

Madara Dzudzilo

ORCID 0000-0003-3551-4581

Mutes leikoplakijas agrīnu
malignitātes pazīmju noteikšana
tās audos un siekalās

Promocijas darbs – disertācija – zinātnes doktora grāda
“zinātnes doktors (*Ph. D.*)” iegūšanai

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes

Nozare – klīniskā medicīna

Apakšnozare – stomatoloģija

Promocijas darba vadītājas:

Dr. habil. med. profesore **Ingrīda Čēma**, Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. med. emeritētā profesore **Regīna Kleina**, Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

NACIONĀLAIS
ATTĪSTĪBAS
PLĀNS 2020



EIROPAS SAVIENĪBA

Eiropas Sociālais
fonds

I E G U L D Ī J U M S T A V Ā N Ā K O T N Ē

Promocijas darbs izstrādāts ar Eiropas sociālā fonda projekta Nr. 8.2.2.0/I/004 “Atbalsts doktorantu iesaistei zinātniski pētnieciskajā un studiju darbā” finansiālu atbalstu

Rīga, 2024

Anotācija

Mutes leikoplakija (ML) ir viena no visbiežāk sastopamām mutes potenciāli ļaundabīgām slimībām, kuru populācijā novēro apmēram 3,41–11,74 % cilvēku, taču ne visas leikoplakijas pārvēršas ļaundabīgos audzējos.

Biežākie mutes ļaundabīgu audzēju cēloņi ir smēķēšana, alkohola lietošana un CPV (cilvēka papilomas vīruss) infekcija. Pēdējos gados Latvijā jaunieši arvien vairāk lieto bezdūmu tabaku, kas arī var būt iemesls priekšvēža un ļaundabīgu audzēju attīstībā.

Epitēlija displāzijas novērtēšanu uzskata par ļaundabīgas transformācijas riska noteikšanas “zelta standartu”. Lai izprastu sarežģīto malignizācijas procesu mutes gļotādā, ir nepieciešami kompleksi imūnhistoķīmiski, elektronmikroskopiski, ģenētiski un imunoloģiski pētījumi. Mūsu pētījumā tika kombinēti klīniski, laboratoriski un imūnhistoķīmiski izmeklējumi, izvērtējot epitēlija cikla regulatora p27 un transkripcijas proteīna ThPOK, kā arī cilmes šūnu CD44 un eksosomu CD9 antigēnus.

Darba mērķis bija novērtēt dažādu veidu mutes dobuma leikoplakiju klīniskās, morfoloģiskās un imūnhistoķīmiskās pārmaiņas vienlaikus ar siekalu testa rādītājiem, lai noteiktu mutes leikoplakijas agrīnas malignizācijas pazīmes.

Pētījumā tika iekļauti 50 mutes leikoplakijas pacienti un 2 salīdzinošās grupas – 20 slimnieki ar mutes dobuma plakanšūnu karcinomu un 20 personas ar neizmainītu mutes dobuma gļotādu. Visās pacientu grupās tika veikta *VELscope* attēlu izvērtēšana, kā arī šķīstošā CD44 un kopējā proteīna noteikšana siekalās. Veselajos audos, ML un plakanšūnu karcinomas audiem veica rutīno morfoloģisko novērtējumu. CD44, CD9, ThPOK un p27 proteīni tika novērtēti ar standarta uz polimēriem balstītu vizualizācijas *En-vision* metodi.

Iegūto rezultātu novērtēšanai tika veikta statistiskā datu analīze, izmantojot *GraphPadPrism 9.0* programatūru MacOS (*GraphPad Software*, Sandjego, CA, ASV). Visiem statistiskajiem testiem p vērtības < 0,05 tika uzskatītas par nozīmīgām. Rezultāti tiek parādīti kā mediāna ar starpkvartiļu diapazonu.

Izanalizējot iegūtos rezultātus, secināts, ka mūsu pētījuma grupā ML biežāk novēroja vīriešiem ar vidējo vecumu 57 gadi. Vidējais ML izmērs bija $14 \pm 3,7$ mm, un biežākā lokalizācija bija vaigu un mēles sāna gļotāda, 26 % gadījumu bija ar smagas pakāpes displāziju.

Tika secināts, ka *VELscope* fluorescentā spektroskopija deva iespēju izvērtēt un noteikt izmainīto audu robežas gan ML, gan karcinomu gadījumos, tādējādi precizējot biopsijas vietas un rezekcijas līniju noteikšanu.

Pieaugot mutes leikoplakiju klīniskās formas smagumam, siekalu kopējā proteīna līmeņa paaugstināšanās kombinācijā ar pozitīvu šķīstošo CD44 testu liecina par epitēlija agrīnām mikrovides izmaiņām.

Mūsu pētījums pierādīja adhēzijas molekulas CD44 ekspresiju gan ML hiperplastiskajās un displastiskajās vietās, gan karcinomās. CD44 antigēna klātbūtne mutes zemgļotādas makrofāgos liecina par tā piedalīšanos epiteliāli mezenhimālās aktivitātēs kā hialuronais receptora proteīns. CD9 glikoproteīna ekspresija eksosomās pierādīja mutes epitēlijā tā sauktos transporta proteīnus un palīdzēja izprast siekalu un citu šķidrumu transportu gļotādā un tās patoloģiskajos veidojumos.

p27 proteīns uzrādīja supresora un onkogēna īpašības nehomogēnajās ML un mutes plakanšūnu karcinomās, demonstrējot šī antigēna duālās īpašības ar p27 restrukturizāciju no kodola uz citoplazmu. ThPOK lielā ekspresijas dažādība mutes leukoplakijās un karcinomās nosaka to, ka nevaram šo biomarkieri rekomendēt mutes leukoplakiju malignizācijas procesu izpētē.

Biezas leukoplakijas ar smagas pakāpes displāziju, CD44, CD9 un p27 proteīnu translokāciju un šķīstošā CD44 un kopējā proteīna daudzuma paaugstināšanās siekalās raksturo nehomogēnu mutes leukoplakiju kā augsta riska potenciāli ļaundabīgu veidojumu mutes dobumā.

Atslēgvārdi: mutes leukoplakija, *VELscope*, SolCD44, CD44, CD9, ThPOK, p27 antigēni.

Abstract

Detecting Early Signs of Malignancy of Oral Leukoplakia in its Tissues and Saliva

Oral leukoplakia (OL) is one of the most common potentially malignant oral diseases observed in about 3.41–11.74 % of the population, however not all leukoplakias turn into carcinoma.

The most common causes of oral malignancies are smoking, alcohol consumption, and HPV infection. In recent years, more and more smokeless tobacco has been used in Latvia, which can also be a reason for the development of pre-cancer and oral carcinoma.

Evaluation of epithelial dysplasia is considered as the “gold standard” for the detection of the risk of malignant transformation. Complex immunohistochemical, electron microscopic, genetic, and immunological investigations are necessary for deeper understanding the complicated process of malignisation in the oral mucosa. In our study there are combined clinical, laboratory and immunohistochemical examinations of oral leucoplakias. We have analysed the epithelial cycle regulator p27, transcriptional protein ThPOK, as well as antigens of stem cell membranes CD44 and exosomes CD9.

The aim of the study was to evaluate the clinical, morphological and immunohistochemical changes of different types of oral leukoplakia simultaneously with saliva test indicators to determine early signs of malignant transformation oral leukoplakia.

The study included 50 oral leukoplakia patients and 2 comparative groups – 20 patients with oral squamous cell carcinoma and 20 persons with healthy oral mucosa. All patients underwent VELscope imaging, as well as determination of soluble CD44 and total protein in saliva. Morphological assessment was performed on healthy tissue, OL and squamous cell carcinoma tissue. CD44, CD9, ThPOK and p27 proteins were evaluated by the standard polymer-based visualisation En-vision method.

To evaluate the obtained results, statistical data analysis was performed using *GraphPadPrism 9.0* software for MacOS (*GraphPad Software*, San Diego, CA, USA). For all statistical tests, p values < 0.05 were considered significant. Results are presented as median with interquartile range.

We concluded that in our study group, OL was more often observed in men with an average age of 57 years. The mean OL size was 14 ± 3.7 mm and the most frequent localisation was the mucous membrane of the cheeks and the side of the tongue, 26 % of all OL cases had severe dysplasia.

VELscope fluorescent spectroscopy provided an opportunity to evaluate and determine the borders of the altered tissue in both OL and carcinoma cases, thereby clarifying the determination of the biopsy site and resection lines.

As the severity of the clinical form of oral leukoplakia increases, the increase in salivary total protein level in combination with a positive soluble CD44 test was detected and it indicates about early changes in the epithelial microenvironment.

Our study demonstrated the expression of the adhesion molecule CD44 in both hyperplastic and dysplastic areas of OL, as well as in carcinomas. The presence of CD44 antigen in the macrophages of the oral submucosa proved its participation of a hyaluronic receptor protein in epithelial-mesenchymal activities. The expression of CD9 glycoprotein in exosomes demonstrated the so-called transport proteins in the oral epithelium and helped to understand the transport of saliva and other fluids in the healthy mucosa and its pathological lesions.

p27 protein showed suppressor and oncogene features in non-homogeneous OL and oral squamous cell carcinoma, demonstrating the dual properties of this antigen with nuclear-to-cytoplasmic translocalisation of p27. The great variety of expression of ThPOK in oral leukoplakias and cancers determines that we cannot recommend this biomarker in the study of malignancy processes of oral leukoplakias.

Thick leukoplakia with severe dysplasia, translocation of CD44, CD9 and p27 proteins and elevated numbers of soluble CD44 and total protein in saliva characterize non-homogeneous oral leukoplakia as a high-risk potentially malignant formation in the oral cavity.

Keywords: oral leukoplakia, VELscope, SolCD44, CD44, CD9, ThPOK, p27 antigenes.

Satura rādītājs

Anotācija	3
Abstract	5
Darbā izmantotie saīsinājumi	9
Ievads	10
Darba mērķis.....	11
Darba uzdevumi.....	11
Darba hipotēze.....	12
Darba novitāte.....	12
Personīgais ieguldījums.....	12
Darba ētiskie aspekti.....	13
1. Literatūras apskats	14
1.1. Jēdziena “leikoplakija” rašanās vēsturiskais apskats	14
1.2. Mutes leikoplakiju epidemioloģiskais un klīniskais raksturojums	15
1.3. Mutes leikoplakiju morfoloģiskais raksturojums.....	17
1.4. Mutes dobuma plakanšūnu karcinomu klīniskais un morfoloģiskais raksturojums ...	19
1.5. Siekalu šķīstošā proteīna CD44 raksturojums	22
1.6. Imūnhistoķīmisko biomarkieru raksturojums veselos mutes dobuma audos, leikoplakijās un plakanšūnu karcinomās.....	24
1.6.1. Šūnas virsmas antigēna CD44 raksturojums	24
1.6.2. Šūnas virsmas glikoproteīna CD9 antigēna raksturojums	26
1.6.3. ThPOK antigēna raksturojums	28
1.6.4. p27 antigēna raksturojums.....	30
2. Materiāls un metodes.....	32
Darba izpildes vieta	32
Materiāli tehniskais nodrošinājums	32
2.1. Pētījuma grupu raksturojums	32
2.1.1. Pacientu pētījuma grupa ar mutes leikoplakiju.....	32
2.1.2. Mutes gļotādas plakanšūnu karcinomu salīdzinošā grupa.....	32
2.1.3. Neizmainītas mutes gļotādas salīdzinošā grupa	33
2.2. Pētījuma dizains	33
2.3. Pētījuma personu iekļaušanas un izslēgšanas kritēriji	33
2.4. Neizmainītu, leikoplakijas un karcinomas audu novērtēšana mutes gļotādā ar fluorescentās spektroskopijas <i>VELscope</i> iekārtu	34
2.5. Šķīstošā CD44 un kopējā proteīna noteikšana siekalās	35
2.6. Veselu mutes gļotādas audu, mutes leikoplakijas un plakanšūnu karcinomas morfoloģiskais novērtējums.....	36
2.7. Imūnhistoķīmiskā vizualizācija un izvērtēšana.....	37
2.8. Statistiskā datu analīze	38
3. Rezultāti.....	40
3.1. Mutes leikoplakiju klīniskais un morfoloģiskais raksturojums	40
3.2. Mutes plakanšūnu karcinomas klīniskais un morfoloģiskais raksturojums.....	45
3.3. <i>VELscope</i> vizualizācijas raksturojums pacientiem ar neizmainītu gļotādu, leikoplakiju un plakanšūnu karcinomu	45
3.3.1. Neizmainītas mutes dobuma gļotādas audi	45
3.3.2. Homogēnas un nehomogēnas leikoplakijas.....	46
3.3.3. Mutes gļotādas plakanšūnu karcinomas	47

3.4. Siekalu šķīstošā CD44 un totālā proteīna raksturojums pacientiem ar normālu gļotādu, leukoplakiju un plakanšūnu karcinomu un to salīdzinājums ar audu CD44 proteīna ekspresiju	48
3.4.1. Neizmainītas mutes dobuma gļotādas audi	48
3.4.2. Homogēnas un nehomogēnas leukoplakijas.....	48
3.4.3. Mutes gļotādas plakanšūnu karcinomas	52
3.5. Imūnhistoķīmiskais CD44 antigēna raksturojums mutes gļotādas audos.....	53
3.5.1. Neizmainītas mutes dobuma gļotādas audi	53
3.5.2. Homogēnas un nehomogēnas leukoplakijas.....	53
3.5.3. Mutes gļotādas plakanšūnu karcinomas	57
3.6. Imūnhistoķīmiskais CD9 antigēna raksturojums mutes gļotādas audos.....	61
3.6.1. Neizmainītas mutes gļotādas audi	61
3.6.2. Homogēnas un nehomogēnas leukoplakijas.....	61
3.6.3. Mutes gļotādas plakanšūnu karcinomas	62
3.7. Imūnhistoķīmiskais ThPOK antigēna raksturojums mutes gļotādas audos.....	65
3.7.1. Neizmainītas mutes gļotādas audi	65
3.7.2. Homogēnas un nehomogēnas leukoplakijas.....	65
3.7.3. Mutes gļotādas plakanšūnu karcinomas	67
3.8. Imūnhistoķīmiskais p27 antigēna raksturojums mutes gļotādas audos	68
3.8.1. Neizmainītas mutes gļotādas audi	68
3.8.2. Homogēnas un nehomogēnas leukoplakijas.....	68
3.8.3. Mutes gļotādas plakanšūnu karcinomas	71
Diskusija.....	74
Secinājumi.....	88
Priekšlikumi	89
Publikāciju un ziņojumu saraksts par promocijas darba tēmu	90
Literatūras un avotu saraksts	92
Pateicības.....	108
Pielikumi	109
1. pielikums	110
2. pielikums	111

Darbā izmantotie saīsinājumi

CDKN1B	Ciklīna atkarīgās kināzes inhibitors 1 B
CPV	Cilvēka papilomas vīruss
DNS	Dezoksironukleīnskābe
DOI	Invāzijas dziļums
EM	Ekstracelulāra matrice
EMT	Epiteliāli mezenhimāla transformācija
EUCAN	Eiropas Savienība un Kanāda
HPVOED	Ar CPV saistītā mutes epitēlija displāzija
G ₁	Šūnas cikla fāze
G1	Augsta diferenciacijas pakāpe
G2	Mērena diferenciacijas pakāpe
G3	Zema diferenciacijas pakāpe
KP	Kopējais proteīns
MDPK	Mutes dobuma gļotādas plakanšūnu karcinoma
ML	Mutes leukoplakija
MMC	Mutes medicīnas centrs
MPLS	Mutes potenciāli ļaundabīga slimība
NOS	Bez papildu precizējumiem
LT	Ļaundabīga transformācija
OBV	Olbaltumviela
PSKUS	Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca
PVO	Pasaules Veselības organizācija
RNS	Ribonukleīnskābe
SolCD44	Šķīstošais CD44

Ievads

Mutes dobuma gļotādas plakanšūnu karcinoma (MDPK) mēdz attīstīties uz mutes potenciāli ļaundabīgu slimību (MPLS; angļu val. – *OPMD*) fona, tām pieder leukoplakija, eritroplakija, submukozā fibroze un mutes dobuma *lichen ruber planus* erozīvās un atrofiskās formas (Renaud-Vilmer et al., 2017; Sundberg et al., 2019). Populācijā mutes leukoplakijas ir novērojamas apmēram 3,41 % līdz 11,74 % cilvēku (Zhang et al., 2023). Ziemeļeiropas valstīs, kā arī Latvijā (Miluna et al., 2022; Warnakulasuriya et al., 2021) pēdējos gados jaunieši arvien vairāk lieto bezdūmu tabaku, kas līdzās alkohola lietošanai, smēķēšanai un hroniskiem mutes gļotādas iekaisuma procesiem ir iespējamie priekšvēža veidojumu un mutes ļaundabīgu audzēju cēloņi (Leon et al., 2016). Mutes leukoplakijas (ML) loma plakanšūnu karcinomas attīstībā ir apspriesta literatūrā daudzus gadu desmitus (Garcia et al., 2019; Roye et al., 1996; Wang et al., 2009). Ir bijuši mēģinājumi pierādīt citus riska faktoros mutes leukoplakijas ļaundabīgai transformācijai par karcinomu, piemēram, mēles vai mutes pamatnes lokalizācijas leukoplakijas, kuru izmērs ir lielāks par 2 cm, un tās ir nehomogēna tipa ML (Assimakopoulos et al., 2002; Speight et al., 2018).

Mutes leukoplakija tiek raksturota kā visbiežāk sastopamais mutes potenciāli ļaundabīgais veidojums (Iocca et al., 2020), kurš dažādās pasaules valstīs mutes plakanšūnu karcinomā pārvēršas no 1 līdz 12 % gadījumu (Narayan et al., 2016; Warnakulasuriya, 2018), lai gan ir pētījumi Austrumu puslodē, kuros tiek minēti lielāki transformācijas skaitļi – līdz pat 34 % (Ganesh et al., 2018; Saldivia-Siracusa et al., 2021). Taču jāuzsver, ka ne visas leukoplakijas pārvēršas ļaundabīgos audzējos (Iocca et al., 2020; Kuribayashi et al., 2015). Ļaundabīgā transformācijas riska “zelta standarts” ietver epitēlija displāzijas novērtēšanu (van der Waal, 2009). No 1978. līdz 2017. gadam mutes epiteliālās displāzijas histopatoloģiskā klasifikācija tika pārskatīta vairākas reizes, un 2017. gadā Pasaules Veselības organizācija (PVO) apstiprināja trīs displāzijas pakāpes: vieglu, vidēju un smagu, kas tika apvienota ar *cancer in situ* (El-Naggar et al., 2017). Lai gan smagākas displāzijas pakāpes ir saistītas ar lielāku transformācijas risku karcinomā, arī vieglas displāzijas gadījumi var progresēt ļaundabīgā epiteliālā audzējā (Arnaoutakis et al., 2013), savukārt daļa smagu displāziju nepārveidojas par karcinomu neatkarīgi no ārējās vides faktoriem (Nankivell et al., 2013). Taču 2023. gadā tika vēlreiz pārskatīta mutes epiteliālās displāzijas histopatoloģiskā klasifikācija, kurā izdalītas divas pakāpes – viegla un smaga (WHO, 2024).

Vairāki pētījumi liecina, ka mutes leukoplakija pārveidojas par plakanšūnu karcinomu aptuveni 55–57 mēnešu laikā (Bukovszky et al., 2023; Cerqueira et al., 2021), tādēļ to izpēte ir ļoti svarīga. Jāuzsver, ka 4 % no visiem onkoloģiskajiem nāves gadījumiem ir sakarā ar mutes, rīkles un balsenes karcinomu. Tas ir astotais biežākais karcinomas izraisītais nāves cēlonis

pasaulē. Baltijas valstīs mutes dobuma plakanšūnu karcinomas piecu gadu izdzīvotība svārstās no 19,74 % Igaunijā līdz 37,98 % Latvijā (Anonymous, 2020).

No normālās histoloģijas viedokļa, svarīgi akcentēt, ka epitēlija šūnu migrācijas ātrumi mutes dobumā ir dažādi: tā cilmes šūnas vaiga gļotādas virsmu sasniedz 25 dienās, smaganās – 50 dienās, savukārt savienojuma zonās ātri – 5–6 dienās (Nanci, 2017). Tādējādi ar biopsijas palīdzību tiek fiksēts tikai viens brīdis sarežģītajā gļotādas reģenerācijas, hiperplāzijas, displāzijas un malignizācijas procesā.

Dzīvnieku modeļi ne vienmēr ir pieņemami, lai izprastu šo ilgstošo un sarežģīto transformāciju no leukoplakijas līdz invazīvai karcinomai (Herold-Mende et al., 1996; Wielenga et al., 1993). Ļaundabīgas neoplāzijas veidošanās procesam neapšaubāmi ir multipli smalki mehānismi gēnu, molekulu un pat nanodaļiņu līmenī (Zlotogorski-Hurvitz et al., 2015). Ir nepieciešami kombinēti imūnhistoķīmiski, elektronmikroskopiski, ģenētiski un imunoloģiski pētījumi sarežģīto malignizācijas mehānismu izpratnei mutes gļotādā. Jāatzīmē, ka turpinās intensīvi mēģinājumi atrast noteiktus prognostiskos biomarkierus, kas varētu norādīt uz mutes leukoplakijas agrīnu ļaundabīgu transformāciju. Mutes gļotādas epitēlija citoplazmatisko un kodolu antigēnu noteikšana leukoplakijas audos ļauj ielūkoties tās iespējamās ļaundabīgas transformācijas molekulāros mehānismos. Svarīgi ML pētniecībā ir kombinēta epitēlija cikla regulatora p27 un transkripcijas proteīna ThPOK, kā arī audzēju cilmes šūnu CD44 un eksosomu CD9 antigēnu analīze. Jo komplekss, nevis izolēts, šo proteīnu imūnhistoķīmiskais raksturojums literatūrā irniecīgs, sadrumstalots un pretrunīgs.

Darba mērķis

Noteikt agrīnas mutes leukoplakijas malignizācijas pazīmes, izvērtējot dažādu veidu mutes dobuma leukoplakiju klīniskās, morfoloģiskās un imūnhistoķīmiskās pārmaiņas vienlaikus ar siekalu testa rādītājiem.

Darba uzdevumi

Promocijas darba mērķa sasniegšanai izvirzīti šādi uzdevumi:

1. Apkopot mutes leukoplakiju pacientu epidemioloģiskos, klīniski laboratoriskos un morfoloģiskos datus un veikt to novērtējumu.
2. Analizēt *VELscope* fluorescentās spektroskopijas iegūtos datus un to nozīmi patoloģiski izmainīto mutes dobuma audu robežu un biopsijas vietas noteikšanā.
3. Noteikt un novērtēt šķīstošā CD44 un kopējā proteīna ekspresijas datus siekalās personām ar neizmainītu gļotādu, dažādām mutes gļotādas leukoplakijas formām un plakanšūnu karcinomu.

4. Analizēt šūnu membrānu CD44 un CD9 antigēnu imūnhistoķīmisko ekspresijas biežumu, veidu un lokalizāciju mutes leikoplakijās salīdzinājumā ar veseliem gļotādas audiem un plakanšūnu karcinomām.
5. Noteikt un izvērtēt šūnu kodolu imūnhistoķīmisko marķieru ThPOK un p27 ekspresijas biežumu, veidu un lokalizāciju mutes leikoplakijās salīdzinājumā ar veseliem gļotādas audiem un plakanšūnu karcinomām.
6. Izvirzīt informatīvākos mutes gļotādas leikoplakiju potenciālos malignizācijas kritērijus.

Darba hipotēze

1. SolCD44 ekspresija siekalās uzrāda CD44 proteīna paaugstinātu klātbūtni nehomogēnu leikoplakiju pacientu siekalās ar potenciāli agrīnām malignizācijas pazīmēm.
2. Mutes gļotādas epitēlija membrānu (CD44, CD9) un kodolu (p27, ThPOK) antigēnu lokalizācijas izmaiņas šūnā liecina par agrīnu ļaundabīgu pārmaiņu sākšanos leikoplakiju audos.

Darba novitāte

Šajā pētījumā pirmo reizi Latvijā un Baltijā tika izvērtēta siekalu šķīstošā CD44 un kopējā proteīna ekspresija pacientiem ar mutes leikoplakiju un salīdzināts ar CD44 ekspresiju leikoplakijas audos. Agrīnu mutes leikoplakiju malignizācijas kritēriju izstrāde ir svarīga pasaules zinātnes līmenī, jo joprojām tiek meklētas šīs pazīmes diagnostikas un ārstēšanas uzlabošanai, kā arī slimības prognozes izvērtēšanai. Siekalu šķīstošā CD44 tests ir ērti un vienkārši lietojams eksprestests zobārstniecības praksē malignitātes riska noteikšanai mutes dobumā.

Reģionālā aspektā pirmo reizi tika analizēts mutes plakanā epitēlija šūnu membrānu un kodolu biomarķieru kopums homogēnās un nehomogēnās leikoplakijās, meklējot analogas izmaiņas ar mutes gļotādas karcinomām, lai izvērtētu to prognostisko nozīmi kancerogēnēzē.

Personīgais ieguldījums

Promocijas darba autore veica pētījuma procesa plānošanu, literatūras apkopojumu un tās analīzi, pacientu klīnisko datu apstrādi. Tāpat tika izvērtēts *OncAlert* siekalu tests un slimnieku mutes dobuma gļotādas stāvoklis. Fotoattēlu uzņemšana notika ar *VELscope* ierīci. Promocijas darba autore veica imūnhistoķīmisko marķieru izvēli, pamatojoties uz literatūras datiem par mutes gļotādas leikoplakijām un plakanšūnu karcinomām, kā arī analizēja imūnhistoķīmisko reakciju rezultātus mikroaparātos. Sadarbojoties ar RSU Statistikas mācību laboratoriju, darba autore veica statistisko datu apstrādi.

Darba ētiskie aspekti

Pētījums veikts saskaņā ar Helsinku deklarāciju un Rīgas Stradiņa universitātes Ētikas komitejas atļauju Nr. 3 / 18.08.2016. Visi pacienti tika iepazīstināti ar pētījuma norisi, un viņi parakstīja informētās piekrišanas veidlapu. Ikkatrs pētījuma posms tika veikts atbilstoši ētikas principiem.

1. Literatūras apskats

1.1. Jēdziena “leikoplakija” rašanās vēsturiskais apskats

Termins *leukoplakia* ir atvasināts no grieķu valodas vārdiem λευκός un πλάξ, kas nozīmē “balts plankums”. Pirmo reizi balts plankums mutes dobumā tika minēts Pedžeta (*Paget*) pētījumā (1860), kurā norādīta balta keratotiska mutes bojājuma saistība ar mēles karcinomu. Vārdu *leukoplakia* pirmo reizi minēja 1861. gadā Karls Freiherr (*Karl Freiherr*), lai aprakstītu urīnceļu baltos plankumus. 1877. gadā dermatologs Ernsts Švimmers (*Ernst Schwimmer*) pirmo reizi klīniski aprakstīja baltu mutes dobuma gļotādas plankumu. Vēlāk 1885. gadā Butlins baltus plankumus saistīja ar smēķēšanu un uzskatīja, ka ir agrīna stadija agresīvākam mazliet paceltam, baltam veidojumam, kuru nosauca par leikomu (Mohammed et al., 2023; Tanaka et al., 2011). Mutes leikoplakijas termins sāka parādīties literatūras klīniskos apskatos, sākot ar 1969. gadu (Sugár et al., 1969). 1978. gadā Kramers aprakstīja baltu, paceltu bojājumu, kas ir cieši piesaistīts mutes gļotādai (Kramer et al., 1978).

Mutes leikoplakijas definīcija ir vairākas reizes pārskatīta un papildināta (Axéll et al., 1996). 2007. gadā Apvienotajā Karalistē notika Pasaules Veselības organizācijas (PVO) Mutes gļotādas karcinomas un priekšvēža sadarbības centra organizēts un koordinēts seminārs. Tajā pārskatīja mutes priekšvēža un karcinomas pastāvošās definīcijas, terminoloģiju, klasifikāciju un pieejamos molekulāros marķierus. Ekspertiem bija vienots viedoklis, ka apzīmējums “leikoplakija” jālieto pēc citu balto veidojumu izslēgšanas, piemēram, leikoedēma, baltais spongiozais *nevus* u. c., kuri nav ar malignizācijas risku. Semināra noslēgumā tika ierosināts apzīmējums “potenciāli ļaundabīgi veidojumi”, kas norāda uz to, ka ne visas ML transformēsies karcinomā.

Ir zināmi vairāki potenciāli ļaundabīgi veidojumi, kuri ir ar paaugstinātu ļaundabīga audzēja attīstības risku: eritroleikoplakija, eritroplakija, mutes submukozā fibroze, *lichen planus*, *lupus erythematosus*, aukslēju bojājumi reversiem smēķētājiem un iedzimtas patoloģijas – *dyskeratosis congenita* un *epidermolysis bullosa* (Warnakulasuriya, 2018).

2012. gadā van der Vāls (*van der Wahl*) piedāvāja jaunu definīciju: “Pārsvarā baltas krāsas bojājums vai plankums, ar diskutablu gaitu, pēc klīniski un histopatoloģiski jebkuras citas noteikta baltas krāsas bojājuma vai slimības izslēgšanas.” (Brouns et al., 2013) Taču PVO šo definīciju vēl nav apstiprinājusi. Pašreiz ir akceptēta PVO definīcija: “Balts plankums ar pieaugošu diskutablu mutes karcinomas attīstības risku, izslēdzot visas citas zināmās slimības un traucējumus, kas risku nepalielina.” (Mohammed & Fairozekhan, 2023)

1.2. Mutes leikoplakiju epidemioloģiskais un klīniskais raksturojums

Stefano Peti (*Stefano Petti*) 2003. gadā veica metaanalīzi, apkopojot 23 pētījumus, kuri realizēti 1986.–2002. gadā, un konstatēja, ka vispārējā populācijā mutes leikoplakija ir konstatēta 1,7–2,7 %, neatrodot ģeogrāfiskas atšķirības (Petti, 2003). Savukārt Elizabete Brauna (*Elizabeth Brouns*) ar līdzautoriem konstatēja, ka no 16 % līdz 62 % plakanšūnu karcinomu veidojas uz mutes leikoplakiju fona (Brouns et al., 2013). Eiropas valstīs un ASV mutes leikoplakija pārtop par mutes plakanšūnu karcinomu retāk nekā pasaules austrumu daļā (Alsalem, 2019; Narayan & Shilpashree, 2016; Speight et al., 2018; Zhang et al., 2023).

Citā sistemātiskā literatūras pārskatā, kurā apkopoti pētījumi par 2015.–2020. gadu, tika novērtēti riska faktori, kas saistīti ar mutes leikoplakijas ļaundabīgu transformāciju. Dažādās zinātniskajās publikācijās ML ļaundabīga transformācija svārstās no 0,13 % līdz 40,8 % (Aguirre-Urizar et al., 2021) ar ikgadēju progresu 1–3 % (Aguirre-Urizar et al., 2021; Arduino et al., 2013).

Metaanalīze un sistemātiskais pārskats atspoguļo faktu, ka leikoplakijas ļaundabīgās transformācijas ātrums ir klīniski nozīmīgs, jo 9,5 % bojājumu attīstījās par karcinomu ar ikgadējo transformācijas ātrumu 1,56 % (Iocca et al., 2020; Zhang et al., 2023).

Mutes leikoplakija agrīnā stadijā var būt bez simptomiem, ar labdabīgu klīnisku ainu, bet nereti to ir grūti atšķirt no citiem mutes dobuma baltas nokrāsas procesiem. Leikoplakiju konstatē 2× biežāk vīriešiem pēc 40 gadu vecuma, pārsvarā 50–70 gadu vecumā, bet ar vidējo vecumu 60 gadi, un 6× biežāk smēķētājiem, nekā nesmēķētājiem (Neville et al., 2002). Izplatītākie riska faktori ir tabaka, alkohols, beteles riekstu košļāšana, arekas rieksti, bet pēdējos gadus riska faktoru vidū ir iekļauts arī cilvēka papilomas vīruss (Martorell-Calatayud et al., 2009). Kopš 1982. gada zobu pastās un mutes skalojamos līdzekļos sāka pievienot vielu *Sanguinaria*, kuru ieguva no ārstnieciska augs "asins sakne". Tomēr pētījumi atklāja, ka, lietojot mutes skalojumu ilgāk par sešiem mēnešiem, mutes vestibulārajā zonā var attīstīties leikoplakija (Nureddin, 2018), taču jāuzsver, ka ne vienmēr leikoplakijām ir zināma to etioloģija.

Rietumu populācijā leikoplakija visbiežāk lokalizējas mēles sānu virsmā un mutes pamatnē, bet Āzijas populācijā biežāk skar vaiga gļotādu un vestibulāro rajonu. Japānas populācijā leikoplakija skar smaganu rajonu (Nagao et al., 2016).

Klīniski nosaka divus galvenos mutes leikoplakijas veidus – homogēno un nehomogēno (PVO, 1978). Tās atšķiras pēc veidojuma krāsas un morfoloģiskām īpatnībām, pēc biezuma un faktūras.

Homogēna leukoplakija ir plāns, vienmērīgs, plakans baltas krāsas plankums, kas parasti ir asimptomātisks. Tā var būt bieza un ar seklām rievām. Homogēnai leukoplakijai ir mazāka varbūtība transformēties ļaundabīgā audzējā (Abati et al., 2020; Neville & Day, 2002).

Klīniski izšķir 3 nehomogēnas leukoplakijas:

- 1) verukoza – uz virsmas redz kārpveida izaugumus, var būt mazliet pacelta un ar gofrētu izskatu;
- 2) nodulāra – uz gļotādas virsmas nelieli polipoīdi izaugumi;
- 3) eritroleukoplakija – jaukti sarkani un balti neviendabīgi plankumi, dominējot baltas krāsas apvidiem. Iepriekšējā klasifikācijā šo formu apzīmēja kā “erozīva leukoplakija” (Warnakulasuriya et al., 2007).

Nehomogēnas leukoplakijas ir ar robotām, neregulārām malām, tām ir lielāka varbūtība transformēties ļaundabīgā audzējā (Abati et al., 2020; Aguirre-Urizar et al., 2021). Pacientiem ar nehomogēnu leukoplakiju ir sūdzības par jutīgumu uz pieskārieniem, karstiem un pikantiem ēdieniem, par diskomforta un tirpšanas sajūtu skartajā mutes dobuma rajonā (Warnakulasuriya et al., 2007). Sarkanās krāsas bojājumi norāda uz atrofiskām pārmaiņām gļotādā vai eroziju. Salīdzinot ar homogēnu leukoplakiju un eritroplakiju, eritroleukoplakijai var būt neregulāras malas, un subjektīvi pacients sūdzas par sāpīgumu un jutīgumu, tāpēc jāizslēdz arī *Candida albicans* hifu klātbūtne patoloģiski izmainītos audos (Suter et al., 2008).

Atsevišķi izdala proliferatīvo verukozo leukoplakiju. Pirmo reizi šo formu aprakstīja Hansens (*Hansen*) 1985. gadā. Tā ir sastopama samērā reti, bet tās izpausme ir plaša, ietverot vairākas mutes dobuma daļas, ar augstu varbūtību var pārvērsties ļaundabīgā audzējā. Klīniski novēro nelīdzenu virsmu ar izteikti eksofītiem izaugumiem. Patoloģiskas izmaiņas var būt plašas, ietverot smaganas, alveolārā izauguma, mēles un vaiga gļotādu. Sākumā tā sākas kā homogēna leukoplakija, pakāpeniski pārejot uz citiem mutes dobuma rajoniem. Process progresē lēni, ar lielu recidivēšanas risku pēc ārstēšanas (Bagan & Scully & et al., 2010).

Cerero-Lapiedra et al. (*Cerero-Lapiedra* et al., 2010) aprakstīja proliferatīvas verukozas leukoplakijas pazīmes:

1. Gļotādas izmaiņas ar leukoplakiju skar vairāk nekā divas mutes dobuma lokalizācijas, visbiežāk smaganas, alveolārā izauguma un aukslēju gļotādu.
2. Novēro verukozu zonu.
3. Slimības attīstības laikā atsevišķie bojājumi saplūduši savā starpā.
4. Iepriekš ārstētos rajonos notiek recidīvi.

ASV ekspertu grupa diagnosticēja multifokālus bojājumus bez verukoza izskata. Līdz ar to ne vienmēr novēro verukozu izskatu, īpaši slimības sākuma posmā (Villa et al., 2018).

Aguirre-Urizar ieteica citu terminu šādai klīniskai izpausmei – “proliferatīva multifokāla leukoplakija” (*Aguirre-Urizar*, 2011).

Proliferatīvai verukozai leukoplakijai ir neskaidra etioloģija. Ir veikti pētījumi, lai saistītu tās attīstību ar cilvēka papilomas vīrusa vai Epšteina – Barra vīrusa klātbūtni, bet pašlaik saistība ar tiem nav pierādīta. Epšteina – Barra vīruss konstatēts 60 % proliferatīvi verukozu leukoplakiju gadījumā un 40 % mutes dobuma karcinomu, bet nevienā normālas gļotādas gadījumā (*Bagan et al.*, 2008).

1.3. Mutes leukoplakiju morfoloģiskais raksturojums

Mutes leukoplakijas morfoloģiski raksturo divu veidu hiperkeratoze – ortokeratoze un parakeratoze – un epitēlija akantoze. Ap ML mēdz būt hroniska iekaisuma infiltrāti *lamina propria*, kā arī dažādas pakāpes displāzija, ko ir sevišķi svarīgi diagnosticēt laikus kā iespējamo priekšvēža stāvokli.

Termins “displāzija” radies Senajā Grieķijā: *Dys* nozīmē “slikta”, *plasis* – “veidošanās”. Zinātniski epiteliālo displāziju raksturo kā anomālu augšanu, kuru izraisa abnormāla vai atipiska epiteliāla proliferācija bojājumā ar traucētu diferenciāciju un nobriešanu (*Tilakaratne et al.*, 2019). Epiteliālās displāzijas konceptu mediķi zina vairāk nekā 60 gadu, norādot, ka mutes potenciāli ļaundabīgiem bojājumiem ir spēja progresēt mutes dobuma karcinomā. 1969. gadā ieviesa sistemātiskas klasifikācijas, izmantojot atsauces uz fotogrāfijām, taču vēlāk formulēja starptautiski saskaņotas klasifikācijas. Mutes potenciāli ļaundabīgus bojājumus var atpazīt klīniski, taču tie var būt arī bez displāzijas. Šī iemesla dēļ termins “potenciāli ļaundabīgs” tiek izmantots, lai aprakstītu klīniskās izmaiņas. Arī tad, ja displāzija ir konstatēta, tas norāda tikai uz ļaundabīgas transformācijas risku (*Nankivell et al.*, 2011; *Odell et al.*, 2021).

Klīniski mutes epiteliāla displāzija izpaužas kā balts plankums (leukoplakija), bet var būt arī kā sarkans apvidus (eritroplakija) vai kā nehomogēns veidojums – eritroleukoplakija (*Nankivell & Mehanna*, 2011; *Tilakaratne et al.*, 2019).

Displastisku veidojumu ļaundabīga transformācija joprojām ir nepilnīgi izprotama. Ir teorija, ka mutes karcinoma attīstās, pakāpeniski akumulējot molekulārās izmaiņas audzēja supresorgēnos un onkogēnos, izmainot genotipu un izraisot invāziju. To virza pakāpeniska mutāciju un hromosomālu traucējumu palielināšanās displāzijas bojājumos (*Nankivell & Mehanna*, 2011; *Odell et al.*, 2021).

Displāzijas atpazīšana mutes potenciāli ļaundabīgos veidojumos sākotnēji bija atkarīga no citoloģiskās atipijas individuālo pazīmju noteikšanas. Arvien biežāk arhitektūras izmaiņas tiek pieņemtas kā displāzijas pazīmes, norādot uz to, ka ļaundabīgas transformācijas var rasties

arī ar minimālām vai pat bez citoloģiskām anomālijām (Nankivell & Mehanna, 2011; Odell et al., 2021) (skat. 1.1. tabulu).

1.1. tabula

Mutes epiteliālas displāzijas arhitektūras un citoloģiskās pazīmes

Arhitektūras iezīmes	Citoloģiskās iezīmes
1. Neregulāra epitēlija slāņošanās	1. Abnormālas kodola izmēra izmaiņas
2. Bazālo šūnu polaritātes zudums	2. Nenormālas kodola formas izmaiņas
3. Epitēlija tapiņas, kas ieņem pilienvēda formu	3. Nenormālas šūnu izmēra izmaiņas
4. Palielināts mitožu skaits	4. Nenormālas šūnu formas izmaiņas
5. Abnormālas superficiālas mitozes	5. Palielināta kodola-citoplazmas attiecība
6. Pāragra keratinizācija	6. Atipiskas mitozes
7. Keratīna pērles	7. Palielināts kodoliņu skaits un izmērs
8. Epitēliālu šūnu kohēzijas zudums	8. Hiperhromatisms

* Modificēts pēc 2017. gada PVO klasifikācijas.

Histoloģiskās pazīmes (1.1. tabula) atsevišķi ir relatīvi nespecifiskas un gandrīz visas var novērot dažādu slimību procesos. Vairāku pazīmju kopums norāda uz epitēlija displāziju. Hiperplāzijas termins ir izņemts no iezīmju saraksta, jo process ir reaktīvs un atgriezenisks. 2017. gadā izmainīja klasifikāciju un izdalīja trīs displāzijas pakāpes, izņemot hiperplāziju, kā arī apvienoja smagu displāziju ar *Carcinoma in situ* (Odell et al., 2021; Tilakaratne et al., 2019).

Jo smagāka displāzija, jo lielāks ļaundabīgas transformācijas risks. *Carcinoma in situ* tika pielīdzināta smagai displāzijai, jo dažreiz tā ir grūti diferencējama. 2023. gada klasifikācijā izdalīja tikai divas displāzijas pakāpes – vieglas pakāpes displāziju un smagas pakāpes displāziju (WHO, 2024). No 2023. gada klasifikācijas tiek izdalītas arī CPV saistītās displāzijas un CPV nesaistītās displāzijas (WHO, 2024). “Zelta standarts” ļaundabīgo transformāciju riska noteikšanai ietver epitēlija displāzijas novērtēšanu (van der Waal, 2009), tomēr bijuši intensīvi mēģinājumi atrast marķierus, kas varētu norādīt uz mutes leukoplakijas agrīnu ļaundabīgu transformāciju un prognozētu šo risku pacientiem, kuriem diagnosticēta mutes leukoplakija (Kitahara et al., 2021; Liu et al., 2021; Monteiro et al., 2020; Nasser et al., 2011; Pitiyage et al., 2009).

Lai displāzijas novērtētu detalizēti molekulārā līmenī un konstatētu agrīnas pazīmes, kas tālāk var progresēt ļaundabīgā audzējā, ir iespējams izmantot dažādus molekulārus marķierus: audzēja nomācējgēnu p53 un retinoblastomas proteīnu pRb, proliferācijas rādītāju Ki-67, ciklīnu D1, proliferējošo šūnu kodolu antigēnu PCNA. Arī dažādie šūnu pārragošanos un proliferāciju raksturojošie citokeratīni ir populāri marķieri, kas pierādījuši savu diagnostisko nozīmi (Nankivell & Mehanna, 2011). Antigēnu p53 un p26 ekspresijas zudums ir agrīnākie rādītāji ML malignizācijas procesā. Ir pierādīts, ka leukoplakijās, kurās nav noteikta displāzija, p53, Ki67, p16INK4a kombinēta ekspresijas maiņa ir viens no ļaundabīga audzēja

progresēšanas risku faktoriem (Nasser et al., 2011). Lai gan pēdējā desmitgadē ir noticis ievērojams progress molekulārajā bioloģijā, nav atrasts konkrēts marķieris, kas prognozētu mutes leikoplakijas ļaundabīgu transformāciju.

1.4. Mutes dobuma plakanšūnu karcinomu klīniskais un morfoloģiskais raksturojums

Cancer.net ziņojumi liecina, ka no mutes un orofaringeālām karcinomām pasaulē gadā mirst ap 476 125 cilvēku ar vidējo vecumu 64 gadi, bet 20 % pacientu ir jaunāki par 55 gadiem. Savukārt Latvijā gadā no mutes gļotādas karcinomas mirst 214 cilvēku (GLOBOCAN, 2020). Vidējais piecu gadu izdzīvotības rādītājs ir 49 %.

Baltijas valstīs mutes gļotādas plakanšūnu karcinoma joprojām tiek diagnosticēta slimības vēlīnās stadijās. Pamatojoties uz EUCAN Nacionālā reģistra datiem 2020. gadā, lielākā saslimstība ar mutes un rīkles karcinomu Ziemeļeiropas valstīs ir Dānijā – 910 (13,0), bet par Baltijas valstīm ir šādi dati: Lietuvā 273 (6,3); Igaunijā 109 (8,5) un Latvijā 267 (7,5). Mirstības ziņā augstākie rādītāji 2020. gadā bija Lietuvā – 217 (5,2), Latvijā – 136 (4,6) un Igaunijā 45 (3,2) (GLOBOCAN, 2020). Saslimstības biežumu nosaka atšķirīgie iedzīvotāju paradumi, dzīves ilgums un mutes higiēna.

