

Anna Ivanova

SIEKALU DZIEDZERU UN
ORONAZOFARINGEĀLO AUDZĒJU
KLĪNISKĀ UN MORFOLOĢISKĀ IZPĒTE,
HERPES GRUPAS VĪRUSU LOMAS
ANALĪZE MALIGNĀ PROCESĀ

Promocijas darbs
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – Mutes, sejas un žokļu ķirurģija

Darba zinātniskie vadītāji:

Dr. habil. med. asociētā profesore Valērija Groma,
Dr. habil. med. asociētais profesors Egīls Korņevs



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ



Promocijas darbs veikts ar ESF projekta „Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē” atbalstu

Rīga – 2013

ANOTĀCIJA

Latvijā ar katru gadu pakāpeniski pieaug saslimstība ar mutes dobuma, nazofaringeālajiem un siekaldziedzeru ļaundabīgajiem audzējiem. Galvas un kakla ļaundabīgo audzēju izcelsmē ir nozīme gan endogēniem, gan eksogēniem faktoriem. Slimības prognoze atkarīga no audzēju uzbūves īpatnībām un slimības stadijas.

Darba mērķis bija ar klīniskām, morfoloģijas un molekulārās bioloģijas metodēm pētīt mutes dobuma, nazofaringeālo un siekaldziedzeru ļaundabīgo audzēju klīnisko gaitu un etiopatogēnēzi, analizēt šo saslimšanu saistību ar herpes vīrusu infekciju.

Retrospektīvajā pētījumā izmantoti dati par 322 pacientiem ar siekaldziedzeru audzējiem, kuri bija ārstēti Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Latvijas Onkoloģijas centrā (RAKUS LOC) Galvas un kakla ķirurģijas nodaļā 1996.-2007.gadam. Bez tam pētījumā tika iekļauti vēl 32 pacienti ar parafaringeāliem audzējiem, kuri tika izmeklēti un ārstēti RAKUS LOC laikā no 2001.gada janvāra līdz 2006.gada decembrim. Laikā no 2009.gada janvāra līdz 2011.gada janvārim RAKUS LOC tika izmeklēti un operēti vēl 14 pacienti ar mutes pamatnes karcinomu, pieauss siekaldziedzeru audzējiem un nazofaringeālo karcinomu – šiem pacientiem noteica herpes grupas vīrusu DNS un EBV antivielu titrus.

Mutes dobuma un orofaringeālie ļaundabīgie audzēji, it īpaši to vēlīnā stadijā, Latvijā diagnosticēti biežāk nekā citās valstīs. Labdabīgie siekaldziedzeru audzēji Latvijas iedzīvotāju populācijā kopumā diagnosticēti gandrīz tikpat bieži kā pārējās Eiropas valstīs, tomēr lielāka saslimstība bija vērojama sieviešu populācijā (mērena tendence). Ki-67 proliferācijas marķiera ekspresija un proliferācijas indeksa pieaugums recidivējošas pleomorfas adenomas stromālajā komponentā var būt saistīti ar audzēja agresīvo klīnisko gaitu. EBV infekcija ir neoplasmas pavadpatoloģija, kura sastopama visos izplatītāko oronazofaringeālo audzēju gadījumos. Pētījuma rezultātā konstatēja, ka prevalē EBV-pozitīvo mutes dobuma plakanšūnu karcinomas. Siekaldziedzeru, mutes dobuma un nazofaringeālo rajona audzēju audos tika atklāta EBV, HHV-6 un HHV-7 DNS, kas liecināja par iespējamo vīrusu līdzdalību oronazofaringeālo karcinomu attīstībā.

Atslēgas vārdi: mutes dobuma karcinoma, NFK, EBV, HHV6, HHV7, siekaldziedzeru audzēji, recidivēšana, Ki-67, CD44, imūnsistēmas šūnas.

SUMMARY

The incidence of the oronasopharyngeal cancers increases in recent decades in Latvia. The tumors of the oronasopharyngeal region and salivary gland tumors represent the morphological diversity and different pathogenic pathways.

The aim of the study was to investigate the clinical course and etiopathogenesis of the oronasopharyngeal and salivary gland tumors using clinical, morphological and molecular virusology methods; deciphering possible connection of herpes virus infection with these neoplasms.

