između skupine ispitanika sa metastazama OPCC u limfne čvorove vrata i drugih analiziranih skupina ispitanika (Slika 16).

Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na Caspase 1 s obzirom na broj obojenih stanica u analiziranim skupinama ispitanika je prikazan u Tablici 18.



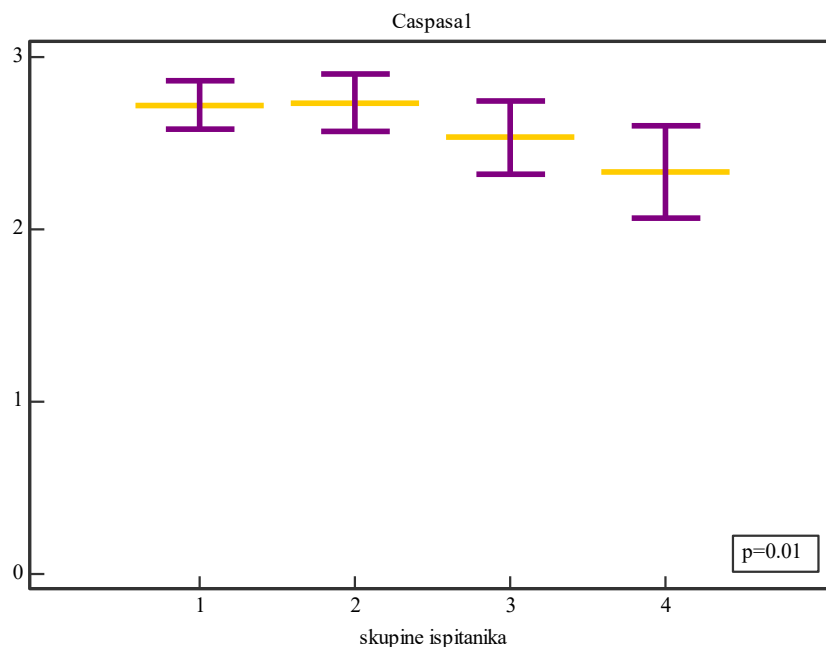
Slika 16. Rezultat proporcije Caspase 1 protutijela između analiziranih skupina bolesnika. Rezultat proporcije Caspase 1 protutijela je značajno izraženiji u skupini ispitanika sa OPCC u odnosu na skupinu ispitanika sa leukoplakijom i skupinu ispitanika sa papilomima/fibromima ($p=0.0003$). Vodoravne linije označavaju srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; p, razina značajnosti označena na grafu Kruskal-Wallis, post-hoc analiza po Conover-u.

Tablica 18. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na Caspase 1 s obzirom na broj obojenih stanica u analiziranim skupinama ispitanika.

	Broj analiziranih uzoraka				Ukupan broj (%)
	OPCC	Metastaze	Leukoplakije	Papilomi i fibromi	
1	3 (4.9%)	2 (6.7%)	2 (6.7%)	4 (13.3%)	11 (7.29%)
2	14 (23.0%)	9 (30.0%)	15 (50.0%)	12 (40.0%)	50 (33.11%)
3	19 (31.1%)	14 (46.7%)	10 (33.3%)	14 (46.7%)	57 (37.75%)
4	25 (41.0%)	5 (16.7%)	3 (10.0%)	0 (0.0%)	33 (21.85%)
Ukupno	61 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	151 (100%)

Rezultat analize IRS faktora Caspase 1 protutijela u skupini ispitanika sa OPCC je značajno izraženiji u odnosu na skupinu ispitanika sa leukoplakijom i skupinu ispitanika sa papilomima/fibromima; ta razlika je statistički značajna ($p=0.01$), dok nije uočena statistički značajna razlika između skupine ispitanika sa metastazama OPCC u limfne čvorove vrata i drugih analiziranih skupina ispitanika (Slika 17). Caspase 1 pokazuje izraženiju ekspresiju prvenstveno u primarnom OPCC-u, dok je razlika u metastatskoj skupini manje izražena.

Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na Caspase 1 s obzirom na IRS faktor u analiziranim skupinama ispitanika je prikazan u Tablici 19.



Slika 17. IRS faktor Caspase 1 protutijela između analiziranih skupina bolesnika. IRS faktor Caspase 1 protutijela je značajno izraženiji u skupini ispitanika sa OPCC u odnosu na skupinu ispitanika sa leukoplakijom i skupinu ispitanika sa papilomima/fibromima ($p=0.01$). Vodoravne linije označavaju srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; p, razina značajnosti označena na grafu Kruskal-Wallis, post-hoc analiza po Conover-u.

Tablica 19. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na Caspase 1 s obzirom na IRS faktor u analiziranim skupinama ispitanika.

Broj analiziranih uzoraka					Ukupan broj (%)
	OPCC	Metastaze	Leukoplakije	Papilomi i fibromi	
1	3 (4.9%)	0 (0.0%)	1 (3.3%)	4 (13.3%)	8 (5.29%)
2	11 (18.0%)	8 (26.7%)	12 (40.0%)	12 (40.0%)	43 (28.47%)
3	47 (77.0%)	22 (73.3%)	17 (56.7%)	14 (46.7%)	100 (66.24%)
Ukupno	61 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	30 (100.0%)	151 (100%)

4.2 Rezultati izražaja analiziranih markera između skupina ispitanika

Imunohistokemijska analiza protutijela Caspase 1, PD-L2, NLRP3, ASC i PD-L1 provedena je na ukupno 151 uzorku (Tablica 20). U ukupnom uzorku analizirana je i uspoređena distribucija intenziteta bojanja, rezultata proporcije te IRS faktora za sva protutijela. Za protutijelo Caspase 1 utvrđena je statistički značajna razlika u intenzitetu bojanja ($p = 0.04$; $\chi^2 = 17.14$), rezultatu proporcije ($p = 0.0009$; $\chi^2 = 28.21$) te IRS faktoru ($p = 0.02$; $\chi^2 = 14.01$)

Za protutijelo PD-L2 utvrđena je izrazito visoka statistička značajnost u svim analiziranim parametrima, uključujući intenzitet bojanja ($p < 0.0001$; $\chi^2 = 52.83$), rezultat proporcije ($p < 0.0001$; $\chi^2 = 51.17$) te IRS faktor ($p < 0.0001$; $\chi^2 = 32.02$). Također, za protutijelo NLRP3 utvrđena je statistički značajna razlika u intenzitetu bojanja ($p = 0.017$; $\chi^2 = 20.02$), rezultatu proporcije ($p < 0.0001$; $\chi^2 = 44.39$) i IRS faktoru ($p = 0.04$; $\chi^2 = 13.06$).

Kod ASC protutijela, statistički značajna razlika potvrđena je za intenzitet bojanja ($p < 0.0001$; $\chi^2 = 42.92$) i rezultat proporcije ($p < 0.0001$; $\chi^2 = 31.92$), dok IRS faktor nije pokazao statističku značajnost ($p = 0.263$; $\chi^2 = 3.98$). Za protutijelo PD-L1 zabilježena je statistički značajna razlika u intenzitetu bojanja ($p < 0.0001$; $\chi^2 = 43.26$), rezultatu proporcije ($p = 0.004$; $\chi^2 = 24.39$) te IRS faktoru ($p = 0.002$; $\chi^2 = 20.48$).

Dodatno, analizirali smo korelacije između analiziranih protutijela u ukupnom uzorku. Rezultati su prikazani u Tablici 21. Prikazani su koeficijenti korelacije (r) i pripadajuće p -vrijednosti.

Tablica 20. Usporedba izražaja analiziranih protutijela između skupina ispitanika.

	<i>p</i>	χ^2
Caspase 1		
Caspase 1_Int	0.04	17.14
Caspase 1_Pro	0.0009	28.21
Caspase 1_IRS	0.02	14.01
PD-L2		
PD-L2_Int	<0.0001	52.83
PD-L2_Pro	<0.0001	51.17
PD-L2_IRS	<0.0001	32.02
NLRP3		
NLRP3_Int	0.017	20.02
NLRP3_Pro	<0.0001	44.39
NLRP3_IRS	0.04	13.06
ASC		
ASC_Int	<0.0001	42.92
ASC_Pro	<0.0001	31.92
ASC_IRS	0.263	3.98
PD-L1		
PD-L1_Int	<0.0001	43.26
PD-L1_Pro	0.004	24.39
PD-L1_IRS	0.002	20.48

Tablica 21. Korelacije između analiziranih protutijela u ukupnom uzorku.

		Caspase 1_IRS	NLRP3_IRS	PD-L1_IRS	ASC_IRS	PD-L2_IRS
Caspase 1_IRS	r		0.285	0.217	0.127	0.363
	p		0.0004	0.007	0.1197	<0.0001
NLRP3_IRS	r	0.285		0.267	0.123	0.244
	p	0.0004		0.0009	0.1315	0.0026
PD-L1_IRS	r	0.217	0.267		0.011	0.182
	p	0.007	0.0009		0.8906	0.0255
ASC_IRS	r	0.127	0.123	0.011		0.191
	p	0.1197	0.1315	0.8906		0.0188
PD-L2_IRS	r	0.363	0.244	0.182	0.191	
	p	<0.0001	0.0026	0.0255	0.0188	

4.3 Rezultati istraživanja o povezanosti ekspresije PD-L1 i PD-L2 s kliničkim i patohistološkim osobinama tumora kod bolesnika s OPCC

Analizirali smo povezanost ekspresije PD-L1 i PD-L2 s različitim kliničkim i patohistološkim osobinama tumora kod ispitanika s OPCC. Uzorak je obuhvatio ukupno 61 ispitanika za PD-L1 (25 s niskim izražajem i 36 s visokim izražajem) i 61 ispitanika za PD-L2 (17 s niskim izražajem i 44 s visokim izražajem).

Nije bilo značajne povezanosti između spola i izražaja PD-L1 ($p=0.24$) ili PD-L2 ($p=1.00$). Muški ispitanici su činili 46 slučajeva za PD-L1 (21 s niskim i 25 s visokim izražajem) i 46 slučajeva za PD-L2 (13 s niskim i 33 s visokim izražajem), dok su ženski ispitanici činili 15 slučajeva za PD-L1 (4 s niskim i 11 s visokim izražajem) i 15 slučajeva za PD-L2 (4 s niskim i 11 s visokim izražajem).

Utvrđena je statistički značajna povezanost između dobnih skupina i ekspresije PD-L1 ($\chi^2=9.82$, $p=0.04$), ali ne i za PD-L2 ($\chi^2=2.05$, $p=0.73$).

U analiziranom uzorku nismo pokazali značajne povezanosti između gradusa tumora i izražaja PD-L1 ($\chi^2=3.84$, $p=0.15$) ili PD-L2 ($\chi^2=0.77$, $p=0.68$). Nismo pokazali značajne razlike u izražaju PD-L1 ($\chi^2=4.84$, $p=0.65$) i PD-L2 ($\chi^2=4.43$, $p=0.62$) u različitim lokalizacijama tumora.

Nije bilo značajne povezanosti između pušenja i ekspresije PD-L1 ($p=0.24$) ili PD-L2 ($p=0.53$), kao ni između konzumacije alkohola i ekspresije PD-L1 ($p=0.09$) ili PD-L2 ($p=1.00$).

Nadalje, nismo pokazali značajnu povezanost između TNM stadija tumora i izražaja PD-L1 ($\chi^2=3.56$, $p=0.31$) ili PD-L2 ($\chi^2=1.37$, $p=0.71$). Nisu pronađene značajne razlike u izražaju PD-L1 (PNI $p=0.38$, LVI $p=0.29$) niti PD-L2 (PNI $p=1.00$, LVI $p=0.26$) povezane s prisustvom perineuralne i limfovaskularne invazije. Također, nije dokazana značajna povezanost između izražaja PD-L1 ($\chi^2=0.03$, $p=0.98$) ni PD-L2 ($\chi^2=0.04$, $p=0.97$) i dubine invazije (Tablica 22).

Korištena radioterapija, komorbiditeti, ASA, vrsta i tip operacije i *Clavien-Dindo* skala, te mjeseci praćenja bolesnika nisu pokazali značajnu povezanost sa izražajem PD-L1 i PD-L2 kod bolesnika s OPCC (podaci nisu prikazani u tablici 22).

Tablica 22. Povezanost izražaja PD-L1 i PD-L2 sa kliničkim i patohistološkim osobinama tumora kod bolesnika s OPCC.

	PD-L1_IRS		<i>p</i>	PD-L2_IRS		<i>p</i>
	0/+ <i>n</i> =25	++/+++ <i>n</i> =36		0/+ <i>n</i> =17	++/+++ <i>n</i> =44	
Spol						
muško	21	25	<i>p</i> =0.24*	13	33	<i>p</i> =1.00*
žensko	4	11		4	11	
Dob						
<44	0	1	$\chi^2=9.82$ <i>p</i> =0.04	0	1	$\chi^2=2.05$ <i>p</i> =0.73
45-54	2	5		2	5	
55-64	12	12		8	16	
65-74	11	9		6	14	
>75	0	9		1	8	
Gradus						
I	4	14	$\chi^2=3.84$ <i>p</i> =0.15	5	13	$\chi^2=0.77$ <i>p</i> =0.68
II	18	18		11	25	
III	3	4		1	6	
Lokalizacija						
dno usne šupljine	3	8	$\chi^2=4.84$ <i>p</i> =0.65	2	9	$\chi^2=4.43$ <i>p</i> =0.62
retromolarno	2	1		1	2	
jezik	10	17		8	18	
gingiva	7	7		2	11	
mandibule						
obraz	1	2		1	2	
gingiva maksile	2	1		1	2	
meko nepce	0	0		1	0	
Pušenje						
da	21	25	<i>p</i> =0.24*	14	32	<i>p</i> =0.53*
ne	4	11		3	12	
Alkohol						
da	20	21	<i>p</i> =0.09*	12	29	<i>p</i> =1.00*
ne	5	15		5	15	
T						
T1	5	13	$\chi^2=2.25$ <i>p</i> =0.52	3	5	$\chi^2=0.57$ <i>p</i> =0.91
T2	8	14		6	16	
T3	9	12		5	16	
T4	3	7		3	7	
N						

N0	12	12		6	18	
N1	4	4	$\chi^2=2.58$	2	6	$\chi^2=1.31$
N2	8	19	$p=0.46$	9	18	$p=0.73$
N3	1	1		0	2	
TNM stadij						
1	5	3		3	5	
2	1	4	$\chi^2=3.56$	1	4	$\chi^2=1.37$
3	8	8	$p=0.31$	3	13	$p=0.71$
4	11	21		10	22	
Perineuralna invazija						
da	5	12	$p=0.38^*$	5	12	$p=1.00^*$
ne	20	24		12	32	
Limfovaskularna invazija						
da	9	19	$p=0.29^*$	10	18	$p=0.26^*$
ne	16	17		7	26	
Dubina invazije						
0-5mm	3	4		2	5	
5-10mm	10	14	$\chi^2=0.03$	7	17	$\chi^2=0.04$
>10mm	12	18	$p=0.98$	8	22	$p=0.97$
Ekstranodalna ekstenzija						
da	3	6	$p=0.61^*$	4	5	$p=0.23^*$
ne	22	30		13	39	

**Fisherov ekzaktni test.*

Dodatno, analizirali smo povezanost izražaja Caspase 1, NLRP3 i ASC sa kliničkim i patohistološkim osobinama tumora kod bolesnika s OPCC.

U analiziranim skupinama nije bilo značajnih razlika povezanih sa spolom ($p=1.00$; $p=1.00$; $p=0.44$), dobi ($p=0.93$, 0.73 , 0.76), niti gradusom tumora ($p=0.93$, 0.73 , 0.76). Značajna povezanosti lokalizacije tumora i izražaja NLRP3 ($\chi^2=14.31$, $p=0.03$), te izražaja ASC ($\chi^2=31.35$, $p<0.0001$), dok poveznosti sa izražajem Caspase 1 protutijela nije bilo ($p=0.65$).

Analizom povezanosti izražaja navedenih protutijela i pušenja, alkohola, TNM stadijem, PNI, LVI, dubinom invazije ili ekstranodalnom ekstenzijom nismo pokazali statističke značajnosti (Tablica 23).

Korištena radioterapija, komorbiditeti, ASA, vrsta i tip operacije i *Clavien-Dindo* skala te mjeseci praćenja bolesnika nisu pokazali značajnu povezanost sa ekspresijom Caspase 1, NLRP3 i ASC kod bolesnika s OPCC. Ovi rezultati sugeriraju da ekspresija Caspase 1, NLRP3 i ASC možda nije značajno povezan s većinom analiziranih kliničkih i patohistoloških osobina tumora kod bolesnika s OPCC.

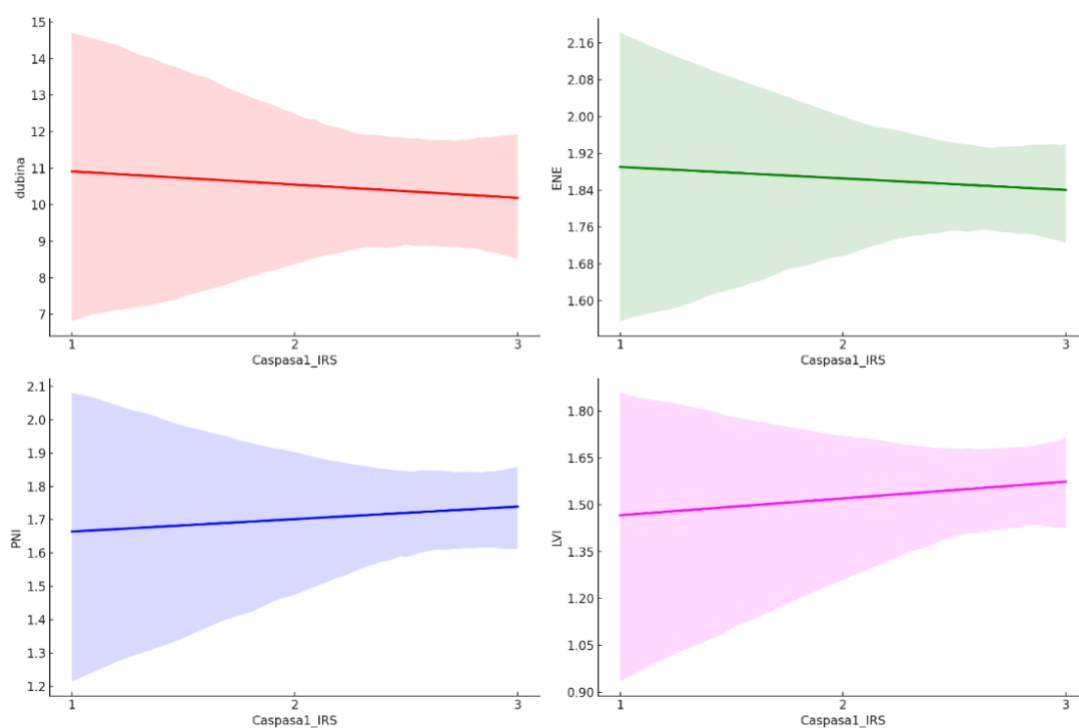
Tablica 23. Povezanost izražaja Caspase 1, NLRP3 i ASC sa kliničkim i patohistološkim osobinama tumora kod bolesnika s OPCC.