Mutes dobuma karcinomas klīniskās pazīmes biežāk ir saistītas ar gļotādas krāsas un blīvuma izmaiņām, ar raksturīgo pietūkumu un čūlu. Pacientam mēdz būt svara zudums, grūtības sagremot vai norīt ēdienu, kā arī mēles notirpums, slikta elpa, balss aizsmakums un palielināti kakla limfmezgli. Vēlīnās slimības stadijās pacienti sūdzas par iradiējošām sāpēm (Bagan & Sarrion & et al., 2010; Kornevs, 2015).

Agrīna mutes karcinomas diagnosticēšana ne tikai uzlabotu terapijas ātrumu, bet arī samazinātu izmaksas gan par onkoloģiskā procesa, gan ar terapiju saistīto blakņu ārstēšanu. Mutes dobuma karcinomas biopsijas vai operācijas materiāla histopatoloģiskais izmeklējums ir galvenais diagnozes apstiprināšanas veids (Ulaganathan et al., 2017).

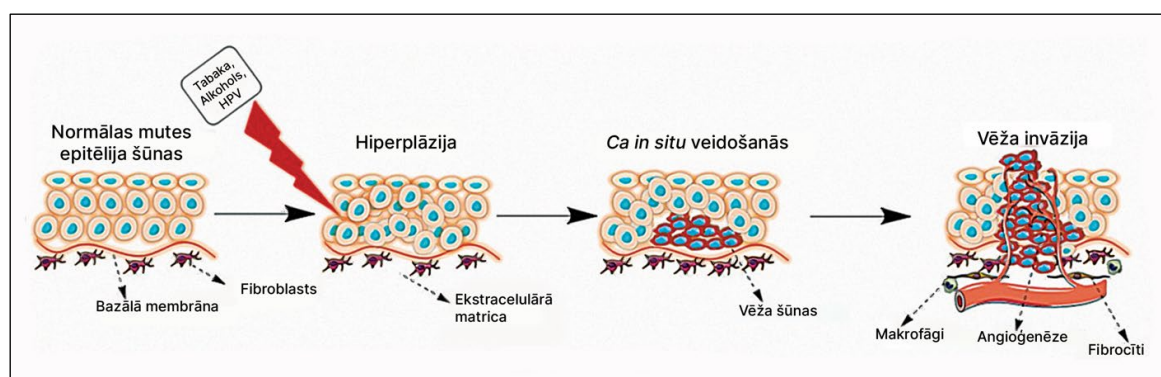
Sundermann et al. (2018) retrospektīvā 1501 mutes plakanšūnu karcinomas gadījuma pētījumā norāda, ka 71,5 % bija vīrieši, bet 28,5 % sievietes. Vidējais vecums bija 60 gadi. Visbiežākā lokalizācija bija mutes dobuma pamatne, bet augšžoklī visbiežāk tiek skartas aukslējas. Statistiskā analīze pierādīja nozīmīgu korelāciju starp personu jaunāku vecumu, sieviešu dzimumu un biežākiem karcinomas recidīviem augšžoklī un mēlē (Sundermann et al., 2018).

Svarīgi apzināties, ka smēķēšana un alkohols veicina gļotādas displāziju un ļaundabīgu šūnu attīstību. Citi iespējamie etioloģiskie faktori ir hronisks iekaisums un/vai kairinājums gļotādā, pēdējā laikā tiek uzsvērti arī košļājamā tabaka, elektronisko cigarešu lietošana un 16. tipa cilvēka papilomas vīrusa klātbūtne, kas var veicināt normālu gļotādas šūnu ļaundabīgu transformāciju (Kumar et al., 2016). MDPK var attīstīties arī agrīnā vecumā, ja ir ģenētiskas

izmaiņas genomā, kā rezultātā attīstās *Xeroderma pigmentosum*, *Fanconi anaemia*, *Dyskeratosis congenital*, kuras var malignizēties (Almangush et al., 2020).

Vairums pētnieku pierāda, ka recidīvu biežumu nosaka mutes karcinomas stadija pirmreizējā diagnosticēšanas reizē, bet izšķiroša nozīme ir karcinomas morfoloģijai – vai tā ir augsti diferencēta, mēreni vai zemu diferencēta mutes plakanšūnu karcinoma. Mutes karcinomas pārsvarā ir mēreni diferencētas. Recidīvi attīstās 50–60 % slimnieku ar vēlīnām mutes karcinomas stadijām un 25–30 % pacientu ar agrīnām tās stadijām (Blatt et al., 2022).

Vairāk nekā 90 % mutes dobuma karcinomu morfoloģiski attīstās no plakanā epitēlija šūnām, veidojot plakanšūnu karcinomu (Chamoli et al., 2021). Morfoloģiski MDPK progresēšana sākas ar epitēlija šūnu hiperplāziju, ar tālāku displāzijas attīstību un *Carcinoma in situ*. Audzējam progresējot, sākas invazīva augšana (1.1. attēls) (Chamoli et al., 2021).



1.1. attēls. **Karcinomas attīstības shematisks attēlojums**

Attēla autore Madara Dzudzilo, dati adaptēti no Chamoli et al., 2021

Mutes karcinomu makroskopiskais izskats var būt ļoti dažāds – kā ekzofīts, endofīts veidojums baltā vai sarkanā krāsā vai kā nedzīstoša čūla. Palielinātu, blīvu, fiksētu, nesāpīgu kakla limfmezglu klātieņi norāda uz onkoloģiskā procesa izplatību (N1). Svarīgi ir, ka ģimenes ārsti, zobārsti un citu specialitāšu mediķi spēj diagnosticēt potenciāli ļaundabīgos veidojumus mutes dobumā (Ota et al., 2021).

Audzēja diferenciācijas pakāpi nosaka, novērtējot morfoloģiskās īpašības: augsta diferenciācijas pakāpe (G1), kas ir ar labvēlīgāku prognozi; mērena diferenciācijas pakāpe (G2) un zema diferenciācijas pakāpe (G3), kas ir prognostiski nelabvēlīga (Glass et al., 2023). Nosakot diferenciācijas pakāpi, tiek izvērtēta mitotiskā aktivitāte, šūnu un kodolu pleomorfisms, invāzija asinsvados, limfvados, nervos un keratinizācijas pakāpe, kā arī apkārtējo audu reakcija (El-Naggar et al., 2017).

TNM (tumour, node, metastasis) sistēmas rezultātus lieto katram slimniekam, lai noteiktu karcinomas stadiju. Atkarībā no ārsta patologa diagnozes izšķir četras stadijas. Stadija 0 (nulle) tiek izmantota tikai ar CPV nesaistītu mutes dobuma karcinomu (Nosé et al., 2022).

T – Tumor – primārs audzējs:

T_x: primārais audzējs nav novērtējams;

T_{is}: *Carcinoma in situ*, audzējs ir virs bazālās membrānas;

T₁: audzēja lielums ir 2 cm vai mazāk. Audzēja invāzijas dziļums ir 5 mm vai mazāk;

T₂: audzēja lielums ir 2 cm vai mazāk, invāzijas dziļums ir vairāk nekā 5 mm. Vai arī audzēja lielums ir 2–4 cm, bet invāzijas dziļums – 10 mm vai mazāk;

T₃: audzēja lielums ir lielāks par 2 cm, bet ne lielāks par 4 cm, invāzijas dziļums ir lielāks par 10 mm. Vai arī audzēja lielums ir lielāks par 4 cm, bet invāzijas dziļums – 10 mm vai mazāk;

T₄: vidēji progresējoša vai ļoti progresējoša slimība;

T_{4a} (lūpa): audzējs ir sācies lūpā, bet ir ieaudzis kaulaudos un izplatījies mutes alveolārajā nervā mutes pamatnē vai sejas ādā;

T_{4b} (mutes dobums): audzējs ir infiltrējis muskuļaudus un kaulaudus, kas formē muti vai galvaskausa pamatni un/vai aptver iekšējās artērijas (El-Naggar et al., 2017).

N – Node – metastāzes reģionālajos limfmezglos:

N_x: reģionālie limfmezgli nav novērtējami;

N₀: metastāžu reģionālajos limfmezglos nav;

N₁: metastāzes vienā unilaterālā limfmezglā, 3 cm vai mazākas;

N_{2a}: metastāzes vienā unilaterālā limfmezglā, lielākas par 3 cm, bet mazākas par 6 cm;

N_{2b}: metastāzes vairākos unilaterālos limfmezglos, ne lielākas par 6 cm;

N_{2c}: metastāzes bilaterālos vai kontrlaterālos limfmezglos, ne lielākas par 6 cm;

N₃: metastāzes limfmezglā, lielākas par 6 cm (El-Naggar et al., 2017).

M – Metastasis – attālas metastāzes:

M_x: attālas metastāzes nav novērtējamas;

M₀: nav attālu metastāžu;

M₁: ir attālas metastāzes, piemēram, plaušās, aknās, CNS (centrālajā nervu sistēmā) (El-Naggar et al., 2017).

Klīniskās stadijas raksturo šādi kritēriji:

0 stadiju raksturo T_{is}, N₀, M₀;

I stadija – T₁, N₀, M₀;

II stadija – T₂, N₀, M₀;

III stadija – T₃, N₀, M₀ vai T₁, N₁, M₀, vai T₂, N₁, M₀, vai T₃, N₁, M₀;

IV A stadija – T_{4a}, N₀, M₀ vai T_{4a}, N₁, M₀, vai T₁, N₂, M₀, vai T₂, N₂, M₀, vai arī T₃, N₂, M₀ vai T_{4a}, N₂, M₀; IV B stadija raksturota ar jebkuru T, N₃, M₀ vai T_{4b} un jebkuru N, M₀. Savukārt IV C stadijas gadījumā ir jebkurš T lielums un jebkurš N, M₁.

Cilvēka papilomas vīrusa, īpaši CPV-16, infekcija ir pierādīta kā viena no galvas un kakla plakanšūnu karcinomu izraisītājām, bet lielākā CPV sakarība ir ar orofaringeālām plakanšūnu karcinomām (Chaturvedi et al., 2011; Gillison et al., 2015; Lerman et al., 2017). CPV ir cieši saistīts ar aukslēju mandeļu karcinomu, mēreni ar orofaringeālām karcinomām un vāji saistīts ar mutes dobuma plakanšūnu karcinomām (Hobbs et al., 2006). CPV pozitīvām galvas un kakla karcinomām piemīt noteiktas molekulāras iezīmes, piemēram, *wild type* p53 degradācija, nenotiek p53 gēna mutācija, samazināta pRb ekspresija un attiecīgi palielināta p16 ekspresija. Šīs molekulārās atšķirības var kalpot kā prognostiskie marķieri karcinomas ārstēšanā (Mallen-St Clair et al., 2016). Pētījumi pierādīja labāku prognozi ar CPV saistītām galvas un kakla karcinomām, nekā CPV negatīvās plakanšūnu karcinomās. CPV klātbūtne mutes dobuma vēžos ir 4–6 % (Katirachi et al., 2023).

Mutes karcinomu imūnhistoķīmiskie izmeklējumi tiek veikti nedaudz ilgāk par trim gadu desmitiem, taču tikai atsevišķi to onkoģenēzes posmi ir noskaidroti. Tādēļ svarīgs ir *PubMed* un *Cochrane* datu bāzes apskats par 43 zinātniskajām publikācijām posmā no 1992. līdz 2021. gadam. Autoru kolektīvs fiksēja piecas dažādas biomarķieru ekspresijas vietas arī mutes plakanšūnu karcinomas gadījumos: epitelija kodolos, citoplazmā, šūnu membrānās, ekstracelulārajā matricē un dažādu lokalizāciju kombinācijā. Četrdesmit sešu marķieru ekspresija tika analizēta, arī ņemot vērā mutes dobuma audu histoģenēzi: ektodermāla, endodermāla, mezodermāla un ar ekspresiju vairākos audos (Prabakaran et al., 2022).

Ja mutes karcinoma ir zemu diferencēta, diagnostiskos nolūkos jālieto šādas antivielas: AE1 / AE3, CK5/6, p63, p40 (Kaur et al., 2022; Pansini et al., 2021; Sinha et al., 2023). Savukārt zinātniskos nolūkos mutes plakanšūnu karcinomās ir analizēti gan tādi populārie marķieri kā p53, Ki 67 (Cema et al., 1998), CD31 un CD34, CD3 un CD20, CEA, gan mazāk pētītie Chk 2 (*checkpoint* kināze 2) (Cardoso et al., 2020), p16, EGFR un citi (Shahsavari et al., 2020; Sritippho et al., 2015; Takkem et al., 2018).

1.5. Siekalu šķīstošā proteīna CD44 raksturojums

Cilvēka siekalas tiek uzskatītas par vērtīgu olbaltumvielu (OBV) un ribonukleīnskābju (RNS) avotu. Deskvamētās audzēja šūnas var izdalīt siekalās OBV/RNS molekulas vai brīvās molekulas, kas atspoguļo gēnu ekspresijas izmaiņas, kas saistītas ar audzēja attīstību. Ņemot

vērā siekalu tuvumu bojājuma vietai, siekalu OBV nodrošina labu iespēju neinvazīvu testu izstrādei. Tests būtu noderīgs ne tikai audzēja atklāšanai, bet arī marķieru identificēšanai pacientiem ar riska ieradumiem un konstatētu priekšvēža veidojumu mutes dobumā (Sivadasan et al., 2020).

Jāatzīmē, ka līdzās audu biomarķieriem, siekalu biomarķieru, tostarp CD44 šķīstošās formas, izpēte ir kļuvusi par daudzsološu diagnostikas līdzekli. Ir pētījumi par tā izmantošanu mutes slimību gadījumos, īpaši siekalu dziedzeru slimību, hroniska periodontīta un *lichen ruber planus* gadījumos (Chaiyarit et al., 2008; Emich et al., 2015; Ghallab et al., 2010; Kaur et al., 2014), dažādu vispārēju slimību (Nunes et al., 2015), kā arī agrīnu (I vai II stadijas) mutes dobuma, orofaringeāla (Gualtero et al., 2016) un citu galvas un kakla audzēju veidu (Allegra et al., 2014; Franzmann et al., 2012; Gualtero & Suarez Castillo, 2016; Pereira et al., 2016; Trapasso et al., 2016) atklāšanā.

Šķīstošo CD44 (SolCD44) var noteikt arī serumā (Dasari et al., 2014; Sawant et al., 2018) un asarās (García-Posadas et al., 2012). Kā minēts iepriekš, ir veikti vairāki pētījumi par šķīstošā CD44 izmantošanu mutes plakanšūnu karcinomas diagnostikā, bet mazāk par SolCD44 līmeņa izmaiņām siekalās epitēlija displāzijas gadījumā, mutes potenciāli ļaundabīgu veidojumu, tostarp leukoplakijas, gadījumā. Daudzus pētījumus par šķīstošo CD44 siekalās kā agrīnas galvas un kakla plakanšūnu karcinomas noteikšanas rīku ir veikusi E. J. Francmane (*E. J. Franzmann*) ar līdzautoriem (Franzmann et al., 2007). 2007. gada pētījumā SolCD44 daudzums tika mērīts, izmantojot ELISA testu, un autori secināja, ka SolCD44 mutes dobuma skalojumos kombinācijā ar citiem marķieriem var kalpot kā noderīgs marķieris galvas un kakla plakanšūnu karcinomas agrīnai noteikšanai. Autori pierādīja, ka SolCD44 un kopējā proteīna kombinācija var uzlabot plakanšūnu karcinomas noteikšanas testa jutīgumu un specifiskumu, salīdzinot ar jebkuru marķieri atsevišķi. Rezultāti liecināja, ka ir pārliecinoši pierādījumi tam, ka šķīstošais CD44 un kopējais proteīns ir saistīti ar karcinomas risku neatkarīgi no tabakas vai alkohola lietošanas, vecuma un dzimuma (Pereira et al., 2016; Smith et al., 2021). E. J. Francmanes un M. Dž. Donovana (*M. J. Donovan*) pētījumā (Franzmann et al., 2018) tika aprakstīta jauna metode mutes dobuma un rīkles plakanšūnu karcinomas agrīnai noteikšanai, izmantojot vienkāršu un lētu testu (*OncAlert® Oral Cancer RAPID Test* un *OncAlert® Oral*). Autori norādīja, ka *OncAlert® Oral Cancer RAPID Test* (v2.0) ir ar 90 % (79–95 %) jutīgumu un ar 62 % (53–70 %) specifiskumu un ieteica to izmantot papildus klīniskai diagnostikai.

Savukārt kopējā proteīna sākotnējais avots siekalās ir atkarīgs no pacienta veselības stāvokļa un ārstēšanas veida (Al-Muhtaseb, 2014). Starp šiem avotiem ir plazmas noplūde siekalās un smaganu spraugas šķidrums aizplūšana (Yan et al., 2009). Ir zināmi divi transporta veidi, kā molekulas, kuras nav normālās siekalās, sekretējas no seruma uz siekalām.

Ir transcelulārais ceļš ar pasīvo difūziju, aktīvo transportu un paracelulārais ceļš (ultrafiltrācija) caur ciešiem savienojumiem (Haeckel et al., 1996). Tomēr joprojām nav zināms precīzs plazmas proteīnu noplūdes mehānisms un tas, vai siekalu sistēmā notiek selektīva specifisku plazmas proteīnu transportēšana. Vēl viens iemesls kopējā olbaltumvielu samazināšanās siekalās var būt saistīts ar transporta sistēmu, kurā transports ir atkarīgs no molekulas polaritātes un lādiņa. Līdz šim lielākā daļa identificēto biomarkķieru nav daļa no siekalu sastāvdaļām, bet ir mazas molekulmasas iekaisuma markķieri, kas iegūti no seruma un tiek transportēti siekalās. Kopējā proteīna samazināšanās siekalās var būt saistīta ar izdalīto cilvēka siekalu daudzumu un sastāvu, kas ir atkarīgs no konkrētiem faktoriem, tostarp plūsmas ātruma, diennakts ritma, siekalu dziedzera veida un lieluma, stimula ilguma un veida, diētas, zālēm, vecuma, dzimuma un fizioloģiskā stāvokļa (Schipper, 2007).

Siekalas izdala mutes gļotādas pieauss, submandibulārie, sublingvālie un siekalu dziedzeri. Rezultātā siekalas tiek sajauktas ar gļotām, neorganiskām vielām, glikoproteīniem, enzīmiem, sekretārajiem imūnglobulīniem, lizocīmiem un ne-siekalu izdalījumiem no smaganu spraugas šķidrums, deguna un bronhu sekrētiem, atslāņotām epitēlija šūnām, pārtikas sastāvdaļām un mikroorganismiem. Tas ietver arī olbaltumvielas, vairāk nekā 40 veidu, tostarp albumīnu un globulīnu (Castagnola et al., 2012; Jai Kumar et al., 2018; Sivadasan et al., 2020).

1.6. Imūnhistoķīmisko biomarkķieru raksturojums veselos mutes dobuma audos, leukoplakijās un plakanšūnu karcinomās

1.6.1. Šūnas virsmas antigēna CD44 raksturojums

Veselos mutes dobuma audos

Par CD44 antigēnu zinātnieki joprojām interesējas daudzu gadu garumā. Astoņdesmito gadu sākumā CD44 pirmo reizi tika identificēts kā glikoproteīns, kas ekspresējas cilvēka mezenhimālajās šūnās (Dalchau et al., 1980). Šobrīd ir zināms, ka CD44 ir daudzstrukturāls un daudzfunkcionāls šūnu virsmas glikoproteīns, kas iesaistīts šūnu savstarpējā mijiedarbībā, šūnu adhēzijā, šūnu proliferācijā, kā arī diferenciācijā un migrācijā (Pisterna et al., 2007; Thapa et al., 2016).

CD44 proteīnu kodē viens gēns hromosomā 11p13. Cilvēka gēns sastāv no 19 eksoniem, no kuriem 10 eksoni (1–5 un 15–19) ir iekļauti CD44 standarta formā, ko sauc par CD44s (Mack et al., 2008; Zheng et al., 2022).

CD44 ir hialuronskābes receptors, un tas var mijiedarboties ar citiem ligandiem, piemēram, osteopontīnu, kolagēniem un matricas metaloproteināzēm (MMP), no kurām MT1 un MT3-MMP proteolītiski šķeļ CD44 ekstracelulāro cilmes reģionu. Sašķeltais ekstracelulārais reģions tiek izdalīts starpšūnu telpā vai sekvestrēts ārpusšūnu matricā

(Thorne et al., 2004). Normālos audos CD44 izoformām ir nozīme hialuronskābes metabolisma regulēšanā, līdz ar to CD44 ekspresijas zudums izjauc hialuronskābes metabolismu un pasliktina brūču dzīšanu un keratinocītu proliferāciju (Hassn Mesrati et al., 2021). CD44 ir doti dažādi nosaukumi, kas raksturo tā bioķīmiskās īpašības: antiheparāna sulfāta proteoglikāns, antihialuronāta receptoru antivielas, hialuronskābes receptors, cilmes šūnu marķieris un antifagocītiskais glikoproteīns-1. CD44 antigēns ekspresējas plakanā epitēlija membrānā (Pisterna & Siragusa, 2007; Roye et al., 1996), limfocītos, plazmatiskajās šūnās un makrofāgos (Hassn Mesrati et al., 2021; Qadri et al., 2018; Zheng & Jiang, 2022), kā arī mazo siekalu dziedzeru izvados.

CD44 antigēna ekspresija leukoplakijā

CD44 antigēna klātie un nozīme mutes leukoplakijā joprojām ir pretrunīga. Daži pētnieki ir atklājuši palielinātu CD44 antigēna daudzumu mutes leukoplakijā (Godge et al., 2011), turpretim lielākā daļa ir diagnosticējuši samazinātu CD44 daudzumu, izmantojot tradicionālo imūnhistoķīmisko metodi ar imūnoperoksidāzi un manuāli aprēķinot ar CD44 iezīmēto šūnu skaitu. Citās publikācijās rezultāti ir balstīti uz *Western blot* datu analīzi un pat plūsmas citometriju (Chen et al., 2019; Miletti-González et al., 2012). Ir pētnieki, kuri norādījuši, ka CD44 un tā variantu izoformas v5 un v6 var kalpot kā marķieri augsta riska leukoplakiju noteikšanai (Godge & Poonja, 2011). 2009. gada *Martorell-Calatayud et al.* publikācijā ir salīdzināta CD44 ekspresija leukoplakijās ar displāziju un plakanšūnu karcinomu (Martorell-Calatayud et al., 2009). CD44 ir arī identificēts kā cilmes šūnu marķieris epitēlija displāzijā (Venkat Naga et al., 2019).

Pēdējos gados CD44 antigēns ir nosaukts par dažādu orgānu cilmes šūnu marķieri (Jakovlevs et al., 2019; Pettersen et al., 2011; Tamatani et al., 2018). Tomēr ir svarīgi uzsvērt, ka ir trīs veidu cilmes šūnas: embrionālās, pieauguša organisma un audzēja šūnas. Mutes leukoplakijās un karcinomās, iespējams, ir pieaugušo un audzēja cilmes šūnu varianti, ko tagad sauc arī par audzēju iniciējošām šūnām.

CD44 antigēna ekspresija mutes dobuma plakanšūnu karcinomās

Karcinomās nepārtraukti notiek šūnu proliferācija, migrācija un šūnu adhēzijas zudums, turklāt viena no molekulām, kas atspoguļo šos procesus, ir CD44 mainīgā ekspresija.

Lielākajā daļā pētījumu par CD44 lomu ļaundabīgu audzēju attīstībā ir pierādīta korelācija starp CD44 ekspresiju un mutes plakanšūnu karcinomas prognozi, tā pakāpi, izplatību un T stadiju (Chen & Wang, 2019; Dzwonek et al., 2015; Kaza et al., 2018; Senbanjo et al., 2017). Taču jāuzsver, ka vairumā pētījumu nav salīdzinājuma ar neizmainītu mutes gļotādu. Zinātnieki galvenokārt ir aprakstījuši samazinātu CD44 adhēzijas molekulu daudzumu

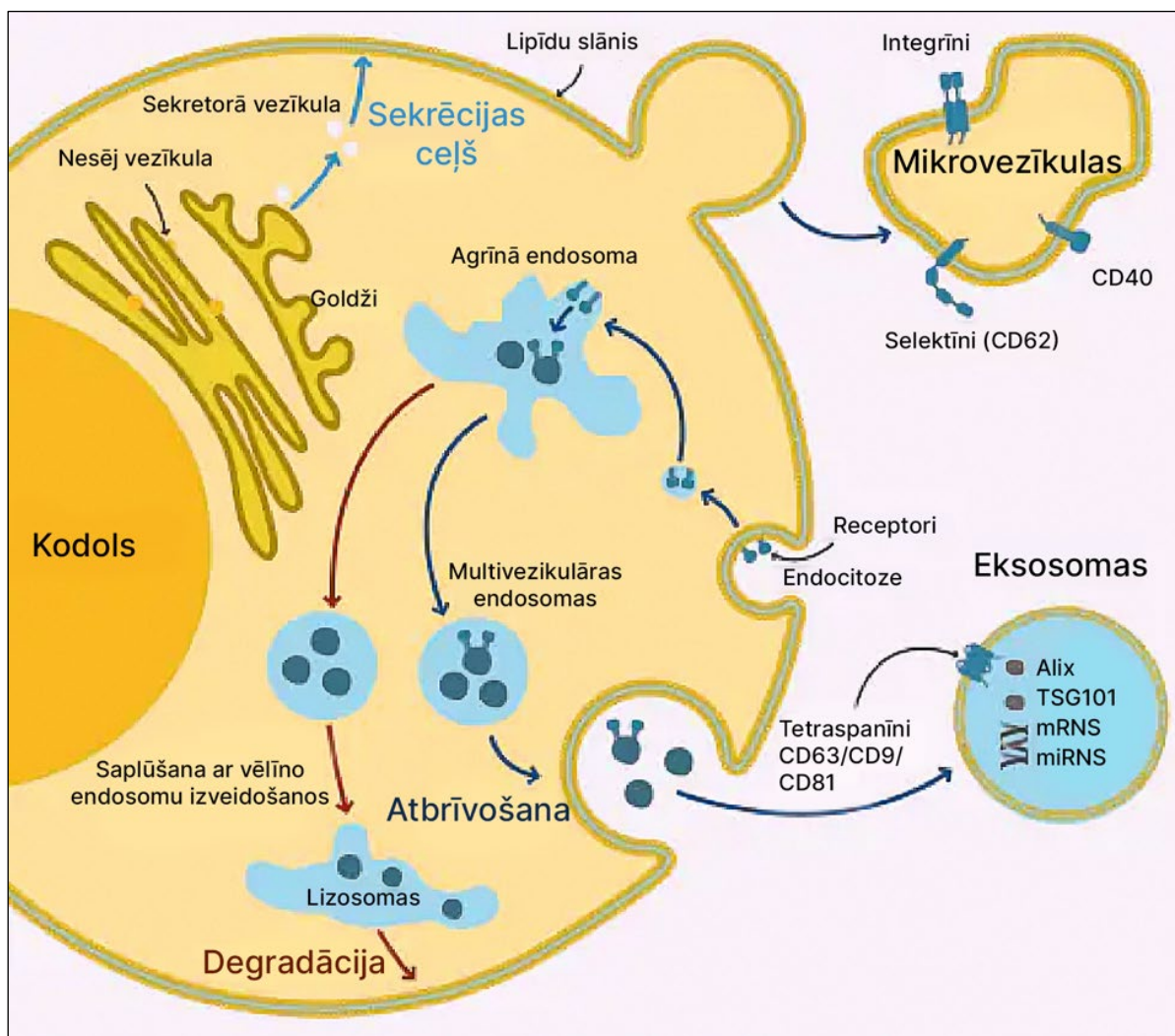
mates plakanšūnu karcinomas gadījumā, un tikai daži pētījumi ir parādījuši palielinātu šī antigēna daudzumu mates dobuma ļaundabīgos audzējos (Lindquist et al., 2012).

Skandalis (*Skandalis*) ar līdzautoriem (2019) konstatēja, ka galvenais CD44 ligands, hialuronāns, ir galvenā karcinomas cilmes šūnu sastāvdaļa, saglabājot karcinomas cilmes šūnu fenotipu. Ir analizēta dažādu CD44 izoformu funkcionālā nozīme kuņģa-zarnu trakta, prostatas, krūts un aizkuņģa dziedzera karcinomu (Skandalis et al., 2019), kā arī galvas un kakla plakanšūnu karcinomu gadījumā, norādot, ka CD44 un CD44v6 ekspresija ir nozīmīga audzēju progresēšanā (Wang et al., 2009). Tomēr ir arī pretrunīgi vērtēti pētījumi, kas apraksta CD44 un CD44v6 bagātīgo ekspresiju lielākajā daļā šūnu galvas un kakla orgānu karcinomās. Taču Mack et al. (2008) rezultāti liecina, ka CD44 un CD44v6 ekspresija neatšķirās normālā galvas un kakla orgānu epitēlijā no to labdabīgiem vai ļaundabīgiem audzējiem (Mack & Gires, 2008).

Zinātnieku grupas ir noskaidrojušas CD44 lomu leukocītu piesaistē iekaisuma vietās un mates ļaundabīgos audzējos (Groma et al., 2012). Šie pētījumi pierādīja arī CD44 nozīmi šo procesu ierobežošanā un atrisināšanā (Gore et al., 2008; Johnson et al., 2009). Ir atsevišķas publikācijas par anti-CD44 proteīna lietošanu eksperimentālajā un praktiskajā medicīnā brūču, iekaisumu un audzēju ārstēšanā (Negi et al., 2012; Reid et al., 2019). Arī audzēja cilmes šūnu modeļa analīze var palīdzēt izskaidrot audzēja šūnu daudzveidīgo uzvedību un veicināt mērķtiecīgu galvas un kakla orgānu plakanšūnu karcinomu ārstēšanas attīstību nākotnē (Chen & Wang, 2019).

1.6.2. Šūnas virsmas glikoproteīna CD9 antigēna raksturojums

CD9 proteīnu kodē gēns hromosomā 12 (12p13) ar molekulasmasu 27 kDa. Ar CD9 antivielu tiek pierādītas eksosomas, kas ir no šūnām iegūti endosomālas izcelsmes membrānas pūslīši, kurus izdala visu veidu šūnas un kuri var nonākt dažādos ķermeņa šķidrums, piemēram, plazmā, serumā, cilvēka pienā, urīnā un siekalās (Zlotogorski-Hurvitz et al., 2015). Interese par eksosomām ir saistīta ar to bioloģiskajām īpašībām, piemēram, starpšūnu saziņu un spēju apmainīties ar šūnu komponentiem, piemēram, ar olbaltumvielām, nukleīnskābēm un lipīdiem (Wang et al., 2016). CD9 antigēns pieder tetraspanīnu saimei, kurā ir 33 proteīni, kas ir iesaistīti vairākos bioloģiskos procesos, tostarp šūnu adhēzijā, migrācijā, membrānas saplūšanā, signalizācijā un proteīnu apritē, kā arī mijiedarbojas ar daudzām dažādām olbaltumvielām un savstarpēji (Andreu et al., 2014). Daudzas tetraspanīnu funkcijas ir neskaidras, un tikai daži proteīni no visas saimes ir pētīti pamatīgāk (Nankivell et al., 2013). Ekstracelulāro vezikulu intracelulārā biogēnēze un sekrēcija ir atspoguļota 1.2. attēlā.



1.2. attēls. **Intracelulārā biogēnēze un ekstracelulāro vezikulu sekrēcija**

Eksosomu veidošanās process sākas ar agrīni veidotām endosomām (ESE), ko realizē endocitoze uz plazmas membrānu virsmas. Pēc tam endosomas nobriest, lai radītu vēliņu endosomu (LSE)/multivezikulāru ķermeni (*MVB* – angļiski). Pēcāk eksosomas tiek atbrīvotas ekstracelulārajā telpā, saplūstot *MVB*. Eksosomas mijiedarbojas ar mērķšūnām: 1) izmantojot receptorus, saplūst ar plazmas membrānu; 2) endocitoze; 3) satura atbrīvošana. Attēls iegūts un modificēts no <https://www.abcam.com/primary-antibodies/extracellular-vesicles-an-introduction>

Veselos mutes dobuma audos

Izteiktu CD9 ekspresiju normālā gļotādā novēro plakanā epitēlija bazālo un spinozo šūnu slāņos (Kusukawa et al., 2001). Arī Buim ar līdzautoriem CD9 ekspresiju nosaka plakanā epitēlija *str. intermedium* un suprabazālo šūnu membrānās (Buim et al., 2010).

CD9 antigēna ekspresija leukoplakijā

Pēdējos gados ir augusi interese par ekstracelulārajām vezikulām, kas pētītas mutes leukoplakijās – gan to diagnostikā, gan klīniskās gaitas prognozēšanā (Peng et al., 2020). Tomēr literatūrā ir tikai daži pētījumi par CD9 ekspresiju mutes dobuma priekšvēža bojājumos un epitēlija displāzijās (Li et al., 2019; Nankivell et al., 2013). Ir sistemātiski pārskati (Yap et al.,

2020), kur tiek salīdzinātas ekstracelulārās vezikulas mutes potenciāli ļaundabīgos procesos un mutes gļotādas karcinomā.

Neatkarīgi no displāzijas pakāpes *Kusukawa et al.* pētījumā ML CD9 antigēna ekspresijas samazināšanos nenovēro (*Kusukawa et al.*, 2001).

CD9 antigēna ekspresija mutes dobuma plakanšūnu karcinomā

Tetraspanīni audzējos ir iesaistīti tādos šūnu procesos kā migrācija, signālu nodošanā starp šūnām, šūnu matricēs adhēzijā un proliferācijā. CD9 antigēna molekulas tiek uzskatītas par metastazēšanās procesu nomācējām (*Menck et al.*, 2020). Samazināta tetraspanīnu ekspresija ir identificēta daudzos karcinomu veidos. Pacientiem ar audzēju, kurā neekspresējas tetraspanīni, ir sliktāka prognoze un īsāka dzīvildze (*Nankivell et al.*, 2013). Eksperimentālos pētījumos tika pierādīts, ka CD9 antigēns inhibē šūnu kustīgumu un izraisa statistiski šūnu grupu veidošanos, tādējādi novēršot audzēja invāziju un metastāzes (*Li et al.*, 2019; *Peng et al.*, 2020; *Xiao et al.*, 2018; *Yap et al.*, 2020). Samazināta CD9 ekspresija korelē ar sliktu prognozi pacientiem ar pieauss siekalu dziedzera audzējiem, dzemdes karcinomu, urīnpūšļa, barības vada plakanšūnu karcinomām, kā arī plaušu un prostatas karcinomas gadījumos (*Nankivell et al.*, 2013; *Patel et al.*, 2022). Savukārt *Erović* ar kolēģiem (*Erović et al.*, 2003) pierādīja, ka palielināta CD9 antigēna ekspresija galvas un kakla orgānu plakanšūnu karcinomās asociējas ar retāku kakla limfmezglu metastāžu veidošanos un retākiem recidīviem. CD9 antigēna noteikšana karcinomas audos var būt kā palīglikdzeklis, lai paredzētu onkoloģiskas slimības progresēšanas risku (*Buim et al.*, 2010; *Zhong et al.*, 2019).

Klīniski svarīgi ir pētījumi par eksosomām siekalās pacientiem ar mutes plakanšūnu karcinomu, ko varētu izmantot kā skrīningtestu orālajā medicīnā un zobārstniecībā (*Sun et al.*, 2016; *Zhong et al.*, 2019). Šajos pētījumos pievērsta uzmanība ekstracelulāro vezikulu izdalīšanai no siekalām, kas ir sarežģīts process maza izmēra daļiņu un to zemā blīvuma dēļ.

1.6.3. ThPOK antigēna raksturojums

ThPOK atklāja Ņujorkas *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* ģenētiķis Pjērs Paolo Pandolfi ar kolēģiem, un pirmo reizi informācija par šo gēnu ir publicēta žurnāla *Nature* 2005. gada janvāra numurā (*Maeda et al.*, 2005). ThPOK ir eitroīdais mieloīdais onkogēnais faktors, kas pieder POK proteīnu saimei un ir transkripcijas regulētājs, atpazīstams kā *Zbtb7a* (cinka epitopi un btb domēnus saturošs proteīns 7a) un kā FBI-1 – faktors, kas saistās pie IST-1. ThPOK antigēns reaģē uz DNS bojājumu, piedalās šūnu embrionālajā attīstības procesā, kā arī kontrolē šūnas ciklu, tai skaitā šūnu proliferāciju un diferenciāciju (*Maeda et al.*, 2005; *Sartini et al.*, 2015; *Zu et al.*, 2011).

Veselos mutes dobuma audos

Pieejamā literatūrā ir tikai viena publikācija, kur pieminēta ThPOK antigēna ekspresija normālā mutes gļotādā. Sartini et al. (2015) noteica to, izmantojot piecu līmeņu vērtēšanas sistēmu: 0 (0–10 %), 1 (10–30 %), 2 (30–50 %), 3 (50–80 %), 4 (80–100 %) (Sartini et al., 2015). Starpkvartilu diapazons – 2–3. Autoru kolektīvs konstatēja lielāku proteīna ekspresiju neizmainītā gļotādā, salīdzinot ar tā ekspresiju mutes plakanšūnu karcinomā ($p = 0,0038$). Imūnhistoķīmijā lietoto antivielu kataloga informācija liecina, ka ThPOK antivielu vairāk piemērota zinātniskiem pētījumiem, nevis patoloģisko procesu diagnostikai (R&D systems, 2015).

ThPOK antigēna ekspresija leukoplakijā

Analizējot pieejamo *Pubmed* literatūru, netika atrasta neviena publikācija, kur pieminēta ThPOK antigēna ekspresija mutes leukoplakijā, izņemot tēzes, kur atspoguļots neliela gadījumu skaita pētījuma fragments ($n = 38$), kuru veica mūsu grupa 2019. gadā (Kleina et al., 2019). Mūsu pētījuma dati uzrādīja ThPOK ekspresiju epitēlijsūnu kodolos, to pozitivitāte variēja no 20 % līdz 87 %.

ThPOK antigēna ekspresija mutes karcinomā

ThPOK marķieris onkoloģijā ir pētīts vairāku karcinomu, limfomu un gliomu gadījumā (Jiang et al., 2019; Liu et al., 2017). Dažādos audos tas ir aprakstīts kā protoonkogēns un arī pretēji, kā onkosupresora faktors (Constantinou et al., 2019; Zu et al., 2011). ThPOK proteīni, kas savu funkciju neveic, izraisa šūnas attīstības traucējumus, kas ir pamats arī audzēju procesos. Pokemon vai ThPOK gēns ir vairāku gēnu transkripcijas regulētājs tiešā vai netiešā veidā. Viens no šādiem gēniem ir audzēja nomācējgēns ARF. Rezultātā ThPOK pārmērīga ekspresija nomāc ARF izdali un p53 degradāciju (Jiao et al., 2013; Zu et al., 2011). Kad ThPOK proteīns uzvedas kā protoonkogēns, tas nodrošina šūnu onkogēno aktivitāti. Šādi kontrolējot citu gēnu transkripciju, proteīns ir iesaistīts šūnas augšanas un proliferācijas kontrolē (Maeda et al., 2005; Zu et al., 2011).

Savukārt 2013. gadā ThPOK ekspresijas pētījums tika veikts nazofaringeālās karcinomās. Tika konstatēts, ka proteīna ekspresija bija ievērojami augstāka nediferencētā nepārragotā aizdegunes karcinomā, salīdzinot ar gļotādu hroniska rinīta gadījumā (Jiao et al., 2013).

Pašreiz, kā jau minēts iepriekš, ir zināms tikai viens pētījums par ThPOK imūnhistoķīmisko ekspresiju mutes gļotādas plakanšūnu karcinomā (Sartini et al., 2015). Iegūtie rezultāti ir pretēji ThPOK ekspresijas rezultātiem citās ļaundabīga audzēja lokalizācijās, jo normālos audos minētais proteīns bija vairāk ekspresēts, nekā mutes plakanšūnu karcinomas audos. ThPOK līmenis (audzējs/pret veseliem audiem) apgriezti korelēja ar karcinomas diferenciācijas pakāpi, un pētnieki norāda, ka ThPOK proteīna samazināšanos var izmantot kā

mutes plakanšūnu karcinomas prognostisko faktoru. Apgriezta korelācija tika konstatēta arī starp proteīnu ekspresijas daudzumu un audzēju izmēru, tādēļ tam varētu būt prognostiska nozīme agrīnā karcinomas attīstības fāzē (Sartini et al., 2015).

Samazināta *Zbtb7a* ekspresija korelē ar pastiprinātu glikolīzes gēnu darbību un sliktiem pacienta izdzīvotības rādītājiem. Tā kā pastiprināta glikolīze ir tipiska karcinomas metabolisma pazīme, tad *Zbtb7a*, iespējams, darbojas kā audzēja nomācējgēns. Ja *Zbtb7a* gēns tiek zaudēts vai tā darbība karcinomas audos izmainīta, tad ThPOK darbojas kā audzēja nomācējgēni (Liu et al., 2014).

1.6.4. p27 antigēna raksturojums

Ciklīna atkarīgās kināzes inhibitori 1B (CDKN1B) ir zināms kā p27, proteīns, kas piesaistās un nomāc ciklīna E/CDK2 vai ciklīna D/CDK4 kompleksu aktivāciju, regulējot šūnas cikla progresēšanu caur 'G₁' un 'S' fāzēm. p27 proteīna darbība izraisa šūnas cikla apstāšanos 'G₁' fāzē (Thambiah et al., 2018; Vallonthetaiel et al., 2016). Antigēna p27 gēns lokalizējas 12p13 hromosomā (Abbastabar et al., 2018). Tā kristāliskā struktūra satur 69 aminoskābes (Rath et al., 2016; Sgambato et al., 2000). Citas p27 funkcijas literatūrā ir aprakstītas kā šūnas diferenciāciju un apoptozi ietekmējošs faktors (Abbastabar et al., 2018). Uzska, ka šūnas diferenciācija tiek sasniegta šūnas augšanas apstāšanās laikā, ko ierosina ciklīna atkarīgās kināzes inhibitori, tādi kā p21 un p27 (Visioli et al., 2012). Ir pētījumi, kuros tiek novērota p27 pārslēgšanās funkcija – tas maina šūnas funkciju no proliferācijas uz diferenciāciju (Shiozawa et al., 2001).

Veselos mutes dobuma audos

Veselā gļotādā p27 proteīns atrodas vidējā un virspusējā slāņa snaudošo epitēlija šūnu kodolos (Queiroz et al., 2010). Citas zinātnieku grupas p27 antigēna ekspresiju konstatēja tikai normālas mutes gļotādas virspusējos slāņos, ko izskaidro ar plakanā epitēlija pilnīgu nobriešanu šajā zonā (Shintani et al., 2002).

p27 antigēna ekspresija leukoplakijā

Ir maz pētījumu par p27 proteīna ekspresiju dažādās mutes leukoplakijās ar precīzu to kodolu imūnopozitivitātes aprēķinu. *Kövesi* un *Szende* pētījumā tika novērtētas 1000 epiteliālas šūnas un p27 ekspresiju aprēķināja procentos (Kövesi et al., 2006). Savukārt *Thambiah* ar kolēģiem savā pētījumā p27 ekspresiju novērtēja, nosakot šūnu kodolu krāsojuma intensitāti epitēlija šūnu bazālajā, parabazālajā un suprabazālajā slānī (Thambiah et al., 2018).

Tā kā p27 antigēna loma joprojām ir neskaidra un pretrunīga, ir nepieciešams izanalizēt p27 proteīna ekspresiju dažādos mutes potenciāli ļaundabīgo veidojumu klīniskajos tipos – homogēnās un nehomogēnās mutes leukoplakijās.

p27 antigēna ekspresija mutes gļotādas karcinomā

Samazināta p27 proteīna ekspresija ir ziņota vairākos cilvēka audzējos – barības vada (Shibata et al., 2001); krūts (Alkarain et al., 2004); aizkuņģa dziedzera (Jeannot et al., 2015); dzemdes kaklā (Shiozawa et al., 2001) un citos. Ir pierādīts, ka CDKN1B (p27) ir samazināts 0,98 % galvas un kakla karcinomas pacientu gadījumu (AACR Project GENIE Consortium, 2017). Tas norāda, ka p27 proteīns var tikt izmantots kā prognostisks faktors plakanšūnu karcinomas gadījumā (Bencivenga et al., 2017).

Karcinogēnēzes gadījumā p27 antigēns var darboties divējādi: kodolā kā audzēja nomācējs un citoplazmā kā onkoproteīns (Abbastabar et al., 2018). p27, pārvietots citoplazmā, nespēj nodrošināt kodola funkciju kā ciklīna atkarīgās kināzes inhibitors un bremzē šūnu apoptozi (Abbastabar et al., 2018; Vallonthetaiel et al., 2016).

Pēdējo gadu pētījumos tiek norādīts uz atsevišķu kodola un citoplazmas p27 proteīna analīzes nepieciešamību ne tikai karcinomās, bet arī mutes dobuma vēzdraudes veidojumos (Teng et al., 2020; Vallonthetaiel et al., 2016).