	Caspase 1_IRS		<i>p</i>	NLRP3_IRS		<i>p</i>	ASC_IRS		<i>p</i>
	0/+	++/++ +		0/+	++/++ +		0/+	++/++ +	
	<i>n=1</i> 4	<i>n=47</i>		<i>n=1</i> 0	<i>n=51</i>		<i>n=</i> 2	<i>n=59</i>	
Spol									
muško	11	35		8	38		1	45	
žensko	3	12	<i>p=1.0</i> <i>0*</i>	2	13	<i>p=1.00</i> <i>*</i>	1	14	<i>p=0.44*</i>
Dob									
<44	0	1		0	1		0	1	
45-54	1	6		2	5		0	7	
55-64	6	18	$\chi^2=1.2$ 9	2	22	$\chi^2=3.3$ 6	1	23	$\chi^2=0.83$ <i>p=0.93</i>
65-74	4	16		5	15		1	19	
>75	3	6	<i>p=0.8</i> 6	1	8	<i>p=0.51</i>	0	9	
Gradus									
I	4	14	$\chi^2=0.1$ 4	2	16	$\chi^2=0.6$ 3	1	17	$\chi^2=0.56$ <i>p=0.76</i>
II	8	28		7	29		1	35	
III	2	5	<i>p=0.9</i> 3	1	6	<i>p=0.73</i>	0	7	
Lokalizacija									
dno usne šupljine	3	8		0	11		0	11	
retromolarno	1	2		2	1		0	3	
jezik	8	19	$\chi^2=4.2$ 6	3	24	$\chi^2=14.31$	0	27	$\chi^2=31.35$ <i>p<0.0001</i>
gingiva	1	12		2	11		1	12	
mandibule									
obraz	0	3	<i>p=0.6</i> 5	2	1	<i>p=0.03</i>	0	3	
gingiva maksile	1	3		1	3		1	3	
meko nepce	0	0		0	0		0	0	

Pušenje									
da	12	34		9	37		2	44	
ne	2	13	$p=0.48^*$	1	14	$p=0.43^*$	0	15	$p=1.00^*$
Alkohol									
da	10	31		9	32		2	39	
ne	4	16	$p=0.76^*$	1	19	$p=0.15^*$	0	20	$p=1.00^*$
T									
T1	2	6		2	6		1	7	
T2	4	18	$\chi^2=0.73$	3	19	$\chi^2=2.63$	1	21	$\chi^2=3.31$
T3	6	15		2	19		0	21	$p=0.35$
T4	2	8	$p=0.86$	3	7	$p=0.45$	0	10	
N									
N0	7	17		4	20		1	23	
N1	0	8	$\chi^2=3.64$	2	6	$\chi^2=0.87$	0	8	$\chi^2=0.42$
N2	7	20		4	23		1	26	$p=0.94$
N3	0	2	$p=0.31$	0	2	$p=0.83$	0	2	
TNM stadij									
1	2	6		2	6		1	7	
2	2	3	$\chi^2=1.91$	1	4	$\chi^2=0.67$	0	5	$\chi^2=2.86$
3	2	14		2	14		0	16	$p=0.41$
4	8	24	$p=0.59$	5	27	$p=0.88$	1	31	
Perineuralna invazija									
da	4	13	$p=1.00^*$	2	15	$p=0.71^*$	5	12	$p=1.00^*$
ne	10	34		8	36		12	32	
Limfovaskularna invazija									
da	8	20	$p=0.37^*$	5	23	$p=1.00^*$	0	28	$p=0.49^*$
ne	6	27		5	28		2	31	
Dubina invazije									
0-5mm	1	6		3	4		1	6	
5-10mm	5	19	$\chi^2=0.59$	2	22	$\chi^2=4.72$	1	23	$\chi^2=3.75$
>10mm	8	22	$p=0.75$	5	25	$p=0.09$	0	30	$p=0.15$
Ekstranodalna ekstenzija									
da	1	8		2	7	$p=0.63^*$	1	8	$p=0.27^*$
ne	13	39	$p=0.67^*$	8	44		1	51	

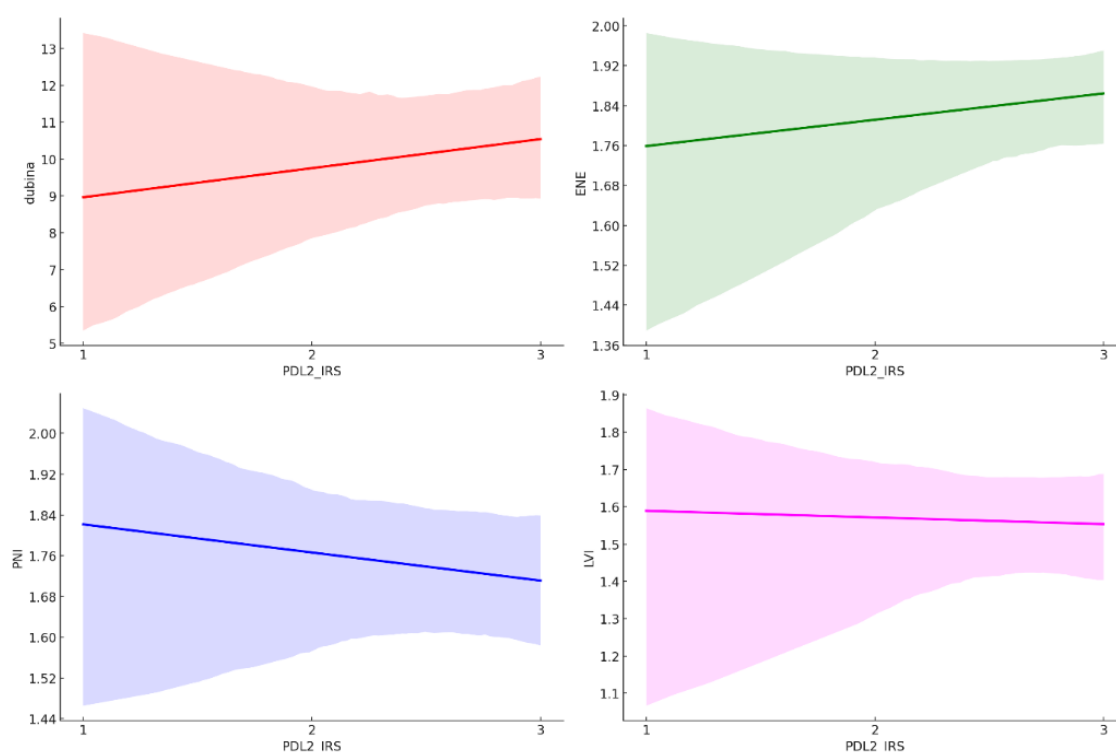
4.4 Rezultati analize ekspresija markera i parametara agresivnosti tumora u skupini ispitanika s OPCC

Kako bi determinirali izražaj analiziranih protutijela na progresiju tumora, analizirali smo parametre agresivnosti tumorskog rasta i to dubina invazije, ENE, PNI i LVI sa svakim od protutijela. Iako nije pokazana jasna statistička značajnost između navedenih parametara agresivnosti tumora i izražaja Caspase 1 protutijela (dubina invazije ($r=-0.0036$, $p=0.787$), ENE ($r=0.04$, $p=0.74$), PNI ($r=0.02$, $p=0.89$) i LVI ($r=0.0653$, $p=0.656$)), regresijska linija i 95% intervalom pouzdanosti jasno ukazuju na trend, posebice kod parametara ENE, PNI i LVI. Čini se da je veća ekspresija IRS faktora Caspase 1 protutijela povezana s većim stupnjem ENE, PNI i LVI (slika 18).



Slika 18. Linearna regresijska analiza IRS faktora Caspase 1 protutijela i četiri odabrana parametra: dubina invazije ($r=-0.0036$, $p=0.787$), ENE ($r=0.04$, $p=0.74$), PNI ($r=0.02$, $p=0.89$) i LVI ($r=0.0653$, $p=0.656$). Svaki graf prikazuje odnos IRS faktora Caspase 1 protutijela i jednog od navedenih parametara, s regresijskom linijom i 95% intervalom pouzdanosti koji ukazuju na trend.

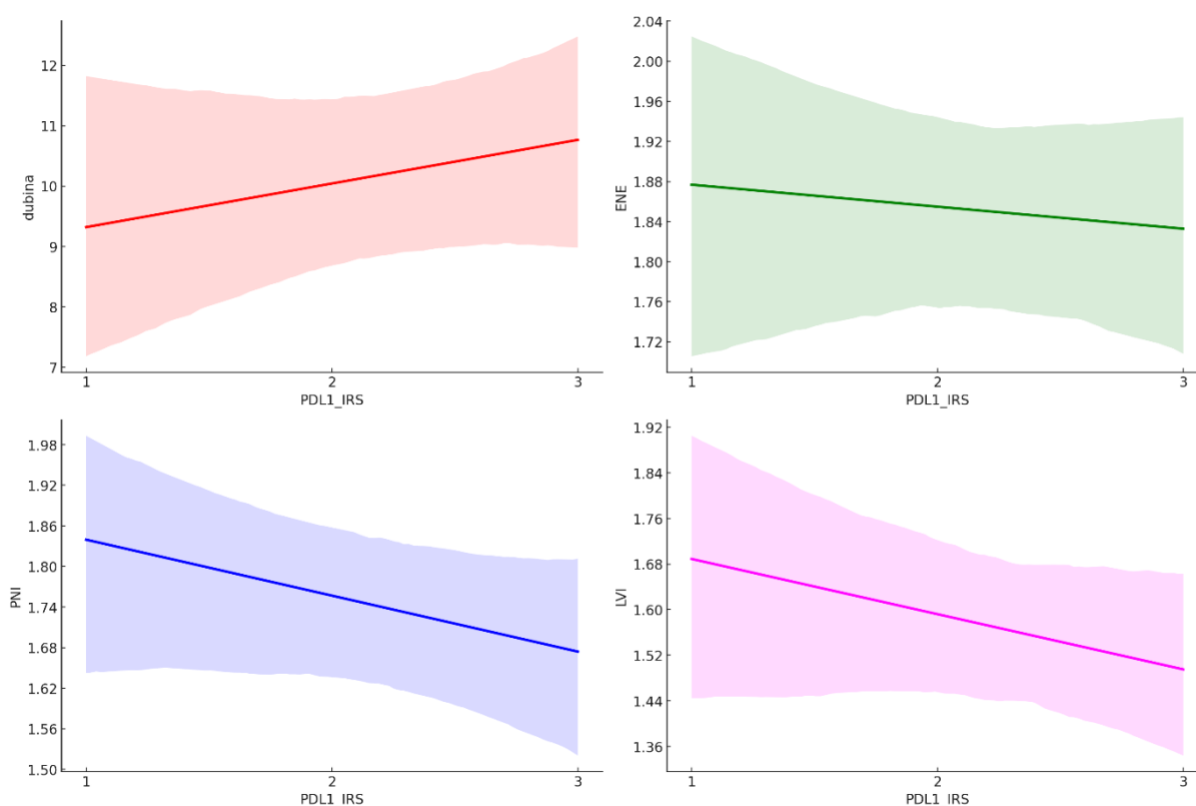
Nadalje, nije pokazana jasna statistička značajnosti između navedenih parametara agresivnosti tumora i izražaja PD-L2 protutijela (dubina invazije ($r=0.0092$, $p=0.521$), ENE ($r=0.07$, $p=0.593$), PNI ($r=0.05$, $p=0.690$) i LVI ($r=-0.0256$, $p=0.872$)), regresijska linija i 95% intervalom pouzdanosti jasno ukazuju na trend, posebice kod parametara dubina invazije, ENE i PNI. Čini se da je veća ekspresija IRS faktora PD-L2 protutijela povezana s većim stupnjem dubine invazije, ENE i PNI (Slika 19).



Slika 19. Linearna regresijska analiza IRS faktora PD-L2 protutijela i četiri odabrana parametra: dubina invazije ($r=0.0092$, $p=0.521$), ENE ($r=0.07$, $p=0.593$), PNI ($r=0.05$, $p=0.690$) i LVI ($r=-0.0256$, $p=0.872$). Svaki graf prikazuje odnos IRS faktora PD-L2 protutijela i jednog od navedenih parametara, s regresijskom linijom i 95% intervalom pouzdanosti koji ukazuju na trend.

Također, nije pokazana jasna statistička značajnosti između navedenih parametara agresivnosti tumora i izražaja PD-L1 protutijela (dubina invazije ($r=0.0175$, $p=0.397$), ENE ($r=0.06$, $p=0.667$), PNI ($r=0.19$, $p=0.148$) i LVI ($r=-0.2879$, $p=0.206$)), regresijska linija i

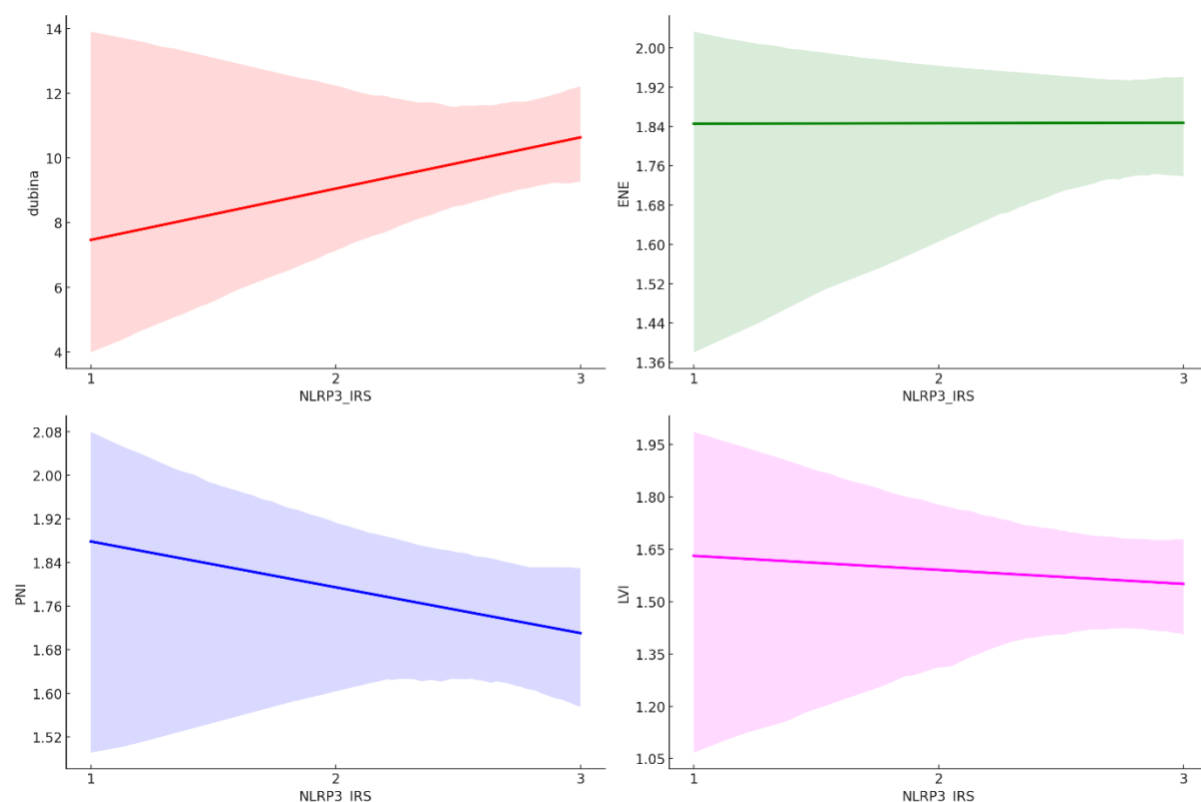
95% intervalom pouzdanosti jasno ukazuju na trend, posebice kod parametara dubina invazije, PNI i LVI. Čini se da je veća ekspresija IRS faktora PD-L1 protutijela povezana s većim stupnjem dubine invazije, PNI i LVI (Slika 20).



Slika 20. Linearna regresijska analiza IRS faktora PD-L1 protutijela i četiri odabrana parametra: dubina invazije ($r=0.0175$, $p=0.397$), ENE ($r=0.06$, $p=0.667$), PNI ($r=0.19$, $p=0.148$) i LVI ($r=-0.2879$, $p=0.206$). Svaki graf prikazuje odnos IRS faktora PD-L1 protutijela i jednog od navedenih parametara, s regresijskom linijom i 95% intervalom pouzdanosti koji ukazuju na trend.

Nije pokazana jasna statistička značajnosti između navedenih parametara agresivnosti tumora i izražaja NLRP3 protutijela (dubina invazije ($r=0.0161$, $p=0.227$), ENE ($r=0.01$, $p=0.967$), PNI ($r=0.13$, $p=0.336$) i LVI ($r=-0.0501$, $p=0.736$)), regresijska linija i 95%

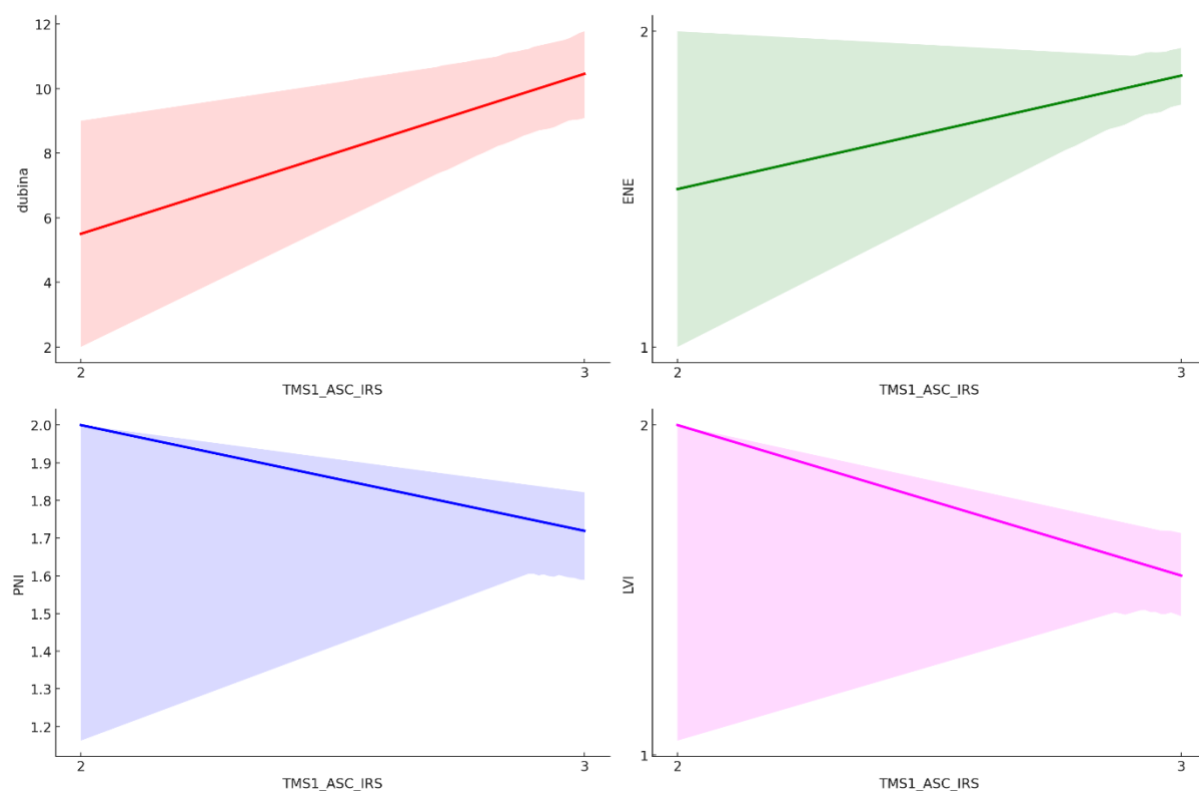
intervalom pouzdanosti jasno ukazuju na trend, posebice kod parametara dubina invazije, PNI i LVI. Čini se da je veća ekspresija IRS faktora NLRP3 protutijela povezana s većim stupnjem dubine invazije, PNI i LVI (Slika 21).



Slika 21. Linearna regresijska analiza IRS faktora NLRP3 protutijela i četiri odabrana parametara: dubina invazije ($r=0.0161$, $p=0.227$), ENE ($r=0.01$, $p=0.967$), PNI ($r=0.13$, $p=0.336$) i LVI ($r=-0.0501$, $p=0.736$). Svaki graf prikazuje odnos IRS faktora NLRP3 protutijela i jednog od navedenih parametara, s regresijskom linijom i 95% intervalom pouzdanosti koji ukazuju na trend.

Nije pokazana jasna statistička značajnosti između navedenih parametara agresivnosti tumora i izražaja ASC protutijela (dubina i invazije ($r=0.0053$, $p=0.218$), ENE ($r=0.18$, $p=0.158$), PNI ($r=0.11$, $p=0.380$) i LVI ($r=-0.0606$, $p=0.208$)), regresijska linija i

95% intervalom pouzdanosti pokazuju blagu tendenciju posebice kod parametara dubina invazije i ENE. Čini se da je veća ekspresija IRS faktora ASC protutijela povezana s većim stupnjem dubine invazije i ENE (Slika 22).



Slika 22. Linearna regresijska analiza IRS faktora ASC protutijela i četiri odabrana parametara: dubina invazije ($r=0.0053$, $p=0.218$), ENE ($r=0.18$, $p=0.158$), PNI ($r=0.11$, $p=0.380$) i LVI ($r=-0.0606$, $p=0.208$). Svaki graf prikazuje odnos IRS faktora ASC protutijela i jednog od navedenih parametara, s regresijskom linijom i 95% intervalom pouzdanosti koji ukazuju na trend.

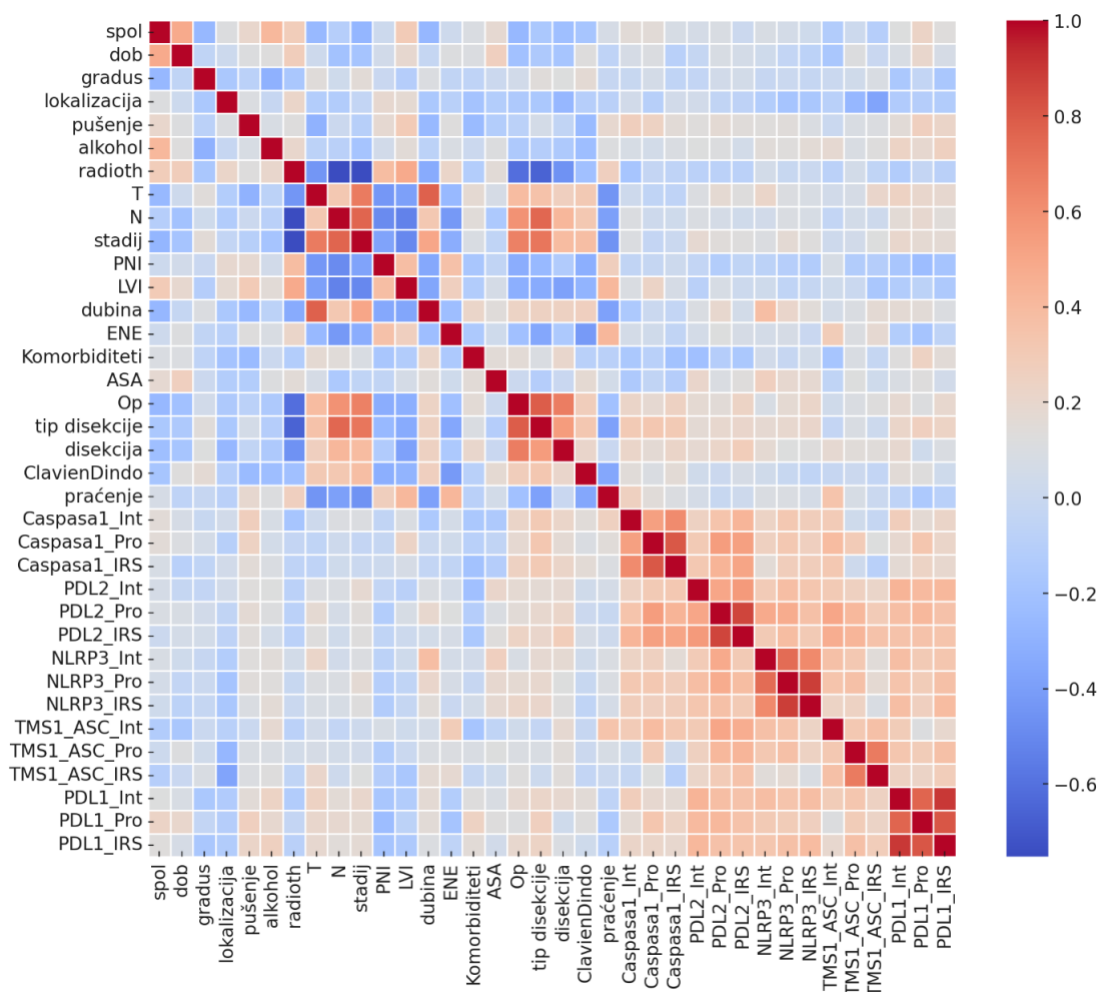
4.5 Povezanosti analiziranih parametara u skupini ispitanika s OPCC

Na temelju Spearmanove korelacijske analize za skupinu ispitanika s OPCC, nekoliko parova varijabli pokazalo je statistički značajne korelacije. Pokazana je snažna pozitivna korelacija između spola ispitanika i njihove dobi ($r=0.491$, $p=0.0001$), ali i statistički značajna negativna korelacija između spola i gradusa tumora ($r=-0.290$, $p=0.023$). Nadalje, pokazana je značajna pozitivna korelacija između spola i konzumacije alkohola ($r=0.412$, $p=0.00097$). Pokazana je značajna pozitivna korelacija između spola i primjene radioterapije ($r=0.285$, $p=0.026$) te značajna negativna korelacija između spola i stadija tumora ($r=-0.264$, $p=0.040$). Dodatno, značajna pozitivna korelacija spola i LVI ($r=0.297$, $p=0.020$) te negativna korelacija spol i tipa operacije ($r=-0.261$, $p=0.043$). Uočena je povezanost između spola ispitanika i različitih kliničkih te demografskih karakteristika, sugerirajući potencijalne razlike u karakteristikama bolesti i liječenju između muških i ženskih ispitanika.

Značajna pozitivna korelacija ($r=0.259$, $p=0.044$) uočena je između parametara dob i radio terapija. Gradus tumora značajno negativno korelira s upotrebom alkohola ($r=-0.326$, $p=0.010$), a pozitivno sa Clavien-Dindo skalom postoperativnih komplikacija ($r=0.273$, $p=0.033$). Pušenje negativno korelira sa T parametrom ($r=-0.312$, $p=0.014$) i Clavien-Dindo skalom postoperativnih komplikacija ($r=-0.259$, $p=0.044$), a pozitivno korelira sa LVI ($r=0.297$, $p=0.020$).

Parametar radioterapija pokazuje snažnu negativnu korelaciju sa N parametrom ($r=-0.752$, $p<0.000001$), T parametrom ($r=-0.422$, $p=0.00071$), stadijem tumora ($r=-0.742$, $p<0.000001$), dubinom invazije ($r=-0.377$, $p=0.00274$) i tipom disekcije ($r=-0.653$, $p=0.0001$), te snažnu pozitivnu korelaciju sa PNI ($r=0.391$, $p=0.00185$), LVI ($r=0.486$, $p=0.00007$), ENE ($r=0.310$, $p=0.014$) i praćenjem ispitanika ($r=0.253$, $p=0.04895$). Parametar T i N snažno pozitivno korelira sa stadijem tumora ($r=0.573$, $p=0.0001$), ($r=0.790$, $p=0.0001$). Parametar stadij negativno korelira sa PNI ($r=-0.308$, $p=0.015$) i LVI ($r=-0.366$, $p=0.003$).

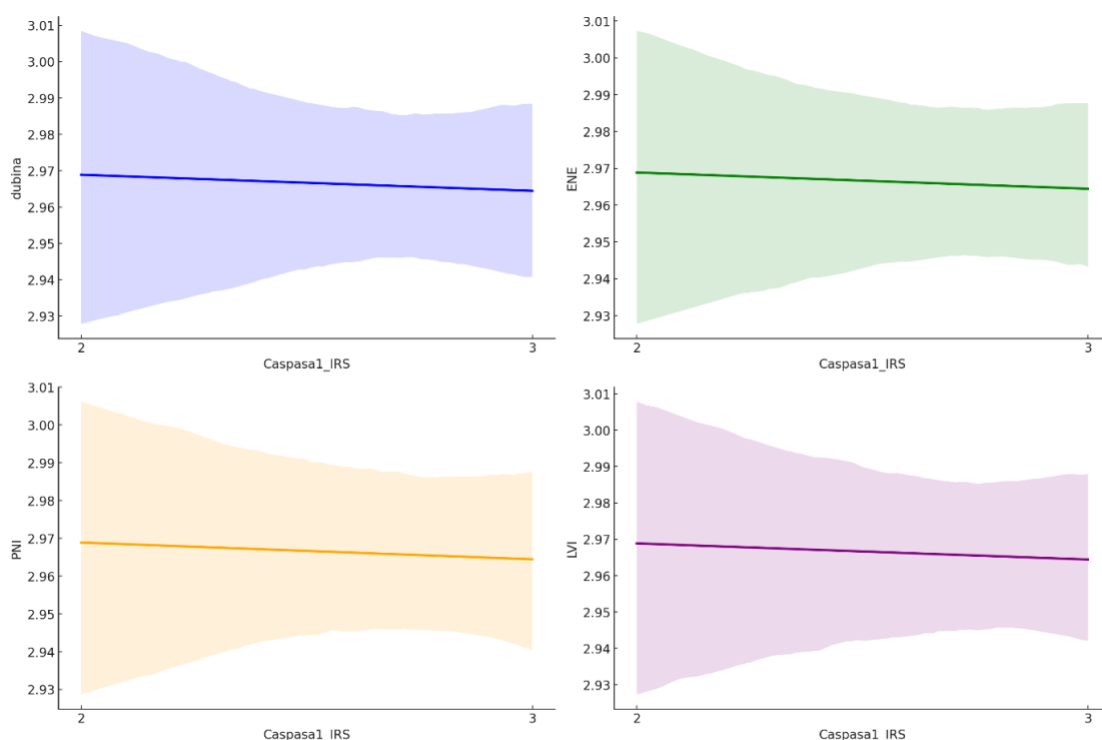
Većina parametara agresivnosti tumora pokazuju značajne korelacije. Također, koreliraju i sa preživljenjem bolesnika. Zabilježena je negativna korelacija između preživljenja bolesnika i dubine invazije ($r=-0.290$, $p=0.023$), PNI ($r=-0.289$, $p=0.024$) i LVI ($r=-0.304$, $p=0.016$). Analiza parametara agresivnosti tumora (dubina invazije, ENE; PNI, LVI) parametar T, N i stadij tumora nisu pokazali značajne korelacije sa ekspresijom analiziranih markera u skupini ispitanika s OPCC (Slika 23, Slika 24).



Slika 23. Toplinska mapa korelacija analiziranih parametara u bolesnika s OPCC. Tamnije crvene boje ukazuju na jače pozitivne korelacije, dok tamnije plave boje predstavljaju jače negativne korelacije. Svjetlije boje ukazuju na slabije ili nikakve korelacije.

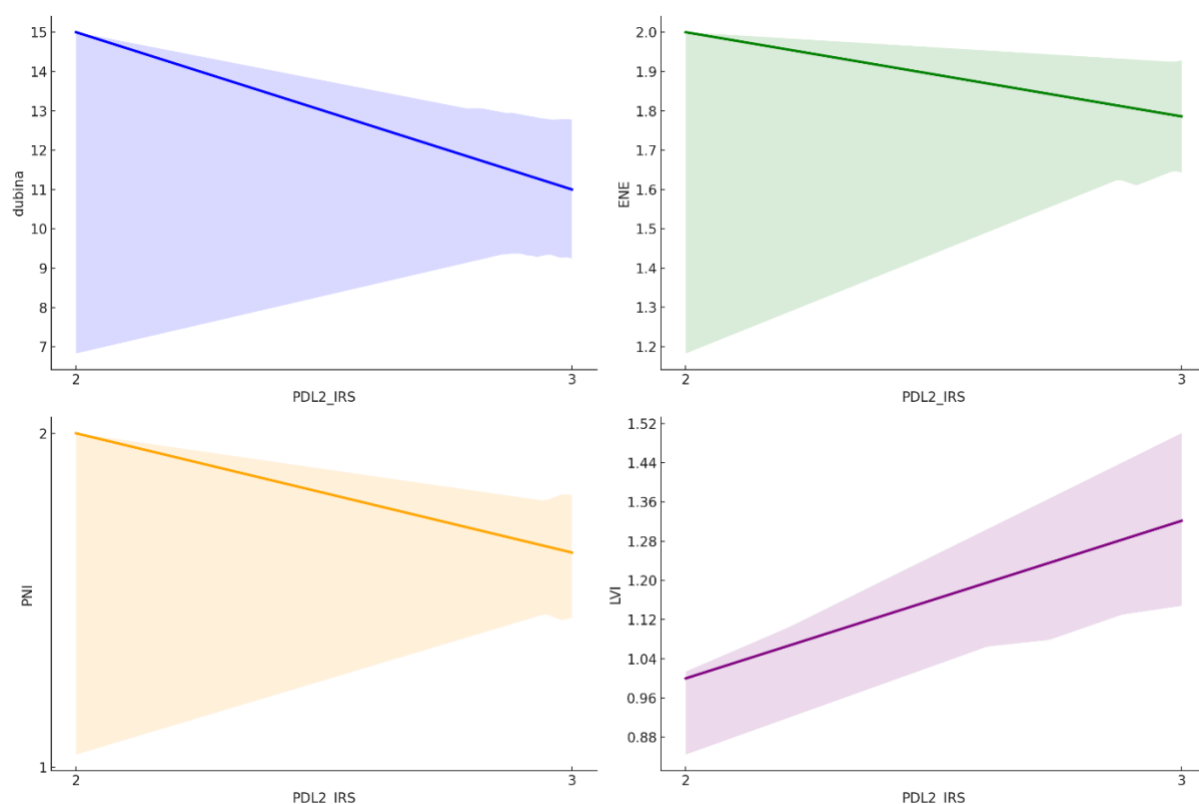
4.6 Rezultati analize ekspresije markera i parametara agresivnosti tumora u skupini ispitanika s metastazama OPCC u limfne čvorove vrata

Kako bi determinirali izražaj analiziranih protutijela na progresiju tumora, analizirali smo parametre agresivnosti tumorskog rasta i to dubina invazije, ENE, PNI i LVI sa svakim od protutijela. Iako nije pokazana jasna statistička značajnost između navedenih parametara agresivnosti tumora i izražaja Caspase 1 protutijela (dubina invazije ($r=-0.0182$, $p=0.4010$), ENE ($r=0.0295$, $p=0.8986$), PNI ($r=0.0696$, $p=0.7330$) i LVI ($r=0.2482$, $p=0.2702$)), regresijska linija i 95% intervalom pouzdanosti ukazuju na trend, posebice kod parametara ENE i LVI. Čini se da je veća ekspresija IRS faktora Caspase 1 protutijela povezana s većim stupnjem ENE i LVI (Slika 25).



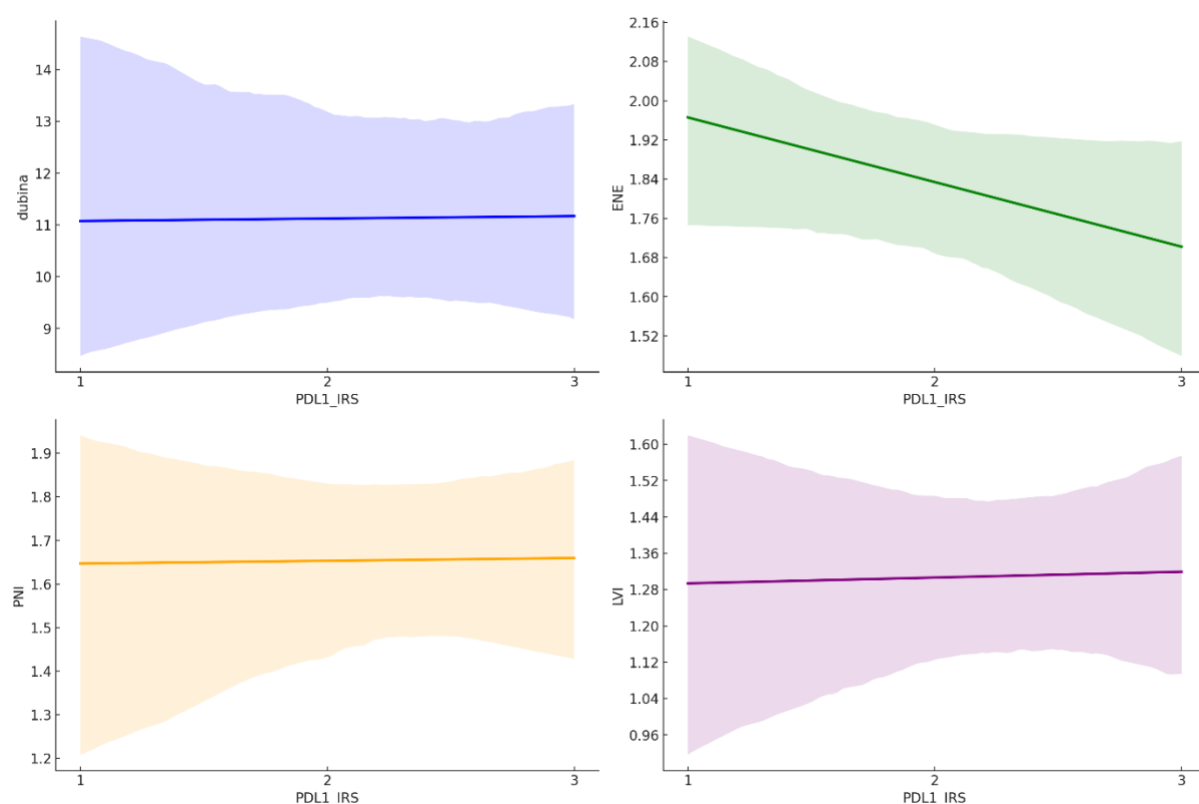
Slika 25. Linearna regresijska analiza IRS faktora Caspase 1 protutijela i četiri odabrana parametra: dubina invazije ($r=-0.0182$, $p=0.4010$), ENE ($r=0.0295$, $p=0.8986$), PNI ($r=0.0696$, $p=0.7330$) i LVI ($r=0.2482$, $p=0.2702$). Svaki graf prikazuje odnos IRS faktora Caspase 1 protutijela i jednog od navedenih parametara, s regresijskom linijom i 95% intervalom pouzdanosti koji ukazuju na trend.

Nadalje, nije pokazana jasna statistička značajnosti između navedenih parametara agresivnosti tumora i izražaja PD-L2 protutijela (dubina invazije ($r=-0.0072$, $p=0.4307$), ENE ($r=-0.0468$, $p=0.6341$), PNI ($r=-0.00840$, $p=0.3345$) i LVI ($r=0.0561$, $p=0.5521$)), regresijska linija i 95% intervalom pouzdanosti jasno ukazuju da je trend najizraženiji kod parametara dubina invazije. Veća ekspresija IRS faktora PD-L2 protutijela mogla bi biti povezana s većim stupnjem LVI, dok je manja ekspresija IRS faktora PD-L2 protutijela povezana s većim stupnjem dubine invazije, ENE i PNI (Slika 26).