Tā kā p27 antigēna loma joprojām nav līdz galam izpētīta, ir nepieciešams izanalizēt p27 proteīna ekspresiju potenciāli ļaundabīgos veidojumos, sevišķi nehomogēnās ML un agrīnās karcinomās.

2. Materiāls un metodes

Darba izpildes vieta

- 1) Rīgas Stradiņa universitātes Stomatoloģijas institūts, Mutes medicīnas centrs;
- 2) Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca (PSKUS), Mutes, sejas un žokļu ķirurģijas centrs;
- 3) Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca, Patoloģijas institūts.

Materiāli tehniskais nodrošinājums

Pētījuma veikšanai tika izmantots RSU Stomatoloģijas institūta Mutes medicīnas centra, PSKUS Mutes, sejas un žokļu ķirurģijas centra un Patoloģijas institūta materiāli tehniskie līdzekļi. Finansiālais atbalsts iegūts Rīgas Stradiņa universitātes doktorantūras studiju granta un projekta Nr. 8.2.2.0/I/004 "Atbalsts doktorantu iesaistei zinātniski pētnieciskajā un studiju darbā" ietvaros.

2.1. Pētījuma grupu raksturojums

2.1.1. Pacientu pētījuma grupa ar mutes leukoplakiju

Pētījumā iekļāvām 50 mutes leukoplakiju pacientu datus, kuri ambulatori konsultēti un ārstēti RSU Stomatoloģijas institūta Mutes medicīnas centrā, kā arī operēti PSKUS Mutes, sejas un žokļu ķirurģijas centra stacionārā no 2016. līdz 2022. gadam. Vispirms darba autore klīniski katram pacientam novērtēja leukoplakijas variantu – homogēna vai nehomogēna, tad noteica ML apakštipu – vienkārša (*simplex*), nodulāra (*nodular*), verukoza (*verrucous*) vai eritroleukoplakija (*erythroleukoplakia*). Analizēja mutes leukoplakiju lokalizāciju, izmērus, pacientu dzimumu un vecumu.

2.1.2. Mutes gļotādas plakanšūnu karcinomu salīdzinošā grupa

Pētījumā salīdzinošā grupā iekļāvām 20 pacientus ar mutes gļotādas plakanšūnu karcinomu, kuri konsultēti RSU Stomatoloģijas institūta Mutes medicīnas centrā no 2016. līdz 2022. gadam. Karcinomas tika analizētas atbilstoši PVO klasifikācijai, ņemot vērā *TNM* (*tumour, node, metastasis*) lielumus. Plakanšūnu karcinomas diferenciacijas pakāpes: *Grade 1* (G1, augsta diferenciacijas pakāpe), *Grade 2* (G2, mērena diferenciacijas pakāpe), *Grade 3* (G3, zema diferenciacijas pakāpe). Tika novērtētas plakanšūnu karcinomas klīniskās stadijas no I līdz IVc.

Promocijas darbs tika izstrādāts pirms jaunās PVO grāmatas "Galvas un kakla audzēji" (*Head and Neck Tumours, 5th edition, 2024*) izdošanas, tādēļ nav iekļauti dati par CPV pozitīvām un negatīvām displāzijām un mutes gļotādas karcinomām. Izmantojam plakanšūnu

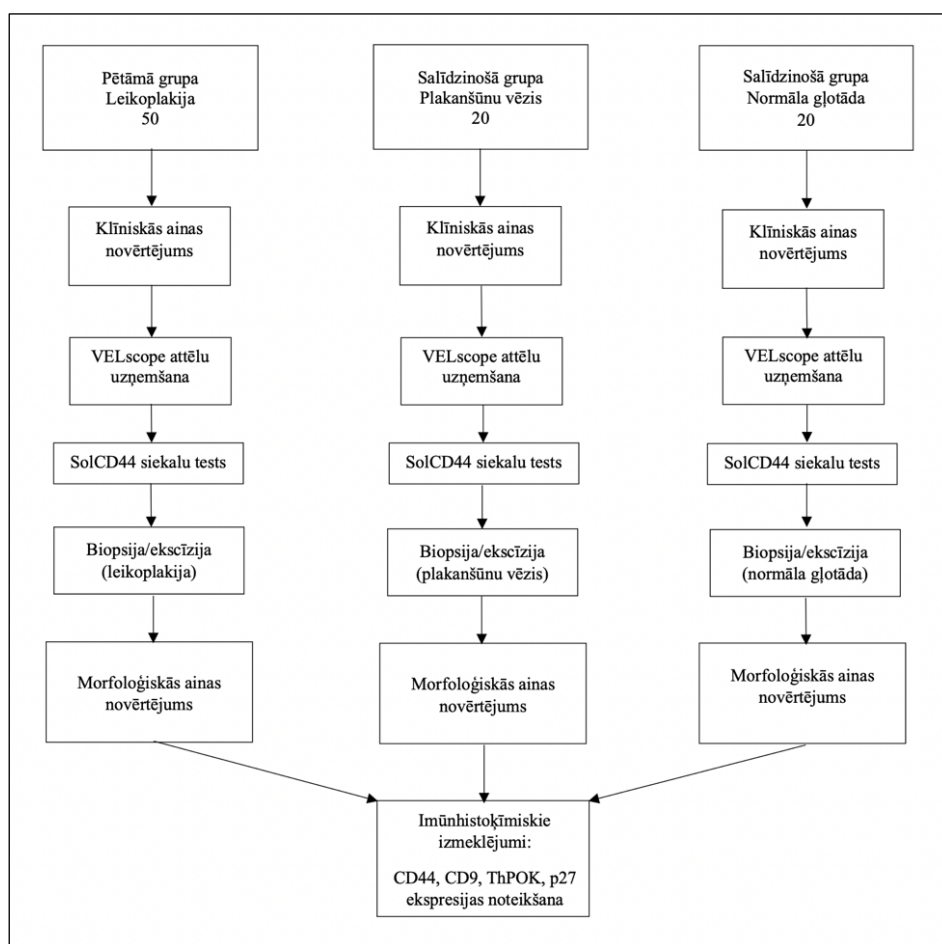
karcinomu klasifikāciju bez papildu precizējumiem (*NOS – not otherwise specified*), neuzsverot invāzijas dziļumu zem bazālās membrānas (*DOI – depth of invasion*) (WHO, 2024).

2.1.3. Neizmainītas mutes gļotādas salīdzinošā grupa

Otro salīdzinošo grupu veidoja 20 pacienti, kuriem pēc epuļu un fibropapilomu elipsveida ekscīzijas to distālie un proksimālie gļotādas rajoni tika izmantoti kā veselas gļotādas paraugi, ja vizuāli tie bija neizmainīti. Veselas gļotādas klātbūtne tika apstiprināta arī mikroskopiskajā novērtējumā.

2.2. Pētījuma dizains

Pētījuma dizains attēlots 2.1. attēlā.



2.1. attēls. Pētījuma dizains

2.3. Pētījuma personu iekļaušanas un izslēgšanas kritēriji

Šajā pētījumā tika izdalīta viena pētījuma grupa un divas salīdzinošās grupas, iekļaujot pacientus vecumā no 18 līdz 85 gadiem. Pētījuma grupā iekļāvām 50 pacientus ar aizdomām par iespējamo ML, kas pēc tam tika apstiprinātas ar klīniskām un morfoloģiskām metodēm;

vienu salīdzinošo grupu veidoja 20 pacienti ar histoloģiski pierādītu plakanšūnu karcinomu, un otru salīdzinošo grupu veidoja 20 pacienti ar neizmainītu mutes dobuma gļotādu.

Iekļaušanas kritēriji:

- 1) pacienta vecums 18–85 gadi;
- 2) patoloģiskas pārmaiņas mutes dobumā diagnosticētas pirmo reizi;
- 3) neatzīmē iepriekš veiktu ārstēšanu sakarā ar ļaundabīgu saslimšanu citās orgānu sistēmās.

No pētījuma tika izslēgtas personas līdz 18 gadu vecumam, grūtnieces un pacienti, kuriem anamnēzē ir citu lokalizāciju ļaundabīgas slimības un kuriem mutes dobuma plakanšūnu karcinoma ir ārstēta ar operāciju un/vai staru terapiju.

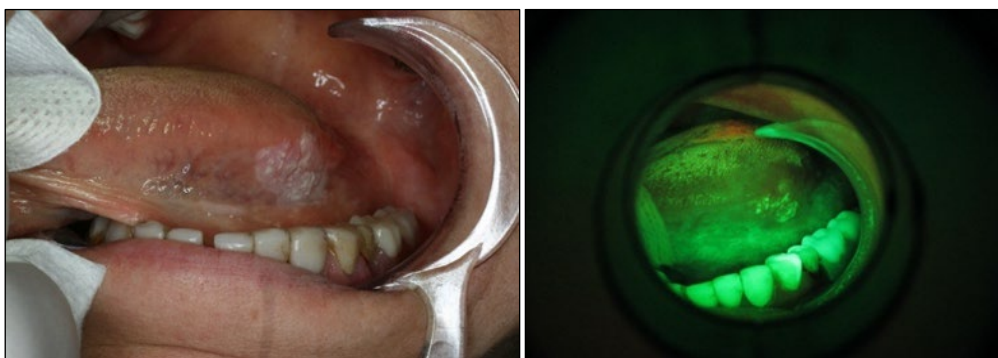
2.4. Neizmainītu, leukoplakijas un karcinomas audu novērtēšana mutes gļotādā ar fluorescentās spektroskopijas *VELscope* iekārtu

Pēc rūpīgas pacienta ekstraorālas un intraorālas izmeklēšanas pacientiem ar mutes dobuma leukoplakiju, plakanšūnu karcinomu un veselu gļotādu tika veikta fotografēšana ar *Canon Eos 750D* (Tokija, Japāna) kameru un *Canon EF-S 60 mm f/2.8* makrolēcu (2.2. attēls). Pēc tam ar adapteru fotokamerai tika pievienota *VELscope* ierīce, kas ļāva fotografēt un novērtēt izgaismoto audu fluorescenci. *VELscope* ir balstīta uz tiešu patoloģisko audu vizualizēšanu fluorescences rezultātā. Izstarojot zilo gaismu uz mutes dobuma audiem rajonā, kur notiek neoplastiskās pārmaiņas, kas ar aci nav redzamas, fluorescences zūd, norādot konkrēta patoloģiskā procesa lielumu un robežas biopsijas vai operācijas veikšanai (2.3. un 2.4. attēls). Mutes dobuma leukoplakiju un veselu gļotādu fotografēšanu veica darba autore, karcinomas fotografēja prof. Ingrīda Čēma un asoc. prof. Guntars Selga. Visu iegūto fotogrāfiju analīzi veica darba autore.



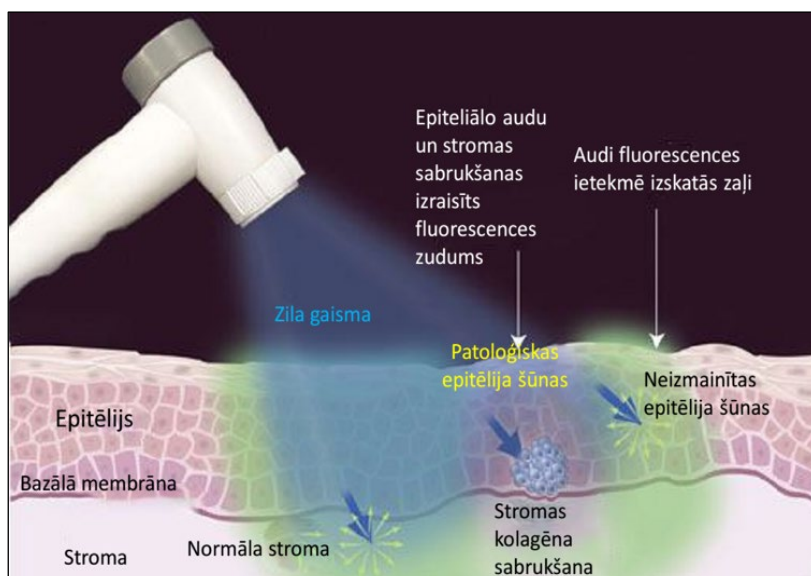
2.2. attēls. *VELscope* ierīce un *Canon Eos 750D* kamera

Mutes dobuma izmeklēšana ar *VELscope* ierīci. Attēlu autore Madara Dzudzilo



2.3. attēls. **Mēles laterālās daļas nodulāra leukoplakija** (kreisajā attēlā)
un tās vizualizācija ar *VELscope* (labajā attēlā)

Attēls no Stomatoloģijas institūta Mutes medicīnas centra arhīva



2.4. attēls. *VELscope* darbības princips

Attēla autore Madara Dzudzilo (dati adaptēti no hewlettndental.com)

2.5. Šķīstošā CD44 un kopējā proteīna noteikšana siekalās

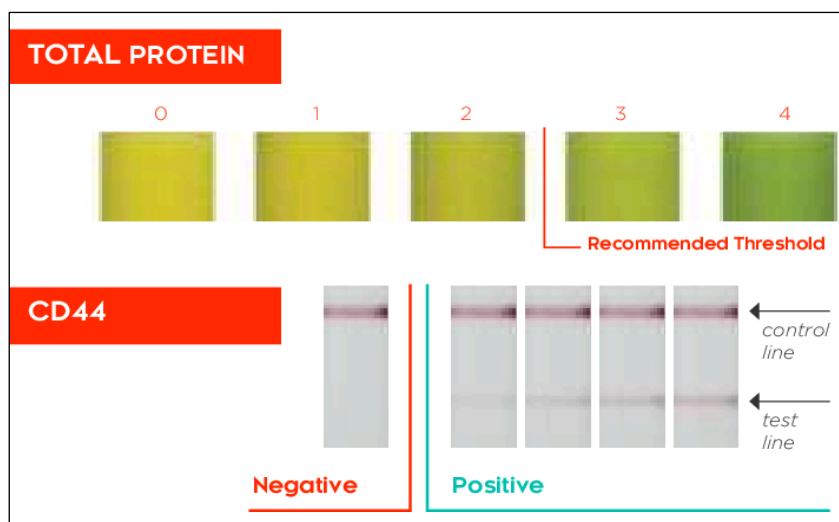
Šķīstošais CD44 un kopējais proteīns tika novērtēts, izmantojot *OncAlert*® *Oral Cancer Rapid* testu (*VIGILANT BIOSCENCES, Ft. Lauderdale, FL, USA*) (2.5. attēls). Testa ierīce sastāv no divām testa kasetes daļām – viena ar CD44 kontroles un testa līnijām, otra – kopējā proteīna kolorimetriskai novērtēšanai. Siekalu parauga savākšanas trauks un 5 ml fizioloģiskā šķīduma tika izmantoti mutes skalojumu iegūšanai. Mutes skalojumus ievāca pirms audu parauga biopsijas vai ekscīzijas veikšanas. Metodoloģija tika ievērota stingri pēc protokola. Pacientam iedeva 5 ml fizioloģiskā šķīduma un tika dotas instrukcijas skalot muti un rīkli ar šķīdumu katras 5 sekundes un pēc tam izspļaut paraugu traukā. Testa kaseti ievietoja traukā ar mutes skalojumu uz trim sekundēm, pēc tam izņēma un novietoja uz plakanas virsmas uz 10 minūtēm. Pēc 10 minūtēm nolasīja testa rezultātus. Ja testa kontroles līnija neparādījās, tad testu uzskatīja par nederīgu. Ja parādījās CD44 līnija, tests bija pozitīvs. Kopējā proteīna

rezultāti tika novērtēti, balstoties uz krāsu intensitātes skalu no 0 līdz 4. Palielinoties proteīna daudzumam, dzeltenais laukums mainās uz zaļu krāsu un tad līdz pat tumši zaļganam vai zilgani zaļganam laukumam (2.6. attēls). SolCD44 un kopējā proteīna (KP) ekspresijas novērtējumu veica darba autore, vadoties pēc oficiāli rekomendētās krāsu gradienta skalas.



2.5. attēls. *OncAlert* siekalu tests

Attēls adaptēts no Franzmann et al., 2018



2.6. attēls. **Kopējā proteīna krāsu gradienta skala**

Attēls adaptēts no Franzmann et al., 2018

2.6. Veselu mutes gļotādas audu, mutes leukoplakijas un plakanšūnu karcinomas morfoloģiskais novērtējums

Pēc klīniskās izmeklēšanas pacienti operēti PSKUS Mutes, sejas un žokļu ķirurģijas centra stacionārā, iegūtie audu paraugi tika fiksēti 10 % neitrālā buferētā formalīna šķīdumā un nosūtīti uz PSKUS Patoloģijas institūtu. Tālākā procesā paraugi tika apstrādāti *Sakura Tissue-Tek VIP 5 TM* vakuuma audu infiltrācijas procesorā un ieguldīti paraplastā (*Diapath, Bergamo, Italy*). Paraugi no iegūtajiem parafīna blokiem tika sagriezti 4 μm biezos griezumus,

tad novietoti uz adhezīviem pozitīvi lādētiem priekšmetstikliem. Tālāk sekoja deparafinizācijas un rehidratācijas process ar alkoholu līdz ūdenim.

Mikropreparātus krāsoja ar hematoksilīnu un eozīnu, pēc tam tos novērtēja gaismas mikroskopā divi neatkarīgi morfoloģi (prof. Regīna Kleina un dr. Madara Dzudzilo).

Kontroles grupas audu paraugi bija vizuāli un mikroskopiski neizmainīti, ar klasisko mutes gļotādas struktūru. Morfoloģiski analizējam epiteliālo slāni, bazālo membrānu un zemgļotādu. Tika izslēgtas citas mutes gļotādas slimības. Lielākos audu paraugos diagnosticējam mazos siekalu dziedzerus un to izvadus.

Mutes leukoplakijā tika novērtēti šādi parametri: izmērs, biezums, tās virsma, histoloģiskais tips, displāzijas pakāpe – viegla, mērena un smaga (saskaņā ar 2017. gada PVO klasifikāciju) (El-Naggar et al., 2017) –, keratinizācijas procesu izplatība un stromas šūnu reakcija zem leukoplakijas, sastāvoša no plazmas šūnām, limfocītiem un makrofāgiem (Odell et al., 2021).

Mutes dobuma plakanšūnu karcinomas preparātos, krāsotos ar hematoksilīnu, analizējam to pārragošanās pakāpi, epiteliālo šūnu atipijas izteiktību, lai noteiktu plakanšūnu karcinomas diferenciācijas pakāpi (G), kā arī invāzijas vietas cauri bazālajai membrānai līdz pat iesaigšanai zemgļotādas struktūrās. Analizētās karcinomas tika grupētas pēc 2017. gada PVO klasifikācijas (El-Naggar et al., 2017), ņemot vērā visu informāciju par mums pieejamiem *TNM* datiem.

2.7. Imūnhistoķīmiskā vizualizācija un izvērtēšana

Pētāmo antigēnu imūnhistoķīmiskā vizualizācija veikta formalīnā fiksētos, parafīnā ieguldītos mutes leukoplakijas, veselos un plakanšūnu karcinomas audos, kurus apstrādāja ar primārām antivielām (2.1. tabula).

2.1. tabula

Pētījumā izmantoto primāro antivielu raksturojums

Antiviela	Klons	Ražotājs	Atšķaidījums
CD44	DF1485	DAKO	1:50
CD9	60232-1-Ig-20	<i>Proteintech</i>	1:1000
p27	SX53G8	DAKO	1:50
ThPOK	615819	<i>R&D Systems</i>	0,5 µg/mL

CD44, p27, ThPOK un CD9 proteīni tika novērtēti ar standarta uz polimēriem balstītu vizualizācijas *EnVision* metodi. Audu paraugi tika inkubēti ar 3 % H₂O₂ uz 10 minūtēm, lai inhibētu endogēnas peroksidāzes aktivitāti. Antigēna atbrīvošana tika veikta svaigi pagatavotā 0,01 mol/l nātrija citrāta buferšķīdumā 750 W triju ciklu ietvarā, katrs 10 minūtes. Audu paraugi tika iekrāsoti ar Meijera hematoksilīnu. Antigēnu ekspresija mutes gļotādas epitelijā un

mononukleārajās šūnās zem bazālās membrānas tika uzskatīta par pozitīvu, ja vairāk par 10 % šūnu ekspresēja attiecīgo marķieri. CD44, CD9, ThPOK un p27 antigēna ekspresiju izvērtējām trijos redzes laukos ar palielinājumu 400× (1.2. tabula). Veselos gļotādas audos un homogēnās leikoplakijās CD44, CD9 antigēna ekspresija iekrāsojās mutes epitēlija un stromas šūnu membrānā brūnā krāsā. Nehomogēnās ML un karcinomās izvērtējām biomarķieru klātbūtni epitēlija citoplazmā. Tika saskaitīts epitēlija slāņu un mononukleāro šūnu skaits, kas ekspresēja CD44 un CD9 antigēnu. Klasiskos gadījumos ThPOK un p27 antigēns tika pierādīts epitēlija kodolos. Savukārt daļā nehomogēnu leikoplakiju un karcinomu diagnosticējām p27 ekspresiju plakanā epitēlija citoplazmā. Fotoattēli no mikropreparātiem, kuros izmantotas imūnhistoķīmiskās krāsošanas metodes, tika uzņemti ar Kapa attēlu bāzes programmu, izmantojot *Axiolab* (Zeiss, *Oberkochen*, Vācija) mikroskopu.

2.2. tabula

Pozitīvas imūnhistoķīmiskas reakcijas interpretācijas raksturojums

Antiviela	Antigēna ekspresijas lokalizācija	Pozitīvas reakcijas interpretācija
CD44	Citolemma	Pozitīvu epitēlija slāņu skaits vienā redzes laukā, palielinājums 400×
CD9	Citolemma	Pozitīvu epitēlija slāņu skaits vienā redzes laukā, palielinājums 400×
p27	Kodolos	Pozitīvu epitēlija šūnu kodolu skaits vienā redzes laukā, palielinājums 400×
ThPOK	Kodolos	Pozitīvu epitēlija šūnu kodolu skaits vienā redzes laukā, palielinājums 400×

2.8. Statistiskā datu analīze

Iegūto rezultātu novērtēšanai tika veikta statistiskā datu analīze, izmantojot *GraphPadPrism 9.0* programmatūru MacOS (*GraphPad Software*, Sandjego, CA, ASV).

Lai pārbaudītu, vai iegūtie skaitliskie dati ir normāli sadalīti, tika izmantoti D'agostino Pīrsona (*D'Agostino-Pearson*), Andersona-Darlinga (*Anderson-Darling*) un Šapiro-Vilka (*Shapiro-Wilk*) normalitātes testi. Grupu salīdzināšana tika veikta ar nesapārotu t-testu vai vienvirziena ANOVA, vai atkārtotu mērījumu divvirzīnu ANOVA, kam sekoja divpakāpju Bendžamini, Krīgera un Jekuteli metode (*Benjamini, Krieger and Yekutieli*). Spīrmena (*Spearman*) ranga korelācijas tests tika izmantots, lai izmērītu asociāciju stiprumu un virzīnu starp mainīgajiem. Šai analīzei kategoriju dati tika kodēti šādi: dzimums (sieviete, vīrietis) tika kodēti kā 1 un 2; KP līmenis 4 pakāpēs (1, 2, 3, 4), pieņemot, ka 1 un 2 norāda uz zemu līmeni, 3 un 4 norāda uz augstu līmeni; leikoplakijas klīniskās formas ir sadalītas trijās grupās, kas iedalītas kā 1 – homogēna, 2 – verukoza un nodulāra un 3 – eritroleikoplakija; leikoplakijas lokalizāciju raksturoja 3 rajoni – vaiga un lūpas gļotāda (1), mēles un smaganas (2), mutes dobuma pamatne (3). Visiem statistiskajiem testiem p vērtības < 0,05 tika uzskatītas par nozīmīgām. Promocijas darbā p lielumi līdz 0,0001 ir attēloti precīzos skaitļos. Pētāmo

parametru atspoguļošanai tika izveidota aluviālā diagramma, izmantojot *Jamovi* programmu. Visi grafiskie attēli un statistiskās analīzes tika veiktas, izmantojot *GraphPadPrism 9.0* programmatūru MacOS (*GraphPad Software*, Sandjego, CA, ASV). Rezultāti tiek parādīti kā mediāna ar starpkvartiļu diapazonu.

3. Rezultāti

3.1. Mutes leukoplakiju klīniskais un morfoloģiskais raksturojums

Pētījumā tika analizēti 50 pacientu dati. No tiem 29 (58 %) bija vīrieši un 21 (42 %) sieviete (3.1. tabula). Minimālais vecums bija 27 gadi, maksimālais 82; vecuma amplitūda 55 gadi. Pacientu vidējais vecums bija $M = 57$ gadi; $SD = 14,14$ gadi, modālais jeb visbiežāk sastopamais vecums bija 55 gadi; vecuma mediāna 59 gadi.

Mutes leukoplakijas mūsu pētījuma grupā lokalizējās vaiga gļotādā (*mucosae buccae*, $n = 18$), mēles laterālajā un ventrālajā virsmā (*pars lateralis et ventrale linguae*, $n = 17$), mutes pamatnē (*fundus cavi oris*, $n = 11$), smaganās (*gingivae*, $n = 2$) un lūpas gļotādā (*mucosae labii*, $n = 2$). Pētāmajā pacientu grupā mutes leukoplakijas lokalizējās kreisajā mutes dobuma pusē ($n = 22$), labajā – $n = 15$, savukārt pārējās leukoplakijas lokalizējās mutes pamatnē, vairāk tās priekšējā daļā un lūpas gļotādā ($n = 13$).

Izvērtējot leukoplakiju izmērus, tās iedalījām trijās grupās: 1) < 1 cm – mazas, 2) 1–2 cm – vidējas, 3) > 2 cm – lielas. ML ar mazu izmēru bija 18 gadījumos (36 %), ar vidēju izmēru bija 10 pacienti (20 %), bet lielākas ML par 2 cm bija 22 (44 %) slimnieku operācijas materiālā, nevis biopsijās. Multiplas mutes leukoplakijas mūsu pētījuma grupā bija 6 gadījumos, kas veido 12 %.

Tika diagnosticēti šādi leukoplakijas klīniskie varianti: $n = 18$ (36 %) homogēnas leukoplakijas un $n = 32$ (64 %) nehomogēnas leukoplakijas. Nehomogēnas leukoplakijas paveidi bija eritroleikoplakijas ($n = 17$), verukozas leukoplakijas ($n = 11$) un nodulāras leukoplakijas ($n = 4$).

Leikoplakijas pacientu raksturojums

Pacients	Vecums	Dzimums	Lokalizācija	Leikoplakijas klīniskā forma	CD44 pozitīvu epitelija slāņu vidējais skaits (40×10)	CD9 pozitīvu epitelija slāņu vidējais skaits (40×10)	p27 pozitīvu epitelija kodolu vidējais skaits (400)	Makrofaģu vidējais skaits vienā redzes laukā (400×)	Šķīstošā CD44 tests, pozitīvs/negatīvs	Kopējā proteīna (KP) krāsu intensitāte	Patoloģiskie procesi mutes leikoplakijas epitelija
1 - R	68	S	<i>Fundus cavi oris</i>	Homogēna	15	16	82	23	-	augsta 3	Hiperplāzija bez displāzijas
2 - K	65	S	<i>p. lateralis linguae sin</i>	Verukoza	15	13	47	29	-	augsta 3	Hiperplāzija bez displāzijas
3 - P	59	S	<i>p. lateralis linguae sin</i>	Nodulāra	15	28	94	14	-	augsta 3	Viegla displāzija
4 - P	68	V	<i>p. lateralis linguae dx</i>	Verukoza	16	17	134	11	-	augsta 3	Viegla displāzija
5 - E	27	V	<i>Mucosa buccae dx</i>	Eritroleikoplakija	14	15	88	15	-	augsta 3	Smaga displāzija
6 - T	56	S	<i>p. lateralis linguae dx</i>	Eritroleikoplakija	15	25	73	29	-	zema 2	Hiperplāzija bez displāzijas
7 - M	50	S	<i>Fundus cavi oris</i>	Eritroleikoplakija	18	19	52	23	+	augsta 4	Smaga displāzija
8 - K	62	V	<i>Mucosa buccae sin</i>	Nodulāra	17	17	81	17	+	augsta 3	Viegla displāzija
9 - B	40	S	<i>Mucosa buccae dx</i>	Eritroleikoplakija	21	20	69	23	+	zema 2	Viegla displāzija
10 - P	59	S	<i>Mucosa buccae sin</i>	Homogēna	11	16	117	28	+	zema 2	Hiperplāzija bez displāzijas
11 - L	78	S	<i>Fundus cavi oris</i>	Eritroleikoplakija	11	18	76	21	+	augsta 4	Smaga displāzija
12 - D	62	S	<i>Mucosa buccae sin</i>	Eritroleikoplakija	16	16	58	24	+	augsta 3	Vidēja displāzija
13 - O	55	V	<i>Mucosa buccae sin</i>	Verukoza	15	16	56	23	+	zema 2	Hiperplāzija bez displāzijas

3.1. tabulas turpinājums

Pacients	Vecums	Dzimums	Lokalizācija	Leikoplakijas Klīniskā forma	CD44 pozitīvu epitelija slāņu vidējais skaits (40×10)	CD9 pozitīvu epitelija slāņu vidējais skaits (40×10)	p27 pozitīvu epitelija kodolu vidējais skaits leikoplakijā (400)	Makrofaģu vidējais skaits vienā redzes laukā (400×)	Šķīstošā CD44 tests, pozitīvs/negatīvs	Kopēja proteīna (KP) krāsu intensitāte	Patoloģiskie procesi mutes leikoplakijas epitelija
14 - V	65	S	<i>Mucosa buccae dx</i>	Eritroleikoplakija	18	19	75	22	+	zema 2	Hiperplāzija bez displāzijas
15 - P	38	V	<i>Fundus cavi oris</i>	Eritroleikoplakija	13	15	65	23	+	augsta 3	Smaga displāzija
16 - S	63	S	<i>Mucosa buccae sin</i>	Nodulāra	16	16	79	25	-	zema 2	Hiperplāzija bez displāzijas
17 - P	66	V	<i>Fundus cavi oris</i>	Verukoza	19	28	16	22	+	zema 1	Hiperplāzija bez displāzijas
18 - M	37	V	<i>Mucosa proc. alveolaris mandibulae sin</i>	Homogēna	19	21	250	14	+	zema 2	Viegla displāzija
19 - G	81	V	<i>p. lateralis linguae sin</i>	Eritroleikoplakija	17	17	115	17	+	augsta 3	Smaga displāzija
20 - M	56	S	<i>Mucosa buccae dx</i>	Homogēna	24	27	111	24	-	zema 2	Hiperplāzija bez displāzijas
21 - R	41	V	<i>Fundus cavi oris</i>	Homogēna	15	17	67	28	-	zema 2	Hiperplāzija bez displāzijas
22 - S	82	V	<i>p. lateralis linguae sin</i>	Verukoza	18	18	157	12	+	augsta 3	Viegla displāzija
23 - O	79	V	<i>Mucosa buccae sin</i>	Eritroleikoplakija	10	9	120	8	+	augsta 4	Smaga displāzija
24 - V	64	V	<i>Mucosa labii inferior</i>	Verukoza	10	10	302	5	+	augsta 3	Vidēja displāzija
25 - J	29	V	<i>Mucosa buccae dx</i>	Verukoza	14	24	98	19	+	augsta 3	Vidēja displāzija
26 - S	34	V	<i>Mucosa buccae dx</i>	Homogēna	18	20	187	17	-	zema 2	Viegla displāzija

3.1. tabulas turpinājums

Pacients	Vecums	Dzimums	Lokalizācija	Leikoplakijas Klīniskā forma	CD44 pozitīvu epitelija slāņu vidējais skaits (40×10)	CD9 pozitīvu epitelija slāņu vidējais skaits (40×10)	p27 pozitīvu epitelija kodolu vidējais skaits (400)	Makrofaģu vidējais skaits vienā redzes laukā (400×)	Šķīstošā CD44 tests, pozitīvs/negatīvs	Kopēja proteīna (KP) krāsu intensitāte	Patoloģiskie procesi mutes leikoplakijas epitelija
27 - F	70	S	<i>Mucosa proc. alveolaris mandibulae dx</i>	Homogēna	19	20	137	27	+	zema 2	Hiperplāzija bez displāzijas
28 - K	39	V	<i>p. lateralis linguae sin</i>	Eritroleikoplakija	13	16	182	23	+	augsta 3	Smaga displāzija
29 - N	41	V	<i>p. lateralis linguae sin</i>	Eritroleikoplakija	22	24	87	17	-	zema 2	Smaga displāzija
30 - P	55	V	<i>Mucosa buccae dx</i>	Verukoza	14	18	103	19	+	augsta 3	Vidēja displāzija
31 - L	78	V	<i>p. lateralis linguae sin</i>	Eritroleikoplakija	25	25	162	24	+	augsta 3	Smaga displāzija
32 - A	63	S	<i>p. lateralis linguae sin</i>	Eritroleikoplakija	17	18	39	11	+	augsta 3	Smaga displāzija
33 - S	51	V	<i>Mucosa buccae sin</i>	Homogēna	22	24	167	14	-	zema 2	Viegla displāzija
34 - S	65	S	<i>Fundus cavi oris</i>	Eritroleikoplakija	16	16	32	11	+	augsta 4	Smaga displāzija
35 - M	56	V	<i>p. lateralis linguae sin</i>	Verukoza	12	13	98	12	+	augsta 3	Vidēja displāzija
36 - S	64	V	<i>Mucosa buccae sin</i>	Homogēna	16	17	99	19	+	augsta 3	Hiperplāzija bez displāzijas
37 - S	29	S	<i>p. lateralis linguae sin</i>	Homogēna	24	25	199	22	-	zema 2	Hiperplāzija bez displāzijas
38 - M	62	V	<i>Fundus cavi oris</i>	Verukoza	12	10	101	31	+	augsta 3	Vidēja displāzija
39 - C	69	S	<i>Fundus cavi oris</i>	Eritroleikoplakija	8	8	30	9	+	augsta 4	Smaga displāzija
40 - D	58	S	<i>Mucosa buccae dx</i>	Homogēna	19	20	239	27	-	zema 2	Hiperplāzija bez displāzijas

3.1. tabulas turpinājums

Pacients	Vecums	Dzimums	Lokalizācija	Leikoplakijas Kliniskā forma	CD44 pozitīvu epitēlija slāņu vidējais skaits (40×10)	CD9 pozitīvu epitēlija slāņu vidējais skaits (40×10)	p27 pozitīvu epitēlija kodolu vidējais skaits (400)	Makrofāgu vidējais skaits vienā redzes laukā (400×)	Šķīstošā CD44 tests, pozitīvs/negatīvs	Kopēja proteīna (KP) krāsu intensitāte	Patoloģiskie procesi mutes leikoplakijas epitēlija
41 - D	42	S	<i>Mucosa labii inferior</i>	Homogēna	15	16	180	28	-	zema 2	Hiperplāzija bez displāzijas
42 - K	43	V	<i>p. lateralis linguae sin</i>	Verukoza	10	12	74	12	+	augsta 4	Vidēja displāzija
43 - K	49	S	<i>p. lateralis linguae dx</i>	Homogēna	22	23	165	14	+	zema 2	Viegla displāzija
44 - O	63	V	<i>Mucosa buccae sin</i>	Homogēna	18	19	187	13	-	zema 2	Viegla displāzija
45 - D	67	V	<i>Fundus cavi oris</i>	Homogēna	22	22	123	18	-	zema 2	Viegla displāzija
46 - R	66	S	<i>p. lateralis linguae dx</i>	Homogēna	19	20	207	15	-	zema 2	Viegla displāzija
47 - B	49	V	<i>Fundus cavi oris</i>	Eritroleikoplakija	11	10	17	6	+	augsta 4	Smaga displāzija
48 - J	77	V	<i>p. lateralis linguae dx</i>	Homogēna	24	25	377	24	-	zema 2	Hiperplāzija bez displāzijas
49 - M	55	V	<i>p. lateralis linguae sin</i>	Nodulāra	14	15	88	23	+	augsta 3	Vidēja displāzija
50 - L	55	V	<i>Mucosa buccae dx</i>	Homogēna	22	23	256	21	-	zema 2	Hiperplāzija bez displāzijas

3.2. Mutes plakanšūnu karcinomas klīniskais un morfoloģiskais raksturojums

Tika analizēti 22 pacientu dati, taču pētījumā neiekļāvām divus gadījumus, jo klīnicista diagnoze par karcinomu neapstiprinājās un morfoloģiski tās bija mutes leukoplakijas. Minimālais vecums bija 43 gadi, maksimālais 73; vecuma amplitūda 30 gadi. Sieviešu vidējais vecums bija $M = 63,5$ gadi; $SD = 14,14$ gadi, modālais jeb visbiežāk sastopamais vecums bija 62 gadi; vecuma mediāna 55 gadi. Savukārt vīrieši bija jaunāki, ar vidējo vecumu 58,8 gadi, $SD = 12,11$ gadi, modālais jeb visbiežāk sastopamais vecums bija 55 gadi; vecuma mediāna 59 gadi. 12 (60 %) no slimniekiem bija vīrieši un 8 (40 %) sievietes.

Mutes karcinomu klīniskajā (makroskopiskajā) aprakstā dominēja izcūlojumi ($n = 17$), bet trijos gadījumos bija eritroplakija. Audzēju diferenciācijas pakāpes: *Grade* 1 un 3, katra 25 % gadījumu, bet mēreni diferencētas karcinomas – *Grade* 2 – bija 50 % analizēto onkoloģisko slimnieku. Dažos gadījumos tika konstatētas arī karcinomas fona slimības: papiloma ar smagu displāziju un transformāciju karcinomā ($n = 2$), leukoplakijas malignizēšanās ($n = 2$) un hronisks sialadenīts ar malignizāciju tā izvada galā ($n = 1$).

Karcinomas mūsu pētījuma grupā lokalizējās mutes pamatnē ($n = 8$, 40 %), mēles un smaganu gļotādā bija vienādi – pa 20 % gadījumu katrā lokalizācijā ($n = 4$). Citas lokalizācijas karcinomas (vaiga gļotāda u. c.) bija 20 % ($n = 4$).

Mutes karcinomu sadalījums pēc klīniskajām stadijām:

- 1) T_{is} ($n = 2$ ar N_0M_0),
- 2) T_1 ($n = 2$ ar $T_1 N_0M_0$),
- 3) T_2 ($n = 9$ ar $T_2 N_0M_0$),
- 4) T_3 ($n = 2$ ar $T_2 N_1M_0$),
- 5) T_{4A} ($n = 3$ ar $T_4 N_0M_0$),
 T_{4B} ($n = 2$ ar $T_4 N_1M_0$).

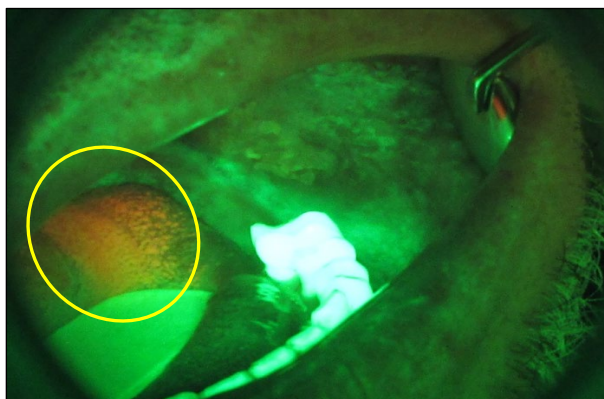
3.3. VELscope vizualizācijas raksturojums pacientiem ar neizmainītu gļotādu, leukoplakiju un plakanšūnu karcinomu

Audu fluorescences novērtēšanai un biopsijas vietas noteikšanai ar *VELscope* ierīci tika apskatīti 20 pacienti ar neizmainītu mutes dobuma gļotādu, 50 pacienti ar mutes leukoplakiju un 20 pacienti ar mutes plakanšūnu karcinomu.

3.3.1. Neizmainītas mutes dobuma gļotādas audi

Normālos mutes dobuma audos epitēlija autofluorescenci izraisa bazālo un *str. intermedium* šūnu citoplazma, savukārt stromas fluorescenci izraisa strukturālās šķiedras. Skatoties caur *VELscope* sistēmu, veselie mutes dobuma audi fluorescēja zaļā krāsā. Nelielu fluorescences zudumu varēja novērot vietās ar lokālu iekaisumu. Lai gan fizioloģisks

fluorescences zudums norāda uz epiteliālām izmaiņām, to varēja novērot arī hiperēmijas, hiperkeratozes un citu labdabīgu izmaiņu gadījumā. Dažos gadījumos fluorescence izzuda mēles dorsālajā daļā, kur uz hipertrofiski keratinizētām, pārragotām diegveida kārpiņām kolonizējas baktērijas, kas fluorescē spilgti oranži sarkanā krāsā (3.1. attēls). To sauc par porfirīnu fluorescenci, ko izraisa mikroorganismu izdalītie porfirīni.



3.1. attēls. **Mutes dobuma audu vizualizācija ar *VELscope* ierīci**

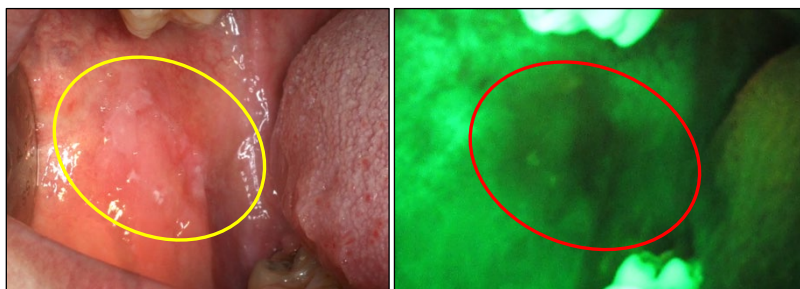
Ar dzeltenu apli atzīmētā zona norāda uz fluorescenci spilgti oranžā krāsā baktēriju ietekmē.

Attēls no Stomatoloģijas institūta
Mutes medicīnas centra arhīva

3.3.2. Homogēnas un nehomogēnas leukoplakijas

Izvērtējot klīniskos attēlus ar mutes leukoplakiju mākslīgā un *VELscope* gaismā, tika secināts, ka izteikts audu fluorescences zudums ir konstatēts rajonos ar erozīvām pārmaiņām. Pārmainīta mutes dobuma gļotāda fluorescencē parādās kā pelēcīgi tumša neregulāras formas zona.

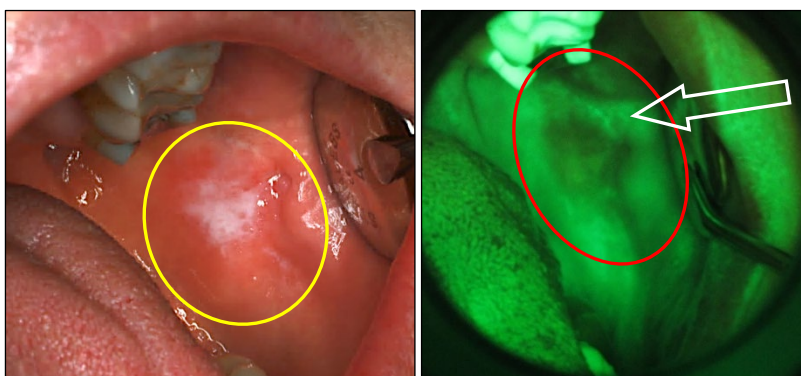
Homogēnu leukoplakiju *VELscope* ierīce attēlo kā nevienmērīgas intensitātes pelēkmelnas krāsas plankumu ar noteiktu robežu (3.2. attēls). Blakus esošie veselie audi fluorescē gaiši zaļā krāsā.



3.2. attēls. **Homogēnas leukoplakijas attēlošana vaiga gļotādā mākslīgajā gaismā (pa kreisi) un *VELscope* (pa labi)**

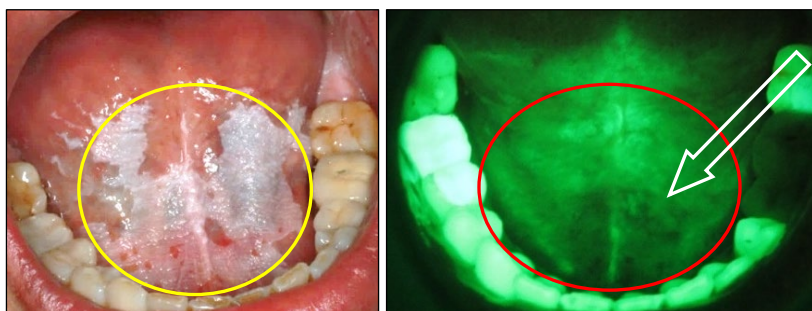
Ar bultu norādīts visizteiktākais fluorescences zudums.
Attēls no Stomatoloģijas institūta Mutes medicīnas centra arhīva

VELscope izstarotā gaismā nehomogēnu leukoplakiju gadījumos vizuāli atspoguļoja tumši pelēkas krāsas audus, kas zaudējuši fluorescenci. Salīdzinot ar homogēnām leukoplakijām, pārmainīto audu rajoni bija tumši pelēkmelnā krāsā. Taču vislielākā krāsu intensitāte bija bojājumu vietās ar erozīvām pārmaiņām (3.3. attēls). Tas var būt saistīts ar pastiprinātu hiperēmiju un sīkiem asins izplūdumiem. Klīniski mutes leukoplakijas bija redzamas mazākas, nekā skatoties ar *VELscope* ierīces palīdzību. Tomēr atsevišķos gadījumos klīniski redzamās leukoplakijas bija redzamas plašas, bet *VELscope* demonstrētā krāsu intensitāte bija variabla – no vāji izteikta fluorescences zuduma līdz tumši pelēkai (3.4. attēls).



3.3. attēls. Erozīvas leukoplakijas attēlošana vaiga gļotādā mākslīgajā apgaismojumā (pa kreisi) un *VELscope* (pa labi)

Ar bultu norādīts izteikts fluorescences zudums.
Attēls no Stomatoloģijas institūta Mutes medicīnas centra arhīva

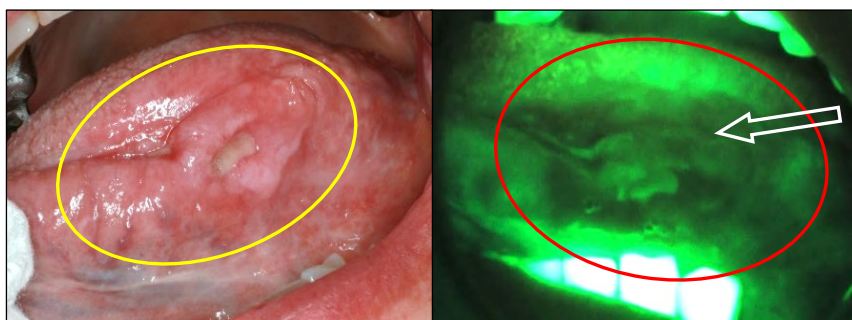


3.4. attēls. Verukozas leukoplakijas attēlošana mutes pamatnes un mēles ventrālās virsmas gļotādā mākslīgajā apgaismojumā (pa kreisi) un *VELscope* (pa labi)

Ar bultu norādīts izteikts fluorescences zudums.
No Stomatoloģijas institūta Mutes medicīnas centra arhīva

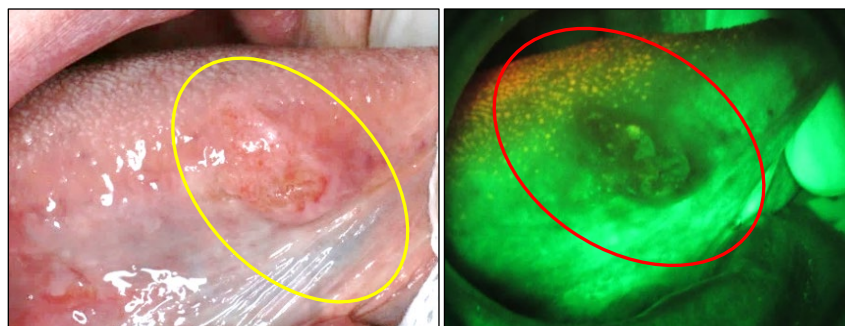
3.3.3. Mutes gļotādas plakanšūnu karcinomas

Pacientiem ar mutes dobuma karcinomu (3.5. un 3.6. attēls) ar *VELscope* ierīci izgaismotie rajoni parādījās kā tumši pelēka zona, un tā robežas bija krietni plašākas un neregulāras, nekā tās ir vizuāli redzamas, uzlabojot operācijas vietas noteikšanu.



3.5. attēls. Mutes plakanšūnu karcinomas (uz nodulāras leukoplakijas fona) attēlošana mēles kreisā sāna gļotādā mākslīgajā apgaismojumā (pa kreisi) un *VELscope* (pa labi)

Ar bultu norādīts izteikts fluorescences zudums.
Attēls no Stomatoloģijas institūta Mutes medicīnas centra arhīva



3.6. attēls. Mutes plakanšūnu karcinomas attēlošana mēles kreisā sāna gļotādā mākslīgajā apgaismojumā (pa kreisi) un *VELscope* (pa labi)

Attēls no Stomatoloģijas institūta Mutes medicīnas centra arhīva

3.4. Siekalu šķīstošā CD44 un totālā proteīna raksturojums pacientiem ar normālu gļotādu, leukoplakiju un plakanšūnu karcinomu un to salīdzinājums ar audu CD44 proteīna ekspresiju

3.4.1. Neizmainītas mutes dobuma gļotādas audi

Pacientiem ar normālu mutes dobuma gļotādu *OncAlert Oral Cancer Rapid* tests uzrādīja 100 % negatīvu rezultātu. Kopējā proteīna analīze 12 pacientiem uzrādīja 1. pakāpes krāsas intensitāti, bet astoņiem – 2. pakāpes krāsas intensitāti.

3.4.2. Homogēnas un nehomogēnas leukoplakijas

Veicot *OncAlert Oral Cancer Rapid* testu, tika atklāts, ka pozitīva šķīstošā CD44 testa līnija parādījās tikai pieciem pacientiem ar homogēnu leukoplakiju (n = 18), bet no 32 nehomogēnas leukoplakijas pacientiem pozitīva testa līnija parādījās 24 pacientiem.

Kopējā proteīna rezultāti homogēnās leukoplakijas pacientiem: 2. pakāpes krāsas intensitāte tika noteikta 16 pacientiem, 3. pakāpes intensitāte parādījās diviem pacientiem.

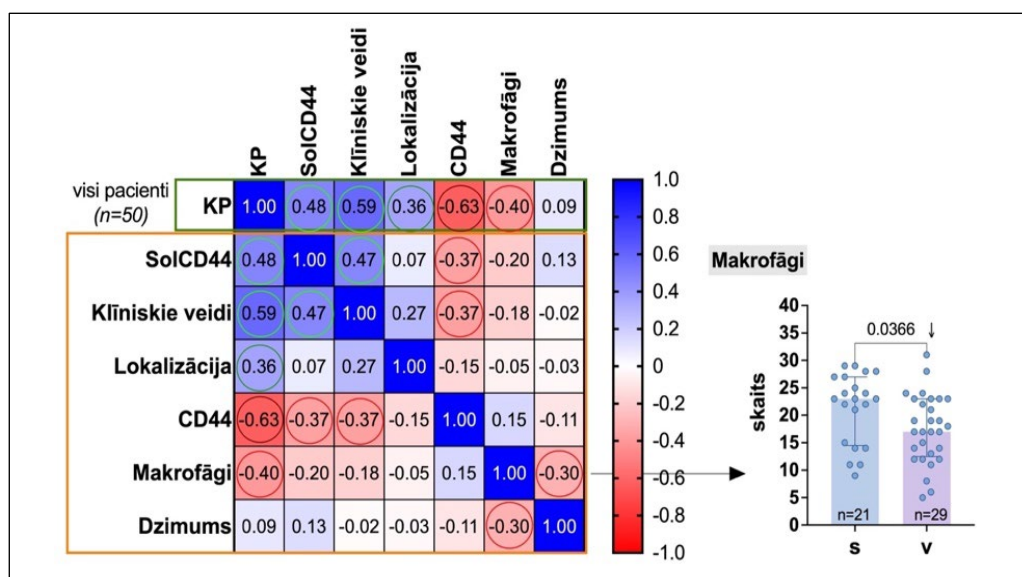
Palielinoties KP līmenim, palielinājās testa krāsu intensitāte līdz zilgani zaļganai krāsai, ko noteica pēc krāsu skalas.

Nehomogēnās leukoplakijas pacientu testa rezultāti: 2. pakāpes krāsu intensitāte parādījās septiņiem pacientiem, 3. pakāpes krāsu intensitāte tika konstatēta 18 pacientiem, bet 4. pakāpes krāsas intensitāte verificējās septiņiem pacientiem, norādot uz KP daudzuma palielināšanos.

Izmantojot Spīrmena rangu korelācijas matrici (3.7. attēls), tika analizēti pētāmās grupas dati. Pozitīvi šķīstošā CD44 testu daudzums bija vairāk nekā KP intensitātes vērtība ($p = 0,0005$) un palielinājās līdz ar smagāku mutes leukoplakijas klīnisko formu ($p = 0,0006$). Pozitīvu šķīstošā CD44 testu daudzums palielinājās arī gadījumos, kad CD44 ekspresēto epitēlija slāņi samazinājās ($p = 0,0086$). Tika pierādīta statistiski nozīmīga atšķirība starp KP daudzumu, balstoties uz krāsu intensitātes skalu, un mutes leukoplakijas klīnisko formu; jo augstāks proteīna līmenis, jo smagāka leukoplakijas klīniskā forma ($p < 0,0001$).

Statistiski nozīmīga negatīva korelācija tika noteikta starp augstāku KP līmeni un samazinātu pozitīvu CD44 imūnhistoķīmisku ekspresiju leukoplakijas audos ($p < 0,0001$). Korelācija starp leukoplakijas lokalizāciju un citiem pētāmiem parametriem netika atrasta.

Mēs novērojam tendenci starp lielāku CD44 iekrāsoto makrofāgu skaitu zem mutes leukoplakijas un mazāku KP līmeni, kas izpaudās kā zemāka krāsu intensitāte uz krāsu skalas ($p = 0,0043$) (3.7. attēls).

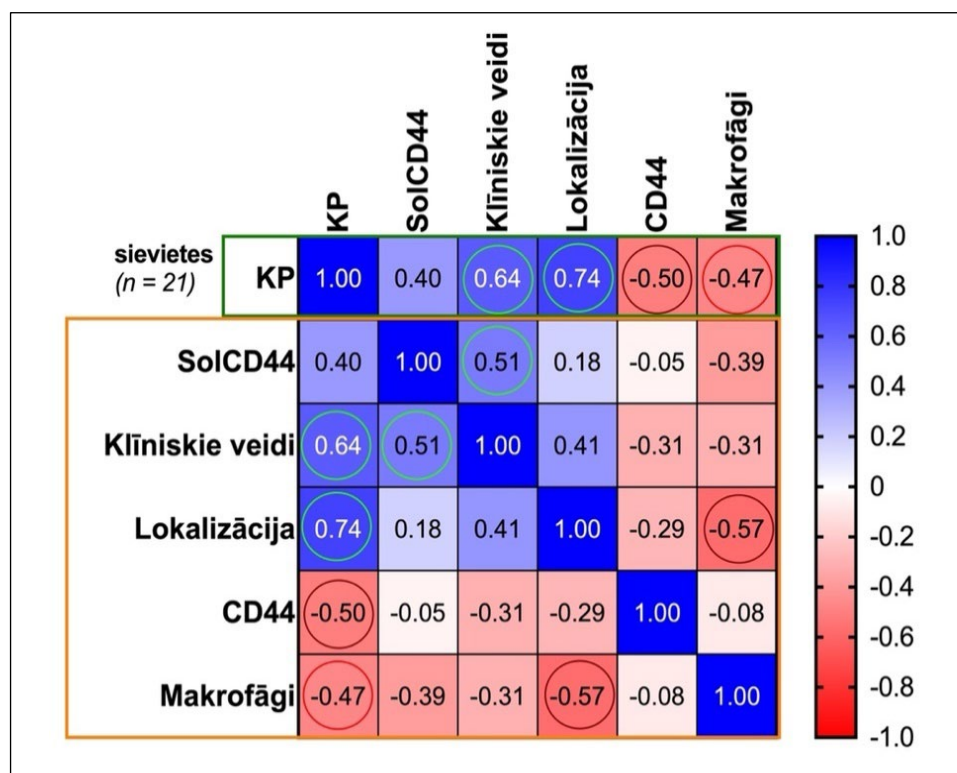


3.7. attēls. Pētīto mainīgo lielumu asociācijas stiprums

Šķīstošais CD44, leukoplakijas klīniskie veidi, lokalizācija, vidējais ar CD44 marķēto epitēlija slāņu skaits, kas izteikts epitēlija slāņos mutes leukoplakijā, mononukleārās šūnas (makrofāgi zem bazālās membrānas) un leukoplakijas pacientu dzimums ($n = 50$) attiecībā uz kopējā proteīna līmeni (un kovariācijām). Spīrmena rangu korelācijas matrica: skaitļi kvadrātos parāda korelācijas koeficienta vērtību, kas parāda asociācijas stiprumu; krāsainie apli apzīmē nozīmīgākās asociācijas (sarkani – negatīvas; zaļi – pozitīvas).

Stabiņu diagramma: s – sievietes, v – vīrieši; decimālskaitlis norāda p vērtību

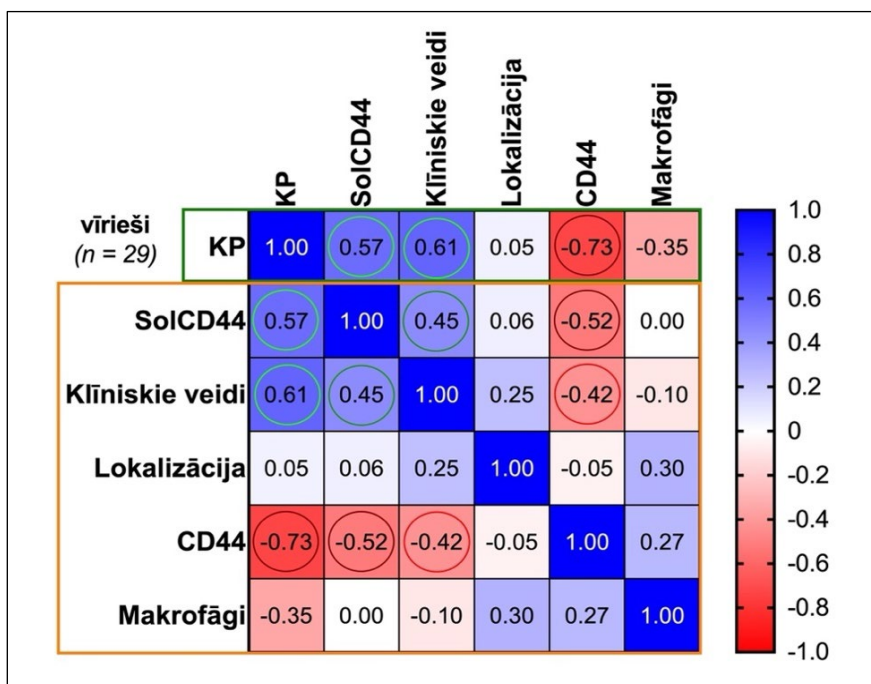
Izvērtējot atsevišķi sieviešu grupu (3.8. attēls), statistiski nozīmīga korelācija ($p < 0,0001$) tika atrasta starp leukoplakijas lokalizāciju (*pars lateralis linguae*) un augstāku kopējā proteīna līmeni (krāsu intensitāte 3 vai 4).



3.8. attēls. Spīrmena rangū korelācijas matrica sieviešu grupai

Pētīto mainīgo lielumu asociācijas stiprums: šķīstošais CD44, leukoplakijas klīniskā forma, mutes leukoplakijas lokalizācija, vidējais ar CD44 marķēto epitēlija slāņu skaits, kas izteikts leukoplakijas audos, mononukleārās šūnas (makrofāgi zem bazālās membrānas) un leukoplakijas pacientu dzimums (n = 21) attiecībā uz kopējā proteīna līmeni (un kovariācijām) sieviešu grupā. Spīrmena ranga korelācijas matrica: skaitļi kvadrātos parāda korelācijas koeficienta vērtību, kas parāda asociācijas stiprumu; krāsainie apļi apzīmē nozīmīgākās asociācijas (sarkani – negatīvas; zaļi – pozitīvas)

Analizējot vīriešu grupu (3.9. attēls), tika novērota statistiski nozīmīga negatīva korelācija gadījumos, kad kopējā proteīna daudzums bija lielāks, bet CD44 ekspresēto epitēlija slāņu skaits leukoplakijās bija samazināts ($p < 0,0001$).

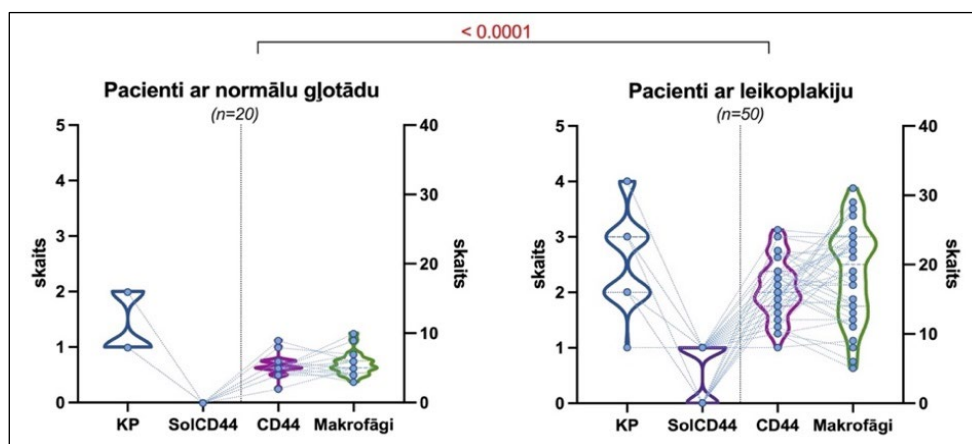


3.9. attēls. Spīrmena rangu korelācijas matrica vīriešu grupai

Pētīto mainīgo lielumu asociācijas stiprums: SolCD44, leikoplakijas klīniskā forma, mutes leikoplakijas lokalizācija, vidējais ar CD44 marķēto epitēlija slāņu skaits leikoplakijas audos, mononukleārās šūnas zem bazālās membrānas un pacientu dzimums (n = 29) attiecībā uz kopējā proteīna līmeni (un kovariācijām) vīriešu grupā.

Spīrmena rangu korelācijas matrica: skaitļi kvadrātos parāda korelācijas koeficienta vērtību, kas parāda asociācijas stiprumu; krāsainie apļi apzīmē nozīmīgākās asociācijas (sarkani – negatīvas; zaļi – pozitīvas)

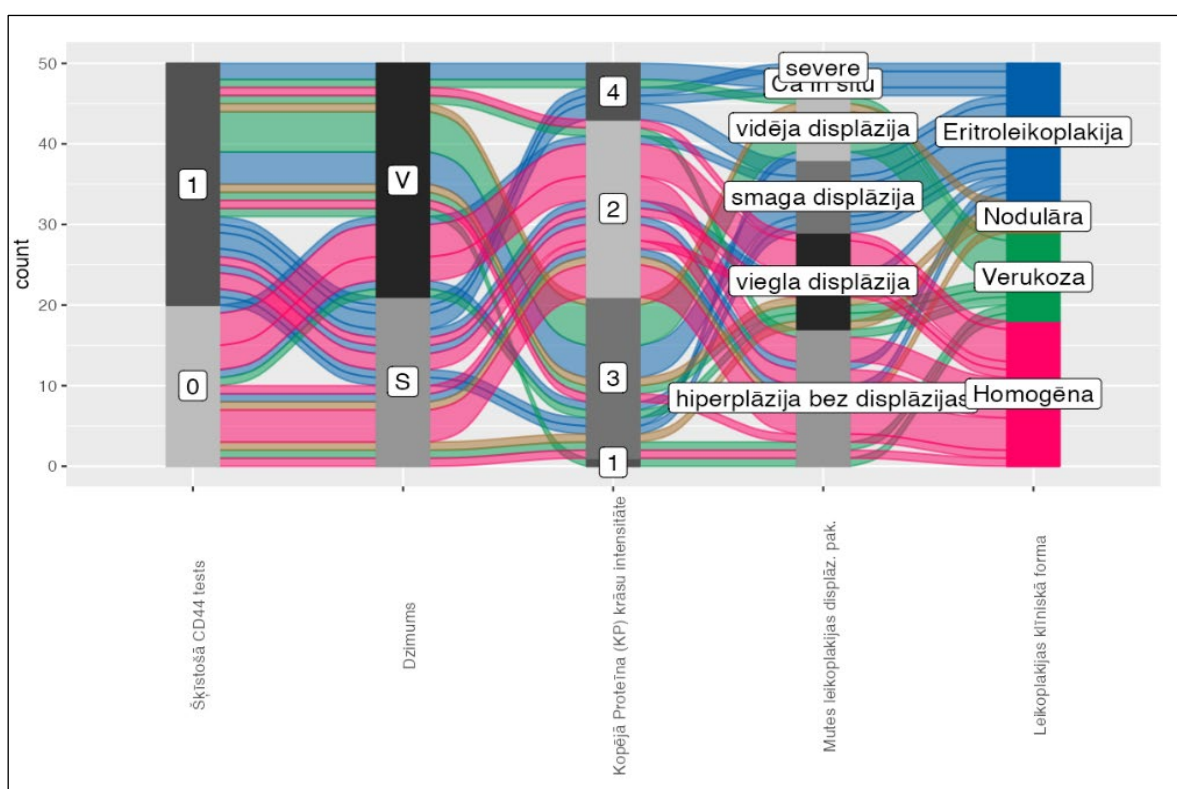
3.10. attēlā ilustrēta sapārotā korelācija starp kopējo proteīnu, šķīstošo CD44, vidējo CD44 ekspresēto epitēlija slāņu skaitu leikoplakijas audos un makrofāgu skaitu saistaudos starp kontroles grupu un pacientiem ar mutes leikoplakiju; $p < 0,0001$ norāda uz statistiski nozīmīgu atšķirību starp grupām.



3.10. attēls. Sapārotā lielumu salīdzinājums starp pacientiem ar normālu gļotādu un leikoplakiju

Statistiskais nozīmīgums (p, decimālskaitļi) noteikts ar grupveida ANOVA testu

Diagramma (3.11. attēls) demonstrē mūsu pētījumā iekļautu dažādu leukoplakijas klīnisko formu sakarību ar mutes leukoplakijas displāzijas pakāpi, kopējā proteīna krāsu intensitāti, dzimumu un šķīstošo CD44 (negatīvs – 0, pozitīvs – 1). Homogēnai leukoplakijai (rozā lente) vislielākā saistība ar hiperplāziju un vieglu displāziju, kopējā proteīna 2. pakāpes intensitāti un negatīvu šķīstošā CD44 testu. Nodulārai un verukozei leukoplakijai (zaļā lente) vislielākā saistība ar vieglu un vidēju displāziju, kopējā proteīna 3. pakāpes intensitāti un pozitīvu šķīstošā CD44 testu. Eritroleikoplakijai (zilā lente) vislielākā sakarība ar smagu displāziju un pozitīvu šķīstošā CD44 testu.



3.11. attēls. Mutes leukoplakiju pētāmo parametru atspoguļojums aluviālā diagrammā

Diagrammā salīdzinātie parametri: šķīstošā CD44 tests (1 – pozitīvs, 0 – negatīvs), dzimums (S – sieviete, V – vīrietis), kopējā proteīna krāsu intensitāte (1–4), mutes leukoplakijas displāzijas pakāpe (hiperplāzija bez displāzijas, viegla displāzija, vidēja displāzija, smaga displāzija, *Ca in situ*), leukoplakijas klīniskā forma (homogēna, verukoza, nodulāra, eritroleikoplakija)

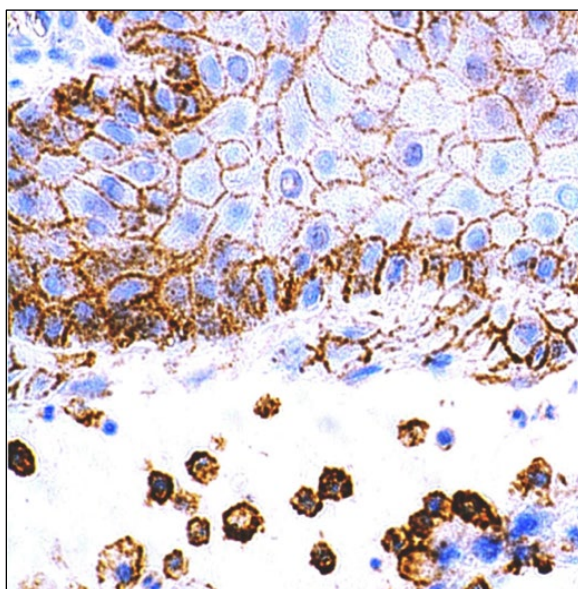
3.4.3. Mutes gļotādas plakanšūnu karcinomas

Pacientiem ar mutes gļotādas plakanšūnu karcinomu *OncAlert Cancer Rapid* tests uzrādīja 100 % pozitīvu šķīstošā CD44 atzīmi. 12 pacientiem noteica kopējā proteīna 3. pakāpes krāsu intensitāti, bet astoņiem – 4. pakāpes krāsu intensitāti.

3.5. Imūhistoķīmiskais CD44 antigēna raksturojums mutes gļotādas audos

3.5.1. Neizmainītas mutes dobuma gļotādas audi

CD44 antigēna ekspresija tika novērtēta veselas mutes gļotādas audos, kur neizmainītā mutes epitēlijā pozitīva CD44 proteīna ekspresija tika novērota vidēji piecos *str. basale* un *str. intermediale* šūnu slāņos, bet neekspresējās gļotādas augšējo slāņu epitēlija membrānās. Pozitīva CD44 proteīna ekspresija bija tikai šūnu membrānās. CD44 glikoproteīns tika konstatēts vidēji arī piecās mononukleārajās šūnās zem bazālās membrānas vienā redzes laukā 400× (3.12. attēls). Tika salīdzināta CD44 ekspresija trijos veselas gļotādas punktos (divi mikropreparāta malās, bet viens centrā). Normālā gļotādā CD44 ekspresija epitēlija citolemmā statistiski ticami neatšķīrās visos trijos audu parauga punktus.

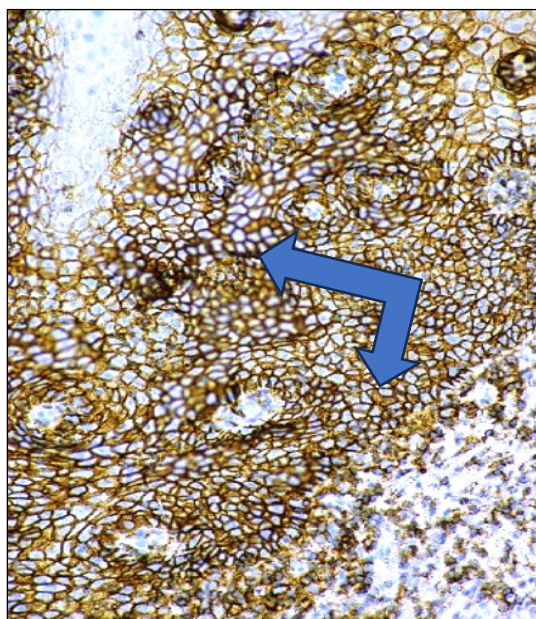


3.12. attēls. **CD44 antigēna ekspresija epitēlija membrānās un retās mononukleārajās šūnās zem bazālās membrānas veselā mutes gļotādā**

Imunoperoxidāze, anti-CD44, 400× palielinājums.
Attēla autore Madara Dzudzilo

3.5.2. Homogēnas un nehomogēnas leukoplakijas

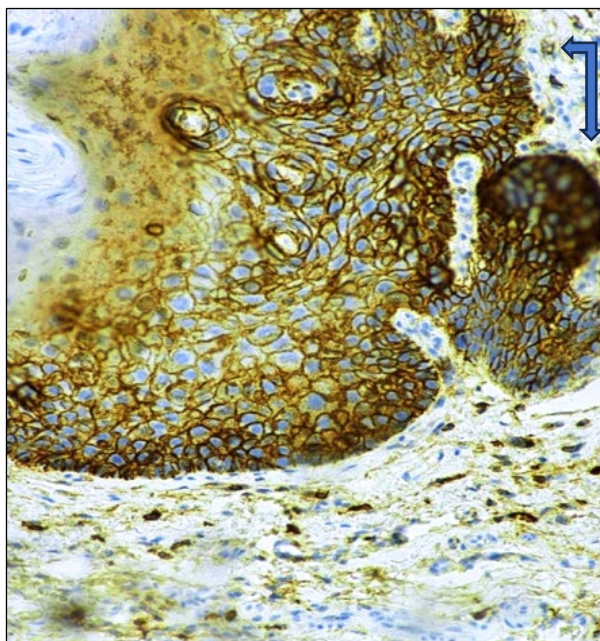
Homogēnas mutes leukoplakijās membranoza CD44 glikoproteīna ekspresija bija vidēji 19 epitēlija slāņu šūnu membrānās (3.13. attēls). Antigēna ekspresija statistiski ticami bija lielāka leukoplakijas malās ($p = 0,0224$), salīdzinot ar tās centru ($p = 0,0019$).



3.13. attēls. **CD44 antigēna ekspresija palielinātā epitēlija slāņu skaitā mutes leukoplakijā (bulta)**

Imunoperoksidāze, anti-CD44, 100× palielinājums.
Attēla autore Madara Dzudzilo

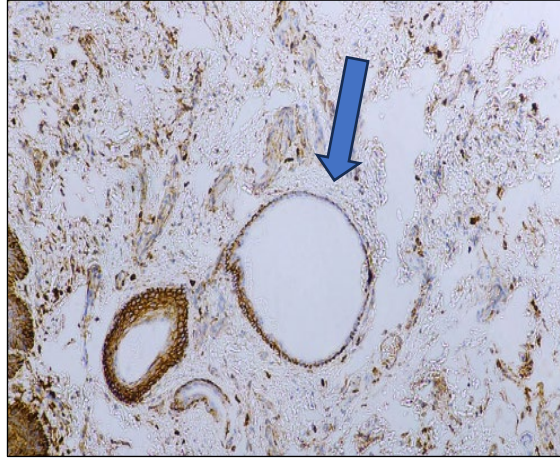
Nehomogēnās leukoplakijās CD44 proteīns ekspresējās vidēji 15 epitēlija slāņos, un 47 % no šīm leukoplakijām CD44 antigēns bija ne tikai epitēlija šūnas citolemmā, bet arī leukoplakijas epitēlija citoplazmā (3.14. attēls).



3.14. attēls. **CD44 glikoproteīna membranoza un intracitoplazmatiska ekspresija nehomogēnā mutes leukoplakijā (bulta)**

Imunoperoksidāze, anti-CD44, 200× palielinājums.
Attēla autore Madara Dzudzilo

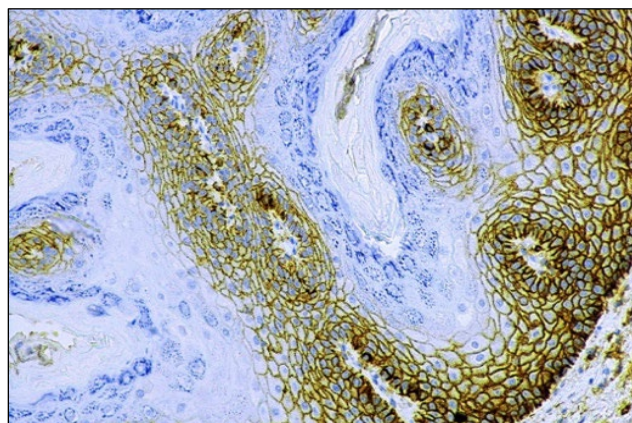
CD44 antigēna ekspresija tika konstatēta arī mazo siekalu dziedzeru acinuos un to izvados zem bazālās membrānas. Jāatzīmē, ka paplašinātos izvados ar atrofisku epitēliju CD44 proteīna ekspresija ievērojami samazinās (3.15. attēls).



3.15. attēls. **Dažāda CD44 antigēna ekspresija mazo siekalu dziedzeru acinuos un izvados mutes zemgļotādā (bulta)**

Imunoperoksidāze, anti-CD44, 100× palielinājums.
Attēla autore Madara Dzudzilo

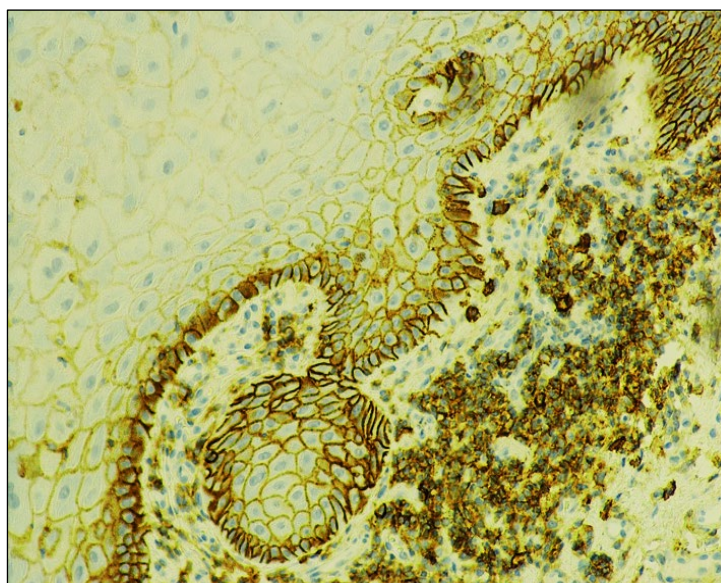
CD44 proteīns netika pierādīts ne šūnu membrānās, ne citoplazmā, kur mutes plakanajā epitēlijā bija keratohialīna granulas. Keratohialīna granulas, kā zināms, ir arī cieši saistītas ar tonofibrilām, un tās veicina agregāciju un šķērssaišu veidošanos starp keratinizētā slāņa citokeratīna pavedieniem. Mutes gļotādas mikropreparātos tās iekrāsojas spilgti zilā krāsā ar hematoksilīnu (3.16. attēls).



3.16. attēls. **CD44 antigēna ekspresijas iztrūkums plakanā epitēlija slāņos ar keratohialīno granulu klātbūtni**

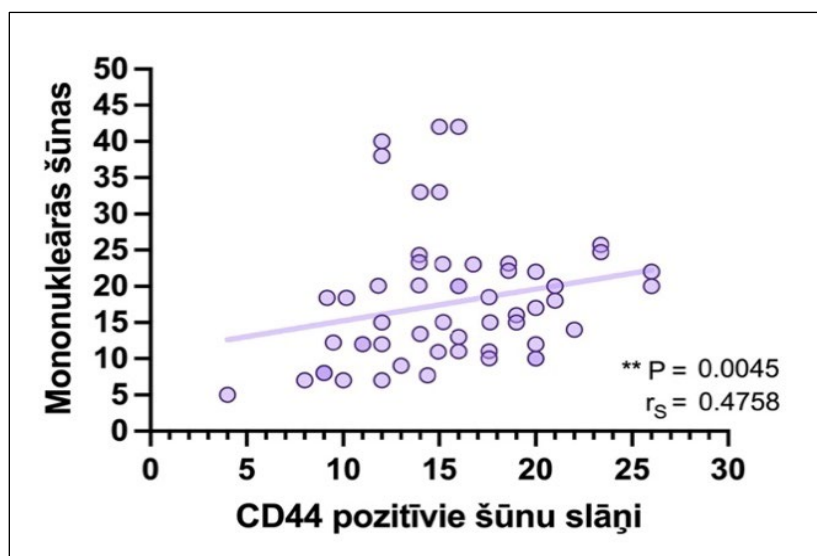
Imunoperoksidāze, anti-CD44, 200× palielinājums.
Attēla autore Madara Dzudzilo

Zem bazālās membrānas ML apvidū CD44 marķēto mononukleāro šūnu skaits vidēji bija 18 un starpība bija statistiski ticama ($p < 0,0001$), salīdzinot ar morfoloģiski neizmainītiem audu paraugiem ($p < 0,0001$). Mērena korelācija ($p = 0,0045$) bija starp CD44 pozitīvo epitēlija slāņu skaitu leukoplakijas centrālajā daļā un *lamina propria* gļotādas marķētajām stromas šūnām šajā daļā (3.17. attēls). Tika diagnosticēts, ka CD44 antigēns pastiprināti vienlaikus uzkrājas epitēlija membrānās un *lamina propria* šūnās.



3.17. attēls. **Liels skaits CD44 pozitīvu mononukleāro šūnu zem bazālās membrānas mutes leukoplakijas apvidū**

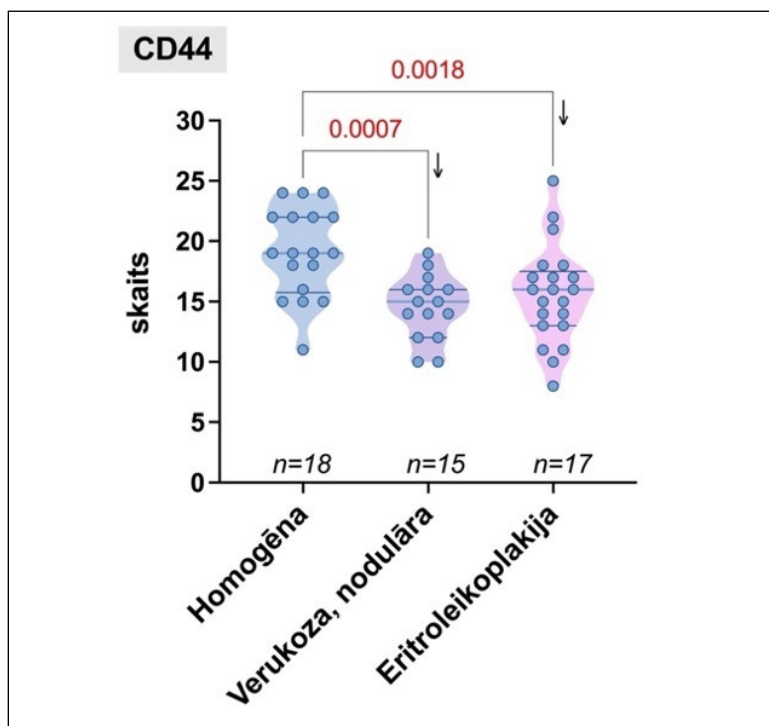
Imunperoksidāze, anti-CD44, 400× palielinājums.
Attēla autore Madara Dzudzilo



3.18. attēls. **Korelācija starp CD44 pozitīvo epitēlija slāņu skaitu un *lamina propria* gļotādas mononukleārajām šūnām leukoplakijas centrālajā daļā**

Neparametriskais Spīrmena tests:
 r_s – Spīrmena korelācijas koeficients

Salīdzinot mutes leukoplakijas klīnisko formu ar CD44 antigēna ekspresēto epitēlija slāņu vidējo skaitu tajās, tika pierādīta vāja korelācija starp šiem parametriem (3.19. attēls).

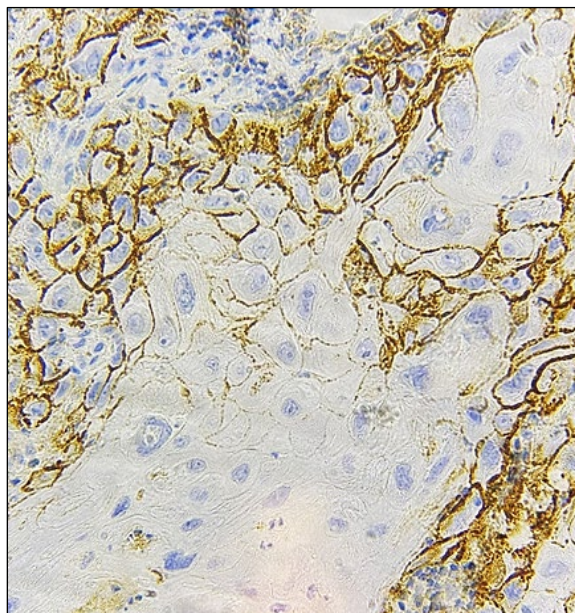


3.19. attēls. Vidējā CD44 marķēto epitēlija slāņu skaita salīdzinājums starp dažādiem mutes leukoplakijas veidiem

Statistiskais nozīmīgums (p, decimālskaitļi) noteikts ar ANOVA un tai sekojošo pēctestu (skat. materiālu un metožu sadaļā)

3.5.3. Mutes gļotādas plakanšūnu karcinomas

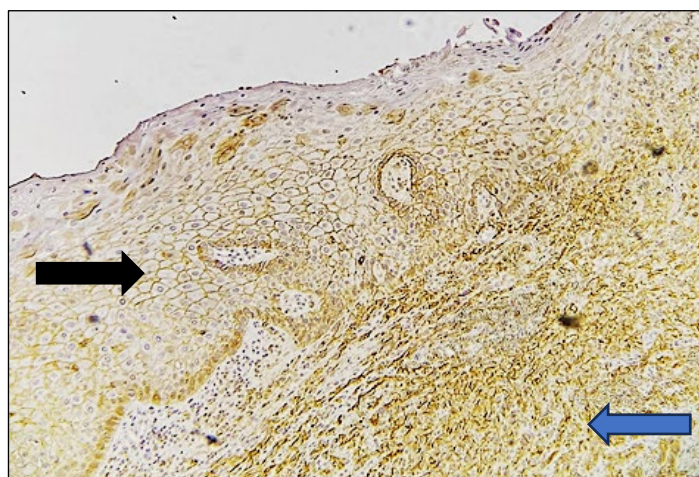
Tika analizēti salīdzinošās grupas 20 karcinomu gadījumi. Par pozitīvi marķētiem paraugiem tika uzskatīti audzēji, kuru centrālajā apvidū un invāzijas vietā CD44 ekspresija bija virs 10 %. Visās plakanšūnu karcinomās tika diagnosticēta CD44 antigēna klātbūtne, bet tā daudzums bija ļoti variabls – no 10 līdz 80 % no visām ļaundabīgajām šūnām. CD44 ekspresijas veids plakanšūnu karcinomas audos bija perēkļveidīgs (3.20. attēls).



3.20. attēls. CD44 antigēna membranoza ekspresija karcinomas šūnu grupu perifērijā, bet tās iztrūkums – vidū

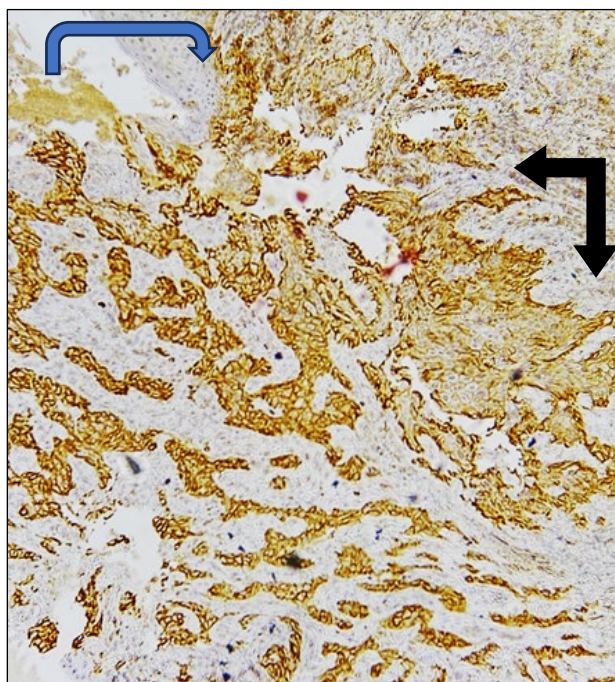
Imunoperoxidāze, anti-CD44, 400× palielinājums.
Attēla autore Madara Dzudzilo

Augstāk diferencētās karcinomās (G1 un G2) CD44 marķējums bija izteikti membranozs, kā arī tika diagnosticētas karcinomas šūnu grupas bez CD44 antigēna ekspresijas, tai skaitā epitēlija pārragošanās vietās, savukārt zemu diferencētās karcinomās (G3) CD44 glikoproteīns tika konstatēts gan karcinomu šūnu membrānās, gan ļaundabīgo šūnu citoplazmā (3.21. un 3.22. attēls).