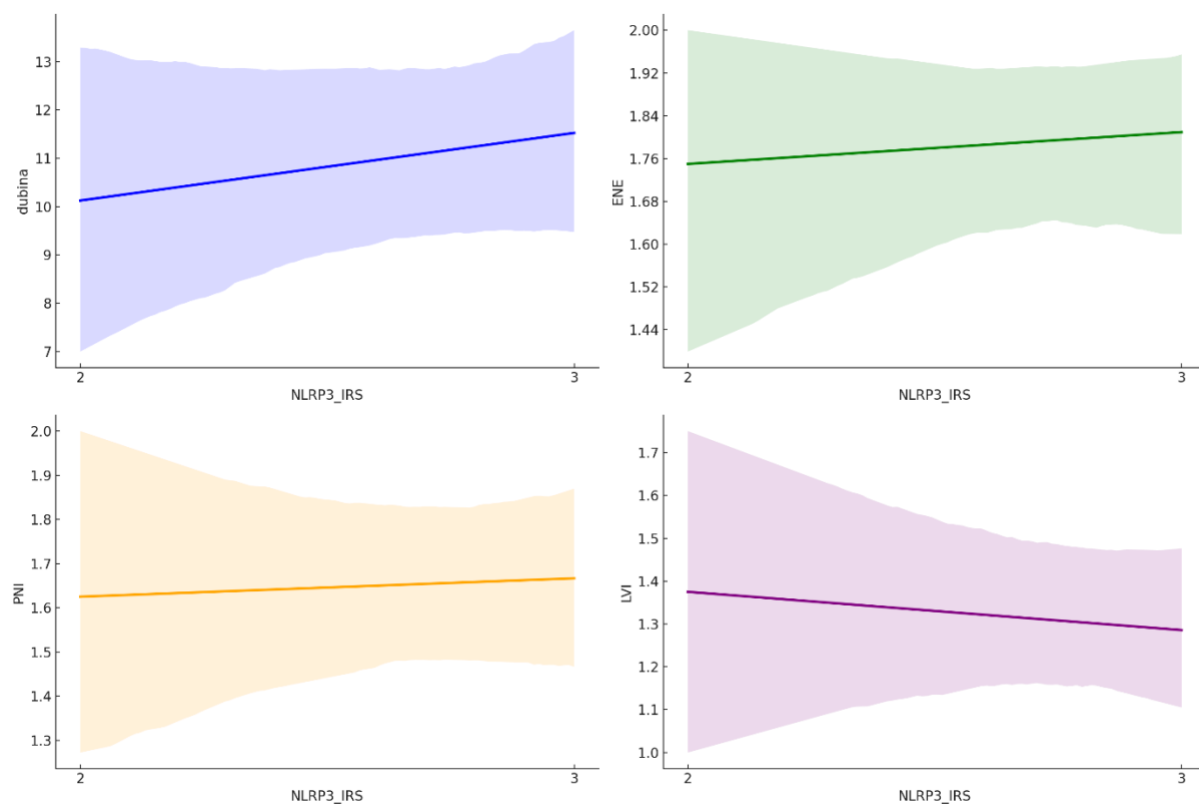
Slika 26. Linearna regresijska analiza IRS faktora PD-L2 protutijela i četiri odabrana parametra: dubina invazije ($r=-0.0072$, $p=0.4307$), ENE ($r=-0.0468$, $p=0.6341$), PNI ($r=-0.00840$, $p=0.3345$) i LVI ($r=0.0561$, $p=0.5521$). Svaki graf prikazuje odnos IRS faktora PD-L2 protutijela i jednog od navedenih parametara, s regresijskom linijom i 95% intervalom pouzdanosti koji ukazuju na trend.

Također, nije pokazana jasna statistička značajnosti između navedenih parametara agresivnosti tumora i izražaja PD-L1 protutijela (dubina invazije ($r=0.0071$, $p=0.8505$), ENE ($r=-0.5687$, $p=0.1674$), PNI ($r=0.1493$, $p=0.6744$) i LVI ($r=0.1889$, $p=0.6262$)), regresijska linija i 95% intervalom pouzdanosti jasno ukazuju na trend, posebice kod parametra ENE. Čini se da je veća ekspresija IRS faktora PD-L1 protutijela povezana s manjim stupnjem ENE (Slika 26).



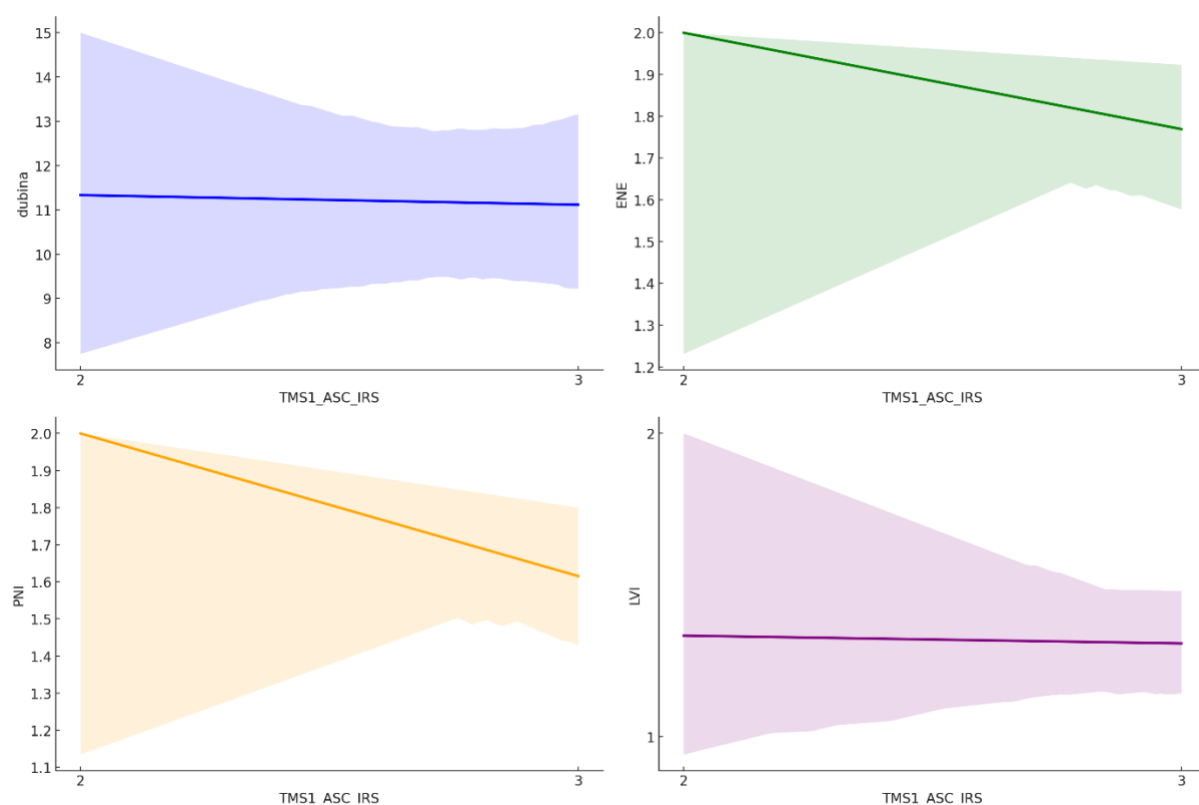
Slika 27. Linearna regresijska analiza IRS faktora PD-L1 protutijela i četiri odabrana parametra: dubina invazije ($r=0.0071$, $p=0.8505$), ENE ($r=-0.5687$, $p=0.1674$), PNI ($r=0.1493$, $p=0.6744$) i LVI ($r=0.1889$, $p=0.6262$). Svaki graf prikazuje odnos IRS faktora PD-L1 protutijela i jednog od navedenih parametara, s regresijskom linijom i 95% intervalom pouzdanosti koji ukazuju na trend.

Nije pokazana jasna statistička značajnosti između navedenih parametara agresivnosti tumora i izražaja NLRP3 protutijela (dubina invazije ($r=0.0139$, $p=0.5472$), ENE ($r=0.0959$, $p=0.6983$), PNI ($r=0.0834$, $p=0.7015$) i LVI ($r=-0.0705$, $p=0.7661$)), regresijska linija i 95% intervalom pouzdanosti jasno ukazuju na trend, posebice kod parametara dubina invazije i ENE. Čini se da je veća ekspresija IRS faktora NLRP3 protutijela povezana s većim stupnjem dubine invazije i ENE (Slika 28).



Slika 28. Linearna regresijska analiza IRS faktora NLRP3 protutijela i četiri odabrana parametra: dubina invazije ($r=0.0139$, $p=0.5472$), ENE ($r=0.0959$, $p=0.6983$), PNI ($r=0.0834$, $p=0.7015$) i LVI ($r=-0.0705$, $p=0.7661$). Svaki graf prikazuje odnos IRS faktora NLRP3 protutijela i jednog od navedenih parametara, s regresijskom linijom i 95% intervalom pouzdanosti koji ukazuju na trend.

Nije pokazana jasna statistička značajnosti između navedenih parametara agresivnosti tumora i izražaja ASC protutijela (dubina invazije ($r=-0.0070$, $p=0.6481$), ENE ($r=-0.0917$, $p=0.5765$), PNI ($r=-0.1695$, $p=0.2457$) i LVI ($r=-0.0388$, $p=0.8048$)), regresijska linija i 95% intervalom pouzdanosti jasno ukazuju na trend, posebice kod parametara ENE i PNI. Čini se da je manja ekspresija IRS faktora ASC protutijela povezana s većim stupnjem dubine invazije i ENE (Slika 29).



Slika 29. Linearna regresijska analiza IRS faktora ASC protutijela i četiri odabrana parametra: dubina invazije ($r=-0.0070$, $p=0.6481$), ENE ($r=-0.0917$, $p=0.5765$), PNI ($r=-0.1695$, $p=0.2457$) i LVI ($r=-0.0388$, $p=0.8048$). Svaki graf prikazuje odnos IRS faktora ASC protutijela i jednog od navedenih parametara, s regresijskom linijom i 95% intervalom pouzdanosti koji ukazuju na trend.

4.7 Povezanosti analiziranih parametara u skupini ispitanika s metastazama OPCC u limfne čvorove vrata

Na temelju Spearmanove korelacijske analize za skupinu ispitanika s metastazama OPCC u limfne čvorove vrata, nekoliko parova varijabli pokazalo je statistički značajne korelacije.

Uočena je statistički značajna povezanost između spola i dobi ($r=0.474$, $p=0.0009$), ali i statistički značajna pozitivna korelacija između spola i konzumacije alkohola ($r=0.420$, $p=0.023$). Ovi rezultati ukazuju na statistički značajne veze između spola ispitanika i različitih kliničkih te demografskih karakteristika, sugerirajući potencijalne razlike u karakteristikama bolesti i liječenju između muških i ženskih ispitanika.

Značajna pozitivna korelacija ($r=0.383$, $p=0.04$) uočena je između parametara T i konzumacije alkohola. Clavien-Dindo skala postoperativnih komplikacija značajno pozitivno korelira s parametrom N ($r=0.373$, $p=0.046$) i stadijem tumora ($r=0.436$, $p=0.018$), a negativno korelira sa PNI ($r=-0.400$, $p=0.031$) i zanimljivo, s izražajem NLRP3 ($r=-0.456$, $p=0.013$).

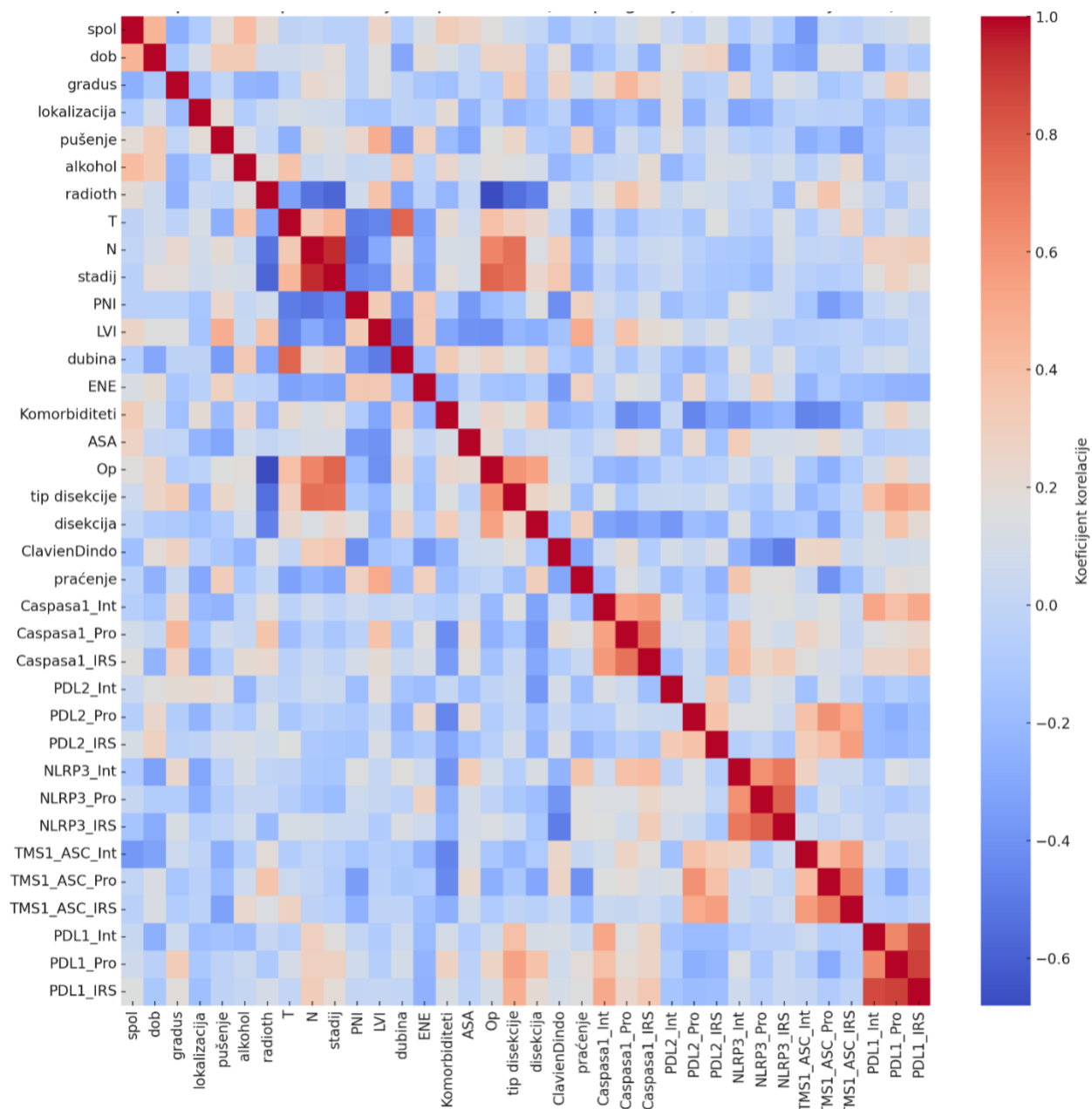
Tip učinjen disekcije značajno pozitivno korelira s N parametrom ($r=0.675$, $p=0.0001$), izražajem PD-L1 ($r=0.505$, $p=0.0052$) i stadijem tumora ($r=0.659$, $p=0.0001$), dok je značajno negativno koreliran s radioterapijom ($r=-0.488$, $p=0.007$).

Zanimljivo, prikazana je značajna negativna korelacija izražaja Caspase 1 i komorbiditeta ispitanika ($r=-0.443$, $p=0.016$). Također, značajna negativna korelacija opisana je između parametara ASA i LVI ($r=-0.389$, $p=0.0371$). Dodatno, uočena je značajna pozitivna korelacija između parametara LVI i pušenje ($r=0.493$, $p=0.0066$) te radioterapija ($r=0.380$, $p=0.042$).

Parametar N snažno pozitivno korelira sa stadijem tumora ($r=0.971$, $p<0.0001$), dok negativno korelira s parametrima agresivnosti tumora: PNI ($r=-0.549$, $p=0.002$) i radioterapijom ($r=-0.430$, $p=0.019$). Parametar T snažno pozitivno korelira s dubinom invazije tumora ($r=0.796$, $p<0.0001$) dok pokazuje negativnu korelaciju s LVI ($r=-0.489$, $p=0.0072$).

Svi parametri agresivnosti tumora pokazuju značajne korelacije. Također, koreliraju i sa preživljenjem bolesnika. Zabilježena je negativna korelacija između preživljenja bolesnika i lokacije tumora ($r=-0.383$, $p=0.044$), te pozitivna korelacija između učinjene disekcije vrata ($r=0.366$, $p=0.05$) i LVI ($r=0.491$, $p=0.006$).

Analiza parametara agresivnosti tumora (dubina invazije, ENE; PNI, LVI) kao i parametara T, N i stadija tumora nisu pokazale značajne korelacije sa izražajem analiziranih protutijela u skupini ispitanika s OPCC (Slika 30).

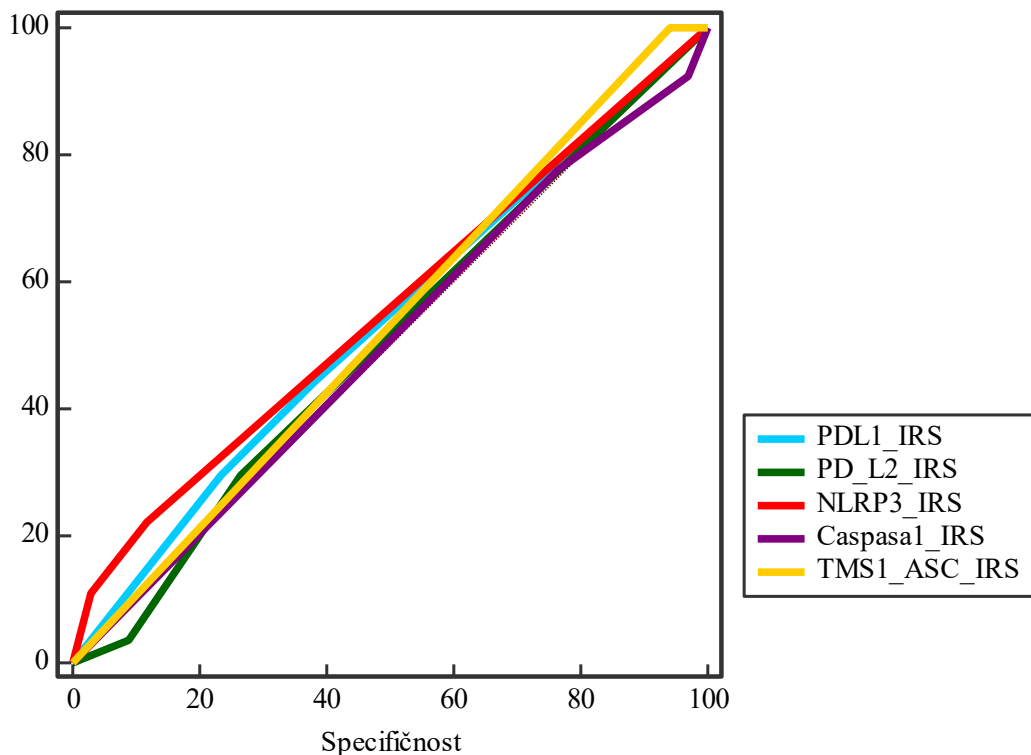


Slika 30. Toplinska mapa ilustrira povezanosti analiziranih parametara u skupini ispitanika s metastazama OPCC u limfne čvorove vrata. Tamnije crvene boje ukazuju na jače pozitivne korelacije, dok tamnije plave boje predstavljaju jače negativne korelacije. Svjetlije boje ukazuju na slabije ili nikakve korelacije.

4.8 Rezultati prognostičke analize

Kako bismo procijenili potencijalnu prediktivnu vrijednost izražaja analiziranih protutijela u napredovanju i širenju bolesti proveli smo ROC analizu. U ROC analizu uključili smo izražaj svih analiziranih protutijela i bolesnike iz skupine sa OPCC kod kojih je zabilježeno napredovanje i širenje bolesti pojavom metastaza u limfnim čvorovima vrata.