3.21. attēls. CD44 glikoproteīna membranoza ekspresija hiperplazētā mutes gļotādas epitēlijā virs karcinomas (melna bulta), bet intracitoplazmatiska ekspresija ļaundabīgajās šūnās karcinomas invāzijā zem bazālās membrānas (zila bulta)

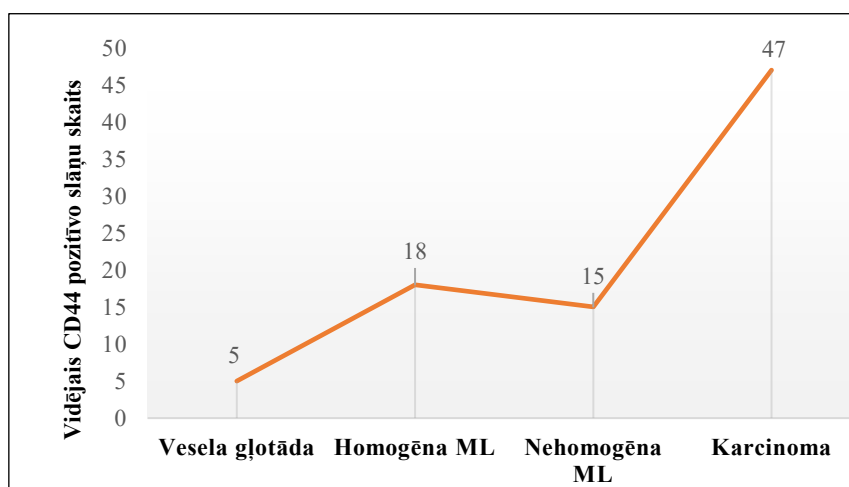
Imunoperoxidāze, anti-CD44, 100× palielinājums.
Attēla autore Madara Dzudzilo



3.22. attēls. **Mikroskopisks izčūlojums (zila bulta) mutes dobuma zemu diferencētas karcinomas virspusē (zila bulta) ar intracitoplazmatisku CD44 ekspresiju ļaundabīgajās šūnās (melna bulta)**

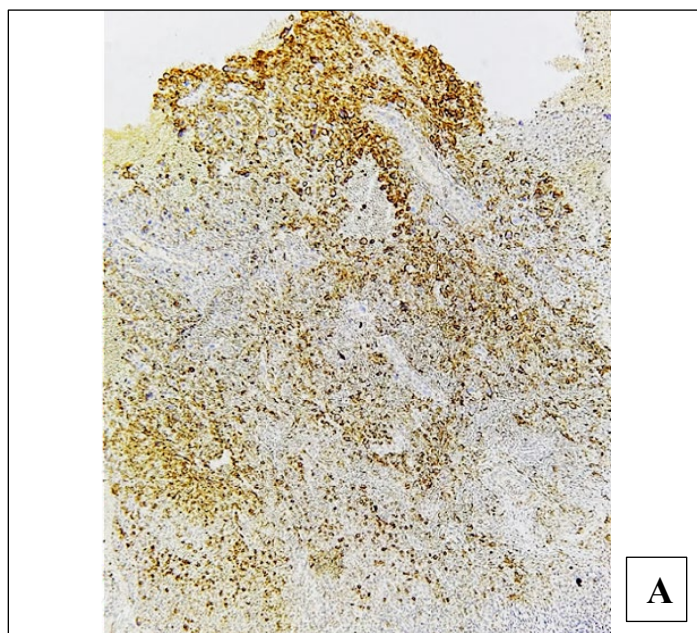
Imunoperoksidāze, anti-CD44, 100× palielinājums.
Attēla autore Madara Dzudzilo

Mūsu analizētajās karcinomās bija 200 un vairāk dezorganizētu atipiska epitēlija slāņu, un šo skaitli ietekmēja karcinomas T stadija un sevišķi audzēja invāzijas dziļums mutes dobuma zemgļotādā. Bet vidējais ar CD44 marķēto šūnu slāņu karcinomās bija 47 ± 8 . Salīdzinot CD44 ekspresiju neizmainītas gļotādas, mutes leukoplakiju un karcinomu paraugos (3.23. attēls), konstatējām, ka ir statistiski ticama atšķirība starp šiem trim lielumiem ($p < 0,0001$). Turpretī karcinomu malās ar CD44 marķēto epitēlija slāņu skaits neatšķirās no neizmainītas gļotādas.



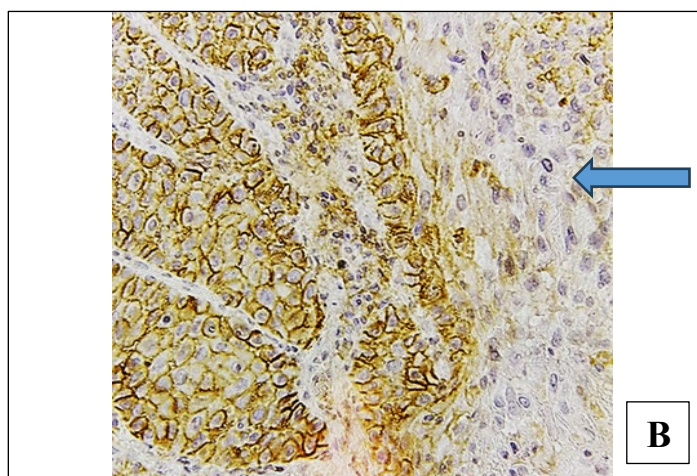
3.23. attēls. **Vidējais CD44 pozitīvo slāņu skaits veselā gļotādā, mutes leukoplakijās un plakanšūnu karcinomā**

CD44 glikoproteīns tika konstatēts arī mononukleārajās šūnās gan ap karcinomu, gan intratumorozi audzēja stromā. Reaktīvā reakcija ap audzēju un intratumorozā iekaisuma infiltrācija nekorelēja ar karcinomas *TNM* un G lielumiem ($p < 0,1$), iespējams, nelielā audzēju gadījumu skaita dēļ. Pastiprināta CD44 ekspresija bija arī iekaisuma šūnās izčūlojošu karcinomu virspusē gļotādas nekrozes vietās (3.24.A un B attēls).



3.24. A attēls. **CD44 proteīna ekspresija izčūlojošas karcinomas detrītā un iekaisuma šūnās**

Imunoperoxidāze, anti-CD44, 100× palielinājums.
Attēla autore Madara Dzudzilo



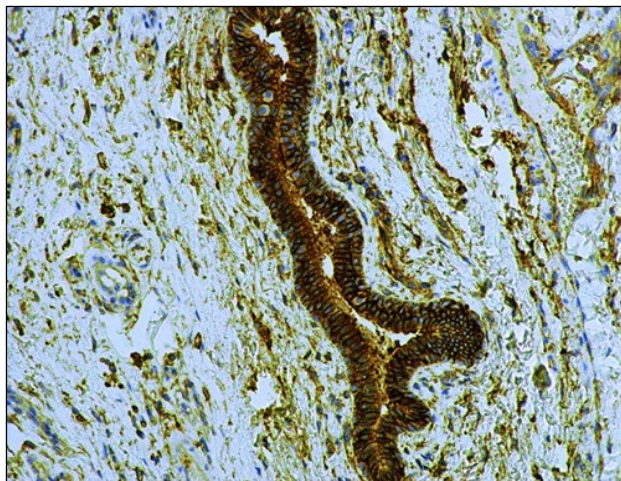
3.24. B attēls. **CD44 glikoproteīna membranoza ekspresija vidēji diferencētā plakanšūnu karcinomā un retās stromas šūnās peritumorozā zonā (bulta)**

Imunoperoxidāze, anti-CD44, 200× palielinājums.
Attēla autore Madara Dzudzilo

3.6. Imūnhistoķīmiskais CD9 antigēna raksturojums mutes gļotādas audos

3.6.1. Neizmainītas mutes gļotādas audi

CD9 antigēna ekspresija morfoloģiski neizmainītā mutes gļotādā bija tās apakšējā trešdaļā, bet neekspresējās gļotādas augšējās 2/3. Pozitīva CD9 proteīna ekspresija bija tikai šūnu membrānās. CD9 glikoproteīns tika konstatēts 3–8 mononukleārajās šūnās zem bazālās membrānas. CD9 proteīna ekspresija bija arī siekalu dziedzeru izvadu epitēlijā un mikrodaļiņās to lūmenā (3.25. attēls).

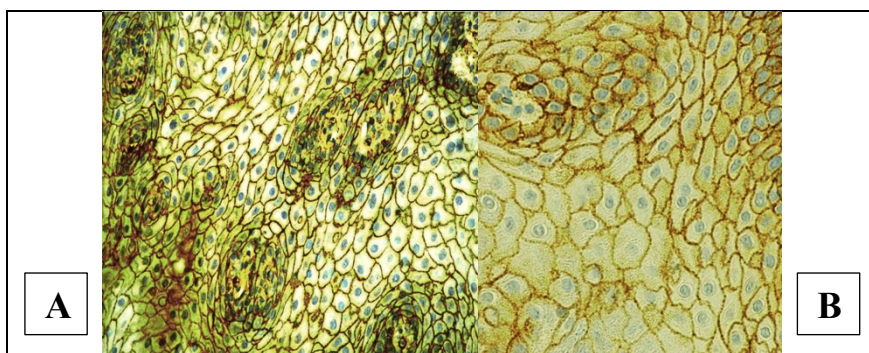


3.25. attēls. **CD9 antigēna ekspresija izvada epitēlijā un mikrodaļiņās tā lūmenā**

Imunoperoksidāze, anti-CD9, 200× palielinājums.
Attēla autore Madara Dzudzilo

3.6.2. Homogēnas un nehomogēnas leukoplakijas

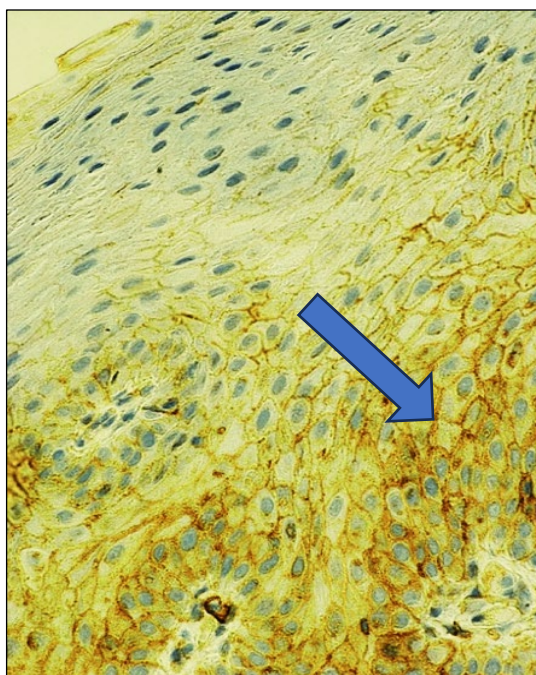
Mutes leukoplakijās CD9 ekspresija šūnu membrānās tika atrasta tajos pašos apvidos ar vienādu epitēlija šūnu rindu skaitu, kur ekspresējās CD44 antigēns. CD9 netika atrasts mutes leukoplakijas virsējos slāņos un rajonos ar keratohialīna granulām. CD44 ekspresijas zīmējums šūnas membrānā bija kā līdzena līnija, savukārt CD9 antigēna klātbūtne uzrādīja nelielus citolemmas sabiezējumus un membrānas nelīdzenumus (3.26.A un B attēls). Marķēto epitēlija slāņu skaits homogēnās leukoplakijas centrā bija 19, bet nehomogēnā – 16.



3.26. A un B attēls. **CD9 antigēna imūnhistoķīmiska vizualizācija epitēlija šūnu membrānās un tā eksosomās**

Imunoperoksidāze, anti-CD9, 200× un 400× palielinājumi.
Attēlu autore Madara Dzudzilo

Vieglas un vidējas displāzijas apvidos CD9 proteīna ekspresija citolemmā ir saglabāta, lai gan smagas un dažreiz arī vidējas displāzijas gadījumā diagnosticējām arī intracitoplazmatisko CD44 antigēna ekspresiju (3.27. attēls).



3.27. attēls. **CD9 antigēna ekspresija epitēlija šūnu membrānās un citoplazmā vidējas pakāpes displāzijas apvidū (bulta)**

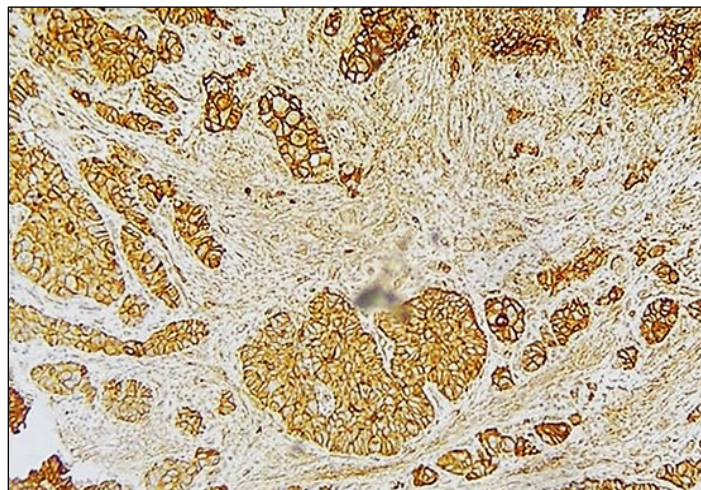
Imunoperoksidāze, anti-CD9, 200× palielinājums.
Attēla autore Madara Dzudzilo

3.6.3. Mutes gļotādas plakanšūnu karcinomas

No 21 mutes dobuma karcinomas ir izvērtētas 20, jo viens gadījums pēc morfoloģiskiem izmeklējumiem bija siekalu dziedzeru karcinoma ar ieaugšanu gļotādā. Divos audu paraugos operācijas materiālā diagnosticējām mutes leukoplakijas malignizāciju.

Salīdzinošās karcinomas grupas analīze pierādīja, ka CD9 glikoproteīna ekspresijas daudzums un veids bija ļoti variabls, tādēļ visus gadījumus pēc CD9 ekspresijas veida iedalījām trijās grupās:

- 1) saglabāta vai daļēji saglabāta membranozā ekspresija (n = 5) – 3.28. attēls;
- 2) CD9 ir pierādāms gan citolemmā, gan citoplazmas struktūrās (n = 7) – 3.29. attēls;
- 3) CD9 negatīvas karcinomas (n = 8) – 3.30. attēls.

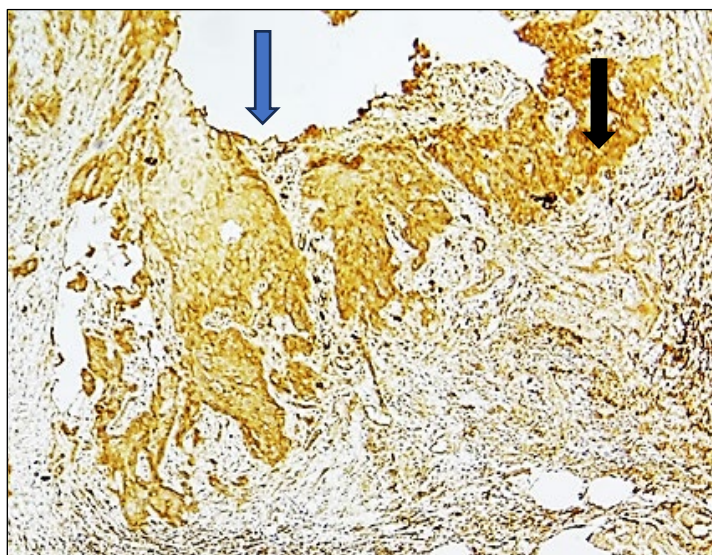


3.28. attēls. **CD9 antigēna ekspresija ļaundabīgo šūnu membrānās karcinomas invāzijas vietā zemglotādā**

Imunoperoksidāze, anti-CD9, 200× palielinājums.

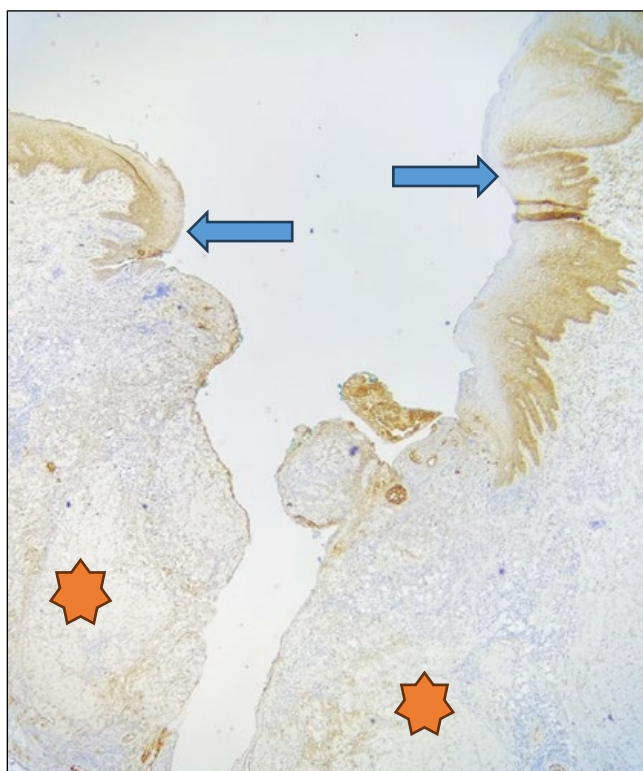
Attēla autore Madara Dzudzilo

Dažādo CD9 glikoproteīna ekspresijas veidu dēļ epitēlija slāņi vienā redzes laukā šīs grupas audu paraugos netika skaitīti. Kopējais CD9 antigēna ekspresijas daudzums vienā karcinomas paraugā, salīdzinot ar CD9 glikoproteīna daudzumu veselos audos un ML, ir kvantitatīvi palielināts uz ļaundabīgā audzēja invāzijas dziļuma un intracitoplazmatiskās ekspresijas rēķina, izņemot karcinomas grupu ar pilnīgu CD9 antigēna iztrūkumu.



3.29. attēls. **CD9 antigēna ekspresija karcinomas šūnu membrānās (zilā bultā) un to citoplazmā (melnā bultā)**

Imunoperoksidāze, anti-CD9, 200× palielinājums.
Attēla autore Madara Dzudzilo



3.30. attēls. **Absolūts CD9 antigēna ekspresijas iztrūkums karcinomā gar siekalu dziedzeru izvadu (zvaigznītes), bet proteīns labi vizualizējas karcinomas abās malās (bultas)**

Imunoperoksidāze, anti-CD9, 100× palielinājums.
Attēla autore Madara Dzudzilo

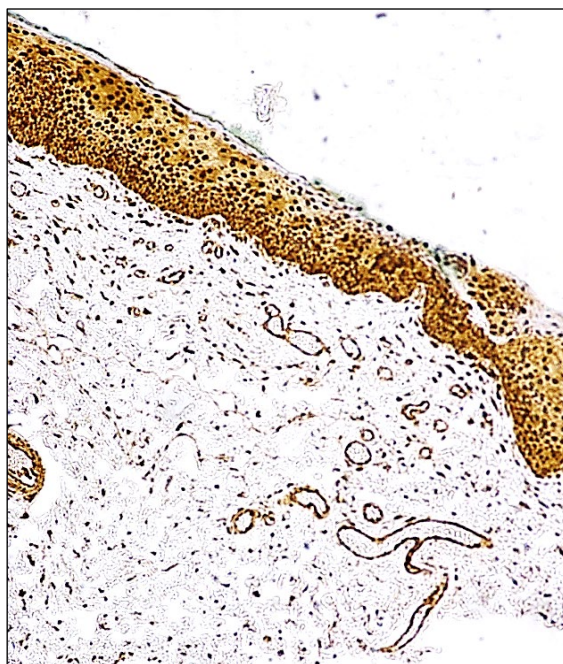
Analizētajā grupā bija neoplāzijas apvidi ar pilnīgu CD9 antigēna zudumu epitēlijā, bet saglabātu ekspresiju plazmas šūnu un limfocītu sakopojumos ap karcinomu. Atsevišķos

karcinomu gadījumos diagnosticējām CD9 ekspresiju audzēja augšdaļā, bet invāzijas virzienā antigēna daudzums samazinās.

3.7. Imūnhistoķīmiskais ThPOK antigēna raksturojums mutes gļotādas audos

3.7.1. Neizmainītas mutes gļotādas audi

Neizmainītā mutes gļotādas audos ThPOK antigēns ekspresējās visos mutes gļotādas līmeņos. Ekspresijas intensitāte svārstījās no vājas līdz vidējai, un to novēroja vidēji $27 \pm 5,6$ marķētos epitēlija šūnu kodolos vienā redzes laukā 400 reižu palielinājumā, un šo novērtējumu veicām dažādos gļotādas slāņos (3.31. attēls).



3.31. attēls. ThPOK antigēna ekspresija veselā mutes gļotādā

Imunoperoxidāze, anti-ThPOK, 100× palielinājums.
Attēla autore Madara Dzudzilo

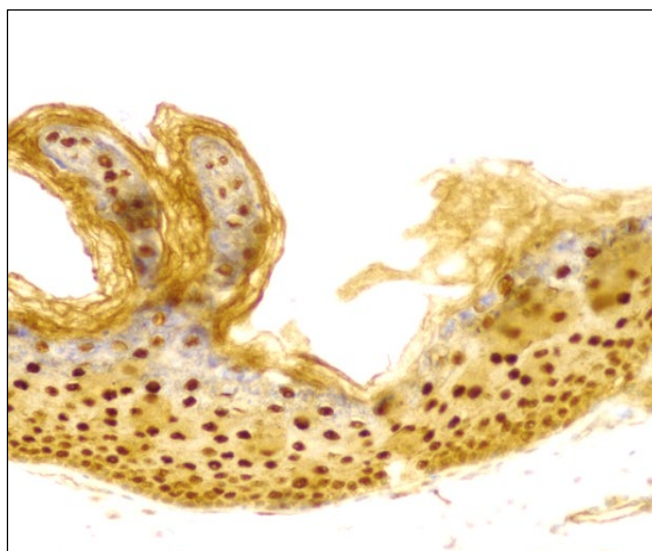
3.7.2. Homogēnas un nehomogēnas leukoplakijas

Mutes leukoplakijās ThPOK antigēnu konstatēja gan *str. basale*, gan *str. spinosum*, *str. granulosum* un *str. lucidum* (3.32. attēls). Ekspresijas intensitāte variēja no vājas līdz stiprai. ThPOK antigēna pozitīva imūnreakcija bija parakeratotiskajās epitēlija šūnās, bet izzuda *stratum corneum*. Mutes leukoplakijās ThPOK vislielākā proteīna ekspresija bija verukozo leukoplakiju displastiskajos rajonos, kuros arī tika diagnosticēta marķiera ekspresija plakanā epitēlija proliferātos tās virspusē (3.33. attēls). Vidējais epitēlija kodolu skaits ar ThPOK marķējumu leukoplakijās bija $43,7 \% \pm 9,4 \%$.



3.32. attēls. **ThPOK ekspresija mutes leukoplakijas audu *str. spinosum*, *str. granulosum* un *lucidum***

Imunoperoxidāze, anti-ThPOK, 100× palielinājums.
Attēla autore Madara Dzudzilo

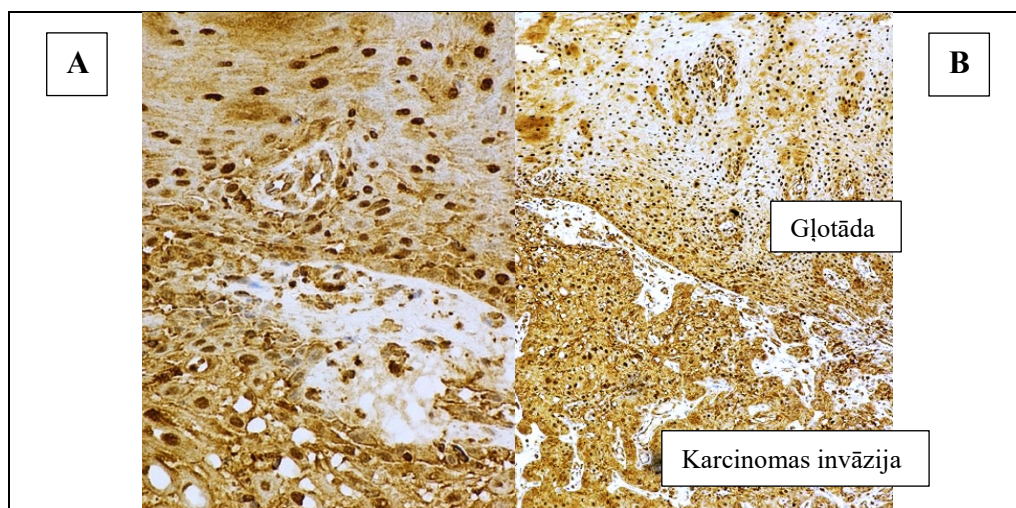


3.33. attēls. **ThPOK marķējums visā ML biezumā un epitēlija proliferātos gļotādas virspusē verukozā leukoplakijā**

Imunoperoxidāze, anti-ThPOK, 200× palielinājums.
Attēla autore Madara Dzudzilo

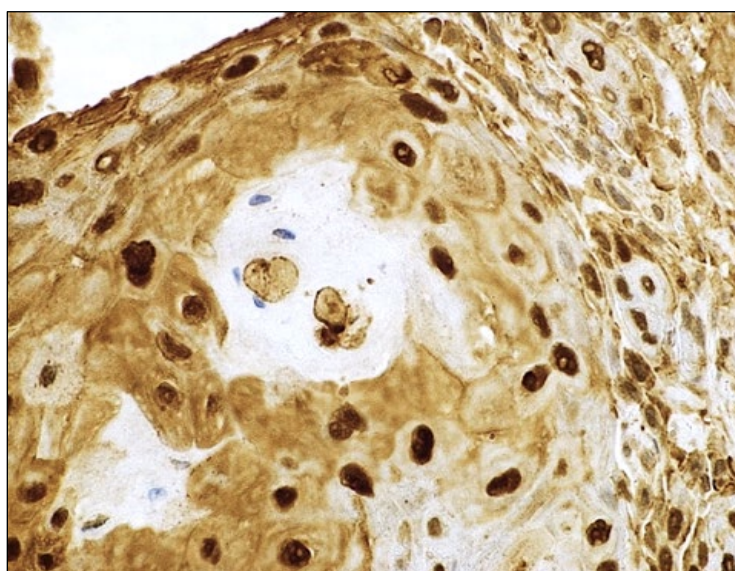
3.7.3. Mutes gļotādas plakanšūnu karcinomas

Mutes gļotādas plakanšūnu karcinomās ThPOK ekspresējās visā audzēja invāzijas dziļumā ar perēkļveida raksturojumu (3.34.A un B attēls). Tā ekspresijas intensitāte variēja no stipras līdz vājai, pārsvarā 2. līmenī. Pozitīvā imūnreakcija izzuda apoptotiskās šūnu grupās un karcinomas pārragošanās vietās (3.35. attēls).



3.34. A un B attēls. **ThPOK vidēja ekspresija gļotādā virs plakanšūnu karcinomas un tās invāzijas vietā**

Imunoperoxidāze, anti-ThPOK, 200× un 100× palielinājumi.
Attēlu autore Madara Dzudzilo



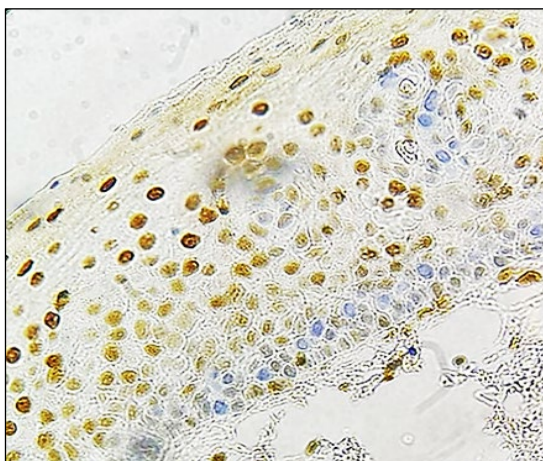
3.35. attēls. **ThPOK ekspresijas zudums mutes plakanšūnu karcinomas keratinizācijas apvidū un apoptotiskajās šūnās**

Imunoperoxidāze, anti-ThPOK, 400× palielinājums.
Attēla autore Madara Dzudzilo

3.8. Imūnhistoķīmiskais p27 antigēna raksturojums mutes gļotādas audos

3.8.1. Neizmainītas mutes gļotādas audi

Veselā mutes gļotādā p27 antigēns ekspresējās tikai epitēlija šūnu kodolos. p27 proteīns tika atrasts gandrīz visās šūnās *str. intermediale* un *str. superficiale*, bet netika atrasts *str. basale* (3.36. attēls). Vidējais p27 pozitīvo šūnu skaits salīdzinošā grupā bija 76 (63–99) vienā redzes laukā 400× palielinājumā.

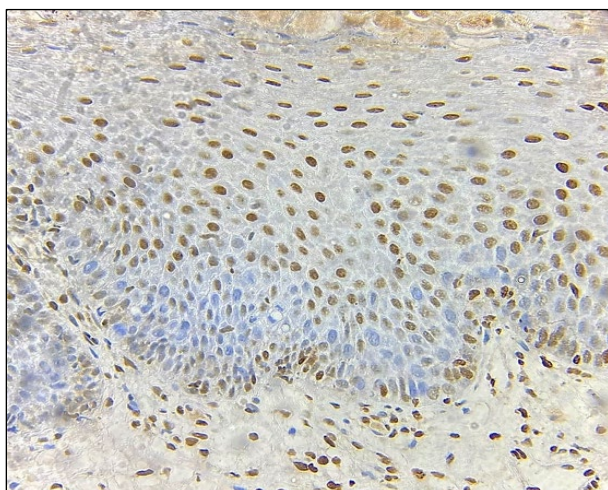


3.36. attēls. **p27 proteīna ekspresija iztrūkst veselas mutes gļotādas bazālajos slāņos**

Imunoperoksidāze, anti-p 27, 200× palielinājums.
Attēla autore Madara Dzudzilo

3.8.2. Homogēnas un nehomogēnas leukoplakijas

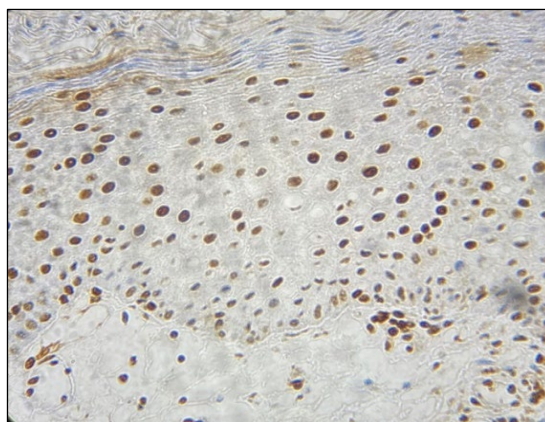
Abu veidu leukoplakijās vidējais p27 marķēto šūnu skaits vienā redzes laukā 400× palielinājumā bija 111 (79–160). Mutes homogēnās leukoplakijās p27 antigēns ekspresējās tikai epitēlija šūnas kodolā, un tas bija konstatēts tikai *str. intermediale* un *str. superficiale*. p27 proteīna ekspresijai bija viendabīgs raksturs, un kodola krāsojuma intensitāte viscaur bija līdzīga (3.37. attēls).



3.37. attēls. **p27 proteīna ekspresija nekeratinizētā epitēlija kodolos, pārsvarā homogēnas leukoplakijas virsējos slāņos**

Imunoperoksidāze, anti-p27, 200× palielinājums.
Attēla autore Madara Dzudzilo

Nehomogēnās leukoplakijās p27 proteīns ekspresējās *str. intermediale* un *str. superficiale* un daļā no *str. basalis* un *str. parabasalis* (3.38. attēls). Tika novērots p27 ekspresijas zudums epitēlijā ar keratohialīna granulām.

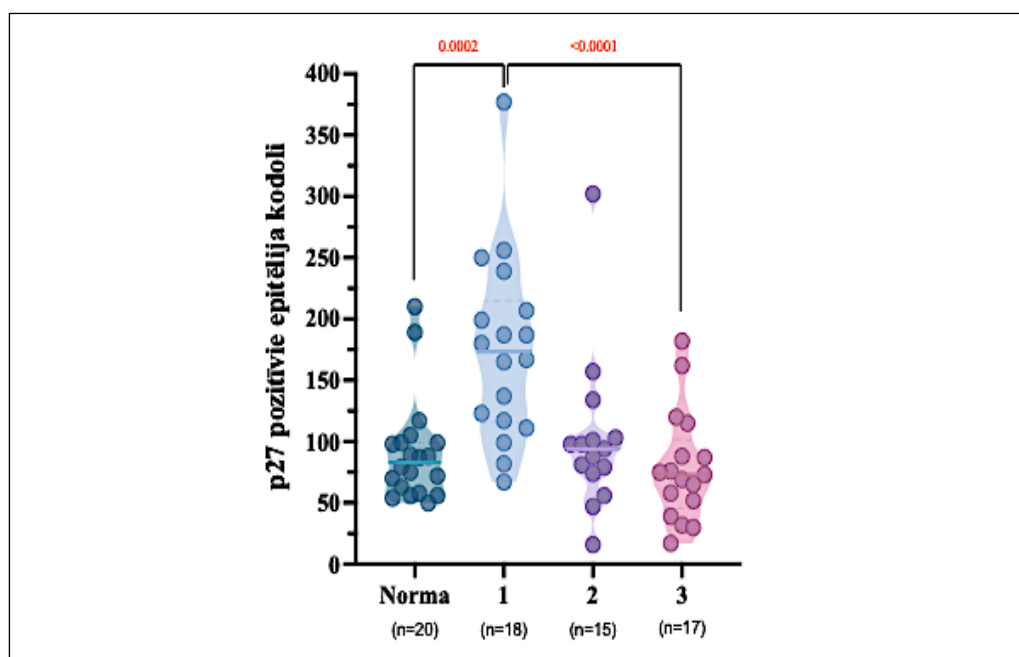


3.38. attēls. **p27 ekspresija nehomogēnas leukoplakijas visos tās slāņos ar vidēju epitēlija displāziju**

Imunoperoksidāze, anti-p27, 200× palielinājums.
Attēla autore Madara Dzudzilo

Verukoza un nodulārā leukoplakijā ar p27 antivielu marķēto epitēlija kodolu skaits (vidēji 105 (75–163)) bija mazāks nekā homogēnā leukoplakijā (vidēji 120 (99–187)), bet lielāks nekā eritroleukoplakijā (vidēji 75 (67–84)). Tika pierādīta statistiski nozīmīga atšķirība ($p = 0,0002$) starp p27 ekspresiju veselā gļotādā un homogēnā mutes leukoplakijā. Ņemot vērā mutes leukoplakijas veidu, statistiski nozīmīga atšķirība ($p < 0,0001$) bija starp homogēnu un

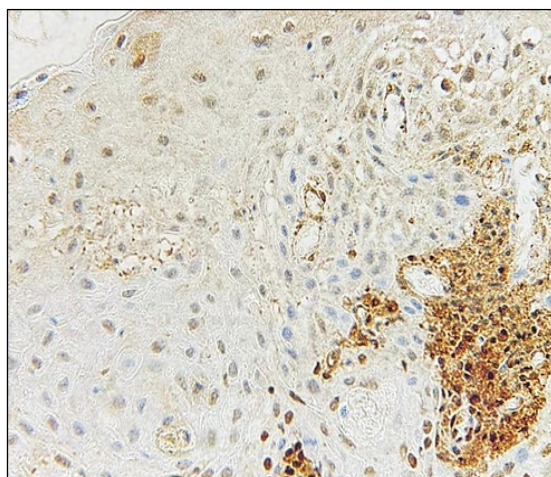
eritroleikoplakiju (3.39. attēls). p27 pozitīvu kodolu ekspresija samazinājās, pieaugot leukoplakijas klīniskās formas smagumam – vidēja negatīva korelācija $r_s = -0,352$ (Spīrmena rangu korelācijas koeficients).



3.39. attēls. **p27 ekspresija normālas mutes dobuma gļotādas (salīdzinošā grupa) un dažādu leukoplakiju epitēlija kodolos**

Leukoplakijas: 1 – homogēna, 2 – verukoza un nodulāra, 3 – eritroleikoplakija.
 Statistiskais nozīmīgums (p, decimālskaitļi) noteikts ar ANOVA un tai sekojošo pēttestu (skat. materiālu un metožu sadaļā)

Eritroleikoplakijās tika novērota mozaīkveida antigēna p27 nukleāra ekspresija. Antigēna p27 ekspresija parādās arī daļā no bazālā slāņa epitēlija kodoliem. Taču šajās ML p27 proteīns nereti tika konstatēts arī epitēlija citoplazmā (3.40. attēls). Vidēja pozitīva korelācija ($r_s = 0,340$) bija starp p27 pozitīvo kodolu skaitu un pacienta dzimumu – mediānais p27 pozitīvu šūnu skaits sievietēm bija 94 (75–114) un vīriešiem 127 (83–186).

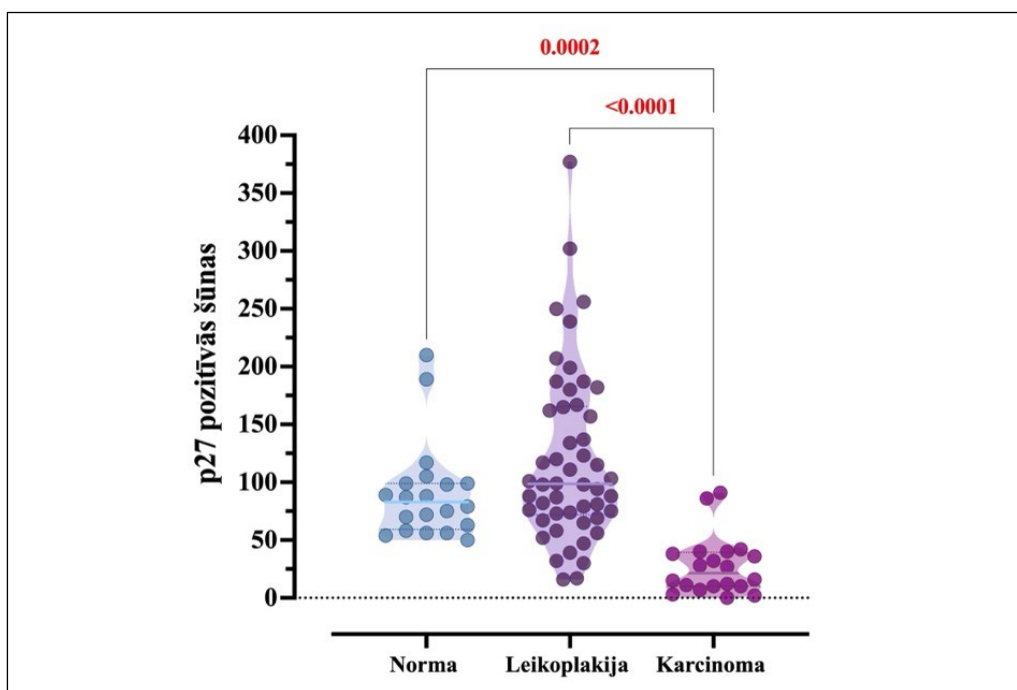


3.40. attēls. **p27 ekspresija nehomogēnas leukoplakijas epitēlija kodolos un citoplazmā**

Imunoperoksidāze, anti-p27, 200× palielinājums.
Attēla autore Madara Dzudzilo

3.8.3. Mutes gļotādas plakanšūnu karcinomas

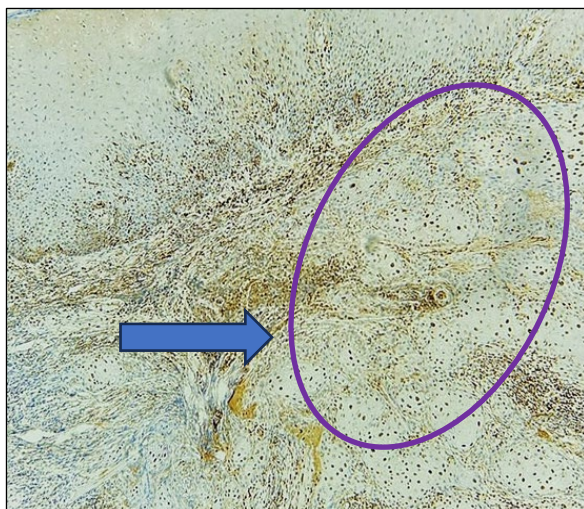
Vidējais p27 pozitīvu šūnu skaits plakanšūnu karcinomā bija 16 (10–36), kas bija ievērojami mazāks, salīdzinot ar kontroles grupu 79 (63–99) ($p = 0,0002$) un visiem leukoplakiju veidiem 111 (79–160) ($p < 0,0001$) (3.41. attēls).



3.41. attēls. **p27 antigēna ekspresija epitēlija kodolos neizmainītā mutes gļotādā, leukoplakijā un plakanšūnu karcinomā**

Statistiskais nozīmīgums (p , decimālskaitļi) noteikts ar ANOVA un tai sekojošo pēctestu (skat. materiālu un metožu sadaļā)

Plakanšūnu karcinomā nukleāra p27 ekspresija ievērojami samazinājās un perēkļveidīgi izzuda, bet paralēli tika pierādīta antigēna ekspresija karcinomas šūnu citoplazmā un arī tās stromā (3.42. attēls).

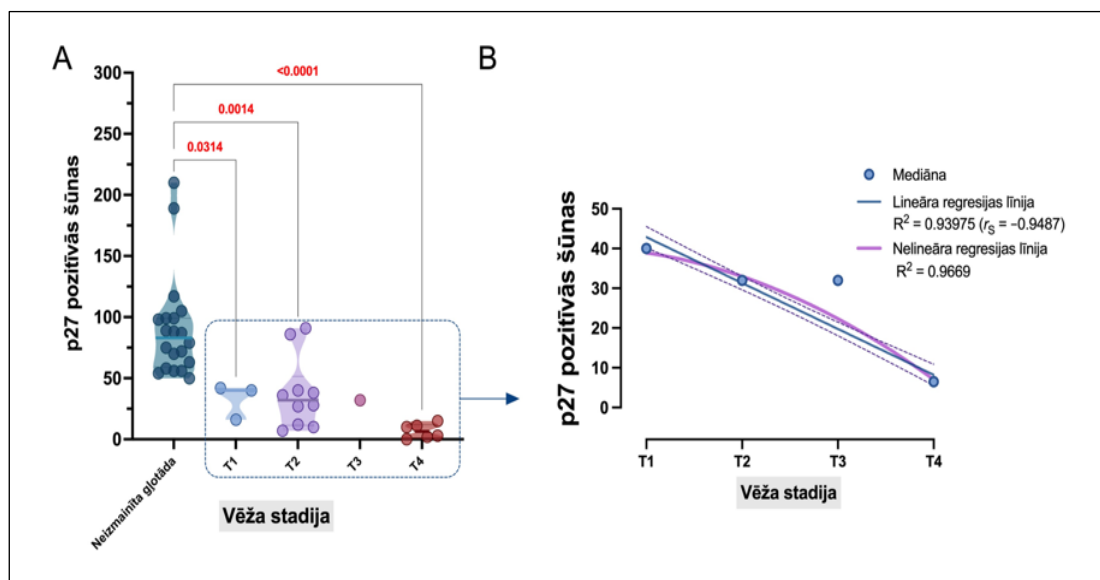


3.42. attēls. **p27 antigēna izzūdoša ekspresija mutes gļotādas plakanšūnu karcinomas šūnu kodolos (ovāls) zemgļotādā, bet šī proteīna klātiene karcinomas šūnu citoplazmā un arī tās stromā (bulta)**

Imunoperoksidāze, anti-p27, 100× palielinājums.
Attēla autore Madara Dzudzilo

Plakanšūnu karcinomā p27 proteīna ekspresijai ir mozaīkveida zīmējums un antigēna ekspresijas intensitāte vizualizējās no gaiši brūnas līdz tumši brūnai.

Analizējot lielāka izmēra mutes gļotādas plakanšūnu karcinomas operācijas materiālu attālākos apvidos no karcinomas, konstatējām palielinātu p27 proteīna ekspresiju bazālā slāņa cilmes šūnās, taču karcinomas invāzijas vietā ekspresija pakāpeniski izzuda. Konstatējām p27 antigēna ekspresijas daudzuma korelāciju ar karcinomas T-stadijām salīdzinājumā ar pacientiem ar normālu mutes dobuma gļotādu (3.43.A attēls). Korelācijas analīze ar lineāriem un nelineāriem rīkiem atklāja stipru negatīvu korelāciju ($r_s = -0,9669$) karcinomas stadijām (T). Šī saistība tika atrasta ar nelineāru kvadrātisko polinomiālo modeli – $R^2 = 0,9669$ (3.43.B attēls).



3.43. attēls. **A.** p27 antigēna ekspresija neizmainītas mutes gļotādas audos un audu paraugos ar dažādām karcinomas stadijām. **B.** p27 ekspresijas korelācija attiecībā uz karcinomas stadijām

Statistiskais nozīmīgums (p, decimālskaitļi) noteikts ar ANOVA un tai sekojošo pēctestu (skat. materiālu un metožu sadaļā); r_s – Spīrmena rangu korelācijas koeficients, R^2 – korelācijas koeficients kvadrātā.

Diskusija

Mutes dobuma plakanšūnu karcinoma veido 2,1 % no visiem ļaundabīgajiem audzējiem, un gada laikā to konstatē ap pusmiljonu cilvēku visā pasaulē (World Cancer Research Fund International, 2022). Mutes gļotādas karcinoma tiek diagnosticēta novēloti, bieži attīstās metastāzes kakla limfmezglos un attālos orgānos, kā arī recidīvi. Latvijā no šīs onkoloģiskās slimības gadā mirst 214–218 cilvēki (PVO, 2020). Tādēļ ir būtiski diagnosticēt un radikāli ārstēt mutes dobuma gļotādas priekšvēža procesus, kā arī pētīt to malignizācijas procesa celulāros un molekulāros mehānismus.

Biežākie mutes gļotādas potenciāli ļaundabīgie bojājumi ir mutes leukoplakija, mutes eritroplakija, mutes submukozā fibroze, mutes *lichen planus* un aktīniskais heilīts (Mello et al., 2018). Metaanalīzes ziņojumi liecina, ka mutes potenciāli ļaundabīgu veidojumu globālā izplatība ir 4,47 %. Visizplatītākie vēzdraudes veidojumi Rietumeiropā ir leukoplakija un mutes *lichen planus* (4,11 %) (Mello et al., 2018).

Mūsu pētījumā klīniski, morfoloģiski un imūnhistoķīmiski ir detalizēti analizētas homogēnas un nehomogēnas mutes leukoplakijas un to izmeklējumi salīdzināti ar veselu gļotādu un mutes gļotādas plakanšūnu karcinomām.