Analiza protutijela Caspase 1 (osjetljivost 92.59%, specifičnost 2.94%, Youden indeks, $J=0.044$, područje ispod krivulje, *area under curve*, *AUC*, $AUC=0.501$, $p=0.984$), PD-L2 (osjetljivost 3.70%, specifičnost 91.18%, $J=0.051$, $AUC=0.508$, $p=0.898$), NLRP3 (osjetljivost 22.22%, specifičnost 88.24%, $J=0.104$, $AUC=0.556$, $p=0.264$), ASC (osjetljivost 100.00%, specifičnost 5.88%, $J=0.058$, $AUC=0.529$, $p=0.151$) te PD-L1 (osjetljivost 44.44%, specifičnost 61.76%, $J=0.062$, $AUC=0.535$, $p=0.596$) nisu pokazali prognostički značaj u smislu napredovanje i širenje bolesti pojavom metastaza u limfne čvorove vrata u ispitivanoj skupini (Slika 31). Dobiveni rezultati ukazuju da analizirani biomarkeri (Caspase-1, PD-L1, PD-L2, NLRP3 i ASC) u ovoj studiji nisu pokazali dovoljnu diskriminacijsku sposobnost te nisu imali značajnu prognostičku vrijednost u predviđanju napredovanja bolesti i razvoja metastaza u limfnim čvorovima vrata. Međutim, ovakav nalaz ne isključuje njihovu potencijalnu biološku i patofiziološku ulogu u razvoju i progresiji tumora, već upućuje na mogućnost da njihova klinička vrijednost može biti izraženija u kombinaciji s drugim molekularnim ili kliničkim biomarkerima.



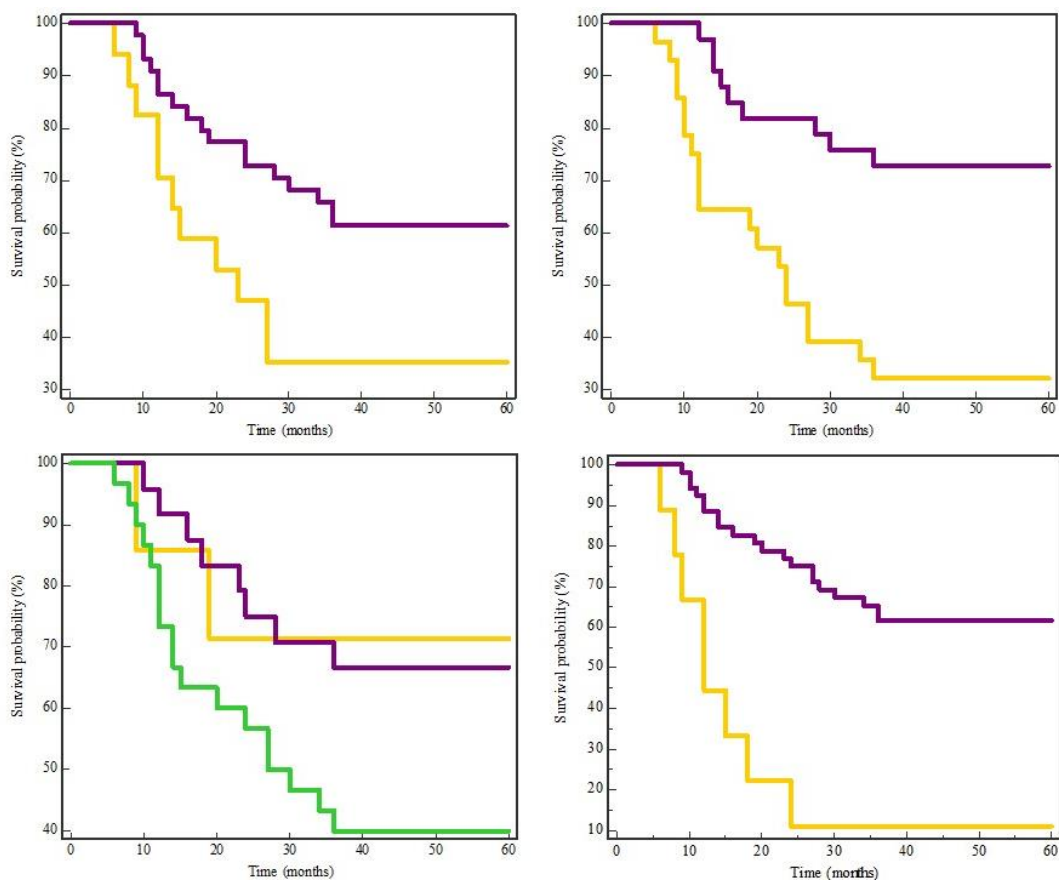
Slika 31. Prognostička ROC analiza izražaja protutijela Caspase 1 (osjetljivost 92.59%, specifičnost 2.94%, $J=0.044$, $AUC=0.501$, $p=0.984$), PD-L2 (osjetljivost 3.70%, specifičnost 91.18%, $J=0.051$, $AUC=0.508$, $p=0.898$), NLRP3 (osjetljivost 22.22%, specifičnost 88.24%, $J=0.104$, $AUC=0.556$, $p=0.264$), ASC (osjetljivost 100.00%, specifičnost 5.88%, $J=0.058$, $AUC=0.529$, $p=0.151$) PD-L1 (osjetljivost 44.44%, specifičnost 61.76%, $J=0.062$, $AUC=0.535$, $p=0.596$) nije pokazala prognostički značaj u smislu napredovanja i širenje bolesti pojavom metastaza u limfne čvorove vrata u ispitivanoj skupini.

4.9 Analiza preživljenja

U analizu preživljenja uključeni su bolesnici OPCC skupine, a podaci o vremenskom praćenju bili su dostupni za sve bolesnike. Dužina preživljenja bolesnika praćena je od trenutka postavljanja dijagnoze i/ili operacijskog zahvata do posljednje kontrole ili smrtnog ishoda. Svi bolesnici su kirurški liječeni. Medijan vremena praćenja je iznosio 44.4 mjeseci s rasponom od 6 do 60 mjeseci. Tijekom praćenja, 28/61 bolesnika je umrlo. Osim toga, tijekom praćenja je u 27/61 bolesnika zabilježena progresija bolesti u smislu pojave metastaza. Medijan vremena do progresije bolesti je iznosio 15 mjeseci s rasponom od 8 do 84 mjeseci.

Za sve analizirana protutijela korištene su ranije opisane prijelomne vrijednosti kojima su skupine bolesnika podijeljene na one s visokim ili niskim izražajem ispitivanih proteina. Prilikom analize preživljenja prvo je određen utjecaj parametara na sveukupno preživljenje Kaplan-Meier-ovom metodom, a razlika između krivulja preživljavanja utvrđena je pomoću log-rank testa. Analizirana protutijela, redom Caspase 1 ($p=0.37$), PD-L2 ($p=0.39$), NLRP3 ($p=0.59$), ASC (0.91) te PD-L1 ($p=0.65$) nisu pokazali statističku značajnosti u analizi preživljenja bolesnika.

Prilikom analize utjecaja kliničko-patoloških karakteristika tumora na sveukupno preživljavanje bolesnika utvrđena je statistička značajnosti kod parametra agresivnosti tumorskog rasta i to ENE ($p<0.0001$), PNI ($p=0.02$), LVI ($p=0.0007$), dok je dubina invazije ($p=0.08$) pokazala trend statističke značajnosti (slika 32).



Slika 32. Analiza utjecaja kliničko-patoloških karakteristika tumora na sveukupno preživljavanje bolesnika. Utvrđena je statistička značajnosti kod parametra agresivnosti tumorskog rasta i to PNI ($p=0.02$) (gore lijevo), LVI ($p=0.0007$) (gore desno), ENE ($p<0.0001$) (dolje desno) i dok je dubina invazije (dolje lijevo) ($p=0.08$) pokazuje trend značajnosti. Žuta boja na grafovima PNI, LVI i ENE označuje prisutnost, dok ljubičasta boja označuje odsutnost PNI, LVI, ENE. Na grafu dubina invazije žuto označuje dubinu $<5\text{mm}$, ljubičasto $5\text{-}10\text{mm}$ i zeleno $>15\text{mm}$ dubina invazije.

Nadalje, na sveukupno preživljavanje bolesnika utvrđena je statistička značajnosti kod T stadija ($p=0.003$), N stadija ($p=0.01$), stadija bolesti ($p=0.003$), dok gradus tumora ($p=0.65$) nije pokazao statističku značajnost. Ostali analizirani parametri, kao što je pušenje ($p=0.19$), alkohol ($p=0.28$), komorbiditeti ($p=0.83$), ASA ($p=0.54$) nisu pokazali statističku značajnost, dok su tip disekcije ($p=0.001$) i Clavien Dindo klasifikacija

($p < 0.0001$) pokazali statističku značajnost u analizi preživljenja bolesnika. Iako analizirani imunohistokemijski biomarkeri (Caspase 1, PD-L1, PD-L2, NLRP3 i ASC) nisu pokazali statistički značajnu povezanost sa sveukupnim preživljenjem bolesnika, klasični patohistološki parametri agresivnosti tumora, uključujući ENE, PNI i LVI, kao i T i N stadij bolesti, pokazali su značajan utjecaj na preživljenje bolesnika, potvrđujući njihovu važnu prognostičku vrijednost u bolesnika s oralnim planocelularnim karcinomom.

5. RASPRAVA

Imunomodulatorni mehanizmi kontrolnih točaka još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni, a podaci o njihovom prognostičkom i prediktivnom značaju su ograničeni i ponekad proturječni. Ova studija ima za cilj dodatno okarakterizirati profil ekspresije PD-L1, PD-L2 uz inflammasom NLRP3 i njegove komponente ASC i Caspase 1 kod karcinoma usne šupljine i pripadajućim metastazama u limfne čvorove, te isto usporediti s prekancerozama i benignim lezijama oralne sluznice, te procijeniti njihovu ulogu kao prognostičkih čimbenika. U ovom istraživanju analizirali smo ekspresiju proteina imunoloških kontrolnih točaka (PD-L1 i PD-L2) i komponenti povezanih s inflammasomom (NLRP3, ASC i Caspase 1) u različitim oralnim lezijama, uključujući oralni planocelularni karcinom (OPCC), metastaze, leukoplakiju i benigne promjene. Naš cilj bio je procijeniti njihov potencijal kao dijagnostičkih i prognostičkih markera za planocelularni karcinom usne šupljine (OPCC). Pomoću imunohistokemije ispitali smo ekspresiju proteina kod 151 pacijenta, od OPCC-a i metastaza do prekanceroznih lezija i normalne sluznice, kako bismo utvrdili povezanosti s malignom progresijom, izbjegavanjem imunosnog odgovora te kliničkim i patološkim karakteristikama.

Iako se blokada PD-1 i PD-L1/PD-L2 puta monoklonskim antitijelima nedavno pojavila kao nova terapijska metoda za tumor glave i vrata, povezanost između ekspresije PD-L1 i prognoze kod uznapredovalog planocelularnog karcinoma glave i vrata ostala je uglavnom kontroverzna [107] [108]. U našem istraživanju ispitali smo ekspresiju PD-L1 i PD-L2 na uzorcima pacijenata s planocelularnim karcinom usne šupljine.

Naši rezultati pokazali su da su PD-L1 i PD-L2 značajno izraženiji u planocelularnom karcinomu usne šupljine u usporedbi s leukoplakijom i benignim lezijama, pri čemu je najviša razina ekspresije zabilježena u skupini bolesnika s metastazama u cervikalne limfne čvorove. Takav obrazac upućuje na progresivnu aktivaciju osi PD-1 liganada tijekom maligne transformacije i širenja bolesti, te potvrđuje važnu ulogu imunološkog mikrookoliša u biologiji OPCC-a. Ti su rezultati u skladu s prethodnim istraživanjima koja pokazuju da prekomjerna ekspresija PD-L1 i PD-L2 u karcinomima, uključujući

karcinome glave i vrata, omogućuje tumorima izbjegavanje imunosnog nadzora putem vezanja na PD-1 receptor na T-stanicama, čime se inhibira imunosni odgovor i omogućuje preživljavanje tumora [109] [110] [111]. Slična opažanja iznio je Lin sa suradnicima, koji su pokazali visoku ekspresiju PD-L1 u SCC-ima usne šupljine, u korelaciji s povećanom imunosnom supresijom. Također, Sudo i sur. pokazali su da je povećana ekspresija PD-L2 u metastazama povezana s jačim metastatskim potencijalom, što je u skladu s našim nalazima [112]. Nadalje, interferon-gama (IFN- γ) može inducirati ekspresiju PD-L1, potencijalno pretvarajući PD-L1 negativne u PD-L1 pozitivne tumore, dodatno omogućujući imunosno izbjegavanje, što može pridonijeti imunološkom izbjegavanju i metastatskom potencijalu tumora [113] [114].

Naši rezultati uklapaju se u koncept imunomodulacije tumora, prema kojem se tijekom prijelaza iz premaligne u invazivnu bolest postupno uspostavlja imunosupresivni mikrokoliš. Greeshme i suradnici su u svom istraživanju pokazali porast PD-L1 ekspresije od oralne leukoplakije prema invazivnom OSCC-u, uz izraženu prisutnost PD-L1 pozitivnih stanica ne samo u tumorskom epitelu, nego i u stromalnim komponentama, osobito fibroblastima pridruženim tumoru. Autori taj nalaz interpretiraju kao dio ravnotežne faze imunološkog nadzora, u kojoj je imunološki odgovor još uvijek prisutan, ali postupno gubi kontrolu nad tumorskim rastom [22]. Naše istraživanje proširuje taj model pokazujući da se u fazi invazivnog OPCC-a, a osobito kod limfogenog širenja, ekspresija PD-L1 i PD-L2 dodatno pojačava, što je u skladu s prijelazom u fazu imunološkog "bijega". Kogashiwa i suradnici u svojoj studiji lokalno uznapredovalog OSCC-a naglašavaju da PD-L1 i PD-L2 nisu nužno sinkrono regulirani te da PD-L1 ekspresija u njihovoj kohorti korelira s povećanom gustoćom CD8⁺ tumor-infiltrirajućih limfocita i povoljnijim preživljenjem [41], dok Tumei i suradnici su pokazali da je PD-L1 ekspresija prostorno ograničena na regije tumora u kontaktu s CD8⁺ T limfocitima te da predstavlja adaptivni odgovor tumora induciran interferonom gama [43]. Prema toj interpretaciji, PD-L1 nije primarno marker tumorske agresivnosti, već pokazatelj aktivnog, ali inhibiranog antitumorskog imunološkog odgovora. Naši rezultati, iako ne potvrđuju prognostičku vrijednost PD-L1 u analizi preživljenja, nisu u suprotnosti s navedenim konceptom. Naprotiv, izostanak povezanosti PD-L1 i PD-L2 s klasičnim

parametrima agresivnosti tumora, kao i sa sveukupnim preživljenjem, upućuje na to da ovi biljezi u našoj kohorti primarno reflektiraju stanje imunološkog mikrookruženja, a ne intrinzična histopatološka obilježja tumora. Razlike u odnosu na nalaze Kogashiwe i suradnika mogu se objasniti heterogenošću stadija bolesti, uključivanjem premalignih i benignih lezija, te primjenom detaljnijeg sustava bodovanja imunohistokemijske ekspresije (intenzitet, proporcija i IRS faktor). Chen i suradnici pokazali su da PD-L1 ekspresija u OSCC-u korelira s prisutnošću CD8+ limfocita [115], dok Badoual i suradnici [116] te Mattox i suradnici [117] opisuju povoljniji ishod u bolesnika s PD-L1 pozitivnim tumorima, osobito u kontekstu aktivnog imunološkog infiltrata. S druge strane, Maruse i suradnici [58] opisuju povezanost PD-L1 i PD-1 s nodalnim metastazama i lošijom prognozom, što ukazuje na biološku heterogenost i njezinu ovisnost o stadiju i mikrookruženju tumora [58].

U odnosu na PD-L2, literatura i naši rezultati ukazuju na slabiju i manje konzistentnu kliničku povezanost u usporedbi s PD-L1. Kogashiwa i suradnici [41], kao i drugi autori poput Sznola [118] i Chena te Yearleyja i suradnika [63], navode da PD-L2 može biti reguliran alternativnim signalnim putovima te da njegova ekspresija nije nužno povezana s gustoćom CD8+ infiltrata. U skladu s tim, u našem istraživanju PD-L2 jasno razlikuje maligne od nemalignih lezija, ali ne pokazuje izražen prognostički značaj, unatoč mogućim naznakama trenda u regresijskim analizama. Dodatnu potvrdu uloge PD-L1 i PD-L2 u metastatskom kontekstu donosi studija Moratina i suradnika [119], koji su pokazali povišenu ekspresiju oba liganda u metastazama cervikalnih limfnih čvorova u usporedbi s odgovarajućim primarnim tumorima. Autori tumače ovaj nalaz kao posljedicu selektivnog imunološkog pritiska unutar limfnog mikrookruženja, koje pogoduje preživljavanju tumorskih stanica s izraženijim mehanizmima imunološkog izbjegavanja. Ovakva interpretacija u skladu je s našim rezultatima da PD-L1 i PD-L2 prate progresiju bolesti i limfogeno širenje, ali bez konzistentne povezanosti s klasičnim patohistološkim parametrima agresivnosti tumora. Maruse i suradnici istraživali su o povezanosti povišenog izražaja PD-L1 s prisutnošću metastaza u limfnim čvorovima i lošijim ishodom bolesti u OOPCC-u, dok su Yearley i suradnici naglasili heterogenost PD-L2 ekspresije i njezinu slabiju kliničku reproducibilnost u usporedbi s PD-L1 [58]

[63]. Ove razlike dodatno podupiru tezu da PD-L2, za razliku od PD-L1, može biti reguliran alternativnim signalnim putovima, neovisno o interferon-gama osi i gustoći CD8⁺ tumor-infiltrirajućih limfocita, što je ranije opisano u translacijskim i imunološkim studijama [118]. Unatoč ulozi u imunomodulaciji, ni PD-L1 ni PD-L2 nisu pokazali značajnu prognostičku vrijednost u našoj kohorti. ROC analiza pokazala je da ti proteini nemaju dovoljnu osjetljivost i specifičnost za predviđanje progresije bolesti ili metastaza, što ističe složenost interakcija tumora i imunosnog sustava. To se podudara s rezultatima Webera i sur., koji su također zabilježili ograničenu prognostičku vrijednost same PD-L1 ekspresije kod OSCC pacijenata [26]. Ti nalazi sugeriraju da, iako PD-L1 i PD-L2 doprinose imunosnom izbjegavanju, njihova ekspresija sama po sebi nije dostatna kao pouzdan prognostički biljeg, čime se naglašava potreba za višedimenzionalnim pristupom u interpretaciji njihovih kliničkih implikacija [10].

Sveukupno, može se zaključiti da PD-L1 i PD-L2 imaju važnu ulogu u modulaciji tumorskog imunološkog mikrokruženja u OPCC-u. Njihova povišena ekspresija povezana je s malignom transformacijom i limfogenim širenjem, no njihova vrijednost kao samostalnih prognostičkih biomarkera ovisi o kliničkom kontekstu, metodologiji procjene i imunološkom statusu tumora. Ovi nalazi upućuju na potencijalnu ulogu PD-L1 i PD-L2 u biološkoj stratifikaciji bolesnika i budućem odabiru kandidata za imunoterapiju, ali istodobno naglašavaju potrebu za njihovom interpretacijom u kombinaciji s drugim imunološkim i kliničko-patološkim pokazateljima.