Eiropas valstīs un ASV mutes leukoplakija pārvēršas par mutes plakanšūnu karcinomu retāk nekā Āzijā (Alsalem, 2019; Narayan & Shilpashree, 2016; Speight et al., 2018). Svarīgi uzsvērt, ka potenciālie priekšvēža mutes dobuma bojājumi, kā arī šīs lokalizācijas ļaundabīgie audzēji pieder pašizmeklējamām neoplāzijām un pacientiem ir jāiesaistās mutes gļotādas vizuālo vai taustāmo izmaiņu noteikšanā. Būtiska loma diagnostikā ir dažādu subspecialitāšu ārstiem, kuriem ir jādiferencē leukoplakijas no citiem mutes dobuma “baltajiem” un “sarkanajiem” epiteliālajiem un neepiteliālajiem gļotādas bojājumiem. Tāpēc potenciāli ļaundabīgus mutes dobuma bojājumus apstiprina tikai biopsiju un operācijas materiāla mikroskopiskajos vai citoloģiskajos izmeklējumos.

Mūsu pētījumā iekļauto pacientu vecums bija diapazonā no 27 līdz 82, ar vidējo vecumu 57 gadi. Vidējo vecuma diapazonu no 56 līdz 58 gadiem savos pētījumos norādījuši arī citi autori (Evren et al., 2023; Gandara-Vila et al., 2018; Georgaki et al., 2021; Rubert et al., 2021; Venkat Naga et al., 2019).

Pētījumā pārsvarā dominēja vīrieši (attiecība pret sievietēm 1,3:1), kas saskan ar vairāku citu autoru datiem par lielāku ML izplatību vīriešu vidū (Dogenski et al., 2021; Ghazi et al., 2021; Neville & Day, 2002; Stojanov et al., 2024). Tomēr jāatzīmē, ka tajā pašā laikā lielā daļā rietumvalstu pētījumu tiek norādīts uz tendenci saslimstībai ar ML pieaugt sieviešu vidū (Evren et al., 2023; Georgaki et al., 2021; Napier et al., 2003; Rubert et al., 2021; Shavlokhova et al., 2021).

Iegūtos klīniskos rezultātus mēs salīdzinājām ar literatūras datiem, pamatojoties uz leikoplakijas klasifikāciju, kas ir izmantota rietumvalstu pacientu datu bāzēs, jo, salīdzinot ar Āzijas valstīm, mutes leikoplakijai var būt nedaudz citādas īpašības un prognoze atšķirīgu diētu, dažādu tabakas veidu lietošanas un, iespējams, ģenētisko atšķirību dēļ (van der Waal, 2018).

Mūsu pētījuma slimniekiem klīniski ML pārsvarā lokalizējās vaiga gļotādā ($n = 18$), tad mēles laterālajā un ventrālajā virsmā ($n = 17$). Citas skartās lokalizācijas bija mutes pamatnē, smaganas un lūpas gļotāda. Tomēr saskaņā ar literatūras datiem mēle (ventrālā un laterālā virsma) ir visbiežāk skartā lokalizācija (55,4 %), pēc tam vaiga gļotāda (13,8 %), mutes pamatne (8,8 %), smaganas (8,7 %), lūpa (4,1 %) un aukslējas (2,2 %) (Aguirre-Urizar et al., 2021; Nagao et al., 2016). Savukārt *Warnakulasuriya* un *Ariyawardana* (2018) sistemātiskajā pārskatā konstatēja, ka globālā mērogā vaigu gļotāda kopumā bija ML visizplatītākā vieta (18,4 %), tomēr tajā bija zemākais ļaundabīgās transformācijas līmenis (3,35 %). Savukārt mēlē lokalizējās 16,14 % ML, bet ļaundabīgas transformācijas (LT) līmenis sasniedza 24,22 %. Kā dominējošu ML lokalizāciju vaiga gļotādā savos pētījumos norādījuši arī vairāki citi autori (Bagan et al., 2022; Dogenski et al., 2021; Okut et al., 2019; Tovu et al., 2023). Atsevišķi autori (Abati et al., 2020; Tamatani et al., 2018) literatūrā norāda uz vairāku leikoplakiju esamību vienam pacientam. Mūsu pētījumā vairāku leikoplakiju klātbūtni novērojām tikai sešiem pacientiem.

Klīniski gadu desmitiem leikoplakijas tiek iedalītas homogēnās un nehomogēnās leikoplakijās, kur pēdējai raksturīgi dažādi apakštipi (van der Waal, 2018). Starp mūsu diagnosticētām leikoplakijām bija šādi leikoplakijas klīniskie varianti: homogēnas leikoplakijas ($n = 18$ (36 %)) un nehomogēnas leikoplakijas ($n = 32$ (64 %)). No nehomogēnām leikoplakijām tika noteiktas eritroleikoplakijas ($n = 17$), verukozas leikoplakijas ($n = 11$) un nodulāras leikoplakijas ($n = 4$). Literatūrā, Eiropas valstīs veiktajos pētījumos, homogēnās ML sadalījums svārstījās no 42 % līdz 82 % un nehomogēnās ML no 18 % līdz 58 % (Evren et al., 2023; Gandara-Vila et al., 2018; Jäwert et al., 2021; Rubert et al., 2021). Tomēr, piemēram, *Okut et al.* (2019) norāda uz nehomogēnas formas dominēšanu (64 %), salīdzinot ar homogēno. Autori savos pētījumos norāda arī uz atšķirīgu nehomogēnas leikoplakijas apakštipu diagnostiku. Piemēram, *Okut et al.* (2019) savā pētījumā pārsvarā konstatēja nodulāro formu – 18 (22,8 %), tad verukozo – 9 (11,4 %), savukārt *Rubert et al.* (2021) un *Tovu et al.* (2023) pētījumā dominēja verukozā forma, attiecīgi 39 (9,5 %) un 35 (29,2 %), tad eritroleikoplakija – $n = 12$ (10 %) – un nodulārā – 1 (10,8 %) (Tovu et al., 2023).

Leikoplakiju lielums var būt ļoti atšķirīgs. Mūsu pētījumā to diametrs variēja no 4 mm līdz 30 mm, ar vidējo lielumu $14 \text{ mm} \pm 3,7 \text{ mm}$. Leikoplakiju izmērs sievietēm bija mazāks – 5 mm, bet vīriešiem vidējais lielākais ML diametrs bija 27 mm.

Mutes leukoplakijas, lielākas par 2 cm, bija 44 % (n = 22) pacientu, taču jāuzsver, ka tās tika izoperētas un malignizācijas risks novērsts, jo saskaņā ar citu autoru pētījumiem ML, lielākas par 2 cm, ir izteikti potenciāli maligni veidojumi mutes gļotādā (Assimakopoulos et al., 2002; Holmstrup et al., 2006; Speight et al., 2018). *Rubert* (2021) savā pētījumā konstatēja, ka vidējais bojājuma diametrs bija $18,64 \pm 14,92$ mm, turklāt nehomogēnas leukoplakijas bojājumi bija ievērojami lielāki (vidēji 22,63 mm). *Brouns et al.* (2014) savā pētījumā 2014. gadā secināja, ka liels bojājuma izmērs (≥ 4 cm) ir vienīgais statistiski nozīmīgais ļaundabīgas transformācijas prognozētājs, tomēr 2023. gada pētījumā secināja, ka statistiski nozīmīga saistība starp bojājuma lielumu un L/T nav konstatēta (*Brouns et al.*, 2014). Mūsdiā, ir svarīgi ņemt vērā ne tikai potenciāli ļaundabīgā veidojuma diametru, bet arī tā biezumu. Biezākā mutes leukoplakijā ir traucēta epitēlija nobriešana un diferenciācija, sliktāka daudzo epitēlija slāņu asinsapgāde, mainīts šūnu cikls un biežāk izteikti organellu bojājumi, līdz ar to ir lielāka iespēja, ka attīstīsies un progresēs displāzija (*Brizuela et al.*, 2023; *Dzudzilo et al.*, 2021).

Mutes potenciāli ļaundabīgu veidojumu un audzēju vizuāli neredzamās, taču izmainītās robežas atšķiras pēc izmēra un ir neregulāras. Operācijas vietu nosaka 10 mm zonā no ārējās veidojuma robežas (ja to atļauj ML lokalizācija), taču tas nenodrošina 100 % bojājuma izņemšanu. Tādēļ tiek izstrādātas arvien jaunas izmeklēšanas un vizualizācijas metodes, kas ļautu ķirurgam precīzāk noteikt primārā veidojuma robežas pirms operācijas un/vai tās laikā (*Pošta et al.*, 2023). Viena no modernajām izmeklēšanas metodēm tika lietota arī mūsu pētījumā. Tiešā fluorescences metode ar *VELscope* ierīci ir skrīninga metode labākai potenciāli ļaundabīgu veidojumu novērtēšanai. *VELscope* apgaismojums izraisa endogēno gļotādā un submukozā esošo fluoroforu ierosināšanu, kas izstaro zaļo gaismu. Redzamais fizioloģiskās fluorescences zudums norāda uz epitēlija displāzijas izmaiņām, bet to var novērot arī hiperēmijas, traumatizācijas, hiperkeratozes un citu labdabīgu izmaiņu gadījumā, kas samazina metodes specifiskumu (*Elvers et al.*, 2015; *Koch et al.*, 2011; *Pošta et al.*, 2023). Arī mūsu kontroles grupas personām gļotādā konstatējām fluorescences zudumu zonās ar lokālu iekaisumu. Šīs metodes trūkums ir izmaiņu noteikšanas spēja tikai superficiālajos gļotādas slāņos. *Elvers et al.* pētījumā, tāpat kā mēs, atzīmēja fluorescences metodes nozīmīgumu mutes leukoplakijas robežu noteikšanā. Pētnieki pierādīja, ka mutes leukoplakijas vizuāli ir redzamas par 66 % mazākas, nekā tās vizualizējas caur *VELscope* ierīci (*Elvers et al.*, 2015). Veidojumu reālās robežas ir plašākas par vizuāli redzamajām. Savukārt *Amirchaghmaghi et al.* pētījumā par mutes plakanšūnu karcinomu izvērtēšanu ar *VELscope* ierīci nekonstatēja būtiskas krāsu intensitātes atšķirības audzējiem ar dažādu invāzijas dziļumu (*Amirchaghmaghi et al.*, 2023). Metodes jutīgums ir 70,19 %, bet specifiskums 65,95 % (*Cicciù et al.*, 2019), līdz ar to specifisku kritēriju trūkums ierobežo *VELscope* rezultātu interpretāciju.

Warnakulasuriya et al. (2016) konstatēja, ka noteicošie faktori, kas veicina ML ļaundabīgo potenciālu, ir pieaugošs vecums, sieviešu dzimums, leukoplakija, kas pārsniedz 200 mm² un pieder nehomogēnam tipam (piemēram, eritroleikoplakija), un ir ar pieaugošu displāzijas pakāpi (Warnakulasuriya et al., 2016). Aguirre-Urizar et al. (2021) uzskata, ka sieviešu dzimums, eritroleikoplakijas klīniskais tips un epitēlija displāzijas klātbūtne bija būtiski saistīti ar ĻT (Aguirre-Urizar et al., 2021). Tā kā mūsu pētījums norisinājās no 2016. līdz 2022. gadam, tad displāziju izvērtējumam ņēmām vērā 2017. gada PVO rekomendēto displāziju klasifikāciju. Tādēļ mēs izdalījām vieglu, vidēju un smagu displāziju. Jaunajā PVO Galvas un kakla audzēju klasifikācijā (*WHO Classification of Tumours, 5th Edition, Volume 9: Head and Neck Tumours, 2024*) ieteikts izdalīt tikai vieglu un smagu displāziju (WHO, 2024). Par to, ka displāziju vērtējumā ir mērķtiecīgi veikt detalizētu šūnu pārmaiņu aprakstu un izdalīt trīs displāzijas pakāpes, liecina arī pašreiz esošā COST projekta *Interceptor oral cancer*, Nr. CA21140 (2022–2026), mērķis pētīt agrīnās molekulārās pārmaiņas leukoplakijās tieši ar vieglas un vidējas displāzijas pazīmēm.

Līdztekus klīniskiem un vairākiem histopatoloģiskiem faktoriem ļaundabīgas transformācijas risks īpaši atkarīgs no displāzijas veida un pakāpes (Speight et al., 2018). Gandara-Vila et al. (2018) secināja, ka displāzijas klātbūtne ir vienīgais riska faktors, kas statistiski ir saistīts ar karcinomas attīstību (Gandara-Vila et al., 2018). Mūsu pētāmajā grupā displāziju konstatējām 66 % gadījumu, no kuriem 12 (24 %) bija vieglas displāzijas, 8 (16 %) vidējas un 13 (26 %) smagas pakāpes displāzijas. Pētījumi norāda, ka ĻT risks ir augstāks vidējas un smagas displāzijas gadījumā, salīdzinot ar vieglu displāziju un ML bez displāzijas (Iocca et al., 2020; Warnakulasuriya & Ariyawardana, 2016). Warnakulashuriya et al. (2011) pētījumā norādīts uz ĻT rādītājiem attiecīgi vieglas displāzijas – 4,8 %, vidēji smagas – 15,7 % – un 26,7 % smagas displāzijas gadījumā, apstiprinot, ka displāzijas smagumam ir nozīme karcinomas attīstības prognozē (Warnakulasuriya et al., 2011). Vairāki Eiropas valstu autori savos pētījumos norāda mutes epitēlija displāzijas klātbūtni: homogēnā leukoplakijā 8–40 % un 25–77 % nehomogēnā ML (Dost et al., 2013; Rubert et al., 2021; Speight et al., 2018). Smaga displāzija bija ievērojami biežāka pacientiem ar nehomogēniem bojājumiem (Rubert et al., 2021). To pašu varam apstiprināt arī mēs, jo smagas displāzijas klātbūtni (n = 13 (26 %)) mēs konstatējām tikai eritroplakijas gadījumā.

Mūsu pētījumā homogēnās leukoplakijās konstatējām hiperplāziju (n = 11 (34 %)) un vieglu displāziju (n = 7 (24 %)). Līdzīgu slēdzienu izdara arī Rubert et al. (2021) savā pētījumā, atzīstot, ka histoloģiski lielākā daļa bojājumu (n = 271; 65,7 %) neuzrāda displāziju, bet starp displāzijām (n = 141; 34,3 %) viegla displāzija ir visizplatītākā (n = 98; 23,8 %). Lielākajai daļai homogēno ML bojājumu epitēlija displāzijas nebija (92,5 %). Okut et al. (2019)

histoloģiski pārsvarā novēroja plakanā epitēlija hiperplāziju, kas mūsu gadījumā bija $n = 17$ (34 %) slimniekiem.

Tomēr jāatzīmē, lai gan ir virkne predisponējošu karcinomas attīstības faktoru, tas nenozīmē, ka homogēna leukoplakija vai leukoplakija bez displāzijas nevar pāraugt par karcinomu, uz ko īpaši norāda *Villa et al.* (2017). To pierāda 2022. gadā veiktais *Bagan et al.* pētījums, kurā secināts, ka 7,2 % no homogēnām leukoplakijām attīstījās par karcinomu un 7,7 % leukoplakiju bez displāzijas transformējās karcinomā, savukārt LT radās 25,9 % ar vieglu displāziju, 36,4 % ar vidēju displāziju un 50 % smagā formā.

Rietumvalstīs smēķēšana un alkoholisms ir galvenie riska faktori mutes priekšvēžu un ar laiku karcinomu attīstībā. Tas atšķiras no Dienvidāzijas un Klusā okeāna valstīm, kur beteļriekstu košļāšana un lapu smēķēšana ir galvenie faktori leukoplakiju un eritroplakiju, un mutes karcinomu attīstībā. Kā norādīts *Dogenski et al.* (2021) pētījumā, visticamākie etioloģiskie faktori bija smēķēšana (44,7 %) un alkohola lietošana (9,85 %). Mutes leukoplakijas, ko izraisa alkohola un/vai tabakas lietošana, ņemot vērā evolūcijas laiku, kas ir mazāks par 12 mēnešiem, parasti ir asimptomātiskas. Ir labi zināms, ka smēķēšana ietekmē arī mutes leukoplakijas mikrovidi. Tabakas dūmos esošās ķīmiskās vielas izraisa hronisku iekaisumu mutes gļotādā, kas veicina imūnsupresīvu mikrovidi. *Yagyuu* vadītā zinātnieku grupa (2021) pierādīja, ka nesmēķējošiem pacientiem ir mazāka iespēja iegūt mutes leukoplakiju nekā smēķējošiem indivīdiem (*Yagyuu et al.*, 2021). Tomēr, ja mutes leukoplakija attīstās nesmēķējošiem cilvēkiem, tad ļaundabīgas transformācijas risks ir lielāks. Tabakas smēķēšana ir viens no svarīgākajiem mutes karcinomas attīstības riska faktoriem neatkarīgi no tā, vai veidojas tāds priekšvēža veidojums kā mutes leukoplakija vai neveidojas.

Līdztekus tradicionāliem mutes karcinomu attīstības riska faktoriem nozīmīga iedarbība piemīt arī cilvēka papilomas vīrusiem (CPV) (*Barsouk et al.*, 2023). Saistībā ar jauno PVO 5. izdevuma Galvas un kakla audzēju klasifikāciju mutes dobuma plakanšūnu karcinomas tiek iedalītas ar CPV saistītās un nesaistītās. Ir jāatzīmē, ka mutes dobuma karcinomās CPV iesaisti novēro 6 % (*Katirachi et al.*, 2023), bet orofaringeālajās karcinomās līdz pat 70 % (*Timbang et al.*, 2019), tādēļ lielāka CPV loma ir orofaringeālās karcinomas attīstībā. Saskaņā ar jauno klasifikāciju līdzīgi tiek vērtēta arī CPV saistība ar mutes dobuma displāzijām. Tā kā mūsu pētījums norisinājās no 2016. līdz 2022. gadam, vadījāmies pēc displāziju un karcinomu rekomendētā iedalījuma Galvas un kakla audzēju klasifikācijas 4. izdevumā (*Head and Neck Tumours, 4th edition, 2017*) (*El-Naggar et al.*, 2017).

Neskatoties uz zobārstu, mutes medicīnas speciālistu, ģenētiķu, imunologu un patologu pētījumiem, mutes leukoplakiju malignizācijas process ir neapšaubāmi ilgstošs, daudzpakāpju, samērā pretrunīgs un ne līdz galam noskaidrots. Mutes vēždraudes veidojumu leukoplakiju

izpētei vēsturiski lietoti vairāki imūnhistoķīmiskie marķieri: p53, p16, Ki67, citokeratīni, vimentīns un citi (Cema et al., 1998; Choi et al., 2003; Kresty et al., 2008; Sridharan et al., 2016; Visioli et al., 2012).

Tas nozīmē, ka ir svarīgi identificēt citus marķierus, kas varētu liecināt par agrīnu molekulāru izmaiņu klātbūtni tādos vēždraudes audos kā mutes leukoplakija. Tādēļ izvēlējamies pētīt šūnu adhēzijas, cilmes šūnu, šūnu cikla un transkripcijas regulētāja proteīnus ar CD44, CD9, ThPOK un p27 biomarķieriem.

CD44 proteīns ir analizēts dažādu mutes gļotādas patoloģiju gadījumos vairāk nekā trīs gadu desmitus, taču jaunākie pētījumi par CD44 antigēnu mutes gļotādā ir kļuvuši aktuālāki, jo to var noteikt arī siekalās. Mūsu rezultāti pierādīja, ka, palielinoties kopējā olbaltuma līmenim, testa ierīces krāsa mainījās no dzeltenas līdz pat tumši zaļai, kas tika attiecīgi apzīmēts ar cipariem 1, 2, 3 un 4. Skaitļi norāda, ka *OncAlert® Oral Cancer Rapid* tests paver iespēju izteikties par zemu vai paaugstinātu iespējamu ļaundabīgas transformācijas risku leukoplakiju gadījumā. Tika konstatēta statistiski nozīmīga atšķirība starp augstāku kopējo proteīna līmeni siekalās un klīniski smagākām mutes leukoplakijas formām (nehomogēna forma, eritroleukoplakijas tips).

Mūsu pētījuma dati liecina par SolCD44 testa intensitātes palielināšanos gadījumos, kad CD44 antigēna ekspresija leukoplakijas audos bija ne tikai mutes epitēlija šūnu membrānā, bet arī tās citoplazmā, kā arī mononukleārās šūnās zem ML. Līdzīgus datus ieguva E. R. Cohena vadītā laboratorija (Cohen et al., 2020), imūnhistoķīmiski novērtējot CD44 ekspresiju mutes un orofaringeālā karcinomas gadījumā, kā arī SolCD44 mutes skalojumos, bet tas tika mērīts, izmantojot ELISA testa metodi. Autori konstatēja būtisku saistību starp SolCD44 līmeni siekalās un CD44 ekspresiju audos. Būtiskas korelācijas starp CD44 ekspresiju biopsijas paraugos un šķīstošā CD44 līmeni siekalās ir konstatētas arī mutes *lichen planus* pacientiem (Chaiyarit et al., 2008).

Novērtējot kopējā proteīna daudzumu, jāņem vērā, ka siekalas ir komplekss šķidrums, kas satur plašu biomolekulu spektru, piemēram, olbaltumvielas/peptīdus, nukleīnskābes, elektrolītus, hormonus gan no lokāliem, gan sistēmiskiem avotiem, fermentus, antivielas, pretmikrobu sastāvdaļas un citokīnus. Lielākā daļa siekalās esošo organisko savienojumu tiek ražoti lokāli siekalu dziedzeros, bet dažas molekulas no asinīm nonāk siekalās. Biomolekulas var iekļūt siekalās difūzijas, filtrācijas un/vai aktīvas transportēšanas ceļā (Wang et al., 2019). Kā jau minēts iepriekš, siekalās ir ne tikai sekrēts no lielajiem un mazajiem siekalu dziedzeriem, bet arī atslāņojušās epitēlija šūnas no normālas gļotādas un leukoplakijas audiem. Citi pētnieki ir akcentējuši SolCD44 un kopējā proteīna daudzuma nozīmi kā noderīgu diagnostikas marķieri

mates dobuma, galvas un kakla orgānu plakanšūnu karcinomai pirms patohistoloģiskās veidojuma verificēšanas (Metgud et al., 2014; Pereira et al., 2016).

Pašlaik ir tikai atsevišķas zinātnieku grupas, kuras izmanto *OncAlert® Oral Cancer Rapid* testu. Tomēr pētījumi ir vērsuši uzmanību uz to, ka SolCD44 palielināšanās siekalās norāda uz sākotnēju displāziju audos. *OncAlert®* testa lietotāji gan atzīmē, ka iekaisuma process gļotādas audos var izraisīt kļūdaini pozitīvus rezultātus (Franzmann & Donovan, 2018).

CD44-pan antigēns ir viena no adhēzijas molekulām, kas realizē šūnu savstarpējo mijiedarbību mates gļotādā, tai skaitā arī leukoplakiju gadījumā, taču ir pierādītas tā izmaiņas arī tādos procesos kā iekaisums, neoplāzija, autoimūnas slimības (Puré et al., 2001). CD44 proteīna molekulmasa ir 85–90 kad, un to veido 1–5 un 16–20 eksonu transkripcija. Mutes dobuma pētnieki galvenokārt uzsver CD44 lomu kā mates plakanšūnu karcinomas prognostisko faktoru. Dažas zinātnieku grupas ir atklājušas, ka CD44 pārmērīga ekspresija korelē ar plašāku metastazēšanos, lielāku T stadiju un zemāku diferenciācijas pakāpi – G (Negi et al., 2012; Ortiz et al., 2018), bet citi pētnieki uzsvēruši, ka samazināts CD44 daudzums nav saistīts ar mates karcinomas progresēšanu (Boxberg et al., 2018). Lielākā daļa autoru apraksta CD44 adhēzijas molekulas lokalizēšanos šūnu membrānās, un tikai daži ir diagnosticējuši tās ekspresiju citoplazmā (Groma et al., 2012; Kaza et al., 2018). Mutes leukoplakiju gadījumā rezultāti par CD44 antigēnu ir vēl pretrunīgāki, jo pētījumos ir izmantoti dažādi mikroskopa palielinājumi patohistoloģisko izmeklējumu laikā, rezultāti ir aprakstīti dažāda lieluma redzes laukos un izmantotas ļoti variablas antigēna ekspresijas vērtēšanas metodes. Mūsu pētījumā CD44 daudzumu izteicām ar marķēto epitēlija slāņu skaitu veselā mates gļotādā, ML un karcinomā, jo tas objektīvāk atspoguļo adhēzijas molekulu daudzumu dažāda biezuma leukoplakijās un mates karcinomās. Mūsu rezultātu statistiskā analīze pierādīja statistiski nozīmīgu atšķirību starp CD44 iezīmēto slāņu daudzumu normālā gļotādā un mates leukoplakijas audos. Tādēļ mēs iesakām šo CD44 proteīna izvērtēšanas metodi, lai labāk novērtētu CD44 ekspresiju potenciālu vēždraudes bojājumu un agrīnu mates dobuma karcinomu pētījumos. Mūsu pētījumā tika pierādīta CD44 intracitoplazmatiska imūnekspressija 47 % nehomogēnu mates leukoplakiju gadījumā, kā arī plakanšūnu karcinomās. Šāda netipiska CD44 lokalizācija ir atzīmēta pārsvarā pētījumos par mates plakanšūnu karcinomu (Khajuria et al., 2015). Autori šo ekspresijas vietu ir pieminējuši sakarā ar CD44 antigēna mijiedarbību ar šūnas citoskeletu (Harada et al., 2007; Miletti-González et al., 2012). Mūsaprāt, šis fakts, iespējams, parāda glikoproteīna CD44 ekspresiju mates leukoplakijas hiperplastiskā un displastiskā epitēlija bojātajos mitohondrijos, ribosomās, endoplazmatiskajā tīklā un/vai Goldži kompleksā, taču tas jāprecizē leukoplakiju elektronmikroskopiskajos izmeklējumos. Pēdējā desmitgadē CD44 antigēns ir nosaukts par dažādu orgānu cilmes šūnu marķieri (Jakovlevs et al., 2019; Pettersen et al., 2011; Tamatani

et al., 2018). Tādēļ ir skaidrs, ka CD44 glikoproteīnu pierādījām gan karcinomu, gan aktīvi proliferējošo, gan nobriedušo mutes gļotādas šūnu membrānās. Tomēr svarīgi uzsvērt, ka ir trīs veidu cilmes šūnas: embrionālās, nobriedušas un karcinomas šūnas. Mutes leukoplakijās un karcinomās, iespējams, ir nobriedušas un karcinomas cilmes šūnu varianti, ko tagad dēvē arī par audzēju iniciējošām šūnām (Venkat Naga et al., 2019).

CD44 intracitoplazmatisko ekspresijas modeli mutes epitēlijā var izmantot kā prognostisku faktoru nehomogēnas leukoplakijas iespējamai transformācijai agrīnā intraepiteliālajā karcinomā. Atšķirība starp nobriedušām cilmes šūnām un tā sauktajām vēža cilmes šūnām ir tik trausla, nestabila, un to ir grūti pierādīt tikai ar imūnhistoķīmiskiem izmeklējumiem, tāpēc mutes leukoplakiju izpēte jāpapildina ar to ģenētiskajiem izmeklējumiem (Ambele et al., 2020). CD44 antigēns var piesaistīt augšanas faktorus, hialuronskābi, kolagēnu, fibronektīnu un metaloproteināzes, un ir aprakstīta CD44 līdzdalība tādos procesos kā limfocītu un makrofāgu aktivācija, leukocītu agregācija (Alves et al., 2009; Gore et al., 2008). Svarīgi, ka mūsu rezultāti uzrādīja statistiski pierādītu atšķirību starp CD44 marķētu mononukleāro šūnu daudzumu normālos gļotādas un leukoplakijas audos. CD44 glikoproteīns tika konstatēts arī mononukleārās šūnās ap karcinomu, arī intratumorozi audzēja stromā, bet reaktīvā reakcija ap audzēju un intratumorozā iekaisuma infiltrācija nekorelēja ar karcinomas *TNM* un G lielumiem nelielā audzēju gadījumu skaita dēļ. Tika konstatēts palielināts mononukleāro šūnu (makrofāgu un limfocītu) daudzums zem bazālās membrānas mutes leukoplakijās salīdzinājumā ar normālu mutes gļotādu. Mūsu statistiskās analīzes dati pierādīja mērenu korelāciju starp CD44 pozitīvo mononukleāro šūnu daudzumu zem bazālās membrānas ar CD44 iezīmēto mutes epitēlija slāņu skaitu leukoplakijas centrālajā daļā, kur, visticamāk, ir visaktīvākā mijiedarbība starp šūnu adhēzijas molekulām gan epitēlijā, gan mezenhīmā. Vienlaicīga CD44 antigēna uzkrāšanās leukoplakiju un karcinomas epitēlija un stromas šūnās ir nodrošinājusi tā dalību vietējās imūnās reakcijās, ilgstošās epitēliāli mezenhimālās mijiedarbībās kā hialurona receptoru un antifagocītiskie proteīni.

Bez CD44 antigēna analīzes citolemmā tika izvērtēts arī tetraspanīns CD9 kā eksosomu marķieris. Lai gan pieaug interese par ekstracelulārajām vezikulām, kas ir pētītas mutes leukoplakijās, tomēr literatūrā ir pieejami tikai daži pētījumi par CD9 ekspresiju mutes dobuma priekšvēža bojājumos un epitēlija displāzijās (Li et al., 2019; Nankivell et al., 2013).

Lai pārbaudītu mūsu hipotēzi par tā līdzdalību divos svarīgos mutes dobuma gļotādas procesos, tika veikta CD9 antigēna analīze. Atklāts, ka šis virsmas proteīns piedalās vairāku šūnu, kā arī šūnu un ekstracelulārās matricēs mijiedarbībā, ļauj transportēt SolCD44 un citus šķīdumus uz mutes gļotādas virsmu. Tāpēc zinātniski un klīniski interesants ir atklājums, ka gan CD44, gan CD9 antigēni ekspresējas mutes gļotādas epitēlija šūnu membrānās gan veselā

gļotādā, gan mutes leukoplakijā, gan mutes plakanšūnu karcinomā. CD44 un CD9 ekspresijas modelis atšķirās: CD44 proteīns mutes gļotādas epitēlijā vizualizējas kā plāna, gluda līnija šūnu membrānā, savukārt CD9 membrānās ekspresējas kā izrobota līnija ar sabiezējumiem, kas var atbilst eksosomām/mikrovezikulām (Peng et al., 2020; Wang et al., 2019; Xiao et al., 2018). Mutes epitēlija CD9 pozitīvie mikroapgabali, iespējams, ir tā sauktie transporta vai kanālu proteīni un izskaidro šķidrums transportēšanas procesu gan veselā gļotādā, gan leukoplakijā, gan karcinomā. CD9 ir zināms arī kā starpšūnu komunikācijas mediators starp šūnām (Baghban et al., 2023; Xing et al., 2020), un, mūsaprāt, tas notiek arī starp ļaundabīgajām šūnām, izņemot mūsu pacientu grupu ar totālu CD9 zudumu 40 % karcinomu gadījumā.

Otrs CD44 un CD9 proteīnu paralēlās pētīšanas mērķis bija noskaidrot, vai CD9 ekspresija mainās mutes leukoplakijas malignizācijas procesā. Daļa zinātnieku norāda, ka CD9 ekspresijas samazināšanās korelē ar mutes leukoplakijas transformāciju ļaundabīgā procesā (Nankivell et al., 2013), turpretī 2019. gada *Wang* pētījumā (Wang et al., 2019) secināts, ka CD9 kavē potenciāli ļaundabīgu procesu progresēšanu. Mūsu rezultāti liecināja par CD9 marķēto epitēlija slāņu skaita samazināšanās tendenci nehomogēnās leukoplakijās, salīdzinot ar homogēnām. *Baghban* et al. (2023) ziņo pretēju teoriju, ka eksosomas var veicināt karcinomas šūnu izplatīšanos: karcinomas šūnas var atbrīvot eksosomas. Tās var palīdzēt sagatavot audzēja mikrovidi, lai tā būtu uzņēmīgāka pret metastāzēm. Piemēram, eksosomas var transportēt fermentus, kas palīdz noārdīt primāro audzēju aptverošo ekstracelulāro matrici, atvieglot vēža šūnu invāziju un izplatīšanos citās ķermeņa daļās (Baghban et al., 2023; Yousafzai et al., 2021).

Mutes leukoplakijās malignizācijas process neapšaubāmi ir lēns – saskaņā ar zinātnieku pētījumiem tas ilgst līdz pat septiņiem gadiem (Aguirre-Urizar et al., 2021; Mello et al., 2018), tādēļ sevišķi svarīgi ir bez citolemmas marķieriem izvērtēt kodolu izmaiņas ar imūnhistoķīmiskajām metodēm. No daudzām antivielām mutes leukoplakiju malignizācijas procesa izpētei mēs izvēlējāmies analizēt mazāk zināmo ThPOK un jau apbēto p27 proteīnu.

Viens no pretrunīgākajiem imūnhistoķīmiskajiem marķieriem ir ThPOK. Proteīns ThPOK 67 (angliski – ZFP67) ar cinka epitopiem sastāv no 539 aminoskābēm, un tā molekulārais svars ir 58/80 kDa. ThPOK klātbūtne ir būtiska citiem onkogēniem, lai ierosinātu karcinomas procesa sākšanos (Maeda et al., 2005). Šis proteīns regulē transkripciju un ir iesaistīts tādos bioloģiskos procesos kā DNS bojājumi, šūnu embrionālā attīstība, šūnas cikla kontrole, šūnu proliferācija un diferenciācija. Sākotnējie ThPOK pētījumi bija par lielo B-šūnu, folikulārām un nehodžkina limfomām (Jiang et al., 2019; Liu et al., 2014). Turpmākās publikācijas bija par ThPOK ekspresijas izpēti plaušu, aknu, krūts, olnīcu un prostatas karcinomās (Maeda et al., 2005; Zu et al., 2011). Piemēram, krūts karcinomā, iespējams, proteīns ar cinka epitopiem regulē vairāku gēnu ekspresiju, kas ir iesaistīti signālu nodošanas

un metabolos procesos, sekmējot audzēja augšanu un progresiju, jo ierosina apoptozi kavējošā proteīna survivina ekspresiju (Zu et al., 2011). Zinātnieku grupa *Jiao et al.* (2013) vadībā ir veikusi ThPOK ekspresijas pētījumu nazofaringeālas karcinomas šūnu kultūrās un audos, kur tika konstatēts, ka proteīna ekspresija bija ievērojami augstāka nediferencētas nepārragotas aizdegunes karcinomas audos, salīdzinot ar hroniska rinīta skarto gļotādu (*Jiao et al.*, 2013). Pašreiz zināms tikai viens pētījums par ThPOK ekspresiju mutes karcinomā (*Sartini et al.*, 2015), kurā autori salīdzināja marķiera ekspresiju normālā gļotādā un plakanšūnu karcinomas audos un konstatēja antigēna samazināšanos ļaundabīgajā audzējā. Publicētie dati ir pretēji ThPOK ekspresijas rezultātiem citas lokalizācijas karcinomās – krūts audzējos (*Zhang et al.*, 2018; *Zu et al.*, 2011), nazofaringeālās karcinomās (*Jiao et al.*, 2013), kur vairums zinātnieku atzīmēja ThPOK proteīna ar cinka epitopiem ekspresijas palielināšanos.

Mūsu analizētajā personu grupā ir pierādīts, ka ThPOK antigēns veselā mutes gļotādā un ML ir klātesošs visos gļotādas slāņos: gan bazālajos, kur ir aktīva šūnu dalīšanās zona, gan suprabazālajos, kur lokalizējas jau vairāk nobriedis epitēlijs. Mutes leikoplakijās ThPOK ekspresija bija kā hiperplāzijas, tā displāzijas vietās. Mums pieejamajā *PubMed* literatūras datu bāzē nav publikāciju par ThPOK ekspresiju ML. Marķēto kodolu skaita dinamika ir pieaugoša no neizmainītas gļotādas uz ML un uz salīdzinošo karcinomu grupu: attiecīgi $27 \pm 5,6$: $43 \pm 9,4$: $49 \pm 7,8$ ar statistiski ticamu atšķirību starp normu un ML, kā arī starp normu un karcinomu, bet bez statistiskas ticamības starp ThPOK ML un karcinomām, ko varētu izskaidrot ar transkripcijas īpašību izžušanu atipiskajās nediferencētajās plakanā epitēlija šūnās, kas vizualizējas ar perēkļveida antigēna izžušanu imūnhistoķīmiskajos preparātos. Taču nevaram būt vienisprātis ar *Sartini et al.* (2015) pētījuma rezultātiem, ka 36 % karcinomu gadījumu ThPOK ekspresija bija totāli negatīva, tātad iznāk, ka nenotiek transkripcija starp DNS un matrices RNS ļaundabīgajās epitēlija šūnās. Pēdējo piecu gadu pētījumi par ThPOK ir tendēti uz to, ka šis proteīns ļaundabīgajos audzējos biežāk darbojas uz imūnajām šūnām un tādējādi ietekmē jaunveidojuma prognozi (*Xia et al.*, 2021; *Yang et al.*, 2022).

Jāuzsver, ka mutes gļotādas epitēlijs ir ektodermāls, bet pārējie ir entodermālas izcelsmes, tādēļ nebūtu akadēmiski pareizi ThPOK izpētes rezultātus mūsu analizētajā grupā salīdzināt ar krūts, priekšdziedzera, kuņģa karcinomām vai limfomām, kur daļa rezultātu iegūti ar plūsmas citometrijas vai *Western Blot* metodēm. Daudzi *in vitro* un *in vivo* pētījumi apstiprina, ka ThPOK kontrolē galvenos eritroīdo, limfoīdo, osteoklastu, adipocītu, epitēlija un CNS šūnu “likteņa” lēmumus (*Lunardi et al.*, 2013), darbojoties gan kā onkogēns, gan kā onkosupresīvs aģents (*Constantinou et al.*, 2019; *Zu et al.*, 2011). Tieši šī proteīna ar cinka epitopiem duālā daba neļauj mums minēto antigēnu rekomendēt kā prognostisku marķieri mutes leikoplakiju malignizācijas procesā.

Otrs kodola marķieris, kuru analizējam mūsu pētījumā, bija p27 proteīns. Mūsu pētījuma rezultāti pierādīja, ka p27 antigēns atrodas diezgan plašā epitēlija spektrā: veselā mutes gļotādā, hiperplāzijas, displāzijas un mutes plakanšūnu karcinomas audos. Šajā pētījumā esam analizējuši p27 proteīnu homogēnā, nehomogēnā mutes leukoplakijā un salīdzinājam ar tā daudzumu karcinomas gadījumā. Ir maz pētījumu par p27 proteīna ekspresiju dažādos mutes leukoplakijas klīniskajos veidos ar precīzu tā kodolu imūnpozitivitātes aprēķinu, kā arī par p27 antigēna ekspresiju epitēlija citoplazmā ML un karcinomā (Kövesi & Szende, 2006; Queiroz et al., 2010; Vallonthaiel et al., 2016). Nehomogēnās leukoplakijas gadījumi kā galvenie potenciāli ļaundabīgie mutes veidojumi bija īpaši klīniski svarīgi, veicot detalizētu p27 proteīna daudzuma statistisko analīzi.

Lielākais p27 proteīna daudzums ir šūnu cikla stadijā 'G₁', lai realizētu ieeju 'S' fāzē, kur tiek veikta DNS replikācija un intensīva proteīnu sintēze. Mēs varam apgalvot, ka homogēnas leukoplakijas epitēlijā šūnu cikls ir neskarts, jo ļoti reti novēro displāzijas. Tātad, kamēr kodolā ir proteīns p27, mēs zinām, ka mutes epitēlijs augs un dalīsies kontrolētā veidā un notiks tā aprīte laikā, kas ir raksturīga katrai mutes gļotādas vietai. Pastāv statistiski nozīmīga atšķirība starp iezīmēto šūnu kodolu skaita pieaugumu veselā gļotādā un homogēnā leukoplakijā. Mūsaprāt, tas ir saistīts ar faktu, ka homogēnā leukoplakijā dominē hiperplastiski procesi un p27 proteīns joprojām darbojas kā audzēja nomācējs. Tomēr mēs nevaram piekrist autoriem, kuri secina, ka p27 ir izteikts nevis visos, bet tikai daļā leukoplakiju gadījumu, un parāda rezultātus procentos. Piemēram, dažādas pētnieku grupas norāda, ka p27 antigēna ekspresija svārstās no 40 līdz 78 % gadījumu (Kudo et al., 1998; Queiroz et al., 2010; Tsuzuki et al., 2003). Mēs apstiprinām, ka p27 proteīns ir sastopams visos veselās gļotādas, leukoplakijas un mutes karcinomu audu paraugos. Jautājums tikai, cik daudz ir šī proteīna, cik tas ir stabils un kur tas šūnā atrodas.

Mūsu pētījuma rezultāti liecina, ka p27 antigēnu ekspresējošo šūnu skaitam ir tendence samazināties no homogēnas uz nehomogēnu leukoplakiju. Tomēr statistiski nozīmīga atšķirība p27 ekspresijas ziņā ir novērota tikai starp homogēnu leukoplakiju un eritroleikoplakiju, bet ne ar citiem nehomogēnas leukoplakijas veidiem. Svarīgs ir fakts, ka normālā gļotādā un eritroleikoplakijā ir līdzīgs ar p27 marķēto šūnu skaits. Šajā gadījumā nav nepieciešams salīdzināt skaitļus, tomēr mēs vēlamies uzsvērt p27 ekspresijas lokalizācijas modeli eritroleikoplakijā: imūnpozitivitāte parādās gļotādas bazālajā slānī un displastisko šūnu citoplazmā, tāpēc skaitļu vērtības abos gadījumos kļūst līdzīgas. Jāpiebilst, ka ML virspusējās zonās ar keratinizāciju izzūd kodolu marķējums ar p27.

Vienlaicīga p27 samazināšanās šūnu kodolos un šī proteīna ekspresijas parādīšanās citoplazmā liecina, ka jau šajā potenciāli ļaundabīgajā bojājumā sākas p27 translokācija no

kodola uz citoplazmu, kas mūsu analizētajos karcinomu gadījumos bija ļoti izteikta. Vāja p27 antigēna ekspresija eritroleikoplakijas epitēlija šūnu citoplazmā ir skaidrojama ar makromolekulu un jonu migrāciju starp kodolu un citoplazmu caur kodola porām (Ibarra et al., 2015), tomēr olbaltumvielas tiek transportētas uz ribosomām, endoplazmatisko tīklu un Goldži kompleksu, kurā notiek aktīvs olbaltumvielu metabolisms (Zheng & Jiang, 2022).

Tā kā p27 ekspresiju leikoplakijās un karcinomās novērtējam trijos redzes laukos, mūsu un citu zinātnieku pētījumu rezultāti atspoguļo šī antigēna ekspresiju vienā histoloģiskā 4 mikronus biezā griezumā, bet ne visā patoloģiskā bojājuma apjomā, kurā p27 antigēna kvantitatīvais daudzums ir daudzkārt lielāks nekā šajos dažos redzes laukos. Tas jāņem vērā nākotnē, izstrādājot mērķa audzēju terapiju šūnu kultūrās, dzīvnieku modeļos un cilvēka audos ar jebkuru antigēnu. Mūsu atradei, ka karcinomas stadija (T 1, 2, 3, 4) ļoti cieši korelē dilstošā secībā ar p27 ekspresiju, ir svarīga klīniska un morfoloģiska nozīme. Tomēr katram pētniekam jāzina, ka T vērtības neatspoguļo ļaundabīgo audzēju apjomu/tilpumu, kas ir nozīmīgi individuālas audzēja mērķa terapijas gadījumā. Molekulārajā patoloģijā un mutes medicīnā precīzi jānošķir eksperimentālie un klīniskie pētījumi par šūnu cikla proteīniem, jo šūnu kultūru un dzīvnieku modeļu pētījumu rezultāti var būt nepamatoti un nebalstīti praktiskajā orālajā medicīnā (Sato et al., 2016; Vairaktaris et al., 2007).

Mēs esam analizējuši p27 ekspresiju ne tikai dažādu klīnisko variantu leikoplakijā, salīdzinājām arī rezultātus ar mutes karcinomas grupu. Mutes dobuma plakanšūnu karcinoma 40 % pacientu tika diagnosticēta vēlīnās stadijās (III un IV-a) ar izplatīšanos limfmezglos. Informācija par p27 mutes gļotādas karcinomas gadījumā ir pretrunīga, jo pēdējās divās desmitgadēs parādījās pilnīgi pretēji rezultāti: dažas pētījumu grupas ir guvušas rezultātus par palielinātu p27 proteīna daudzumu (Hashmi et al., 2019; Mineta et al., 1999), savukārt citas – par samazinātu šī antigēna ekspresiju (Kudo et al., 1998; Shintani et al., 2002). Pretējus rezultātus var skaidrot ar dažādām metodēm, kas izmantotas p27 ekspresijas aprēķināšanai, lai gan tika izmantota viena un tā pati anti-*p27* antivielas. Mūsu pētījumā p27 antigēnu iezīmēto šūnu daudzums mutes karcinomas gadījumā samazinājās 4,7 reizes, salīdzinot ar eritroleikoplakiju, septiņas reizes – ar homogēnu leikoplakiju un 4,8 reizes salīdzinājumā ar veselu gļotādu. Tomēr statistiski nozīmīga p27 daudzuma atšķirība tika novērota starp mutes karcinomu un veselu gļotādu, kā arī starp mutes plakanšūnu karcinomu un visām leikoplakijām. Mūsu mutes karcinomas gadījumos intracitoplazmatiskā imūnpozitivitāte p27 bija daudz izteiktāka nekā eritroleikoplakijās. Arvien vairāk patoļu p27 atrašanās vietu citoplazmā ļaundabīgos audzējos vērtē kā onkogēnu, taču daži pētnieki šo faktu neņem vērā (Ramasubramanian et al., 2013). Mēs tam nepiekrītam, jo p27 proteīns visur tiek pierādīts ar standarta imūnhistoķīmisko metodi kā proteīns ar molekulmasu 16,5 kDa, tas sastāv no 156 aminoskābēm un tam ir tāda

pati funkcija. Ir vispārzināms, ka šūnā ir 20 dažādas aminoskābes, kuras var denaturēties un zaudēt normālu aminoskābju secību. Aminoskābju secības traucējumi ir atbildīgi par tās funkciju novirzēm kodolā un citoplazmā.

Jau vairākus gadus medicīnas literatūrā ir atrodama informācija, ka no ciklīna atkarīgais kināzes inhibitors p27 ir audzēja nomācējs, tomēr tas var darboties arī kā onkogēns citoplazmā (Sharma et al., 2016; Vallonthetaiel et al., 2016). Mūsu pētījums pierāda, ka p27 daudzums mutes karcinomā pakāpeniski izzūd. Mūsaprāt, pakāpeniska p27 izzušana no kodola ietekmē centrosomu aktivitāti un izkropļo pareizu epitēlija šūnu dalīšanos. Tātad p27 proteīns ir audzēja veicinātājs, bet diezgan nestabils onkogēns. Proteīna p27 mainīgā ekspresija apgabalā, kas atrodas blakus audzējam un tā centram, norāda uz šī antigēna duālo raksturu audos, kuri atrodas pat dažu milimetru attālumā.

No otras puses, pamatojoties uz citu pētnieku datiem, mēs redzam, ka p27 vietā ļaundabīgos audzējos tiek diagnosticēti p57, p63, p73 un citi proteīni. Piemēram, p73 molekulmasa ir 77 kDa ar 636 aminoskābēm. Tātad iespējams, ka aminoskābes pārgrupējas un veido citus proteīnus. Pētnieki p27 antigēnam ir piešķīruši nosaukumu “būtiski nestrukturēts proteīns” vai “mīklains proteīns”, un galvenokārt genoma analīžu progresa dēļ CDKN1B p27Kip1 notiek kodējošā gēna lomas audzēja veidošanā pārvērtēšana (Bencivenga et al., 2017). Acīmredzot p27 proteīna bioķīmiskā struktūra ir trausla, un ir iespējams, ka šie proteīni pārvēršas viens par otru, par ko liecina daudzas publikācijas par p14, p16, p21, p27, p53, p73 un citu antigēnu ekspresijas izmaiņām mutes dobuma priekšvēža un ļaundabīgo procesu plakanšūnu epitēlijā (Cema et al., 1998; Choi et al., 2003; Kresty et al., 2008; Sridharan et al., 2016; Visioli et al., 2012).

Mūsu pētījuma imūnhistoķīmiskā daļa par mutes dobuma gļotādas plakanšūnu karcinomas grupas salīdzināšanu ar mutes leikoplakijām par kodolu un citolemmas marķieriem pierādīja CD44, CD9, ThPOK un p27 izmaiņas epitēlijšūnu nobriešanas un dediferenciācijas procesos abos veidojumos. Tieši CD44 un p27 antigēnu ekspresijas rezultātu salīdzinājums deva mums iespēju secināt, ka abiem proteīniem piemīt spēja mainīt savu lokalizāciju starp citolemmu, citoplazmu un kodolu gan nehomogēnajās ML, gan mutes gļotādas plakanšūnu karcinomās. Savukārt CD9 antigēna izpēte atklāja tā nozīmi siekalu un citu mikrodaļiņu transportēšanā ar eksosomām. Bet CD9 proteīna zudums 40 % analizēto karcinomu gadījumā varētu norādīt uz ļaundabīgā procesa progresēšanu (Baghban et al., 2023; Wang et al., 2019). Transkripcijas faktora ThPOK analīze sniedza maz informācijas par šī antigēna nozīmi mutes gļotādas malignizācijas procesu izpētē un arī pašas karcinomas dažādajās diferenciācijas pakāpēs. Bet neapšaubāmi vērtīga bija atrade par analogām imūnhistoķīmiskajām izmaiņām gan ML, sevišķi to nehomogēnajā klīniskajā variantā, gan mutes dobuma plakanšūnu karcinomās.

Mūsu pētījumā tika izmantotas visas RSU Stomatoloģijas institūta Mutes medicīnas centrā (MMC) laika posmā no 2016. līdz 2022. gadam konsultēto un klīniski diagnosticēto pacientu mutes leukoplakijas. Tādēļ viens no pētījuma trūkumiem ir neliels pacientu skaits, kas var mazināt statistisko nozīmību. Salīdzinoši mazais ML skaits varētu būt saistīts ar to, ka pacientiem ar mutes leukoplakiju nav sāpju un sūdzību par izmaiņām mutes dobumā. Jāatzīst arī, ka ne visiem zobārstiem ir pieredze ML diagnostikā, līdz ar to ne katrs pacients tika nosūtīts uz konsultāciju Stomatoloģijas institūta MMC. Mūsu pētāmo pacientu skaitu ievērojami ietekmēja arī Covid-19 pandēmijas laiks, kad konsultācijas iespējas MMC bija ierobežotas.

Turpmāk ML klīnisko datu analīze jākombinē ne vien ar imūnhistoķīmiskiem izmeklējumiem, bet arī ar ģenētiķu un elektronmikroskopijas speciālistu atklājumiem par plakanā epitēlija displāzijas progresēšanu par ļaundabīgu procesu genoma un molekulāro pārmaiņu līmenī. Nākotnes uzdevums ir izstrādāt personalizētas mutes potenciāli ļaundabīgu slimību ārstēšanas un profilakses stratēģijas, kas ir arī viens no COST *Interception of oral cancer development (Interceptor)* galvenajiem mērķiem, kurā mēs piedalāmies.

Secinājumi

1. Pētījuma grupā mutes leikoplakijas biežāk novēroja vīriešiem ar vidējo vecumu 57 gadi. ML vidējais izmērs bija $14 \pm 3,7$ mm. To biežākā lokalizācija bija vaigu un mēles sāna gļotāda, ar smagas pakāpes displāziju 26 % gadījumu, kas arī ir riska faktors ML ļaundabīgai transformācijai.
2. *VELscope* fluorescentā spektroskopija deva iespēju izvērtēt un noteikt izmainīto audu robežas gan ML, gan karcinomu gadījumos, tādējādi precizējot biopsijas vietu un uzlabojot audzēja rezekcijas līniju noteikšanu.
3. Pieaugot mutes leikoplakiju klīniskās formas smagumam, siekalu kopējā proteīna līmeņa paaugstināšanās kombinācijā ar pozitīvu šķīstošo CD44 testu liecina par agrīnām epitēlija mikrovides izmaiņām.
4. Imūnhistoķīmiskais CD44 antigēna pētījums demonstrēja tā ekspresijas daudzveidību neizmainītā, hiperplastiskā un displastiskā epitēlijā dažādās mutes leikoplakijās, kā arī ļaundabīgajā MDPK epitēlijā. Eksosomu CD9 antigēns pierādīja transporta proteīnus mutes gļotādā, kas palīdzēja izprast siekalu un citu šķidrums transportu gļotādā un tās patoloģiskajos veidojumos. CD44 un CD9 antigēnu intracitoplazmatisko ekspresiju kopā ar raksturīgām kodola izmaiņām var izmantot kā prognostisko faktoru nehomogēnas leikoplakijas potenciālai ļaundabīgai transformācijai.
5. Glikoproteīns p27 uzrādīja supresora un onkogēna īpašības nehomogēnajās ML un MDPK, demonstrējot šī antigēna duālās īpašības ar p27 restrukturizācijas dinamiku no kodola uz citoplazmu. ThPOK ir mazinformatīvs marķieris mutes leikoplakiju malignizācijas procesus izpētē.
6. Biezas leikoplakijas ar smagas pakāpes displāziju, CD44, CD9 un p27 proteīnu translokāciju un šķīstošā CD44 un kopējā proteīna daudzuma paaugstināšanās siekalās raksturo nehomogēnu mutes leikoplakiju kā augsta riska potenciāli ļaundabīgu veidojumu mutes dobumā.

Priekšlikumi

1. Zobārstniecības praksēs rekomendējam siekalu šķīstošā CD44 un kopējā proteīna testa izmantošanu, lai skrīningā noteiktu mutes potenciāli ļaundabīgo veidojumu malignizācijas risku, kā arī recidīvu agrīnu diagnostiku bez invazīvām metodēm.
2. *VELscope* fluorescento spektroskopiju rekomendējam izmainīto mutes dobuma audu robežu noteikšanai gan mutes leukoplakiju, gan karcinomu gadījumos, lai precizētu biopsijas vai rezekcijas līniju vietas.
3. Klīnicistiem veidlapās Nr. 014/U-1 (Nosūtījums patohistoloģiskai izmeklēšanai, PSKUS) un nākotnē arī lokālās medicīnas iestāžu datu bāzēs un e-veselības sistēmā detalizēti norādīt visu klīnisko informāciju gan par mutes leukoplakijām, gan par mutes karcinomām, kas ir ļoti svarīgi izmeklējumiem dinamikā, sevišķi, ja tie tiek veikti citā slimnīcā.
4. Ārstiem patoloģiem mutes leukoplakiju agrīnu malignizācijas pazīmju noteikšanai bez rutīnām histoloģiskajām metodēm iesakām veikt imūnhistoķīmiskos izmeklējumus ar CD44, CD9 un p27 antivielām izmainīto audu attīstības gaitas prognozēšanai.

Publikāciju un ziņojumu saraksts par promocijas darba tēmu

Starptautiski citējamās publikācijas:

1. **Dzudzilo, M.**, Kleina, R., Čēma, I., Dabuzinskiene, A., Svirskis, Š. 2021, April. Expression and localisation of CD44 antigen as a prognostic factor of oral leukoplakia. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences.* 75, 2, 68–74.
2. Čēma, I., **Dzudzilo, M.**, Kleina, R., Franckeviča, I., Svirskis, Š. 2021, November. Correlation of soluble CD44 expression in saliva and CD44 protein in oral leukoplakia tissues. *Cancers.* 13, 22, 22 p., 5739; doi:10.3390/cancers13225739.
3. **Dzudzilo, M.**, Čēma, I., Kleina, R., Svirskis, Š., Selga, G. 2022. Characteristics of the dual nature of the p27 protein in oral leukoplakias and cancer. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences.* 76, 5/6, 665–673.

Mutiski ziņojumi starptautiskajās konferencēs:

1. **Dzudzilo, M.**, Čēma, I., Kleina, R., Franckeviča, I., Šmits, A. 2019. Pattern of CD44 Antigen Expression in Mucosal and Submucosal Structures in Case of Oral Leukoplakia. *RSU International Research Conference on Medical and Health Care Sciences, Knowledge for Use in Practice*, April 1–3. Rīga, Latvia.
2. **Dzudzilo, M.**, Kleina R., Čēma, I. 2020. CD44 antigen as an indicator of early structural changes in oral leukoplakia. *The 62nd International Scientific Conference of Daugavpils University.* May 28–29, 2020. Daugavpils, Latvia.
3. **Dzudzilo, M.**, Čēma, I., Kleina, R., Selga, G., Svirskis, Š. 2022. The role of expression of soluble CD44 in saliva and CD44 antigen in oral leukoplakia. *10th Congress of Baltic Association for Maxillofacial and Plastic Surgery and 16th Joint Symposium Riga-Rostock.* June 3, 2022. Rīga, Latvia.
4. **Dzudzilo, M.**, Čēma, I., Kleina, R., Selga, G. 2023. Dysregulation of CD44 and p27 antigens in oral leukoplakia. *RSU Zinātnes nedēļa.* 27.–31. marts, 2023. Rīga, Latvija.
5. **Dzudzilo, M.**, Čēma, I., Kleina, R. 2023. Biomarkers indicating early malignancy in oral leukoplakia. *OPMDay Annual Congress.* August 30–31, 2023. Antwerp University, Belgium. **Best oral presentation award.**

Mutiski ziņojumi vietēja mēroga konferencēs Latvijā:

1. **Dzudzilo, M.**, Čēma, I., Selga, G. 2016. VELscope lietojuma iespējas agrīnu malignitātes pazīmju diagnostikā mutes gļotādā. *RSU Research Conference*, 2016. Rīga, Latvia.
2. **Dzudzilo, M.**, Čēma, I., Kleina, R. 2017. Pokemon – perspektīvs agrīna mutes vēža marķieris. *RSU Scientific Conference*, 2016. Rīga, Latvia.
3. **Dzudzilo, M.**, Čēma, I., Kleina, R. 2021. Early detection of potentially malignant changes in oral leukoplakia using a saliva test. *RSU Research week 2021: Knowledge for Use in Practice.* March 24, 2021. Rīga, Latvia.
4. **Dzudzilo, M.**, Čēma, I., Selga, G., Nazarovs, J. 2022. Biomarkieru pielietojuma iespējas agrīnu malignitātes pazīmju noteikšanai mutes leikoplakijās. *Latvijas ārstu 9. kongress.* 23. septembris, 2022. Rīga, Latvija.

Tēzes starptautiskajās konferencēs:

1. Kleina, R., **Dzudzilo, M.**, Čēma, I. 2017. *Variety of CD44 glycoprotein and immune cell reactions in oral squamous cell carcinoma and its possible precursors.* 9th Baltic morphology conference. September 27–29, 2017. Tartu, Lithuania.
2. **Dzudzilo, M.**, Čēma, I., Kleina, R., Franckeviča, I., Šmits, A. 2019. Pattern of CD44 Antigen Expression in Mucosal and Submucosal Structures in Case of Oral Leukoplakia. *RSU International Research Conference on Medical and Health Care Sciences, Knowledge for Use in Practice*, April 1–3. Rīga, Latvia, 389.
3. Kleina, R., **Dzudzilo, M.**, Čēma, I. 2019. Th-POK Antigen Characteristics in Oral Leukoplakia. *10th Scientific Conference BALTIC MORPHOLOGY.* October 24–25, 2019. Kaunas, Lithuania, 55, 264.

4. Kleina, R., **Dzudzilo, M.**, Čēma, I., Dabužinskiene, A., Lutinska, D. 2019. Characteristics of a Th-POK Expression in Oral Squamous Cell Cancer. RSU International Research Conference. 2019. Riga, Latvia, 368.
5. **Dzudzilo, M.**, Kleina R., Čēma, I. 2020. CD44 antigen as an indicator of early structural changes in oral leukoplakia. The 62nd International Scientific Conference of Daugavpils University. May 28–29, 2020. Daugavpils, Latvia, 49.
6. **Dzudzilo, M.**, Čēma, I., Kleina, R. 2021. Expression of CD44 in potentially premalignant oral epithelial lesion – leukoplakia. 15th Biennial Congress European Association of Oral Medicine (EAOM). 2021. Porto, Portugal, 102–103.
7. **Dzudzilo, M.**, Čēma, I., Kleina, R., Selga, G. 2022. Characteristics of p27 protein diversity in oral leukoplakia and cancer. Oral Potentially Malignant Disorders (OPMD): state of the art and a roadmap for research. February 25, 2022. Brescia, Italy, 16.
8. **Dzudzilo, M.**, Čēma, I., Kleina, R., Selga, G., Svirskis, Š. 2022. The role of expression of soluble CD44 in saliva and CD44 antigen in oral leukoplakia. 10th Congress of Baltic Association for Maxillofacial and Plastic Surgery and 16th Joint Symposium Riga-Rostock. June 3, 2022. Riga, Latvia.
9. **Dzudzilo, M.**, Čēma, I., Kleina, R., Selga, G. 2023. Dysregulation of CD44 and p27 antigens in oral leukoplakia. RSU Zinātnes nedēļa. 27.–31. marts, 2023. Rīga, Latvija.
10. **Dzudzilo, M.**, Čēma, I., Kleina, R. 2023. Biomarkers indicating early malignancy in oral leukoplakia. OPMDay Annual Congress. August 30–31, 2023. Antwerp University, Belgium.
11. **Dzudzilo, M.**, Čēma, I., Kleina, R. 2023. Duality of cell cycle inhibitor p27 and expression of CD44 in Oral Leukoplakia. EAOM 2023 European Association of Oral Medicine 16th Biennial conference. September 29–30, 2023. London, United Kingdom.

Literatūras un avotu saraksts

1. Abati, S., Bramati, C., Bondi, S., Lissoni, A., & Trimarchi, M. (2020). Oral Cancer and Precancer: A Narrative Review on the Relevance of Early Diagnosis. *Int J Environ Res Public Health*, *17*(24). <https://doi.org/10.3390/ijerph17249160>
2. Abbastabar, M., Kheyrollah, M., Azizian, K., Bagherlou, N., Tehrani, S. S., Maniati, M., & Karimian, A. (2018). Multiple functions of p27 in cell cycle, apoptosis, epigenetic modification and transcriptional regulation for the control of cell growth: A double-edged sword protein. *DNA Repair (Amst)*, *69*, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.07.008>
3. Aguirre-Urizar, J. M. (2011). Proliferative multifocal leukoplakia better name than proliferative verrucous leukoplakia. *World J Surg Oncol*, *9*, 122. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-9-122>
4. Aguirre-Urizar, J. M., Lafuente-Ibáñez de Mendoza, I., & Warnakulasuriya, S. (2021). Malignant transformation of oral leukoplakia: Systematic review and meta-analysis of the last 5 years. *Oral Dis*, *27*(8), 1881–1895. <https://doi.org/10.1111/odi.13810>
5. Al-Muhtaseb, S. I. (2014). Serum and saliva protein levels in females with breast cancer. *Oncol Lett*, *8*(6), 2752–2756. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2535>
6. Alkarain, A., Jordan, R., & Slingerland, J. (2004). p27 deregulation in breast cancer: prognostic significance and implications for therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, *9*(1), 67–80. <https://doi.org/10.1023/B:JOMG.0000023589.00994.5e>
7. Allegra, E., Trapasso, S., La Boria, A., Aragona, T., Pisani, D., Belfiore, A., & Garozzo, A. (2014). Prognostic role of salivary CD44sol levels in the follow-up of laryngeal carcinomas. *J Oral Pathol Med*, *43*(4), 276–281. <https://doi.org/10.1111/jop.12129>
8. Almangush, A., Mäkitie, A. A., Triantafyllou, A., de Bree, R., Strojjan, P., Rinaldo, A., Hernandez-Prera, J. C., Suárez, C., Kowalski, L. P., Ferlito, A., & Leivo, I. (2020). Staging and grading of oral squamous cell carcinoma: An update. *Oral Oncol*, *107*, 104799. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2020.104799>
9. Alsalem, B. (2019). *The diagnostic utility of cancer stem cell marker CD44 in early detection of oral cancer* [University of Maryland]. Baltimore.
10. Alves, C. S., Yakovlev, S., Medved, L., & Konstantopoulos, K. (2009). Biomolecular characterization of CD44-fibrin(ogen) binding: distinct molecular requirements mediate binding of standard and variant isoforms of CD44 to immobilized fibrin(ogen). *J Biol Chem*, *284*(2), 1177–1189. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805144200>
11. Ambele, M. A., van Zyl, A., Pepper, M. S., van Heerden, M. B., & van Heerden, W. F. P. (2020). Amplification of 3q26.2, 5q14.3, 8q24.3, 8q22.3, and 14q32.33 Are Possible Common Genetic Alterations in Oral Cancer Patients. *Front Oncol*, *10*, 683. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00683>
12. Amirchaghmaghi, M., Mohtasham, N., Delavarian, Z., Shakeri, M. T., Taghizadeh, A., Khazaeni, K., & Hatami, M. (2023). Analyzing the relationship between tissue color observed in VELscope examination and histopathological factors in OSCC patients. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, *41*, 103248. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103248>
13. Andreu, Z., & Yáñez-Mó, M. (2014). Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol*, *5*, 442. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00442>
14. Anonymous. (2020). *GLOBOCAN*.
15. Arduino, P. G., Bagan, J., El-Naggar, A. K., & Carrozzo, M. (2013). Urban legends series: oral leukoplakia. *Oral Dis*, *19*(7), 642–659. <https://doi.org/10.1111/odi.12065>
16. Arnaoutakis, D., & Padhya, T. A. (2013). Dengue fever: a primer for the otolaryngologist. *Ear Nose Throat J*, *92*(7), E5-9. <https://doi.org/10.1177/014556131309200713>
17. Assimakopoulos, D., Kolettas, E., Patrikakos, G., & Evangelou, A. (2002). The role of CD44 in the development and prognosis of head and neck squamous cell carcinomas. *Histol Histopathol*, *17*(4), 1269–1281. <https://doi.org/10.14670/HH-17.1269>

18. Axéll, T., Pindborg, J. J., Smith, C. J., & van der Waal, I. (1996). Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco- related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18-21 1994. International Collaborative Group on Oral White Lesions. *J Oral Pathol Med*, 25(2), 49–54. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1996.tb00191.x>
19. Bagan, J., Martorell, M., Cebrián, J. L., Rubert, A., Bagán, L., Mezquida, C., & Hervás, D. (2022). Effect of clinical and histologic features on time to malignancy in 224 cases of oral leukoplakia treated by surgery. *Clin Oral Investig*, 26(8), 5181–5188. <https://doi.org/10.1007/s00784-022-04486-x>
20. Bagan, J., Sarrion, G., & Jimenez, Y. (2010). Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol*, 46(6), 414–417. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2010.03.009>
21. Bagan, J., Scully, C., Jimenez, Y., & Martorell, M. (2010). Proliferative verrucous leukoplakia: a concise update. *Oral Dis*, 16(4), 328–332. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2009.01632.x>
22. Bagan, J. V., Jiménez, Y., Murillo, J., Poveda, R., Díaz, J. M., Gavaldá, C., Margaix, M., Scully, C., Alberola, T. M., Torres Puente, M., & Pérez Alonso, M. (2008). Epstein-Barr virus in oral proliferative verrucous leukoplakia and squamous cell carcinoma: A preliminary study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 13(2), E110–113. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18223526>
23. Baghban, N., Kodam, S. P., & Ullah, M. (2023). Role of CD9 Sensing, AI, and Exosomes in Cellular Communication of Cancer. *Int J Stem Cell Res Ther*, 10(1). <https://doi.org/10.23937/2469-570X/1410079>
24. Barsouk, A., Aluru, J. S., Rawla, P., & Saginala, K. (2023). Epidemiology, Risk Factors, and Prevention of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Med Sci (Basel)*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/medsci11020042>
25. Bencivenga, D., Caldarelli, I., Stampone, E., Mancini, F. P., Balestrieri, M. L., Della Ragione, F., & Borriello, A. (2017). p27. *Cancer Lett*, 403, 354–365. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.06.031>
26. Blatt, S., Krüger, M., Sagheb, K., Barth, M., Kämmerer, P. W., & Al-Nawas, B. (2022). Tumor Recurrence and Follow-Up Intervals in Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Med*, 11(23). <https://doi.org/10.3390/jcm11237061>
27. Boxberg, M., Götz, C., Haidari, S., Dorfner, C., Jesinghaus, M., Drecoll, E., Boskov, M., Wolff, K. D., Weichert, W., Haller, B., & Kolk, A. (2018). Immunohistochemical expression of CD44 in oral squamous cell carcinoma in relation to histomorphological parameters and clinicopathological factors. *Histopathology*, 73(4), 559–572. <https://doi.org/10.1111/his.13496>
28. Brizuela, M., & Winters, R. (2023). Histology, Oral Mucosa. In. Treasure Island (FL): StatPearls <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK572115/>
29. Brouns, E., Baart, J., Karagozoglu, K., Aartman, I., Bloemena, E., & van der Waal, I. (2014). Malignant transformation of oral leukoplakia in a well-defined cohort of 144 patients. *Oral Dis*, 20(3), e19–24. <https://doi.org/10.1111/odi.12095>
30. Brouns, E. R., Baart, J. A., Bloemena, E., Karagozoglu, H., & van der Waal, I. (2013). The relevance of uniform reporting in oral leukoplakia: definition, certainty factor and staging based on experience with 275 patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 18(1), e19–26. <https://doi.org/10.4317/medoral.18756>
31. Buim, M. E., Lourenço, S. V., Carvalho, K. C., Cardim, R., Pereira, C., Carvalho, A. L., Fregani, J. H., & Soares, F. A. (2010). Downregulation of CD9 protein expression is associated with aggressive behavior of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 46(3), 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2009.11.009>
32. Bukovszky, B., Fodor, J., Székely, G., Tóth, E., Major, T., Oberna, F., Takácsi-Nagy, Z., & Polgár, C. (2023). Neck Node Squamous Cell Metastasis from Unknown Primary and Mutagen Sensitivity: A Case Series. *Case Rep Oncol*, 16(1), 1598–1605. <https://doi.org/10.1159/000533708>
33. Cardoso, S. C. S., Duarte, A., de Almeida, L. Y., León, J. E., & Ribeiro-Silva, A. (2020). Immunohistochemistry analysis of checkpoint kinase 2 in oral squamous cell carcinoma. *Applied Cancer Research*, 40(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s41241-020-00085-y>

34. Castagnola, M., Cabras, T., Iavarone, F., Vincenzoni, F., Vitali, A., Pisano, E., Nemolato, S., Scarano, E., Fiorita, A., Vento, G., Tirone, C., Romagnoli, C., Cordaro, M., Paludetti, G., Faa, G., & Messana, I. (2012). Top-down platform for deciphering the human salivary proteome. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 25(Suppl 5), 27–43. <https://doi.org/10.3109/14767058.2012.714647>
35. Cema, I., Stengel, B., Liepa, E., & Nizze, H. (1998). Immunohistochemical analysis of PCNA, Ki-67 and p53 expression in benign, dysplastic and malignant lesions of oral mucosa [Article]. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences Section B Natural Exact and Applied Sciences*, 52(3–4), 113–118. <Go to ISI>://BCI:BCI199900010642
36. Cerero-Lapiedra, R., Baladé-Martínez, D., Moreno-López, L. A., Esparza-Gómez, G., & Bagán, J. V. (2010). Proliferative verrucous leukoplakia: a proposal for diagnostic criteria. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 15(6), e839–845.
37. Cerqueira, J. M., Pontes, F. S., Santos-Silva, A. R., Almeida, O. P., Costa, R. F., Fonseca, F. P., Gomez, R. S., Neto, N. C., Miyahara, L. A., Rodrigues-Fernandes, C. I., Neto, E. D., & Araújo, A. L. (2021). Malignant transformation of oral leukoplakia: a multicentric retrospective study in Brazilian population. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 26(3), e292–e298. <https://doi.org/10.4317/medoral.24175>
38. Chaiyarit, P., Thongprasom, K., Satayut, S., Dhanuthai, K., Piboonratanakit, P., Phothipakdee, P., Subarnbhesaj, A., Limlertmongkol, S., & Chaimusig, M. (2008). Alteration of the expression of CD44 [corrected] isoforms in oral epithelia and saliva from patients with oral lichen planus. *J Clin Immunol*, 28(1), 26–34. <https://doi.org/10.1007/s10875-007-9128-5>
39. Chamoli, A., Gosavi, A. S., Shirwadkar, U. P., Wangdale, K. V., Behera, S. K., Kurrey, N. K., Kalia, K., & Mandoli, A. (2021). Overview of oral cavity squamous cell carcinoma: Risk factors, mechanisms, and diagnostics. *Oral Oncol*, 121, 105451. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2021.105451>
40. Chaturvedi, A. K., Engels, E. A., Pfeiffer, R. M., Hernandez, B. Y., Xiao, W., Kim, E., Jiang, B., Goodman, M. T., Sibug-Saber, M., Cozen, W., Liu, L., Lynch, C. F., Wentzensen, N., Jordan, R. C., Altekruze, S., Anderson, W. F., Rosenberg, P. S., & Gillison, M. L. (2011). Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol*, 29(32), 4294–4301. <https://doi.org/10.1200/jco.2011.36.4596>
41. Chen, D., & Wang, C. Y. (2019). Targeting cancer stem cells in squamous cell carcinoma. *Precis Clin Med*, 2(3), 152–165. <https://doi.org/10.1093/pcmedi/pbz016>
42. Choi, H. R., Tucker, S. A., Huang, Z., Gillenwater, A. M., Luna, M. A., Batsakis, J. G., & El-Naggar, A. K. (2003). Differential expressions of cyclin-dependent kinase inhibitors (p27 and p21) and their relation to p53 and Ki-67 in oral squamous tumorigenesis. *Int J Oncol*, 22(2), 409–414. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12527941>
43. Ciccì, M., Cervino, G., Fiorillo, L., D'Amico, C., Oteri, G., Troiano, G., Zhurakivska, K., Lo Muzio, L., Herford, A. S., Crimi, S., Bianchi, A., Di Stasio, D., Rullo, R., Laino, G., & Laino, L. (2019). Early Diagnosis on Oral and Potentially Oral Malignant Lesions: A Systematic Review on the VELscope(®) Fluorescence Method. *Dent J (Basel)*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/dj7030093>
44. Cohen, E. R., Reis, I. M., Gomez-Fernandez, C., Smith, D., Pereira, L., Freiser, M. E., Marotta, G., Thomas, G. R., Sargi, Z. B., & Franzmann, E. J. (2020). CD44 and associated markers in oral rinses and tissues from oral and oropharyngeal cancer patients. *Oral Oncol*, 106, 104720. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2020.104720>
45. Constantinou, C., Spella, M., Chondrou, V., Patrinos, G. P., Papachatzopoulou, A., & Sgourou, A. (2019). The multi-faceted functioning portrait of LRF/ZBTB7A. *Hum Genomics*, 13(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s40246-019-0252-0>
46. Dalchau, R., Kirkley, J., & Fabre, J. W. (1980). Monoclonal antibody to a human brain-granulocyte-T lymphocyte antigen probably homologous to the W 3/13 antigen of the rat. *Eur J Immunol*, 10(10), 745–749. <https://doi.org/10.1002/eji.1830101004>

47. Dasari, S., Rajendra, W., & Valluru, L. (2014). Evaluation of soluble CD44 protein marker to distinguish the premalignant and malignant carcinoma cases in cervical cancer patients. *Med Oncol*, 31(9), 139. <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0139-9>
48. Dogenski, L. C., de Figueiredo Ribeiro, S., Gambin, D. J., Maso, P. C., Linden, M. S. S., Trentin, M. S., Zoehler, B., Crivelini, M. M., & De Carli, J. P. (2021). Oral leukoplakia-epidemiological survey and histochemical analysis of 107 cases in Brazil. *Clin Oral Investig*, 25(4), 1859–1867. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03488-x>
49. Dost, F., KA, L. C., Ford, P. J., & Farah, C. S. (2013). A retrospective analysis of clinical features of oral malignant and potentially malignant disorders with and without oral epithelial dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 116(6), 725–733. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2013.08.005>
50. Dzudzilo, M., Kleina, R., Čēma, I., Dabuzinskiene, A., & Svirskis, Š. (2021). Expression and Localisation of CD44 Antigen as a Prognostic Factor of Oral Leukoplakia. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences.*, 75(2), 68–74. <https://doi.org/doi:10.2478/prolas-2021-0012>
51. Dzwonek, J., & Wilczynski, G. M. (2015). CD44: molecular interactions, signaling and functions in the nervous system. *Front Cell Neurosci*, 9, 175. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00175>
52. El-Naggar, A. K., Chan, J. K. C., Grandis J. R., Takata, T., & J., S. P. (2017). *WHO Classification of Tumours of the Head and Neck*.
53. Elvers, D., Braunschweig, T., Hilgers, R. D., Ghassemi, A., Möhlhenrich, S. C., Hölzle, F., Gerressen, M., & Modabber, A. (2015). Margins of oral leukoplakia: autofluorescence and histopathology. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 53(2), 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2014.11.004>
54. Emich, H., Chapiro, D., Hutchison, I., & Mackenzie, I. (2015). The potential of CD44 as a diagnostic and prognostic tool in oral cancer. *J Oral Pathol Med*, 44(6), 393–400. <https://doi.org/10.1111/jop.12308>
55. Erovic, B. M., Pammer, J., Hollemann, D., Woegerbauer, M., Geleff, S., Fischer, M. B., Burian, M., Frommlet, F., & Neuchrist, C. (2003). Motility-related protein-1/CD9 expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 25(10), 848–857. <https://doi.org/10.1002/hed.10306>
56. Evren, I., Brouns, E. R., Poell, J. B., Wils, L. J., Brakenhoff, R. H., Bloemena, E., & de Visscher, J. (2023). Associations between clinical and histopathological characteristics in oral leukoplakia. *Oral Dis*, 29(2), 696–706. <https://doi.org/10.1111/odi.14038>
57. Franzmann, E. J., & Donovan, M. J. (2018). Effective early detection of oral cancer using a simple and inexpensive point of care device in oral rinses. *Expert Rev Mol Diagn*, 18(10), 837–844. <https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1523008>
58. Franzmann, E. J., Reategui, E. P., Pedroso, F., Pernas, F. G., Karakullukcu, B. M., Carraway, K. L., Hamilton, K., Singal, R., & Goodwin, W. J. (2007). Soluble CD44 is a potential marker for the early detection of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16(7), 1348–1355. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0011>
59. Franzmann, E. J., Reategui, E. P., Pereira, L. H., Pedroso, F., Joseph, D., Allen, G. O., Hamilton, K., Reis, I., Duncan, R., Goodwin, W. J., Hu, J. J., & Lokeshwar, V. B. (2012). Salivary protein and solCD44 levels as a potential screening tool for early detection of head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 34(5), 687–695. <https://doi.org/10.1002/hed.21810>
60. Gandara-Vila, P., Perez-Sayans, M., Suarez-Penaranda, J. M., Gallas-Torreira, M., Somoza-Martin, J., Reboiras-Lopez, M. D., Blanco-Carrion, A., & Garcia-Garcia, A. (2018). Survival study of leukoplakia malignant transformation in a region of northern Spain. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 23(4), e413–e420. <https://doi.org/10.4317/medoral.22326>
61. Ganesh, D., Sreenivasan, P., Öhman, J., Wallström, M., Braz-Silva, P. H., Giglio, D., Kjeller, G., & Hasséus, B. (2018). Potentially Malignant Oral Disorders and Cancer Transformation. *Anticancer Res*, 38(6), 3223–3229. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12587>

62. Garcia, A. S., Assao, A., Carvalho, A. L., Soares, F. A., Kowalski, L. P., & Oliveira, D. T. (2019). The stem cell markers expression CD44v6 and podoplanin in lip cancer: clinical significance. *Virchows Arch*, 474(6), 745–754. <https://doi.org/10.1007/s00428-019-02539-3>
63. García-Posadas, L., Contreras-Ruiz, L., López-García, A., Villarón Álvarez, S., Maldonado, M. J., & Diebold, Y. (2012). Hyaluronan receptors in the human ocular surface: a descriptive and comparative study of RHAMM and CD44 in tissues, cell lines and freshly collected samples. *Histochem Cell Biol*, 137(2), 165–176. <https://doi.org/10.1007/s00418-011-0878-z>
64. Georgaki, M., Theofilou, V. I., Pettas, E., Stoufi, E., Younis, R. H., Kolokotronis, A., Sauk, J. J., & Nikitakis, N. G. (2021). Understanding the complex pathogenesis of oral cancer: A comprehensive review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 132(5), 566–579. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2021.04.004>
65. Ghallab, N., & Shaker, O. (2010). Salivary-soluble CD44 levels in smokers and non-smokers with chronic periodontitis: a pilot study. *J Periodontol*, 81(5), 710–717. <https://doi.org/10.1902/jop.2010.090630>
66. Ghazi, N., Saghravanian, N., Taghi Shakeri, M., & Jamali, M. (2021). Evaluation of CD44 and TGF-B Expression in Oral Carcinogenesis. *J Dent (Shiraz)*, 22(1), 33–40. <https://doi.org/10.30476/dentjods.2020.84393.1079>
67. Gillison, M. L., Chaturvedi, A. K., Anderson, W. F., & Fakhry, C. (2015). Epidemiology of Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol*, 33(29), 3235–3242. <https://doi.org/10.1200/jco.2015.61.6995>
68. Glass, S., Brown, V., Carrico, C., & Madurantakam, P. (2023). Head and neck exam practices of dental professionals. *Clin Exp Dent Res*, 9(5), 887–893. <https://doi.org/10.1002/cre2.772>
69. Godge, P. Y., & Poonja, L. S. (2011). Quantitative assessment of expression of cell adhesion molecule (CD44) splice variants: CD44 standard (CD44s) and v5, v6 isoforms in oral leukoplakias: an immunohistochemical study. *Indian J Dent Res*, 22(3), 493–494. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.87080>
70. Gore, Y., Starlets, D., Maharshak, N., Becker-Herman, S., Kaneyuki, U., Leng, L., Bucala, R., & Shachar, I. (2008). Macrophage migration inhibitory factor induces B cell survival by activation of a CD74-CD44 receptor complex. *J Biol Chem*, 283(5), 2784–2792. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703265200>
71. Groma, V., Kazanceva, A., Nora-Krukle, Z., & Murovska, M. (2012). Oropharyngeal malignant epithelial cell, lymphocyte and macrophage CD44 surface receptors for hyaluronate are expressed in sustained EBV infection: immunohistochemical data and EBV DNA tissue indices. *Pathol Res Pract*, 208(9), 518–526. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2012.05.017>
72. Gualtero, D. F., & Suarez Castillo, A. (2016). Biomarkers in saliva for the detection of oral squamous cell carcinoma and their potential use for early diagnosis: a systematic review. *Acta Odontol Scand*, 74(3), 170–177. <https://doi.org/10.3109/00016357.2015.1110249>
73. Haeckel, R., & Hänecke, P. (1996). Application of saliva for drug monitoring. An in vivo model for transmembrane transport. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 34(3), 171–191.
74. Hansen, L. S., Olson, J. A., & Silverman, S., Jr. (1985). Proliferative verrucous leukoplakia. A long-term study of thirty patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 60(3), 285–298. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(85\)90313-5](https://doi.org/10.1016/0030-4220(85)90313-5)
75. Harada, H., & Takahashi, M. (2007). CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2. *J Biol Chem*, 282(8), 5597–5607. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608358200>
76. Hashmi, A. A., Aijaz, S., Irfan, M., Hussain, Z. F., Hashmi, S. K., Asif, H., & Faridi, N. (2019). Low p27kip1 expression in head and neck squamous cell carcinoma: association with risk factors and adverse outcomes. *Applied Cancer Research*, 39(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s41241-019-0074-3>

77. Hassn Mesrati, M., Syafruddin, S. E., Mohtar, M. A., & Syahir, A. (2021). CD44: A Multifunctional Mediator of Cancer Progression. *Biomolecules*, *11*(12). <https://doi.org/10.3390/biom11121850>
78. Herold-Mende, C., Seiter, S., Born, A. I., Patzelt, E., Schupp, M., Zöller, J., Bosch, F. X., & Zöller, M. (1996). Expression of CD44 splice variants in squamous epithelia and squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Pathol*, *179*(1), 66–73. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199605\)179:1<66::AID-PATH544>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199605)179:1<66::AID-PATH544>3.0.CO;2-5)
79. Hobbs, C. G., Sterne, J. A., Bailey, M., Heyderman, R. S., Birchall, M. A., & Thomas, S. J. (2006). Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol*, *31*(4), 259–266. <https://doi.org/10.1111/j.1749-4486.2006.01246.x>
80. Holmstrup, P., Vedtofte, P., Reibel, J., & Stoltze, K. (2006). Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. *Oral Oncol*, *42*(5), 461–474. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2005.08.011>
81. Ibarra, A., & Hetzer, M. W. (2015). Nuclear pore proteins and the control of genome functions. *Genes Dev*, *29*(4), 337–349. <https://doi.org/10.1101/gad.256495.114>
82. Iocca, O., Sollecito, T. P., Alawi, F., Weinstein, G. S., Newman, J. G., De Virgilio, A., Di Maio, P., Spriano, G., Pardiñas López, S., & Shanti, R. M. (2020). Potentially malignant disorders of the oral cavity and oral dysplasia: A systematic review and meta-analysis of malignant transformation rate by subtype. *Head Neck*, *42*(3), 539–555. <https://doi.org/10.1002/hed.26006>
83. Jai Kumar, S. K., Gayathri, R., & Priya V, V. (2018). Evaluation of salivary total proteins, albumin, globulin, and albumin/globulin ratio among healthy individuals and patients with chronic gingivitis. *Drug Invention Today*, *10*, 925–928.
84. Jakovlevs, A., Vanags, A., Gardovskis, J., & Strumfa, I. (2019). Molecular classification of diffuse gliomas. *Pol J Pathol*, *70*(4), 246–258. <https://doi.org/10.5114/pjp.2019.93126>
85. Jäwert, F., Nyman, J., Olsson, E., Adok, C., Helmersson, M., & Öhman, J. (2021). Regular clinical follow-up of oral potentially malignant disorders results in improved survival for patients who develop oral cancer. *Oral Oncol*, *121*, 105469. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2021.105469>
86. Jeannot, P., Callot, C., Baer, R., Duquesnes, N., Guerra, C., Guillermet-Guibert, J., Bachs, O., & Besson, A. (2015). Loss of p27Kip¹ promotes metaplasia in the pancreas via the regulation of Sox9 expression. *Oncotarget*, *6*(34), 35880–35892. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5770>
87. Jiang, F., Zheng, Q., Chang, L., Li, X., Wang, X., & Gu, X. (2019). Pro-oncogene Pokemon Promotes Prostate Cancer Progression by Inducing STRN4 Expression. *J Cancer*, *10*(8), 1833–1845. <https://doi.org/10.7150/jca.29471>
88. Jiao, W., Liu, F., Tang, F. Z., Lan, J., Xiao, R. P., Chen, X. Z., Ye, H. L., & Cai, Y. L. (2013). Expression of the Pokemon proto-oncogene in nasopharyngeal carcinoma cell lines and tissues. *Asian Pac J Cancer Prev*, *14*(11), 6315–6319. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2013.14.11.6315>
89. Johnson, P., & Ruffell, B. (2009). CD44 and its role in inflammation and inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets*, *8*(3), 208–220. <https://doi.org/10.2174/187152809788680994>
90. Katirachi, S. K., Grønlund, M. P., Jakobsen, K. K., Grønhøj, C., & von Buchwald, C. (2023). The Prevalence of HPV in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. *Viruses*, *15*(2). <https://doi.org/10.3390/v15020451>
91. Kaur, A., Singh, J., Devgan, R., & Utreja, U. (2022). An Immunohistochemical Expression of CK5/6, CK7, and CK20 on Cell Blocks in Metastatic Cervical Lymphadenopathy. *Int J Appl Basic Med Res*, *12*(3), 171–176. https://doi.org/10.4103/ijabmr.ijabmr_813_21
92. Kaur, S., Narayanswamy, S., & Ramesh, A. V. (2014). Comparative evaluation of salivary soluble CD44 levels in periodontal health and disease. *J Indian Soc Periodontol*, *18*(6), 734–738. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.147409>