U našem istraživanju pokazali smo da je ekspresija NLRP3 značajno povišena u primarnim planocelularnim karcinomima usne šupljine, te u metastazama u limfne čvorove vrata u usporedbi s nemalignim lezijama, što upućuje na uključenost NLRP3 inflammasoma u procese maligne transformacije i progresije bolesti. Ovi nalazi u skladu su s rezultatima Wang i suradnika, koji su pokazali da je NLRP3 izrazito povišen u OSCC stanicama i tumorskim tkivima, te da njegova ekspresija korelira s veličinom tumora, T i N stadijem i prisutnošću metastaza u limfnim čvorovima [55]. Autori su dodatno eksperimentalno potvrdili da utišavanje NLRP3 dovodi do smanjenja proliferacije, migracije i invazije tumorskih stanica, uz istodobno smanjenje aktivacije Caspase 1 i produkcije IL-1 β , čime je potvrđena funkcionalna uloga NLRP3

inflammasoma u tumorskome rastu i metastaziranju [55]. Iako je u našem istraživanju također zabilježena jasna diferencijacija malignih u odnosu na nemaligne lezije na temelju izražaja NLRP3, nismo utvrdili statistički značajnu povezanost između izražaja NLRP3 i klasičnih parametara agresivnosti tumora niti sa sveukupnim preživljenjem bolesnika. Ova razlika u odnosu na nalaze Wang i suradnika može se objasniti razlikama u dizajnu studija, veličini uzorka, metodologiji procjene izražaja, kao i činjenicom da je njihov rad uključivao funkcionalne in vitro i in vivo modele, dok je naše istraživanje temeljeno na kliničko-patološkoj analizi ljudskih uzoraka. Naši rezultati stoga upućuju na to da povišena ekspresija NLRP3 u OPCC-u primarno ukazuje na prisutnost aktiviranog upalnog mikrokruženja i sudjelovanje inflammasoma u ranim fazama tumorske progresije, dok vrijednost kao samostalnog prognostičkog biomarkera ostaje ograničena. U kožnim tumorima, Chow i suradnici pokazali su da NLRP3 sudjeluje u karcinogenezi potaknutoj kroničnom upalom, dok su Okamoto i suradnici u melanomu opisali aktivaciju NLRP3 inflammasoma u tumorskim stanicama, povezanu s aktivacijom Caspase 1 i povećanom sekrecijom IL-1 β , što doprinosi progresiji bolesti u uznapredovalim stadijima [120] [92]. Takvi nalazi sukladni su s našim opažanjima povišene ekspresije NLRP3 u primarnim OPCC lezijama i metastazama, pri čemu izostanak jasne povezanosti sa sveukupnim preživljenjem upućuje na to da NLRP3 ponajprije odražava biološku aktivnost tumora i pripadajućeg upalnog mikrokruženja, a ne izravnu mjeru njegove kliničke agresivnosti. Suprotno tome, Allen i suradnici su u svom istraživanju na modelu kolitisom induciranog kolorektalnog karcinoma pokazali da NLRP3 inflammasom u hematopoetskim stanicama može imati zaštitnu, antitumorsku ulogu, čime je istaknuta važnost staničnog konteksta u tumačenju njegove biološke uloge [85]. Ovakav dvostruki učinak dodatno podupire interpretaciju naših rezultata, prema kojoj povišena ekspresija NLRP3 u OPCC-u ne mora nužno imati izravno nepovoljan prognostički značaj, već može upućivati na prisutnost aktiviranog, ali neučinkovitog imunološkog odgovora unutar tumorskog mikrokruženja. Posebno je zanimljiva uloga NLRP3 inflammasoma u terapijskom smislu. Bruchard i suradnici pokazali su da kemoterapijski lijekovi poput gemcitabina i 5-fluorouracila mogu aktivirati NLRP3 inflammasom u mijeloidnim supresorskim stanicama, što dovodi do povećane sekrecije IL-1 β i posljedičnog slabljenja antitumorskog imunološkog odgovora [121]. U

skladu s tim, Feng i suradnici su pokazali da liječenje 5-fluorouracilom dodatno pojačava ekspresiju i aktivaciju NLRP3 inflammasoma u OSCC stanicama, što je povezano sa smanjenjem terapijskog učinka [122].

Sveukupno, integracija naših rezultata s navedenim eksperimentalnim i kliničkim studijama potvrđuje da je NLRP3 inflammasom važan regulator tumorskog mikrookruženja u oralnom planocelularnom karcinomu. Njegova povišena ekspresija povezana je s malignom transformacijom i progresijom bolesti, ali njegova prognostička vrijednost kao samostalnog biomarkera ostaje ograničena i snažno ovisna o staničnom i terapijskom kontekstu. Naši nalazi pokazuju da je ekspresija NLRP3 i ASC povišena u malignim lezijama u odnosu na nemaligne uzorke, što upućuje na aktivaciju inflammasoma u OPCC-u i njegovim metastatskim potencijalima. Iako u našem istraživanju nismo dokazali jasnu prognostičku vrijednost NLRP3 u vidu sveukupnog preživljenja niti povezanost s klasičnim parametrima agresivnosti, takav rezultat ne isključuje biološku relevantnost inflammasoma. Naprotiv, eksperimentalni modeli pokazuju da je NLRP3 signalizacija u OSCC-u funkcionalno uključena u održavanje tumorskog fenotipa. Odsutnost prognostičke vrijednosti ne umanjuje potencijalnu biološku i terapijsku relevantnost inflammasomskog puta. Scuderi je u svom istraživanju opisao da su NLRP3, ASC i Caspase 1 povišeni u OSCC staničnim linijama i tumorskim tkivima te povezani s pro-upalnom citokinskom osi, dok su Fenini i sur. pokazali da IL-1 β i IL-18 mogu poticati tumorsku progresiju kroz pojačanu upalu i remodeliranje mikrookruženja [81] [123]. U skladu s time, farmakološka inhibicija inflammasomskog puta pokazuje mjerljiv antitumorski učinak u eksperimentalnim uvjetima. Kod OPCC-a primjena inhibitora dovodi do smanjenja preživljenja tumorskih stanica, a istodobno se bilježi pad ekspresije NLRP3, ASC i Caspase 1 u usporedbi s kontrolom [81]. Eksperimentalni podaci iz in vivo ispitivanja dodatno potvrđuju da je modulacija inflammasomskog puta povezana sa smanjenjem tumorskog rasta i ukupnog tumorskog opterećenja. U modelu OPCC-a zabilježeno je smanjenje tumorske mase i težine, uz istodobno sniženu ekspresiju NLRP3, ASC i Caspase 1 u tumorskom tkivu, te smanjenu razinu IL-1 β [81]. Ovi nalazi imaju posebnu važnost u kontekstu naših kliničkih rezultata, jer upućuju na to da inflammasomski put može imati ključnu

ulogu u održavanju tumorskog fenotipa u kontroliranim eksperimentalnim uvjetima, dok se u heterogenoj kliničkoj populaciji njegov doprinos vjerojatno preklapa s djelovanjem drugih, dominantnih prognostičkih čimbenika. Ovakvi podaci daju dodatnu težinu interpretaciji naših rezultata kroz činjenicu da NLRP3/ASC u malignim lezijama pokazuje višu ekspresiju u odnosu na benigne uzorke što može značiti da u određenoj podskupini tumora signalizacija inflammasoma ima važnu ulogu, iako se to u ispitivanoj skupini ne mora odražavati kroz jednostavnu korelaciju s TNM-om ili preživljenjem zbog heterogenosti tumora i različitosti mikrookoliša. Učinci povezani s inflammasomom u eksperimentalnim istraživanjima ne odnose se samo na citokinsku signalizaciju, nego zahvaćaju i procese proliferacije i apoptoze. Opisano je smanjenje proliferacijskog markera Ki-67, uz pomak prema proapoptotskom profilu obilježen porastom Bax, Bad i p53 te smanjenjem Bcl-2, a u in vivo uvjetima [86] [88]. Ovi nalazi upućuju na to da inflammasomski put sudjeluje u mehanizmima koji održavaju tumorski fenotip, pri čemu njegova inhibicija može istodobno ograničiti proliferaciju i olakšati programiranu staničnu smrt. Time se može objasniti zašto u našoj skupini uočavamo jasnu razliku u izražaju između malignih i nemalignih lezija, dok klinički ishod u OPCC-u ponajprije određuju klasični parametri agresivnosti poput ENE, PNI, LVI i dubine invazije. Konačno, promjene u imunološkom mikrokruženju nakon inhibicije inflammasomskog puta (npr. niže razine CD4, CD8 i CD30 u tumorskom tkivu) treba tumačiti oprezno, jer mogu odražavati smanjenje tumorske mase i promijenjen citokinski okoliš, a ne nužno izravno "slabljenje" antitumorskog imuniteta [81]. Za našu interpretaciju važnije je da ovi podaci potvrđuju da modulacija NLRP3 puta može remodelirati više razina tumorskog mikrokruženja (citokini, proliferacija/apoptoza). Stoga, iako naši rezultati ne potvrđuju NLRP3 kao samostalan prognostički biomarker, oni se dobro uklapaju u eksperimentalnu literaturu koja sugerira da inflammasomska os ima funkcionalnu i potencijalno terapijski relevantnu ulogu u OPCC-u.

Uz proteine imunoloških kontrolnih točaka, komponente inflammasoma NLRP3 i ASC bile su značajno pojačano eksprimirane u OPCC i LNM u usporedbi s benignim lezijama. NLRP3 je pokazao jaku povezanost s lokalizacijom tumora, što sugerira da njegova ekspresija može biti pod utjecajem tumorskog mikrokruženja. Ovo podržava

rastuće dokaze da NLRP3 doprinosi karcinogenezi potaknutoj upalom, potičući rast tumora putem upalnih puteva [21]. U skladu s našim rezultatima, istraživanja Huang et al. [17] i Wang et al. [18] također su utvrdila povišenu ekspresiju NLRP3 u karcinomima glave i vrata, povezujući je s većom agresivnošću tumora. ASC je u našoj kohorti bio izraženiji u malignim tkivima, ali bez jasne prognostičke vrijednosti, što je u skladu s nalazima Wu i suradnika [124]. Budući da ASC djeluje kao adapter za aktivaciju inflammasoma, njegova ko-ekspresija s NLRP3 otvara mogućnost zajedničke aktivacije inflammasomskog puta u progresiji bolesti. Fernandes-Alnemri i sur. su dodatno pokazali da aktivacija ASC i Caspase 1 može rezultirati formiranjem ASC kompleksa i sekrecijom IL-1 β [125]. Iako naš rad nije uključivao mjerenje citokina, povišeni ASC u malignim uzorcima OPCC podržava mogućnost postojanja takvih upalnih mikroniša unutar tumora. Naši rezultati pokazuju da je ekspresija Caspase 1 bila značajno izraženija u malignim lezijama u usporedbi s nemaligim uzorcima. Takav rezultat dobro se uklapa u koncept da je u OPCC-u prisutna aktivacija upalnih signalnih puteva koji mogu održavati pro-tumorsko mikrookruženje. Caspase 1 je središnji efektorski enzim inflammasoma, te njegova aktivacija dovodi do sazrijevanja proinflamatornih citokina, prvenstveno IL-1 β i IL-18, čime se pojačava lokalni upalni odgovor i komunikacija tumora s okolnim stanicama [126-128]. Međutim, taj signal ne mora nužno imati izravnu korelaciju s klasičnim kliničko-patološkim parametrima ili preživljenjem. Iako ekspresija Caspase 1 nije pokazala značajnu povezanost s preživljenjem, u regresijskim analizama uočen je trend povezanosti s ENE, PNI i LVI, što može upućivati na njegovu ulogu u invazivnosti tumora. Literatura također opisuje dvosmjerne uloge inflammasoma u karcinogenezi, gdje Caspase 1 može poticati ili suzbijati tumor ovisno o tipu tumora i mikrookolišu [127, 129]. U skladu s time, iako je Caspase 1 u našoj kohorti povišen u malignim lezijama, ROC analiza pokazala je visoku osjetljivost uz nisku specifičnost, što ukazuje na ograničenu prognostičku primjenu. Slične rezultate iznio je Zhang et al., koji su pokazali da je Caspase 1 važan za rast tumora u ranoj fazi, ali njegova ekspresija ne predviđa nužno metastatski razvoj[98]. Naši podaci stoga upućuju na to da Caspase 1 može imati dijagnostičku vrijednost u razlikovanju malignih od nemalighnih lezija, dok njegova neovisna prognostička vrijednost u kliničkoj kohorti ostaje ograničena. To možemo objasniti kompleksnom ulogom Caspase 1 u tumorskoj biologiji: osim

sazrijevanja IL-1 β i IL-18 te potencijalnog pokretanja piroptoze [126], inflammasomska signalizacija kroz kroničnu upalu može pridonijeti stvaranju imunosupresivnog mikrookoliša [128], a Caspase 1 može sudjelovati i u procesima regulacije proliferacije i metabolizma bez nužne piroptoze [127]. Fink i sur. naglašavaju Caspase 1 kao medijatora inducirane stanične smrti, uz mogućnost da tumori određene aspekte tog procesa koriste u svoju korist [129]. U konačnici, visoka ekspresija Caspase 1 u malignim tkivima, zajedno s trendovima povezanosti s parametrima invazivnosti, sugerira biološku relevantnost. Buduća istraživanja trebala bi svakako uključiti funkcionalne analize, primjerice mjerenje aktivnog GSDMD i razina IL-1 β /IL-18 kako bi se preciznije odredio status inflammasomske aktivacije u oralnom karcinomu. Analizom kliničkih i patoloških karakteristika nije utvrđena značajna povezanost ekspresije PD-L1, PD-L2, NLRP3, ASC ili Caspase 1 s vanjskim čimbenicima kao što su pušenje, konzumacija alkohola ili TNM stadij. Schneider i sur. navode da rizični čimbenici za PD-L1 ekspresiju još uvijek nisu u potpunosti poznati. Njihovi podaci nisu pokazali povezanost PD-L1 ekspresije sa spolom, dobi ili lokalizacijom tumora [47]. Iako je u studiji od Cho i sur. o oralnom planocelularnom karcinomu (OCSCC) zabilježena povezanost sa ženskim spolom [6], a u drugoj studiji povezanost s muškim spolom i statusom pušenja, literatura po tom pitanju nije dosljedna [76]. Ovi rezultati sugeriraju da je pojačana ekspresija tih proteina više odraz intrinzične biologije tumora nego utjecaja vanjskih čimbenika. Zanimljivo je da su ekspresije NLRP3 i ASC bile značajno povezane s lokalizacijom tumora, što ukazuje na to da se aktivnost inflammasoma može razlikovati ovisno o mjestu tumora unutar usne šupljine ili orofarinksa. Slične su nalaze opisali Liu et al. [19], koji su primijetili da tumorsko mikrookruženje značajno utječe na obrasce ekspresije inflammasoma i njihove učinke u oralnim karcinomima. Rad Wanga i suradnika dodatno podupire koncept da inflammasomska aktivacija može reprogramirati imunološki mikrookoliš. NLRP3 inflammasom preko IL-18/IL-18R osi može potaknuti rast i metastatski potencijal tumora, te doprinijeti imunosupresiji, uključujući procese povezane s PD-L1 ekspresijom i inhibicijom efektorskih T stanica [130]. Zanimljivo, u našem istraživanju također uočavamo korelaciju između povišene ekspresije NLRP3 i povećanog izražaja PD-L1 i PD-L2, što može ukazivati na sličan mehanizam u oralnim karcinomima. Premda naši rezultati nisu statistički potvrdili izravnu povezanost između

NLRP3 i parametara poput TNM stadija ili preživljenja, trendovi govore u prilog njegovoj ulozi u modulaciji tumorskog okoliša. TMA pristup, iako praktičan i standardan, može podcijeniti intratumorsku heterogenost ekspresije. Povećana ekspresija NLRP3, ASC i Caspase 1 u OPCC-u upućuje na aktivaciju inflamatskog puta, ali odsustvo izravne kliničke korelacije naglašava potrebu za dodatnim funkcionalnim analizama te otvara prostor za istraživanje kombiniranih terapijskih pristupa, uključujući modulaciju inflamatsoma i imunoterapiju u budućim studijama oralnog OPCC-a. Analiza preživljenja pokazala je ograničenu prognostičku vrijednost analiziranih proteina. Nijedan od proteina (PD-L1, PD-L2, NLRP3, ASC, Caspase 1) nije bio značajno povezan s ukupnim preživljenjem kod pacijenata s OPCC-om. Nasuprot tome, tradicionalni patološki pokazatelji poput ENE, PNI, LVI i dubine invazije ostali su pouzdani prediktori preživljenja, čime se potvrđuje njihova klinička važnost. To naglašava potrebu integriranja tradicionalnih pokazatelja s molekularnim analizama, što je istaknuto i u meta-analizi Corti i suradnika s ciljem potpunijeg razumijevanja ishoda pacijenata i preciznije klasifikacije rizika [131].

Iako ovo istraživanje predstavlja jedno od većih ispitivanja imunoloških kontrolnih točaka i proteina inflamatsoma u OSCC-u i povezanim patologijama, nije bez ograničenja. Imunohistokemijsko bojanje možda ne prikazuje u potpunosti heterogenost tumora, što može dovesti do podcjenjivanja varijabilnosti ekspresije. Buduća istraživanja trebala bi se fokusirati na preživljenje bez progresije ili specifično preživljenje povezano s bolešću, kako bi se dobio detaljniji uvid u prognostičku vrijednost tih biomarkera. Daljnja istraživanja trebala bi također ispitati terapijski potencijal ciljanog djelovanja na PD-L1, PD-L2, NLRP3, ASC i Caspase 1, osobito u kontekstu imunoterapije. Kako inhibitori imunoloških kontrolnih točaka sve više dobivaju na značaju u liječenju karcinoma glave i vrata, razumijevanje načina na koji ti proteini utječu na odgovor pacijenata na liječenje moglo bi otvoriti put prema personaliziranim terapijskim strategijama. Dublje razumijevanje mehanizama rezistencije na inhibitore kontrolnih točaka moglo bi omogućiti razvoj novih opcija liječenja za pacijente s OPCC-om.

6. ZAKLJUČCI

1. Ekspresija PD-L1 značajnije je izraženija kod pacijenata s oralnim planocelularnim karcinomom i metastazama planocelularnog karcinoma u limfne čvorove vrata, nego kod pacijenata s leukoplakijom i benignim promjenama. ($p=0.003$)
2. Ekspresija PD-L2 pokazala je statistički značajne razlike između svih analiziranih skupina, uključujući bolesnike s oralnim planocelularnim karcinomom, bolesnike s metastazama OPCC-a u limfne čvorove vrata, pacijente s leukoplakijom, te bolesnike s benignim promjenama.
3. Ekspresija protutijela NLRP3 značajnije je izražena kod pacijenata s OPCC u odnosu na pacijente s benignim promjenama.
4. Analiza ekspresije Caspase 1 kod pacijenata sa OPCC-om pokazala je statistički značajniji izražaj u odnosu na pacijente s leukoplakijom i s benignim promjenama, dok ekspresija ASC nije pokazala statistički značajnu razliku između ispitivanih skupina.
5. Statistički značajna povezanost utvrđena je između lokalizacije tumora i ekspresije NLRP3 i ASC, dok je kod PD-L1 uočena značajna povezanost ekspresije i dobi pacijenta.
6. Utvrđeno je kako ne postoji statistički značajna povezanost ekspresije PD-L1, PD-L2, NLRP3, Caspase 1 i ASC kod pacijenata s oralnim planocelularnim karcinomom s većinom analiziranih kliničkih i patohistoloških parametara, kao ni s terapijskim i perioperativnim čimbenicima.
7. Nije dokazana statistički značajna povezanost između ekspresije PD-L1, PD-L2, Caspase 1, NLRP3, ASC i parametara agresivnosti tumora (dubina invazije, ENE, PNI i LVI), no regresijska linija i 95% interval pouzdanosti mogu upućivati na trend prema kojem je viša vrijednost ekspresije navedenih protutijela povezana s većim stupnjem parametara agresivnosti tumorskog rasta.
8. Utvrđena je značajna povezanost između demografskih, kliničkih i patohistoloških parametara u bolesnika s OPCC. Parametri agresivnosti tumora (dubina invazije, ENE,

PNI i LVI) međusobno su korelirali, te su bili značajno povezani s lošijim sveukupnim preživljenjem.

9. Nije dokazana značajna povezanost između parametara agresivnosti tumora, TNM klasifikacije i stadija bolesti s izražajem analiziranih protutijela (PD-L1, PD-L2, Caspase-1, NLRP3 i ASC) u skupini bolesnika s OPCC.

10. Kod pacijenata s metastazama OPCC-a u limfne čvorove vrata analiza parametara agresivnosti tumora (dubina invazije, ENE, PNI i LVI) nije pokazala statistički značajnu povezanost s izražajem Caspase-1, PD-L1, PD-L2, NLRP3 i ASC protutijela. Regresijska analiza i 95 % interval pouzdanosti upućuju na moguće naznake povezanosti između razine IRS izražaja pojedinih protutijela i stupnja tumorske agresivnosti.

11. Utvrđene su brojne statistički značajne korelacije između kliničkih, patohistoloških i terapijskih parametara kod pacijenata s metastazama u limfne čvorove vrata, uključujući snažne povezanosti između T, N i stadija tumora te parametara agresivnosti i preživljenja pacijenta.

12. ROC analiza nije pokazala prediktivnu vrijednost ekspresije PD-L1, PD-L2, NLRP3, ASC i Caspase 1 u predviđanju napredovanja i širenja bolesti pojavom metastaza u limfnim čvorovima vrata.

13. Analiza preživljenja nije pokazala statistički značajnu povezanost između ekspresije analiziranih protutijela i sveukupnog preživljenja bolesnika s OPCC-om, dok su parametri agresivnosti tumora (ENE, PNI, LVI), T, N stadij i ukupni stadij bolesti pokazali jasnu i statistički značajnu povezanost s lošijim sveukupnim preživljenjem.

7. LITERATURA

1. Filho AM, Laversanne M, Ferlay J, Colombet M, Pineros M, Znaor A i sur. The GLOBOCAN 2022 cancer estimates: Data sources, methods, and a snapshot of the cancer burden worldwide. *Int J Cancer* 2025;156(7):1336–46.
2. Chamoli A, Gosavi AS, Shirwadkar UP, Wangdale KV, Behera SK, Kurrey NK i sur. Overview of oral cavity squamous cell carcinoma: Risk factors, mechanisms, and diagnostics. *Oral Oncol* 2021;121:105451.
3. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009;45(4-5):309–16.
4. Kim MJ, Ahn KM. Prognostic factors of oral squamous cell carcinoma: the importance of recurrence and pTNM stage. *Maxillofac Plast Reconstr Surg* 2024;46(1):8.
5. Yete S, D'Souza W, Saranath D. High-Risk Human Papillomavirus in Oral Cancer: Clinical Implications. *Oncology* 2018;94(3):133–41.
6. Cho YA, Yoon HJ, Lee JI, Hong SP, Hong SD. Relationship between the expressions of PD-L1 and tumor-infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2011;47(12):1148–53.
7. Grewal P, Viswanathen VA. Liver cancer and alcohol. *Clin Liver Dis.* 2012;16(4):839–50.
8. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP i sur. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst* 2007;99(10):777–89.
9. Hubbers CU, Akgul B. HPV and cancer of the oral cavity. *Virulence* 2015;6(3):244–8.
10. International Consortium for Outcome Research in H, Neck C, Ebrahimi A, Gil Z, Amit M, Yen TC i sur. Primary tumor staging for oral cancer and a proposed modification incorporating depth of invasion: an international multicenter retrospective study. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2014;140(12):1138–48.
11. Wreesmann VB, Katabi N, Palmer FL, Montero PH, Migliacci JC, Gonen M i sur. Influence of extracapsular nodal spread extent on prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2016;38 Suppl 1(Suppl 1):E1192–9.

12. Zanon DK, Patel SG, Shah JP. Changes in the 8th Edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) Staging of Head and Neck Cancer: Rationale and Implications. *Curr Oncol Rep* 2019;21(6):52.
13. William WN, Jr. Oral premalignant lesions: any progress with systemic therapies? *Curr Opin Oncol*. 2012;24(3):205–10.
14. Moro JDS, Maroneze MC, Ardenghi TM, Barin LM, Danesi CC. Oral and oropharyngeal cancer: epidemiology and survival analysis. *Einstein (Sao Paulo)* 2018;16(2):eAO4248.
15. Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 2007;36(10):575–80.
16. Fleskens S, Slootweg P. Grading systems in head and neck dysplasia: their prognostic value, weaknesses and utility. *Head Neck Oncol* 2009;1:11.
17. Ribeiro AS, Salles PR, da Silva TA, Mesquita RA. A review of the nonsurgical treatment of oral leukoplakia. *Int J Dent*. 2010;2010:186018.
18. Panwar A, Lindau R, Wieland A. Management for premalignant lesions of the oral cavity. *Expert Rev Anticancer Ther* 2014;14(3):349–57.
19. Liu C, Wang M, Zhang H, Li C, Zhang T, Liu H i sur. Tumor microenvironment and immunotherapy of oral cancer. *Eur J Med Res* 2022;27(1):198.
20. Kramer IR, Lucas RB, Pindborg JJ, Sobin LH. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978;46(4):518–39.
21. Yen AM, Chen SC, Chang SH, Chen TH. The effect of betel quid and cigarette on multistate progression of oral pre-malignancy. *J Oral Pathol Med* 2008;37(7):417–22.
22. Greeshma LR, Joseph AP, Sivakumar TT, Raghavan Pillai V, Vijayakumar G. Correlation of PD-1 and PD-L1 expression in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *Sci Rep* 2023;13(1):21698.
23. Horn D, Zittel S, Moratin J, Metzger K, Ristow O, Krisam J i sur. Prospective feasibility analysis of salvage surgery in recurrent oral cancer in terms of quality of life. *Oral Oncol* 2020;102:104580.
24. Huang SH, O'Sullivan B. Oral cancer: Current role of radiotherapy and chemotherapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013;18(2):e233–40.

25. Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB i sur. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2004;350(19):1937–44.
26. Bernier J, Cooper JS, Pajak TF, van Glabbeke M, Bourhis J, Forastiere A i sur. Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). *Head Neck* 2005;27(10):843–50.
27. Patil V, Joshi A, Noronha V, Bhattacharjee A, Dhumal S, Chandrakanth MV i sur. Quality of life and quality-adjusted time without toxicity in palliatively treated head-and-neck cancer patients. *South Asian J Cancer* 2018;7(4):249–53.
28. Pilborough AE, Lambert DW, Khurram SA. Extranodal extension in oral cancer: A role for the nodal microenvironment? *J Oral Pathol Med* 2019;48(10):863–70.
29. Virchow R. Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries. 1858. *Nutr Rev* 1989;47(1):23–5.
30. Dancau AM, Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue Microarrays. *Methods Mol Biol* 2016;1381:53–65.
31. Hu Y, Lin L, Chen J, Hao K, Zhang S, Guo X i sur. Highly Enhanced Antitumor Immunity by a Three-Barreled Strategy of the L-Arginine-Promoted Nanovaccine and Gene-Mediated PD-L1 Blockade. *ACS Appl Mater Interfaces* 2020;12(37):41127–37.
32. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001;357(9255):539–45.
33. Qiao XW, Jiang J, Pang X, Huang MC, Tang YJ, Liang XH i sur. The Evolving Landscape of PD-1/PD-L1 Pathway in Head and Neck Cancer. *Front Immunol* 2020;11:1721.
34. Di Molfetta S, Feola T, Fanciulli G, Florio T, Colao A, Faggiano A i sur. Immune Checkpoint Blockade in Lung Carcinoids with Aggressive Behaviour: One More Arrow in Our Quiver? *J Clin Med* 2022;11(4).
35. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004;22:329–60.
36. Solinas C, Ceppi M, Lambertini M, Scartozzi M, Buisseret L, Garaud S i sur. Tumor-infiltrating lymphocytes in patients with HER2-positive breast cancer treated with

- neoadjuvant chemotherapy plus trastuzumab, lapatinib or their combination: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Cancer Treat Rev* 2017;57:8–15.
37. Solinas C, Aiello M, Rozali E, Lambertini M, Willard-Gallo K, Migliori E. Programmed cell death-ligand 2: A neglected but important target in the immune response to cancer? *Transl Oncol* 2020;13(10):100811.
38. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646–74.
39. Blank C, Gajewski TF, Mackensen A. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2005;54(4):307–14.
40. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H i sur. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000;192(7):1027–34.
41. Kogashiwa Y, Yasuda M, Sakurai H, Nakahira M, Sano Y, Gonda K i sur. PD-L1 Expression Confers Better Prognosis in Locally Advanced Oral Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res* 2017;37(3):1417–24.
42. Salmaninejad A, Valilou SF, Shabgah AG, Aslani S, Alimardani M, Pashar A i sur. PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. *J Cell Physiol* 2019;234(10):16824–37.
43. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L i sur. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 2014;515(7528):568–71.
44. Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csoszi T, Fulop A i sur. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2016;375(19):1823–33.
45. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S i sur. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 2015;373(19):1803–13.
46. Bellmunt J, de Wit R, Vaughn DJ, Fradet Y, Lee JL, Fong L i sur. Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med* 2017;376(11):1015–26.

47. Schneider S, Kadletz L, Wiebringhaus R, Kenner L, Selzer E, Fureder T i sur. PD-1 and PD-L1 expression in HNSCC primary cancer and related lymph node metastasis - impact on clinical outcome. *Histopathology* 2018;73(4):573–84.
48. de Vicente JC, Rodriguez-Santamarta T, Rodrigo JP, Blanco-Lorenzo V, Allonca E, Garcia-Pedrero JM. PD-L1 Expression in Tumor Cells Is an Independent Unfavorable Prognostic Factor in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2019;28(3):546–54.
49. Huang W, Zhou X, Liao Q, Tang Y, Zuo L, Wang H i sur. Clinicopathological and prognostic significance of PD-1/PD-L1 axis expression in patients with tongue squamous cell carcinoma. *J Cell Physiol* 2020;235(10):6942–53.
50. Yoshida S, Nagatsuka H, Nakano K, Kogashiwa Y, Ebihara Y, Yano M i sur. Significance of PD-L1 Expression in Tongue Cancer Development. *Int J Med Sci* 2018;15(14):1723–30.
51. Bauml J, Seiwert TY, Pfister DG, Worden F, Liu SV, Gilbert J i sur. Pembrolizumab for Platinum- and Cetuximab-Refractory Head and Neck Cancer: Results From a Single-Arm, Phase II Study. *J Clin Oncol* 2017;35(14):1542–9.
52. Ferris RL, Blumenschein G, Jr., Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L i sur. Nivolumab vs investigator's choice in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: 2-year long-term survival update of CheckMate 141 with analyses by tumor PD-L1 expression. *Oral Oncol* 2018;81:45–51.
53. Lenouvel D, Gonzalez-Moles MA, Talbaoui A, Ramos-Garcia P, Gonzalez-Ruiz L, Ruiz-Avila I i sur. An update of knowledge on PD-L1 in head and neck cancers: Physiologic, prognostic and therapeutic perspectives. *Oral Dis* 2020;26(3):511–26.
54. Rasmussen JH, Lelkaitis G, Hakansson K, Vogelius IR, Johannesen HH, Fischer BM i sur. Intratumor heterogeneity of PD-L1 expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2019;120(10):1003–6.
55. Chen L, Diao L, Yang Y, Yi X, Rodriguez BL, Li Y i sur. CD38-Mediated Immunosuppression as a Mechanism of Tumor Cell Escape from PD-1/PD-L1 Blockade. *Cancer Discov* 2018;8(9):1156–75.

56. Satgunaseelan L, Gupta R, Madore J, Chia N, Lum T, Palme CE i sur. Programmed cell death-ligand 1 expression in oral squamous cell carcinoma is associated with an inflammatory phenotype. *Pathology* 2016;48(6):574–80.
57. Ferris RL, Blumenschein G, Jr., Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L i sur. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med* 2016;375(19):1856–67.
58. Maruse Y, Kawano S, Jinno T, Matsubara R, Goto Y, Kaneko N i sur. Significant association of increased PD-L1 and PD-1 expression with nodal metastasis and a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2018;47(7):836–45.
59. Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Front Immunol* 2016;7:550.
60. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I i sur. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2001;2(3):261–8.
61. Outh-Gauer S, Alt M, Le Tourneau C, Augustin J, Broudin C, Gasne C i sur. Immunotherapy in head and neck cancers: A new challenge for immunologists, pathologists and clinicians. *Cancer Treat Rev* 2018;65:54–64.
62. Weber M, Wehrhan F, Baran C, Agaimy A, Buttner-Herold M, Preidl R i sur. PD-L1 expression in tumor tissue and peripheral blood of patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2017;8(68):112584–97.
63. Yearley JH, Gibson C, Yu N, Moon C, Murphy E, Juco J i sur. PD-L2 Expression in Human Tumors: Relevance to Anti-PD-1 Therapy in Cancer. *Clin Cancer Res* 2017;23(12):3158–67.
64. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008;26:677–704.
65. Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, Sullivan EL, Munoz O, Wood CR i sur. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol* 2003;170(3):1257–66.
66. Xiao Y, Yu S, Zhu B, Bedoret D, Bu X, Francisco LM i sur. RGMB is a novel binding partner for PD-L2 and its engagement with PD-L2 promotes respiratory tolerance. *J Exp Med* 2014;211(5):943–59.

67. Jie HB, Gildener-Leapman N, Li J, Srivastava RM, Gibson SP, Whiteside TL i sur. Intratumoral regulatory T cells upregulate immunosuppressive molecules in head and neck cancer patients. *Br J Cancer* 2013;109(10):2629–35.
68. Kim MY, Koh J, Kim S, Go H, Jeon YK, Chung DH. Clinicopathological analysis of PD-L1 and PD-L2 expression in pulmonary squamous cell carcinoma: Comparison with tumor-infiltrating T cells and the status of oncogenic drivers. *Lung Cancer* 2015;88(1):24–33.
69. Kano M, Hayano K, Hayashi H, Hanari N, Gunji H, Toyozumi T i sur. Survival Benefit of Neoadjuvant Chemotherapy with S-1 Plus Docetaxel for Locally Advanced Gastric Cancer: A Propensity Score-Matched Analysis. *Ann Surg Oncol* 2019;26(6):1805–13.
70. Youngnak P, Kozono Y, Kozono H, Iwai H, Otsuki N, Jin H i sur. Differential binding properties of B7-H1 and B7-DC to programmed death-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;307(3):672–7.
71. Chang H, Kim JS, Choi YJ, Cho JG, Woo JS, Kim A i sur. Overexpression of PD-L2 is associated with shorter relapse-free survival in patients with malignant salivary gland tumors. *Onco Targets Ther* 2017;10:2983–92.
72. Gao Y, Li S, Xu D, Chen S, Cai Y, Jiang W i sur. Prognostic value of programmed death-1, programmed death-ligand 1, programmed death-ligand 2 expression, and CD8(+) T cell density in primary tumors and metastatic lymph nodes from patients with stage T1-4N+M0 gastric adenocarcinoma. *Chin J Cancer* 2017;36(1):61.
73. Panjwani PK, Charu V, DeLisser M, Molina-Kirsch H, Natkunam Y, Zhao S. Programmed death-1 ligands PD-L1 and PD-L2 show distinctive and restricted patterns of expression in lymphoma subtypes. *Hum Pathol* 2018;71:91–9.
74. Solomon B, Young RJ, Rischin D. Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments. *Semin Cancer Biol* 2018;52(Pt 2):228–40.
75. Neill DR, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, Langford TK i sur. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* 2010;464(7293):1367–70.

76. Abderrazak A, Syrovets T, Couchie D, El Hadri K, Friguet B, Simmet T i sur. NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biol* 2015;4:296–307.
77. Oprisoreanu AM, Ryan F, Richmond C, Dzekhtsiarova Y, Carragher NO, Becker T i sur. Drug screening in zebrafish larvae reveals inflammation-related modulators of secondary damage after spinal cord injury in mice. *Theranostics* 2023;13(8):2531–51.
78. Alexandre YO, Cocita CD, Ghilas S, Dalod M. Deciphering the role of DC subsets in MCMV infection to better understand immune protection against viral infections. *Front Microbiol* 2014;5:378.
79. Fullard N, O'Reilly S. Role of innate immune system in systemic sclerosis. *Semin Immunopathol* 2015;37(5):511–7.
80. Eigenbrod T, Dalpke AH. Bacterial RNA: An Underestimated Stimulus for Innate Immune Responses. *J Immunol* 2015;195(2):411–8.
81. Scuderi SA, Casili G, Lanza M, Filippone A, Paterniti I, Esposito E i sur. Modulation of NLRP3 Inflammasome Attenuated Inflammatory Response Associated to Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome. *Biomedicines* 2020;8(11).
82. Missiroli S, Perrone M, Boncompagni C, Borghi C, Campagnaro A, Marchetti F i sur. Targeting the NLRP3 Inflammasome as a New Therapeutic Option for Overcoming Cancer. *Cancers (Basel)* 2021;13(10).
83. Di Virgilio F. The therapeutic potential of modifying inflammasomes and NOD-like receptors. *Pharmacol Rev* 2013;65(3):872–905.
84. Karki R, Man SM, Kanneganti TD. Inflammasomes and Cancer. *Cancer Immunol Res* 2017;5(2):94–9.
85. Allen IC, TeKippe EM, Woodford RM, Uronis JM, Holl EK, Rogers AB i sur. The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *J Exp Med* 2010;207(5):1045–56.
86. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35(4):495–516.
87. Khan KH, Blanco-Codecido M, Molife LR. Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway. *Crit Rev Oncol Hematol* 2014;90(3):200–19.

88. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16(6):2129–44.
89. Moossavi M, Parsamanesh N, Bahrami A, Atkin SL, Sahebkar A. Role of the NLRP3 inflammasome in cancer. *Mol Cancer* 2018;17(1):158.
90. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 2002;10(2):417–26.
91. Gross O, Yazdi AS, Thomas CJ, Masin M, Heinz LX, Guarda G i sur. Inflammasome activators induce interleukin-1alpha secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. *Immunity* 2012;36(3):388–400.
92. Okamoto M, Liu W, Luo Y, Tanaka A, Cai X, Norris DA i sur. Constitutively active inflammasome in human melanoma cells mediating autoinflammation via caspase-1 processing and secretion of interleukin-1beta. *J Biol Chem* 2010;285(9):6477–88.
93. Hu B, Elinav E, Huber S, Booth CJ, Strowig T, Jin C i sur. Inflammation-induced tumorigenesis in the colon is regulated by caspase-1 and NLRC4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(50):21635–40.
94. Chen LC, Wang LJ, Tsang NM, Ojcius DM, Chen CC, Ouyang CN i sur. Tumour inflammasome-derived IL-1beta recruits neutrophils and improves local recurrence-free survival in EBV-induced nasopharyngeal carcinoma. *EMBO Mol Med* 2012;4(12):1276–93.
95. Guan X, Sagara J, Yokoyama T, Koganehira Y, Oguchi M, Saida T i sur. ASC/TMS1, a caspase-1 activating adaptor, is downregulated by aberrant methylation in human melanoma. *Int J Cancer* 2003;107(2):202–8.
96. Conway KE, McConnell BB, Bowring CE, Donald CD, Warren ST, Vertino PM. TMS1, a novel proapoptotic caspase recruitment domain protein, is a target of methylation-induced gene silencing in human breast cancers. *Cancer Res* 2000;60(22):6236–42.
97. Riojas MA, Guo M, Glockner SC, Machida EO, Baylin SB, Ahuja N. Methylation-induced silencing of ASC/TMS1, a pro-apoptotic gene, is a late-stage event in colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 2007;6(11):1710–6.