93. Kaza, S., Kantheti, L. P. C., Poosarla, C., Gontu, S. R., Kattappagari, K. K., & Baddam, V. R. R. (2018). A Study on the Expression of CD44 Adhesion Molecule in Oral Squamous Cell Carcinoma and its Correlation with Tumor Histological Grading. *Journal of Orofacial Sciences*, 10(1). https://journals.lww.com/joro/fulltext/2018/10010/a_study_on_the_expression_of_cd44_adhesion.9.aspx
94. Khajuria, N., & Metgud, R. (2015). Role of bacteria in oral carcinogenesis. *Indian J Dent*, 6(1), 37–43. <https://doi.org/10.4103/0975-962x.151709>
95. Kitahara, A. B. P., Michels, A. C., Luiz, S. T., Nagashima, S., Camargo Martins, A. P., de Azevedo, M. L. V., Azevedo Alanis, L. R., Couto Souza, P. H., Ignácio, S. A., de Noronha, L., Betttega, P. V. C., Tyski, M. C. A., Quispe, E. M. P., Mozzer, I., Souto, G. R., Aguiar, M. C. F., Modolo, F., Scariot, R., Jham, B. C., . . . Johann, A. C. B. R. (2021). Immunohistochemical detection of NANOG in oral leukoplakia. *Oral Dis*. <https://doi.org/10.1111/odi.13891>
96. Kleina, R., Dzudzilo, M., & Čěma, I. (2019). Th-POK Antigen Characteristics in Oral Leukoplakia. *Medicina (Kaunas)*, 55.
97. Koch, F. P., Kaemmerer, P. W., Biesterfeld, S., Kunkel, M., & Wagner, W. (2011). Effectiveness of autofluorescence to identify suspicious oral lesions--a prospective, blinded clinical trial. *Clin Oral Investig*, 15(6), 975–982. <https://doi.org/10.1007/s00784-010-0455-1>
98. Kornevs, E. (2015). Mutes dobuma gļotādas vēzis – riska faktori, diagnostika un ārstēšana. *Latvijas Ārsts*, 3.
99. Kövesi, G., & Szende, B. (2006). Prognostic value of cyclin D1, p27, and p63 in oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med*, 35(5), 274–277. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2006.00396.x>
100. Kramer, I. R., Lucas, R. B., Pindborg, J. J., & Sobin, L. H. (1978). Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 46(4), 518–539. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/280847>
101. Kresty, L. A., Mallery, S. R., Knobloch, T. J., Li, J., Lloyd, M., Casto, B. C., & Weghorst, C. M. (2008). Frequent alterations of p16INK4a and p14ARF in oral proliferative verrucous leukoplakia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17(11), 3179–3187. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0574>
102. Kudo, Y., Takata, T., Yasui, W., Ogawa, I., Miyauchi, M., Takekoshi, T., Tahara, E., & Nikai, H. (1998). Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is an indicator of malignant behavior in oral squamous cell carcinoma. *Cancer*, 83(12), 2447–2455. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0142\(19981215\)83:12<2447::aid-cnrc7>3.0.co;2-a](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(19981215)83:12<2447::aid-cnrc7>3.0.co;2-a)
103. Kumar, M., Nanavati, R., Modi, T. G., & Dobariya, C. (2016). Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. *J Cancer Res Ther*, 12(2), 458–463. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.186696>
104. Kuribayashi, Y., Tsushima, F., Morita, K. I., Matsumoto, K., Sakurai, J., Uesugi, A., Sato, K., Oda, S., Sakamoto, K., & Harada, H. (2015). Long-term outcome of non-surgical treatment in patients with oral leukoplakia. *Oral Oncol*, 51(11), 1020–1025. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.09.004>
105. Kusukawa, J., Ryu, F., Kameyama, T., & Mekada, E. (2001). Reduced expression of CD9 in oral squamous cell carcinoma: CD9 expression inversely related to high prevalence of lymph node metastasis. *J Oral Pathol Med*, 30(2), 73–79. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0714.2001.300202.x>
106. Leon, M. E., Lugo, A., Boffetta, P., Gilmore, A., Ross, H., Schüz, J., La Vecchia, C., & Gallus, S. (2016). Smokeless tobacco use in Sweden and other 17 European countries. *Eur J Public Health*, 26(5), 817–821. <https://doi.org/10.1093/eurpub/ckw032>
107. Lerman, M. A., Almazrooa, S., Lindeman, N., Hall, D., Villa, A., & Woo, S. B. (2017). HPV-16 in a distinct subset of oral epithelial dysplasia. *Mod Pathol*, 30(12), 1646–1654. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.71>

108. Li, W., Han, Y., Zhao, Z., Ji, X., Wang, X., Jin, J., Wang, Q., Guo, X., Cheng, Z., Lu, M., Wang, G., Wang, Y., & Liu, H. (2019). Oral mucosal mesenchymal stem cell-derived exosomes: A potential therapeutic target in oral premalignant lesions. *Int J Oncol*, *54*(5), 1567–1578. <https://doi.org/10.3892/ijco.2019.4756>
109. Lindquist, D., Ahrlund-Richter, A., Tarján, M., Tot, T., & Dalianis, T. (2012). Intense CD44 expression is a negative prognostic factor in tonsillar and base of tongue cancer. *Anticancer Res*, *32*(1), 153–161. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22213301>
110. Liu, F., Lan, J., Jiao, W., Mo, X., Huang, Y., Ye, H., Xiao, R., Wang, Y., Mo, M., & Shi, L. (2017). Differences in *Zbtb7a* expression cause heterogeneous changes in human nasopharyngeal carcinoma CNE3 sublines. *Oncol Lett*, *14*(3), 2669–2676. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6553>
111. Liu, W., Yao, Y., Shi, L., Tang, G., & Wu, L. (2021). A novel lncRNA LOLA1 may predict malignant progression and promote migration, invasion, and EMT of oral leukoplakia via the AKT/GSK-3 β pathway. *J Cell Biochem*, *122*(10), 1302–1312. <https://doi.org/10.1002/jcb.29951>
112. Liu, X. S., Haines, J. E., Mehanna, E. K., Genet, M. D., Ben-Sahra, I., Asara, J. M., Manning, B. D., & Yuan, Z. M. (2014). ZBTB7A acts as a tumor suppressor through the transcriptional repression of glycolysis. *Genes Dev*, *28*(17), 1917–1928. <https://doi.org/10.1101/gad.245910.114>
113. Lunardi, A., Guarnerio, J., Wang, G., Maeda, T., & Pandolfi, P. P. (2013). Role of LRF/Pokemon in lineage fate decisions. *Blood*, *121*(15), 2845–2853. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-11-292037>
114. Mack, B., & Gires, O. (2008). CD44s and CD44v6 expression in head and neck epithelia. *PLoS One*, *3*(10), e3360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003360>
115. Maeda, T., Hobbs, R. M., & Pandolfi, P. P. (2005). The transcription factor Pokemon: a new key player in cancer pathogenesis. *Cancer Res*, *65*(19), 8575–8578. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1055>
116. Mallen-St Clair, J., Alani, M., Wang, M. B., & Srivatsan, E. S. (2016). Human papillomavirus in oropharyngeal cancer: The changing face of a disease. *Biochim Biophys Acta*, *1866*(2), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.07.005>
117. Martorell-Calatayud, A., Botella-Estrada, R., Bagán-Sebastián, J. V., Sanmartín-Jiménez, O., & Guillén-Barona, C. (2009). [Oral leukoplakia: clinical, histopathologic, and molecular features and therapeutic approach]. *Actas Dermosifiliogr*, *100*(8), 669–684. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19775545>
118. Mello, F. W., Miguel, A. F. P., Dutra, K. L., Porporatti, A. L., Warnakulasuriya, S., Guerra, E. N. S., & Rivero, E. R. C. (2018). Prevalence of oral potentially malignant disorders: A systematic review and meta-analysis. *J Oral Pathol Med*, *47*(7), 633–640. <https://doi.org/10.1111/jop.12726>
119. Menck, K., Sivaloganathan, S., Bleckmann, A., & Binder, C. (2020). Microvesicles in Cancer: Small Size, Large Potential. *Int J Mol Sci*, *21*(15). <https://doi.org/10.3390/ijms21155373>
120. Metgud, R., & Patel, S. (2014). Serum and salivary levels of albumin as diagnostic tools for oral pre-malignancy and oral malignancy. *Biotech Histochem*, *89*(1), 8–13. <https://doi.org/10.3109/10520295.2013.793394>
121. Miletti-González, K. E., Murphy, K., Kumaran, M. N., Ravindranath, A. K., Wernyj, R. P., Kaur, S., Miles, G. D., Lim, E., Chan, R., Chekmareva, M., Heller, D. S., Foran, D., Chen, W., Reiss, M., Bandera, E. V., Scotto, K., & Rodríguez-Rodríguez, L. (2012). Identification of function for CD44 intracytoplasmic domain (CD44-ICD): modulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) transcription via novel promoter response element. *J Biol Chem*, *287*(23), 18995–19007. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.318774>
122. Miluna, S., Melderis, R., Briuka, L., Skadins, I., Broks, R., Kroica, J., & Rostoka, D. (2022). The Correlation of Swedish Snus, Nicotine Pouches and Other Tobacco Products with Oral Mucosal Health and Salivary Biomarkers. *Dent J (Basel)*, *10*(8). <https://doi.org/10.3390/dj10080154>

123. Mineta, H., Miura, K., Suzuki, I., Takebayashi, S., Amano, H., Araki, K., Harada, H., Ichimura, K., Wennerberg, J. P., & Dictor, M. R. (1999). Low p27 expression correlates with poor prognosis for patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *Cancer*, *85*(5), 1011–1017. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0142\(19990301\)85:5<1011::aid-cnrc1>3.0.co;2-0](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(19990301)85:5<1011::aid-cnrc1>3.0.co;2-0)
124. Mohammed, F., & Fairozekhan, A. T. (2023). Oral Leukoplakia. In *StatPearls*. StatPearls Publishing Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.
125. Monteiro, L., Mello, F. W., & Warnakulasuriya, S. (2020). Tissue biomarkers for predicting the risk of oral cancer in patients diagnosed with oral leukoplakia: A systematic review. *Oral Dis*. <https://doi.org/10.1111/odi.13747>
126. Nagao, T., Warnakulasuriya, S., Hasegawa, S., Sakuma, H., Miyabe, S., Komaki, K., Ishii, K., Machida, J., Kimura, M., Kuroyanagi, N., Saito, T., Takeuchi, G., Ohyabu, T., Shimozaoto, K., & Hashimoto, S. (2016). Elucidating risk factors for oral leukoplakia affecting gingivae in Japanese subjects. *Translational Research in Oral Oncology*, *1*, 2057178X16654704. <https://doi.org/10.1177/2057178X16654704>
127. Nagao, T., Warnakulasuriya, S., Hasegawa, S., Sakuma, H., Miyabe, S., Machida, J., Yoshida, W., Sugita, Y., Kubo, K., & Maeda, H.
128. Nanci, A. (2017). *Ten Cate's Oral Histology-E-Book: Development, Structure, and Function*. Elsevier Health Sciences.
129. Nankivell, P., & Mehanna, H. (2011). Oral dysplasia: biomarkers, treatment, and follow-up. *Curr Oncol Rep*, *13*(2), 145–152. <https://doi.org/10.1007/s11912-010-0150-z>
130. Nankivell, P., Williams, H., McConkey, C., Webster, K., High, A., MacLennan, K., Senguven, B., Rabbitts, P., & Mehanna, H. (2013). Tetraspanins CD9 and CD151, epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 expression predict malignant progression in oral epithelial dysplasia. *Br J Cancer*, *109*(11), 2864–2874. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.600>
131. Napier, S. S., Cowan, C. G., Gregg, T. A., Stevenson, M., Lamey, P. J., & Toner, P. G. (2003). Potentially malignant oral lesions in Northern Ireland: size (extent) matters. *Oral Dis*, *9*(3), 129–137. <https://doi.org/10.1034/j.1601-0825.2003.02888.x>
132. Narayan, T. V., & Shilpashree, S. (2016). Meta-analysis on clinicopathologic risk factors of leukoplakias undergoing malignant transformation. *J Oral Maxillofac Pathol*, *20*(3), 354–361. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.190900>
133. Nasser, W., Flechtenmacher, C., Holzinger, D., Hofele, C., & Bosch, F. X. (2011). Aberrant expression of p53, p16INK4a and Ki-67 as basic biomarker for malignant progression of oral leukoplakias. *J Oral Pathol Med*, *40*(8), 629–635. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2011.01026.x>
134. Negi, L. M., Talegaonkar, S., Jaggi, M., Ahmad, F. J., Iqbal, Z., & Khar, R. K. (2012). Role of CD44 in tumour progression and strategies for targeting. *J Drug Target*, *20*(7), 561–573. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2012.702767>
135. Neville, B. W., & Day, T. A. (2002). Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin*, *52*(4), 195–215. <https://doi.org/10.3322/canjclin.52.4.195>
136. Nosé, V., & Lazar, A. J. (2022). Update from the 5th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors: Familial Tumor Syndromes. *Head Neck Pathol*, *16*(1), 143–157. <https://doi.org/10.1007/s12105-022-01414-z>
137. Nunes, L. A., Mussavira, S., & Bindhu, O. S. (2015). Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: ¹SEP a systematic review. *Biochem Med (Zagreb)*, *25*(2), 177–192. <https://doi.org/10.11613/BM.2015.018>
138. Nureddin, A. (2018). New Definition for Leukoplakia and Reclassification of Leukoplakias as Separated Disease Entities. *Advances in Dentistry & Oral Health*, *7*. <https://doi.org/10.19080/ADOH.2018.07.555717>

139. Odell, E., Kujan, O., Warnakulasuriya, S., & Sloan, P. (2021). Oral epithelial dysplasia: Recognition, grading and clinical significance. *Oral Dis*, 27(8), 1947–1976. <https://doi.org/10.1111/odi.13993>
140. Okut, E. B., & Ceylan, C. (2019). Oral leukoplakia: demographic, clinical and histopathological characteristics. *Mucosa*, 2(4), 100–109. [https://doi.org/Bulut Okut E, Ceylan C. Oral leukoplakia: demographic, clinical and histopathological characteristics. Mucosa. 2019;2\(4\):100-9.](https://doi.org/Bulut%20Okut%20E,%20Ceylan%20C.%20Oral%20leukoplakia:%20demographic,%20clinical%20and%20histopathological%20characteristics.%20Mucosa.%202019;2(4):100-9)
141. Ortiz, R. C., Lopes, N. M., Amôr, N. G., Ponce, J. B., Schmerling, C. K., Lara, V. S., Moyses, R. A., & Rodini, C. O. (2018). CD44 and ALDH1 immunoexpression as prognostic indicators of invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 47(8), 740–747. <https://doi.org/10.1111/jop.12734>
142. Ota, Y., Noguchi, T., Ariji, E., Fushimi, C., Fuwa, N., Harada, H., Hayashi, T., Hayashi, R., Honma, Y., Miura, M., Mori, T., Nagatsuka, H., Okura, M., Ueda, M., Uzawa, N., Yagihara, K., Yagishita, H., Yamashiro, M., Yanamoto, S., & Kirita, T. (2021). General rules for clinical and pathological studies on oral cancer (2nd edition): a synopsis. *Int J Clin Oncol*, 26(4), 623–635. <https://doi.org/10.1007/s10147-020-01812-9>
143. Pansini, P. F., do Valle, I. B., Damasceno, T. C. D., de Abreu, P. M., C6, A. C. G., L6pez, R. V. M., Lenzi, J., Rocha, R. M., Souza, E. D., Curado, M. P., Mehanna, H., Nankivell, P., de Podest6, J. R. V., & von Zeidler, S. V. (2021). Differential Expression of Potential Biomarkers of Oral Squamous Cell Carcinoma Development. *Head Neck Pathol*, 15(4), 1127–1136. <https://doi.org/10.1007/s12105-021-01322-8>
144. Patel, A., Patel, S., Patel, P., Mandlik, D., Patel, K., & Tanavde, V. (2022). Salivary Exosomal miRNA-1307-5p Predicts Disease Aggressiveness and Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. *Int J Mol Sci*, 23(18). <https://doi.org/10.3390/ijms231810639>
145. Peng, Q., Yang, J. Y., & Zhou, G. (2020). Emerging functions and clinical applications of exosomes in human oral diseases. *Cell Biosci*, 10, 68. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00424-0>
146. Pereira, L. H., Reis, I. M., Reategui, E. P., Gordon, C., Saint-Victor, S., Duncan, R., Gomez, C., Bayers, S., Fisher, P., Perez, A., Goodwin, W. J., Hu, J. J., & Franzmann, E. J. (2016). Risk Stratification System for Oral Cancer Screening. *Cancer Prev Res (Phila)*, 9(6), 445–455. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-15-0200>
147. Pettersen, J. S., Fuentes-Duculan, J., Su6rez-Fari6as, M., Pierson, K. C., Pitts-Kiefer, A., Fan, L., Belkin, D. A., Wang, C. Q., Bhuvanendran, S., Johnson-Huang, L. M., Bluth, M. J., Krueger, J. G., Lowes, M. A., & Carucci, J. A. (2011). Tumor-associated macrophages in the cutaneous SCC microenvironment are heterogeneously activated. *J Invest Dermatol*, 131(6), 1322–1330. <https://doi.org/10.1037/jid.2011.9>
148. Petti, S. (2003). Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncol*, 39(8), 770–780. [https://doi.org/10.1016/s1368-8375\(03\)00102-7](https://doi.org/10.1016/s1368-8375(03)00102-7)
149. Pisterna, G. V., & Siragusa, M. (2007). CD44 Presence in inflamed pulp tissue. *J Endod*, 33(10), 1203–1207. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.05.022>
150. Pitiyage, G., Tilakaratne, W. M., Tavassoli, M., & Warnakulasuriya, S. (2009). Molecular markers in oral epithelial dysplasia: review. *J Oral Pathol Med*, 38(10), 737–752. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2009.00804.x>
151. Pořta, P., Kolk, A., Pivovar6ikov6, K., Liřka, J., Gen6ur, J., Moztarzadeh, O., Micopulos, C., P6nkava, A., Frolo, M., Bissinger, O., & Hauer, L. (2023). Clinical Experience with Autofluorescence Guided Oral Squamous Cell Carcinoma Surgery. *Diagnostics (Basel)*, 13(20). <https://doi.org/10.3390/diagnostics13203161>
152. Prabakaran, R. C., Rachel, J. B., Rao, G. N., Vennila, A. A., Fathima, S. D., & Keerthik Lavanya, M. K. (2022). Expression sites of immunohistochemistry markers in oral diseases – A scoping review. *J Oral Maxillofac Pathol*, 26(4), 524–533. https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp_364_22
153. Pur6, E., & Cuff, C. A. (2001). A crucial role for CD44 in inflammation. *Trends Mol Med*, 7(5), 213–221. [https://doi.org/10.1016/s1471-4914\(01\)01963-3](https://doi.org/10.1016/s1471-4914(01)01963-3)

154. Qadri, M., Almadani, S., Jay, G. D., & Elsaid, K. A. (2018). Role of CD44 in Regulating TLR2 Activation of Human Macrophages and Downstream Expression of Proinflammatory Cytokines. *J Immunol*, *200*(2), 758–767. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700713>
155. Queiroz, A. B., Focchi, G., Dobo, C., Gomes, T. S., Ribeiro, D. A., & Oshima, C. T. (2010). Expression of p27, p21(WAF/Cip1), and p16(INK4a) in normal oral epithelium, oral squamous papilloma, and oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*, *30*(7), 2799–2803. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20683015>
156. Ramasubramanian, A., Ramani, P., Sherlin, H. J., Premkumar, P., Natesan, A., & Thiruvengadam, C. (2013). Immunohistochemical evaluation of oral epithelial dysplasia using cyclin-D1, p27 and p63 expression as predictors of malignant transformation. *J Nat Sci Biol Med*, *4*(2), 349–358. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.117011>
157. Rath, S. L., & Senapati, S. (2016). Mechanism of p27 Unfolding for CDK2 Reactivation. *Sci Rep*, *6*, 26450. <https://doi.org/10.1038/srep26450>
158. Reid, P., Marcu, L. G., Olver, I., Moghaddasi, L., Staudacher, A. H., & Bezak, E. (2019). Diversity of cancer stem cells in head and neck carcinomas: The role of HPV in cancer stem cell heterogeneity, plasticity and treatment response. *Radiother Oncol*, *135*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2019.02.016>
159. Renaud-Vilmer, C., & Cavelier-Balloy, B. (2017). [Precancerous lesions of the buccal epithelium]. *Ann Dermatol Venereol*, *144*(2), 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2016.07.017>
160. Roye, G. D., Myers, R. B., Brown, D., Poczatek, R., Beenken, S. W., & Grizzle, W. E. (1996). CD44 expression in dysplastic epithelium and squamous-cell carcinoma of the esophagus. *Int J Cancer*, *69*(4), 254–258. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19960822\)69:4<254::AID-IJC2>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19960822)69:4<254::AID-IJC2>3.0.CO;2-W)
161. Rubert, A., Bagán, L., & Bagán, J. V. (2021). Retraction: Oral leukoplakia, a clinical-histopathological study in 412 patients. *J Clin Exp Dent*, *13*(5), e426–e432. <https://doi.org/10.4317/jced.532746>
162. Saldivia-Siracusa, C., & González-Arriagada, W. A. (2021). Difficulties in the Prognostic Study of Oral Leukoplakia: Standardisation Proposal of Follow-Up Parameters. *Front Oral Health*, *2*, 614045. <https://doi.org/10.3389/froh.2021.614045>
163. Sartini, D., Lo Muzio, L., Morganti, S., Pozzi, V., Di Ruscio, G., Rocchetti, R., Rubini, C., Santarelli, A., & Emanuelli, M. (2015). Pokemon proto-oncogene in oral cancer: potential role in the early phase of tumorigenesis. *Oral Dis*, *21*(4), 462–469. <https://doi.org/10.1111/odi.12304>
164. Satoh, T. P., Miya, M., Mabuchi, K., & Nishida, M. (2016). Structure and variation of the mitochondrial genome of fishes. *BMC Genomics*, *17*(1), 719. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3054-y>
165. Sawant, S., Ahire, C., Dongre, H., Joshi, S., Jamghare, S., Rane, P., Kane, S., & Chaukar, D. (2018). Prognostic significance of elevated serum CD44 levels in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, *47*(7), 665–673. <https://doi.org/10.1111/jop.12731>
166. Schipper, H. M. (2007). The role of biologic markers in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, *3*(4), 325–332. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2007.07.015>
167. Senbanjo, L. T., & Chellaiah, M. A. (2017). CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front Cell Dev Biol*, *5*, 18. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00018>
168. Sgambato, A., Cittadini, A., Faraglia, B., & Weinstein, I. B. (2000). Multiple functions of p27(Kip1) and its alterations in tumor cells: a review. *J Cell Physiol*, *183*(1), 18–27. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4652\(200004\)183:1<18::aid-jcp3>3.0.co;2-s](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4652(200004)183:1<18::aid-jcp3>3.0.co;2-s)
169. Shahsavari, F., Miri, R., & Ghorbanpour, M. (2020). Expression of epidermal growth factor receptor in oral and esophageal squamous-cell carcinoma. *Dent Res J (Isfahan)*, *17*(2), 85–91.
170. Sharma, S. S., & Pledger, W. J. (2016). The non-canonical functions of p27(Kip1) in normal and tumor biology. *Cell Cycle*, *15*(9), 1189–1201. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1157238>

171. Shavlokhova, V., Flechtenmacher, C., Sandhu, S., Vollmer, M., Vollmer, A., Pilz, M., Hoffmann, J., Ristow, O., Engel, M., & Freudlsperger, C. (2021). Feasibility and Implementation of Ex Vivo Fluorescence Confocal Microscopy for Diagnosis of Oral Leukoplakia: Preliminary Study. *Diagnostics (Basel)*, *11*(6). <https://doi.org/10.3390/diagnostics11060951>
172. Shibata, H., Matsubara, O., Wakiyama, H., & Tanaka, S. (2001). The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Pathol Res Pract*, *197*(3), 157–164. <https://doi.org/10.1078/0344-0338-00027>
173. Shintani, S., Mihara, M., Nakahara, Y., Kiyota, A., Ueyama, Y., Matsumura, T., & Wong, D. T. (2002). Expression of cell cycle control proteins in normal epithelium, premalignant and malignant lesions of oral cavity. *Oral Oncol*, *38*(3), 235–243. [https://doi.org/10.1016/s1368-8375\(01\)00048-3](https://doi.org/10.1016/s1368-8375(01)00048-3)
174. Shiozawa, T., Shiohara, S., Kanai, M., Konishi, I., Fujii, S., & Nikaido, T. (2001). Expression of the cell cycle regulator p27(Kip1) in normal squamous epithelium, cervical intraepithelial neoplasia, and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Immunohistochemistry and functional aspects of p27(Kip1). *Cancer*, *92*(12), 3005–3011. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(20011215\)92:12<3005::aid-cncr10153>3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/1097-0142(20011215)92:12<3005::aid-cncr10153>3.0.co;2-6)
175. Sinha, G. M., & Hegde, V. (2023). Detection of micro-metastasis using cytokeratins (AE1/AE3) in haematoxylin & eosin-stained N(0) lymph nodes of oral squamous cell carcinoma. *Indian J Med Res*, *157*(4), 316–321. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_489_20
176. Sivadasan, P., Gupta, M. K., Sathe, G., Sudheendra, H. V., Sunny, S. P., Renu, D., Hari, P. S., Gowda, H., Suresh, A., Kuriakose, M. A., & Sirdeshmukh, R. (2020). Salivary proteins from dysplastic leukoplakia and oral squamous cell carcinoma and their potential for early detection. *J Proteomics*, *212*, 103574. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103574>
177. Skandalis, S. S., Karalis, T. T., Chatzopoulos, A., & Karamanos, N. K. (2019). Hyaluronan-CD44 axis orchestrates cancer stem cell functions. *Cell Signal*, *63*, 109377. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109377>
178. Smith, D. H., Raslan, S., Reis, I. M., Al-Awady, A., Buitron, I., Perez, M., Liu, H., Halgowich, J., Gordon, C., Webb Hooper, M., Barengo, N. C., & Franzmann, E. J. (2021). Decreased Levels of Soluble CD44 in a High-Risk Population following a Smoking Cessation Program. *Int J Environ Res Public Health*, *18*(24). <https://doi.org/10.3390/ijerph182413174>
179. Speight, P. M., Khurram, S. A., & Kujan, O. (2018). Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, *125*(6), 612–627. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2017.12.011>
180. Sridharan, G., Bagri-Manjrekar, K., & Shankar, A. (2016). Cell cycle inhibitors in oral leukoplakia: A review.
181. Sritippopho, T., Chotjumlong, P., & Iamaroon, A. (2015). Roles of Human Papillomaviruses and p16 in Oral Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, *16*(15), 6193–6200. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.15.6193>
182. Stojanov, I. J., Omari, J., Akeel, I., Sultan, A. S., & Woo, S. B. (2024). Oral epithelial dysplasia with lymphocytic immune response: clinicopathological characterisation of 44 cases. *Histopathology*, *85*(1), 40–50. <https://doi.org/10.1111/his.15171>
183. Sugár, L., & Bánóczy, J. (1969). Follow-up studies in oral leukoplakia. *Bull World Health Organ*, *41*(2), 289–293.
184. Sun, Y., Xia, Z., Shang, Z., Sun, K., Niu, X., Qian, L., Fan, L. Y., Cao, C. X., & Xiao, H. (2016). Facile preparation of salivary extracellular vesicles for cancer proteomics. *Sci Rep*, *6*, 24669. <https://doi.org/10.1038/srep24669>
185. Sundberg, J., Korytowska, M., Holmberg, E., Bratel, J., Wallström, M., Kjellström, E., Blomgren, J., Kovács, A., Öhman, J., Sand, L., Hirsch, J. M., Giglio, D., Kjeller, G., & Hasséus, B. (2019). Recurrence rates after surgical removal of oral leukoplakia-A prospective longitudinal multi-centre study. *PLoS One*, *14*(12), e0225682. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225682>

186. Sundermann, B. V., Uhlmann, L., Hoffmann, J., Freier, K., & Thiele, O. C. (2018). The localization and risk factors of squamous cell carcinoma in the oral cavity: A retrospective study of 1501 cases. *J Craniomaxillofac Surg*, *46*(2), 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2017.10.019>
187. Suter, V. G., Morger, R., Altermatt, H. J., Spieler, P., & Bornstein, M. M. (2008). [Oral erythroplakia and erythroleukoplakia: red and red-white dysplastic lesions of the oral mucosa--part 1: epidemiology, etiology, histopathology and differential diagnosis]. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, *118*(5), 390–397. (Erythroplakie und Erythroleukoplakie: Rote und rot-weiße Risikoläsionen der Mundhöhlenschleimhaut. Teil 1: Epidemiologie, Ätiologie, Histopathologie und Differenzialdiagnose.)
188. Takkem, A., Barakat, C., Zakaraia, S., Zaid, K., Najmeh, J., Ayoub, M., & Seirawan, M. Y. (2018). Ki-67 Prognostic Value in Different Histological Grades of Oral Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*, *19*(11), 3279–3286. <https://doi.org/10.31557/apjcp.2018.19.11.3279>
189. Tamatani, T., Takamaru, N., Ohe, G., Akita, K., Nakagawa, T., & Miyamoto, Y. (2018). Expression of CD44, CD44v9, ABCG2, CD24, Bmi-1 and ALDH1 in stage I and II oral squamous cell carcinoma and their association with clinicopathological factors. *Oncol Lett*, *16*(1), 1133–1140. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8703>
190. Tanaka, T., & Tanaka, M. (2011). Oral carcinogenesis and oral cancer chemoprevention: a review. *Patholog Res Int*, *2011*, 431246. <https://doi.org/10.4061/2011/431246>
191. Teng, Y., Hu, L., Yu, B., Li, X., Chen, M., Fu, X., Zhang, J., Gao, Y., Xu, R., & Zhu, J. (2020). Cytoplasmic p27 is a novel prognostic biomarker and oncogenic protein for nasopharyngeal carcinoma. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, *48*(1), 336–344. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1699811>
192. Thambiah, L. J., Bindushree, R. V., Anjum, A., Pugazhendi, S. K., Babu, L., & Nair, R. P. (2018). Evaluating the expression of p16 and p27 in oral epithelial dysplasias and oral squamous cell carcinoma: A diagnostic marker for carcinogenesis. *J Oral Maxillofac Pathol*, *22*(1), 59–64. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_92_17
193. Thapa, R., & Wilson, G. D. (2016). The Importance of CD44 as a Stem Cell Biomarker and Therapeutic Target in Cancer. *Stem Cells Int*, *2016*, 2087204. <https://doi.org/10.1155/2016/2087204>
194. Thorne, R. F., Legg, J. W., & Isacke, C. M. (2004). The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. *J Cell Sci*, *117*(Pt 3), 373–380. <https://doi.org/10.1242/jcs.00954>
195. Tilakaratne, W. M., Jayasooriya, P. R., Jayasuriya, N. S., & De Silva, R. K. (2019). Oral epithelial dysplasia: Causes, quantification, prognosis, and management challenges. *Periodontol 2000*, *80*(1), 126–147. <https://doi.org/10.1111/prd.12259>
196. Timbang, M. R., Sim, M. W., Bewley, A. F., Farwell, D. G., Mantravadi, A., & Moore, M. G. (2019). HPV-related oropharyngeal cancer: a review on burden of the disease and opportunities for prevention and early detection. *Hum Vaccin Immunother*, *15*(7–8), 1920–1928. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1600985>
197. Tovar, S., Costache, M., Perlea, P., Caramida, M., Totan, C., Warnakulasuriya, S., & Parlatescu, I. (2023). Oral leukoplakia: A clinicopathological study and malignant transformation. *Oral Dis*, *29*(4), 1454–1463. <https://doi.org/10.1111/odi.14123>
198. Trapasso, S., Garozzo, A., Belfiore, A., & Allegra, E. (2016). Evaluation of the CD44 isoform v-6 (sCD44var, v6) in the saliva of patients with laryngeal carcinoma and its prognostic role. *Cancer Biomark*, *16*(2), 275–280. <https://doi.org/10.3233/CBM-150565>
199. Tsuzuki, H., Fujieda, S., Sunaga, H., Narita, N., Tokuriki, M., & Saito, H. (2003). Expression of p27 and apoptosis in oral leukoplakia. *Anticancer Res*, *23*(2B), 1265–1270. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12820381>

200. Ulaganathan, G., Mohamed Niazi, K. T., Srinivasan, S., Balaji, V. R., Manikandan, D., Hameed, K. A. S., & Banumathi, A. (2017). A Clinicopathological Study of Various Oral Cancer Diagnostic Techniques. *J Pharm Bioallied Sci*, 9 (Suppl 1), S4–s10. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_110_17
201. Vairaktaris, E., Yapijakis, C., Psyrris, A., Spyridonidou, S., Yannopoulos, A., Lazaris, A., Vassiliou, S., Ferekidis, E., Vylliotis, A., Nkenke, E., & Patsouris, E. (2007). Loss of tumour suppressor p16 expression in initial stages of oral oncogenesis. *Anticancer Res*, 27(2), 979–984. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17465230>
202. Vallonthaiel, A. G., Singh, M. K., Dinda, A. K., Kakkar, A., Thakar, A., & Das, S. N. (2016). Prognostic significance of cytoplasmic p27 in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 45(7), 475–480. <https://doi.org/10.1111/jop.12392>
203. van der Waal, I. (2009). Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol*, 45(4–5), 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.05.016>
204. van der Waal, I. (2018). Historical perspective and nomenclature of potentially malignant or potentially premalignant oral epithelial lesions with emphasis on leukoplakia-some suggestions for modifications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 125(6), 577–581. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2017.11.023>
205. Venkat Naga, S. K. S., Shekar, P. C., Kattappagari, K. K., Prakash Chandra, K. L., Reddy, G. S., & Ramana Reddy, B. V. (2019). Expression of cluster differentiation-44 stem cell marker in grades of oral epithelial dysplasia: A preliminary study. *J Oral Maxillofac Pathol*, 23(2), 203–207. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_308_18
206. Villa, A., Menon, R. S., Kerr, A. R., De Abreu Alves, F., Guollo, A., Ojeda, D., & Woo, S. B. (2018). Proliferative leukoplakia: Proposed new clinical diagnostic criteria. *Oral Dis*, 24(5), 749–760. <https://doi.org/10.1111/odi.12830>
207. Villa, A., & Woo, S. B. (2017). Leukoplakia-A Diagnostic and Management Algorithm. *J Oral Maxillofac Surg*, 75(4), 723–734. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2016.10.012>
208. Visioli, F., Lauxen, I. S., Sant'ana Filho, M., & Rados, P. V. (2012). Expression of the cell cycle regulation proteins p53 and p21WAF1 in different types of non-dysplastic leukoplakias. *J Appl Oral Sci*, 20(3), 369–375. <https://doi.org/10.1590/s1678-77572012000300013>
209. Wang, L., Yin, P., Wang, J., Wang, Y., Sun, Z., Zhou, Y., & Guan, X. (2019). Delivery of mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles with enriched miR-185 inhibits progression of OPMD. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 47(1), 2481–2491. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1623232>
210. Wang, S. J., Wong, G., de Heer, A. M., Xia, W., & Bourguignon, L. Y. (2009). CD44 variant isoforms in head and neck squamous cell carcinoma progression. *Laryngoscope*, 119(8), 1518–1530. <https://doi.org/10.1002/lary.20506>
211. Wang, Z., Chen, J. Q., Liu, J. L., & Tian, L. (2016). Exosomes in tumor microenvironment: novel transporters and biomarkers. *J Transl Med*, 14(1), 297. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1056-9>
212. Warnakulasuriya, S. (2018). Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 125(6), 582–590. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2018.03.011>
213. Warnakulasuriya, S., & Ariyawardana, A. (2016). Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies. *J Oral Pathol Med*, 45(3), 155–166. <https://doi.org/10.1111/jop.12339>
214. Warnakulasuriya, S., Johnson, N. W., & van der Waal, I. (2007). Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*, 36(10), 575–580. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00582.x>

215. Warnakulasuriya, S., Kovacevic, T., Madden, P., Coupland, V. H., Sperandio, M., Odell, E., & Møller, H. (2011). Factors predicting malignant transformation in oral potentially malignant disorders among patients accrued over a 10-year period in South East England. *J Oral Pathol Med*, *40*(9), 677–683. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2011.01054.x>
216. Warnakulasuriya, S., Kujan, O., Aguirre-Urizar, J. M., Bagan, J. V., González-Moles, M., Kerr, A. R., Lodi, G., Mello, F. W., Monteiro, L., Ogden, G. R., Sloan, P., & Johnson, N. W. (2021). Oral potentially malignant disorders: A consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer. *Oral Dis*, *27*(8), 1862–1880. <https://doi.org/10.1111/odi.13704>
217. WHO. (2024). *WHO Classification of Tumours*. In *Head and Neck Tumours* (5th edition ed., Vol. Volume 9). IARC.
218. Wielenga, V. J., Heider, K. H., Offerhaus, G. J., Adolf, G. R., van den Berg, F. M., Ponta, H., Herrlich, P., & Pals, S. T. (1993). Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res*, *53*(20), 4754–4756.
219. Xia, L., Jiang, L., Chen, Y., Zhang, G., & Chen, L. (2021). ThPOK transcriptionally inactivates TNFRSF12A to increase the proliferation of T cells with the involvement of the NF-κB pathway. *Cytokine*, *148*, 155658. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155658>
220. Xiao, M., Zhang, J., & Chen, W. (2018). M1-like tumor-associated macrophages activated by exosome-transferred THBS1 promote malignant migration in oral squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*, *37*(1), 143. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0815-2>
221. Xing, C., Xu, W., Shi, Y., Zhou, B., Wu, D., Liang, B., Zhou, Y., Gao, S., & Feng, J. (2020). CD9 knockdown suppresses cell proliferation, adhesion, migration and invasion, while promoting apoptosis and the efficacy of chemotherapeutic drugs and imatinib in Ph⁺ ALL SUP-B15 cells. *Mol Med Rep*, *22*(4), 2791–2800. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11350>
222. Yagyuu, T., Funayama, N., Imada, M., & Kirita, T. (2021). Effect of smoking status and programmed death-ligand 1 expression on the microenvironment and malignant transformation of oral leukoplakia: A retrospective cohort study. *PLoS One*, *16*(4), e0250359. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250359>
223. Yan, W., Apweiler, R., Balgley, B. M., Boontheung, P., Bundy, J. L., Cargile, B. J., Cole, S., Fang, X., Gonzalez-Begne, M., Griffin, T. J., Hagen, F., Hu, S., Wolinsky, L. E., Lee, C. S., Malamud, D., Melvin, J. E., Menon, R., Mueller, M., Qiao, R., . . . Wong, D. T. (2009). Systematic comparison of the human saliva and plasma proteomes. *Proteomics Clin Appl*, *3*(1), 116–134. <https://doi.org/10.1002/prca.200800140>
224. Yang, C., Blaize, G., Marrocco, R., Rouquié, N., Bories, C., Gador, M., Mélique, S., Joulia, E., Benamar, M., Dejean, A. S., Daniels-Treffandier, H., Love, P. E., Fazilleau, N., Saoudi, A., & Lesourne, R. (2022). THEMIS enhances the magnitude of normal and neuroinflammatory type 1 immune responses by promoting TCR-independent signals. *Sci Signal*, *15*(742), eabl5343. <https://doi.org/10.1126/scisignal.abl5343>
225. Yap, T., Pruthi, N., Seers, C., Belobrov, S., McCullough, M., & Celentano, A. (2020). Extracellular Vesicles in Oral Squamous Cell Carcinoma and Oral Potentially Malignant Disorders: A Systematic Review. *Int J Mol Sci*, *21*(4). <https://doi.org/10.3390/ijms21041197>
226. Yousafzai, N. A., Jin, H., Ullah, M., & Wang, X. (2021). Recent advances of SIRT1 and implications in chemotherapeutics resistance in cancer. *Am J Cancer Res*, *11*(11), 5233–5248. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34873458>
227. Zhang, C., Li, B., Zeng, X., Hu, X., & Hua, H. (2023). The global prevalence of oral leukoplakia: a systematic review and meta-analysis from 1996 to 2022. *BMC Oral Health*, *23*(1), 645. <https://doi.org/10.1186/s12903-023-03342-y>
228. Zhang, R., Ma, H., Gao, Y., Wu, Y., Qiao, Y., Geng, A., Cai, C., Han, Y., Zeng, Y. A., Liu, X., & Ge, G. (2018). Th-POK regulates mammary gland lactation through mTOR-SREBP pathway. *PLoS Genet*, *14*(2), e1007211. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007211>

229. Zheng, H. C., & Jiang, H. M. (2022). Shuttling of cellular proteins between the plasma membrane and nucleus (Review). *Mol Med Rep*, 25(1). <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12530>
230. Zhong, W. Q., Ren, J. G., Xiong, X. P., Man, Q. W., Zhang, W., Gao, L., Li, C., Liu, B., Sun, Z. J., Jia, J., Zhang, W. F., Zhao, Y. F., & Chen, G. (2019). Increased salivary microvesicles are associated with the prognosis of patients with oral squamous cell carcinoma. *J Cell Mol Med*, 23(6), 4054–4062. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14291>
231. Zlotogorski-Hurvitz, A., Dayan, D., Chaushu, G., Korvala, J., Salo, T., Sormunen, R., & Vered, M. (2015). Human saliva-derived exosomes: comparing methods of isolation. *J Histochem Cytochem*, 63(3), 181–189. <https://doi.org/10.1369/0022155414564219>
232. Zu, X., Ma, J., Liu, H., Liu, F., Tan, C., Yu, L., Wang, J., Xie, Z., Cao, D., & Jiang, Y. (2011). Pro-oncogene Pokemon promotes breast cancer progression by upregulating survivin expression. *Breast Cancer Res*, 13(2), R26. <https://doi.org/10.1186/bcr2843>

Pateicības

Vēlos izteikt īpašu pateicību savām promocijas darba vadītājām – profesorei Ingrīdai Čēmai un emeritētai profesorei Regīnai Kleinai. Esmu iemācījies mīlestību pret zinātni, padziļināti domāt un sasaistīt apgūto. Doktorantūras un promocijas darba tapšanas laikā esmu saņēmusi ne tikai neskaitāmus padomus un palīdzību, bet arī iedrošinājumu nepadoties kritiskākajos dzīves brīžos.

Liels paldies dr. Šimonam Svirskim par konsultācijām un palīdzību statistikas apgūvē.

Pateicību vēlos izteikt Stomatoloģijas institūta Mutes medicīnas centra kolēģiem, sevišķi asoc. profesoram Guntaram Selgam par būtisko biopsiju materiālu iegūvi.

Neizsakāma pateicība manai ģimenei par atbalstu un sapratni visu gadu garumā. Īpaša pateicība meitiņai Sofijai par izturību un pacietību.

Pielikumi

Pacienta informācijas un piekrišanas veidlapa

Pārzinis – SIA “Rīgas Stradiņa universitātes Stomatoloģijas institūts”

Orālās patoloģijas klīnika

Reģ. Nr. 40003579713

Adrese: Dzirciema iela 20, Rīga, LV-1007

vārds, uzvārds

personas kods _____

Piekrišana fiziskas personas audu datu apstrādei

Lūdzu, iepazīstieties ar zemāk esošo informāciju un atzīmējiet, vai piekrītat / nepiekrītat.

Orālās patoloģijas klīnikas ietvaros tiek izstrādāts zinātnisks pētījums „Mutes leikoplakijas agrīnu malignitātes pazīmju noteikšana tās audos un siekalās”, kurā paredzēts pētīt noteiktu karcinomas cilmes šūnu ekspresiju arī veselos gļotādas audos.

Lūdzam Jūsu piekrišanu izmantot operācijas laikā iegūtos audus pētījuma nolūkos. Pētījuma ietvaros audi tiks izmantoti anonīmā veidā.

Esmu informēts/-a par tiesībām jebkurā laikā atsaukt piekrišanu.

Piekrītu
 Nepiekrītu

Rīga,
2016. gada _____

Paraksts

RSU Ētikas komitejas lēmums

Veidlapa Nr. E-9 (2)

RSU ĒTIKAS KOMITEJAS LĒMUMS NR. 3 / 18.08.2016.

Rīga, Dzirciema iela 16, LV-1007
Tel. 67061596

Komitejas sastāvs	Kvalifikācija	Nodarbošanās
1. Profesors Olafs Brūvers	Dr.theo.	teologs
2. Profesore Vija Sīle	Dr.phil.	filozofs
3. Asoc.prof. Santa Purviņa	Dr.med.	farmakologs
4. Asoc.prof. Voldemārs Arnis	Dr.biol.	rehabilitologs
5. Profesore Regīna Kleina	Dr.med.	patalogs
6. Profesors Guntars Pupelis	Dr.med.	ķirurgs
7. Asoc.prof. Viesturs Liguts	Dr.med.	toksikologs
8. Docente Iveta Jankovska	Dr.med.	
9. Docents Kristaps Cīrcenis	Dr.med.	

Pieteikuma iesniedzējs: **Dr. Madara Dzudzilo**
Medicīnas fakultāte, doktorantūra

Pētījuma nosaukums: „ Agrīna malignitātes pazīmju diagnostika siekalās un mutes vēždraudes audos”

Iesniegšanas datums: 15.08.2016.

Pētījuma protokols: Izskatot iesniegtos pētījuma dokumentus (protokolu) ir redzams, ka pētījuma mērķis tiek sasniegts, bez kāda apdraudējuma veselībai, drošībai un dzīvībai, pacientus iedalot 3 pētījuma grupās – pirmajā pētījuma grupā piedalīsies pacienti, kas ieradušies konsultācijai SI Orālās Patoloģijas klīnikā un devuši savu piekrišanu pētījumā. Pacients tiks iekļauts pētījumā, kam klīniski diagnosticēts priekšvēža saslimšana mutes dobumā. Šiem pacientiem tiks ņemta biopsija, morfoloģiski pierādīta displāzija vai vēža klātbūtne un veikti imūnhistoķīmiskie pētījumi par biomarkieru ekspresiju. Otrajā pētījuma grupā analizēs morfoloģiskos arhīva datus ar jau pierādītu plakanšūnu vēzi un veiks imūnhistoķīmisko biomarkieru ekspresijas analīzi. Trešajā pētījuma grupā iekļaus kontroles grupas pacientus, konsultētus SI Orālās Patoloģijas klīnikā. Pēc iegūto datu apstrādes un analīzes, tiek sniegti priekšlikumi. Personu (pacientu, dalībnieku) datu aizsardzība, brīvprātīga informēta piekrišana piedalīties pētījumā un konfidencialitāte tiek nodrošināta. Līdz ar to pieteikums atbilst pētījuma ētikas prasībām.

Izskaidrošanas formulārs: ir

Piekrišana piedalīties pētījumā: ir

Komitejas lēmums: **piekrist pētījumam**

Komitejas priekšsēdētājs Olafs Brūvers Tituls: Dr. miss., prof.

Paraksts

Ētikas komitejas sēdes datums: 18.08.2016.