98. Zhang C, Li H, Zhou G, Zhang Q, Zhang T, Li J i sur. Transcriptional silencing of the TMS1/ASC tumour suppressor gene by an epigenetic mechanism in hepatocellular carcinoma cells. *J Pathol* 2007;212(2):134–42.
99. Liu W, Luo Y, Dunn JH, Norris DA, Dinarello CA, Fujita M. Dual role of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) in tumorigenesis of human melanoma. *J Invest Dermatol* 2013;133(2):518–27.
100. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell* 2017;168(4):707–23.
101. Neubert NJ, Schmittnaegel M, Bordry N, Nassiri S, Wald N, Martignier C i sur. T cell-induced CSF1 promotes melanoma resistance to PD1 blockade. *Sci Transl Med* 2018;10(436).
102. Theivanthiran B, Evans KS, DeVito NC, Plebanek M, Sturdivant M, Wachsmuth LP i sur. A tumor-intrinsic PD-L1/NLRP3 inflammasome signaling pathway drives resistance to anti-PD-1 immunotherapy. *J Clin Invest* 2020;130(5):2570–86.
103. Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity* 2018;48(3):434–52.
104. Chen L, Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. *J Clin Invest.* 2015;125(9):3384–91.
105. Plataniias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 2005;5(5):375–86.
106. Yasuda K, Nakanishi K, Tsutsui H. Interleukin-18 in Health and Disease. *Int J Mol Sci* 2019;20(3).
107. Straub M, Drecoll E, Pfarr N, Weichert W, Langer R, Hapfelmeier A i sur. CD274/PD-L1 gene amplification and PD-L1 protein expression are common events in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oncotarget* 2016;7(11):12024–34.
108. Vassilakopoulou M, Avgeris M, Velcheti V, Kotoula V, Rampias T, Chatzopoulos K 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.
109. Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Nishimura M. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin Cancer Res* 2004;10(15):5094–100.

110. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012;12(4):252–64.
111. Wehrhan F, Weber M, Baran C, Agaimy A, Buttner-Herold M, Kesting M i sur. PD1 expression and correlation with its ligands in oral cancer specimens and peripheral blood. *J Craniomaxillofac Surg* 2021;49(2):118–25.
112. Sudo S, Kajiya H, Okano S, Sasaki M, Katsumata Y, Ohno J i sur. Cisplatin-induced programmed cell death ligand-2 expression is associated with metastasis ability in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2020;111(4):1113–23.
113. Bellucci R, Martin A, Bommarito D, Wang K, Hansen SH, Freeman GJ i sur. Interferon-gamma-induced activation of JAK1 and JAK2 suppresses tumor cell susceptibility to NK cells through upregulation of PD-L1 expression. *Oncoimmunology*. 2015;4(6):e1008824.
114. Zhao X, Wu Q, Gong X, Liu J, Ma Y. Osteosarcoma: a review of current and future therapeutic approaches. *Biomed Eng Online* 2021;20(1):24.
115. 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.
116. Badoual C, Hans S, Merillon N, Van Ryswick C, Ravel P, Benhamouda 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.
117. Mattox AK, Lee J, Westra WH, Pierce RH, Ghossein R, Faquin WC i sur. PD-1 Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Derives Primarily from Functionally Anergic CD4(+) TILs in the Presence of PD-L1(+) TAMs. *Cancer Res* 2017;77(22):6365–74.
118. Sznol M, Chen L. Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer--response. *Clin Cancer Res* 2013;19(19):5542.
119. Moratin J, Metzger K, Safaltin A, Herpel E, Hoffmann J, Freier K i sur. Upregulation of PD-L1 and PD-L2 in neck node metastases of head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2019;41(8):2484–91.

120. Chow MT, Tschopp J, Moller A, Smyth MJ. NLRP3 promotes inflammation-induced skin cancer but is dispensable for asbestos-induced mesothelioma. *Immunol Cell Biol* 2012;90(10):983–6.
121. Bruchard M, Mignot G, Derangere V, Chalmin F, Chevriaux A, Vegran F i sur. Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nat Med* 2013;19(1):57–64.
122. Feng X, Luo Q, Zhang H, Wang H, Chen W, Meng G i sur. The role of NLRP3 inflammasome in 5-fluorouracil resistance of oral squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2017;36(1):81.
123. Fenini G, Contassot E, French LE. Potential of IL-1, IL-18 and Inflammasome Inhibition for the Treatment of Inflammatory Skin Diseases. *Front Pharmacol* 2017;8:278.
124. Wu CS, Chang IY, Hung JL, Liao WC, Lai YR, Chang KP i sur. ASC modulates HIF-1alpha stability and induces cell mobility in OSCC. *Cell Death Dis* 2020;11(9):721.
125. Fernandes-Alnemri T, Wu J, Yu JW, Datta P, Miller B, Jankowski W i sur. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death Differ* 2007;14(9):1590–604.
126. Miao EA, Rajan JV, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol Rev* 2011;243(1):206–14.
127. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 2014;157(5):1013–22.
128. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol* 2016;16(7):407–20.
129. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* 2005;73(4):1907–16.
130. Wang Z, Zhang S, Xiao Y, Zhang W, Wu S, Qin T i sur. NLRP3 Inflammasome and Inflammatory Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2020;2020:4063562.
131. Corti A, De Cecco L, Cavalieri S, Lenoci D, Pistore F, Calareso G i sur. MRI-based radiomic prognostic signature for locally advanced oral cavity squamous cell carcinoma: development, testing and comparison with genomic prognostic signatures. *Biomark Res* 2023;11(1):69.

POPIS TABLICA

Tablica 1. TNM klasifikacija oralnog planocelularnog karcinoma

Tablica 2. Klinički stadij oralnog planocelularnog karcinoma

Tablica 3. Klinički podaci pacijenata sa planocelularnim karcinomom usne šupljine

Tablica 4. Karakteristike korištenih primarnih protutijela za imunohistokemijsko bojanje

Tablica 5. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na PD-L1 s obzirom na intenzitet bojanja stanica u analiziranim skupinama ispitanika

Tablica 6. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na PD-L1 s obzirom na broj obojenih stanica u analiziranim skupinama ispitanika

Tablica 7. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na PD-L1 s obzirom na IRS faktor u analiziranim skupinama ispitanika

Tablica 8. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na PD-L2 s obzirom na intenzitet bojanja stanica u analiziranim skupinama ispitanika

Tablica 9. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na PD-L2 s obzirom na broj obojenih stanica u analiziranim skupinama ispitanika

Tablica 10. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na PD-L2 s obzirom na IRS faktor u analiziranim skupinama ispitanika

Tablica 11. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na NLRP3 s obzirom na intenzitet bojanja stanica u analiziranim skupinama ispitanika

Tablica 12. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na NLRP3 s obzirom na broj obojenih stanica u analiziranim skupinama ispitanika

Tablica 13. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na NLRP3 s obzirom na IRS faktor u analiziranim skupinama ispitanika

Tablica 14. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na ASC s obzirom na intenzitet bojanja stanica u analiziranim skupinama ispitanika

Tablica 15. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na ASC s obzirom na broj obojenih stanica u analiziranim skupinama ispitanika

Tablica 16. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na ASC s obzirom na IRS faktor u analiziranim skupinama ispitanika

Tablica 17. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na Caspase 1 s obzirom na intenzitet bojanja stanica u analiziranim skupinama ispitanika

Tablica 18. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na Caspase 1 s obzirom na broj obojenih stanica u analiziranim skupinama ispitanika

Tablica 19. Raspored kategorija imunohistokemijskog bojanja na Caspase 1 s obzirom na IRS faktor u analiziranim skupinama ispitanika

Tablica 20. Usporedba izražaja analiziranih protutijela između skupina ispitanika

Tablica 21. Korelacije između analiziranih protutijela u ukupnom uzorku

Tablica 22. Povezanost izražaja PD-L1 i PD-L2 s kliničkim i patohistološkim osobinama tumora kod bolesnika s OPCC

Tablica 23. Povezanost izražaja Caspase 1, NLRP3 i ASC s kliničkim i patohistološkim osobinama tumora kod bolesnika s OPCC

POPIS SLIKA

Slika 1. Shematski prikaz karcinogeneze. *Preuzeto iz rada Chamoli i sur. [2]*

Slika 2. Fotomikrografije prikazuju obrasce imunohistokemijske ekspresije u oralnom planocelularnom karcinomu

Slika 3. Intenzitet bojanja PD-L1 protutijela između analiziranih skupina bolesnika

Slika 4. Rezultat proporcije PD-L1 protutijela između analiziranih skupina bolesnika

Slika 5. IRS faktor PD-L1 protutijela između analiziranih skupina bolesnika

Slika 6. Intenzitet bojanja PD-L2 protutijela između analiziranih skupina bolesnika

Slika 7. Rezultat proporcije PD-L2 protutijela između analiziranih skupina bolesnika

Slika 8. IRS faktor PD-L2 protutijela između analiziranih skupina bolesnika

Slika 9. Intenzitet bojanja NLRP3 protutijela između analiziranih skupina bolesnika

Slika 10. Rezultat proporcije NLRP3 protutijela između analiziranih skupina bolesnika

Slika 11. IRS faktor NLRP3 protutijela između analiziranih skupina bolesnika

Slika 12. Intenzitet bojanja ASC protutijela između analiziranih skupina bolesnika

Slika 13. Rezultat proporcije ASC protutijela između analiziranih skupina bolesnika

Slika 14. IRS faktor ASC protutijela između analiziranih skupina bolesnika

Slika 15. Intenzitet bojanja Caspase 1 protutijela između analiziranih skupina bolesnika

Slika 16. Rezultat proporcije Caspase 1 protutijela između analiziranih skupina bolesnika

Slika 17. IRS faktor Caspase 1 protutijela između analiziranih skupina bolesnika

Slika 18. Linearna regresijska analiza IRS faktora Caspase 1 protutijela i četiri odabrana parametra: dubina invazije, ENE, PNI i LVI

Slika 19. Linearna regresijska analiza IRS faktora PD-L2 protutijela i četiri odabrana parametra: dubina invazije, ENE, PNI i LVI

Slika 20. Linearna regresijska analiza IRS faktora PD-L1 protutijela i četiri odabrana parametra: dubina invazije, ENE, PNI i LVI

Slika 21. Linearna regresijska analiza IRS faktora NLRP3 protutijela i četiri odabrana parametra: dubina invazije, ENE, PNI i LVI

Slika 22. Linearna regresijska analiza IRS faktora ASC protutijela i četiri odabrana parametra: dubina invazije, ENE, PNI i LVI

Slika 23. Toplinska mapa korelacija analiziranih parametara u bolesnika s OPCC

Slika 24. Toplinska mapa Spearmanovih koeficijenata korelacije, s pripadajućim p-vrijednostima za svaki analizirani par varijabli u skupini bolesnika s OPCC

Slika 25. Linearna regresijska analiza IRS faktora Caspase 1 protutijela i četiri odabrana parametra u skupini bolesnika s metastazama OPCC u cervikalne limfne čvorove

Slika 26. Linearna regresijska analiza IRS faktora PD-L2 protutijela i četiri odabrana parametra u skupini bolesnika s metastazama OPCC u cervikalne limfne čvorove

Slika 27. Linearna regresijska analiza IRS faktora PD-L1 protutijela i četiri odabrana parametra u skupini bolesnika s metastazama OPCC u cervikalne limfne čvorove

Slika 28. Linearna regresijska analiza IRS faktora NLRP3 protutijela i četiri odabrana parametra u skupini bolesnika s metastazama OPCC u cervikalne limfne čvorove

Slika 29. Linearna regresijska analiza IRS faktora ASC protutijela i četiri odabrana parametra u skupini bolesnika s metastazama OPCC u cervikalne limfne čvorove

Slika 30. Toplinska mapa povezanosti analiziranih parametara u skupini bolesnika s metastazama OPCC u cervikalne limfne čvorove

Slika 31. Prognostička ROC analiza izražaja protutijela Caspase 1, PD-L2, NLRP3, ASC i PD-L1

Slika 32. Analiza utjecaja kliničko-patoloških karakteristika tumora na sveukupno preživljavanje bolesnika

POPIS POKRATA

AJCC - Američki odbor za rak (eng. American Joint Committee on Cancer)

ASC - protein povezan s apoptozom koji sadrži CARD domenu; adapter inflammasoma (eng. apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD)

ASA - Američko anesteziološko društvo; klasifikacija operativnog rizika (eng. American Society of Anesthesiologists)

AUC - područje ispod krivulje (eng. area under the curve)

Bax - proapoptotski protein porodice Bcl-2 (eng. Bcl-2-associated X protein)

Bad - proapoptotski protein porodice Bcl-2 (eng. Bcl-2-associated death promoter)

Bcl-2 - član porodice antiapoptotskih proteina (eng. B-cell lymphoma 2)

CARD - domena regrutacije caspase (eng. caspase recruitment domain)

CD4 - T-pomoćnički limfociti (eng. cluster of differentiation 4)

CD8 - citotoksični T limfociti (eng. cluster of differentiation 8)

CD30 - član TNF receptorske obitelji (eng. cluster of differentiation 30)

DFS - preživljenje bez bolesti (eng. disease-free survival)

DAMP - molekularni obrasci povezani s oštećenjem (eng. damage-associated molecular patterns)

ENE - ektranodalna ekstenzija

GSDMD - gasdermin D (protein piroptoze) (eng. gasdermin D)

HIF-1 α - hipoksijom inducirani faktor 1 alfa (eng. hypoxia-inducible factor 1 alpha)

HNSCC - planocelularni karcinom glave i vrata (eng. head and neck squamous cell carcinoma)

IHC - imunohistokemija (eng. immunohistochemistry)

IFN- γ - interferon gama (eng. interferon gamma)

IL-1 β - interleukin-1 beta

IL-18 - interleukin-18

IRS - imunoreaktivni skor (eng. immunoreactive score)

Ki-67 - proliferacijski marker (eng. Ki-67 antigen)

LNM - metastaza u limfne čvorove (eng. lymph node metastases)

LVI - limfovaskularna invazija

MAPK - mitogenom aktivirana protein-kinaza (eng. mitogen-activated protein kinase)

MDSC - mijeloidne supresorske stanice (eng. myeloid-derived suppressor cells)

NLR - receptori s ponavljajućim leucinima (eng. NOD-like receptors)

NLRP3 - NOD-slični receptor s pirinskom domenom 3 (eng. NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3)

OL - oralna leukoplakija (eng. oral leukoplakia)

OPCC - oralni planocelularni karcinom (eng. oral squamous cell carcinoma)

OOPCC - oralni i orofaringealni planocelularni karcinom (eng. oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma)

OPMD - oralni potencijalno maligni poremećaji (eng. oral potentially malignant disorders)

ORR - ukupna stopa odgovora (eng. overall response rate)

PAMP - molekularni obrasci povezani s patogenima (eng. pathogen-associated molecular patterns)

PD-1 - protein programirane stanične smrti 1 (eng. programmed cell death protein 1)

PD-L1 - ligand proteina programirane stanične smrti 1 (eng. programmed cell death protein 1 ligand)

PD-L2 - ligand proteina programirane stanične smrti 2 (eng. programmed cell death protein 2 ligand)

PNI - perineuralna invazija

PRR - receptori za prepoznavanje obrazaca (eng. pattern recognition receptors)

ROC - krivulja operativnih karakteristika primatelja (eng. receiver operating characteristic)

SCC - planocelularni karcinom (eng. squamous cell carcinoma)

ssRNA - jednolančana ribonukleinska kiselina (eng. single-stranded RNA)

TNF- α - faktor nekroze tumora alfa (eng. tumor necrosis factor alpha)

TNM - klasifikacija tumora, limfnih čvorova i metastaza (eng. tumor-node-metastasis)

VEGF - faktor rasta krvnih žila (eng. vascular endothelial growth factor)

ŽIVOTOPIS

- Ime i prezime : Arijan Zubović
- Datum rođenja : 06.04.1991.
- Adresa: Franje Belulovića 8, 51000 Rijeka
- email : arijan.zubovic@gmail.com

RADNO ISKUSTVO

- asistent na katedri za maksilofacijalnu kirurgiju – Medicinski fakultet u Rijeci – **08/2020 – trenutačno**
- naslovni asistent na katedri za maksilofacijalnu kirurgiju – Medicinski fakultet u Rijeci – **2018 – 2020 –Rijeka, Hrvatska**
- edukaciju za doktore za rad u izvanbolničkoj hitnoj medicini – **20/04/2017 – 22/04/2017**
- demonstrator – Katedra za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje – **2014 – 2016**
pomoć pri izvođenju različitih vježbi u kabinetu vještina na kolegijima "prva pomoć", "anesteziologija, reanimatologija i intenzivno liječenje"
- priprema i organizacija vježbi i kolokvija

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

- 26/10/2023 – trenutačno Rijeka, Hrvatska
specijalist maksilofacijalne kirurgije **KBC Rijeka**
- 14/01/2018 – trenutačno Rijeka, Hrvatska
specijaliznat maksilofacijalne kirurgije **KBC Rijeka**
- 04/2017 – 01/2018 Novalja, Hrvatska
doktor medicine **Zavod za hitnu medicinu ličko-senjske županije**
- 16/05/2017

položen državni stručni ispit za doktora medicine

- 30/11/2016 – 29/04/2017 Hrvatska

pripravnički staž **Klinika za ortopediju Lovran**

- 30/09/2010 – 14/07/2016 Rijeka, Hrvatska

doktor medicine **Medicinski fakultet u Rijeci**

- **razina europskoga kvalifikacijskog okvira** razina 6 eko-a

- 2005 – 2010 rijeka, hrvatska

srednja stručna sprema **Prva Sušačka gimnazija u Rijeci**

TEČAJEVI

- Tečajevi
-

- tečaj Novi šivaći materijali, transplatati i lokalni režnjevi - Napredni tečaj u zagrebu 8. i 9. veljače 2019

- tečaj biostatistike (Introductory Course on Epidemiology) 9-10. listopada 2014. godine u Puli

Beyond Full: aRCH palatal approach, trans-sinus and implants in the pterygoid area : 20.09.2024-21.09.2024

All-on-4 edukacija - 25.10.2024 - 26.10.2024.

Tilted implants - rehabilitation of atrophic jaws, Milan, 10-12.4. 2025

Warsaw - shadowing program- zygoma implants, 17-18.3, 2025

DIPLOMSKI RAD

- Diplomski rad
-

Diplomski rad izradio na Klinici za Maksilofacijalnu kirurgiju u Rijeci sa radom : "
Kirurško liječenje čeljusnih deformiteta"

Belusic-Gobic M., **Zubovic A.**, Cerovic R., Dekanic A., Marzic D., Zamolo G., 2018: Multivariate analysis of risk factors for postoperative wound infection following oral and oropharyngeal cancer surgery. *J. Craniomaxillofacial Surg.* 2018 Jan;46(1):135-141

Belusic-Gobic M, **Zubovic A**, Predrijevac A, Harmicar D, Cerovic R, Udovic Gobic S, et al. Microbiology of wound infection after oral cancer surgery. *J Craniomaxillofac Surg.* 2020;48(7):700-5.

D. Petrić , V. Racki , M.V. Peitl, **A. Zubovic**, N.G. Racki , M. Rogic, M.B. Gobic, Z. Tovilovic.:
Coping strategies in oral and oropharyngeal cancer patients with alcohol dependence, *Eur. J. Psychiat.* 2020

Zubovic A, Belusic-Gobic M, Harmicar D, Marusic J, Vucinic D, Zamolo G. Pancreatic Carcinoma Metastatic to the Gingiva. *Clin Pract.* 2021;11(1):58-64.

Tarle, M., **Zubovic, A.**, Kos, B., Raguz, M., & Luksic, I. (2023). Retrospective Longitudinal Study on Changes in Atmospheric Pressure as a Predisposing Factor for Odontogenic Abscess Formation. *Dent J (Basel)*, 11.

Zubovic, A., et al. (2025). "Differential expression of PD-L1, PD-L2 and inflammasome related proteins (NLRP3, ASC, and Caspase-1) in oral squamous cell carcinoma, lymph node metastases, and benign lesions." *J Craniomaxillofac Surg* 53(12): 2190–2198.

Harmicar, D., Belusic, M., Gole Jurisa, A., Zupan, Z., **Zubovic, A.** & Cerovic, R.(2026). "The true benefit of the regional block in orthognathic surgery lies in the preemptive effect." *Oral Maxillofac Surg* 30.