In this retrospective study 322 patients with the histologically confirmed diagnosis of salivary gland tumor treated between 1996 and 2007 at the Riga East University Hospital Oncology Center of Latvia in Department of Head and Neck Surgery were used. In total 212 female and 110 male patients were recorded. 32 parapharyngeal space tumors removed during surgeries as well as associated biopsies performed from 2001 till 2006 were also included in this study. Additionally one more group of patient consisted of 14 adult subjects with oral SCC and NPC attending the Oncology Center of Latvia between 2009 and 2011, were also eligible for the study, in this group EBV antibody titres and herpes viruses DNA was investigated.

The present study showed that benign salivary gland tumors in the Latvian population are characterized by the incidence that is comparable with that in the other European populations; moderate tendency for female predominance. The appearance and elevation of stromal cell proliferative activity in the recurrent salivary gland pleomorphic adenoma may be responsible for more aggressive clinical behavior. EBV infection is a neoplasm co-morbid pathology which occurs in all common oronasopharyngeal tumors and is evidenced by elevated titers of antibodies. CD44, a cell surface receptor on the malignant oropharyngeal epithelial cells, lymphocytes and stromal macrophages in sustained EBV infection in patients with SCC and NPC suggests the CD44-mediated signaling in EBV infection and pathogenesis of oral and pharyngeal tumors. Identification of LMP1 expression and EBV DNA at advanced tumor stage (III, IV) should be taken into consideration. The herpes virus co-infection seems to play a significant role in pathogenesis of oral cancer.

Key words: oral carcinoma, NPC, EBV, HHV6, HHV7, recurrent tumors, Ki-67, CD44, salivary gland tumors, immunocompetent cells.

SATURS

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI UN TERMINI	6
IEVADS	9
1. LITERATŪRAS APSKATS	13
1.1. Mutes dobuma un nazofaringeālo audzēju raksturojums saistībā ar Herpes vīrusu infekcijām	13
1.2. Šūnas virsmas glikoproteīna CD44 un imūnkompetento šūnu nozīme orālās un nazofaringeālās patoloģiju malignajā transformācijā.....	20
1.3. Parafaringeālas telpas audzēju operācijas un to īpatnības.....	22
1.4. Siekaldziedzeru audzēju iedalījums un proliferācijas marķiera ekspresijas raksturojums	27
2. MATERIĀLI UN METODES	29
2.1. Pētījuma veids un pētījuma grupas	29
2.2. Pacienti ar mutes dobuma un nazofaringeāliem audzējiem	29
2.3. Pacienti ar siekaldziedzeru labdabīgiem audzējiem un ļaundabīgu limfoepiteliālo karcinomu	30
2.4. Pacienti ar parafaringeālās telpas audzējiem.....	31
2.5. Materiāla sagatavošana gaismas mikroskopijai	31
2.6. Pētījumā izmantotās imūnhistoķīmiskās reakcijas.....	32
2.6.1. CD44 un imūnkompetento šūnu noteikšana, izmantojot anti-CD8, -CD19, -CD68 un -S100 antivielas	33
2.6.2. Siekaldziedzeru audzēju diferenciāldiagnostika un audzēju šūnu proliferācijas noteikšana ar imūnhistoķīmijas metodēm	35
2.6.3. EBV onkoproteīna LMP1 un HHV-6 antivielu noteikšana	36
2.7. Imūnhistoķīmisko reakciju rezultātu novērtēšana ar puskvantitatīvo un kvantitatīvo metodi.....	36
2.7.1. LMP1, CD44, CD19, CD68 un S100 ekspresijas novērtēšana ar puskvantitatīvo metodi	36
2.7.2. Siekaldziedzeru audzēju šūnu proliferācijas novērtēšana ar kvantitatīvo metodi	37
2.8. EBV antivielu titru noteikšana	37
2.9. EBV, HHV6, HHV7 DNS noteikšana ar PĶR pacientiem ar mutes dobuma un nazofaringeālo karcinomu	38
2.10. Elektronmikroskopija	38
2.11. Datu statistiskā apstrāde	40

3. REZULTĀTI	41
3.1. Mutes dobuma un nazofaringeālo audzēju Herpes grupas vīrusu DNS noteikšana un analīze	41
3.2. Mutes dobuma un nazofaringeālo audzēju morfoloģiskās un imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas rezultāti	43
3.3. CD44 un imūnsistēmas šūnu un Herpes vīrusu onkoproteīnu imūnhistoķīmiska noteikšana pacientiem ar mutes dobuma un siekaldziedzeru audzējiem	48
3.4. EBV antivielu titri pacientiem ar mutes dobuma ļaundabīgiem un siekaldziedzeru ļaundabīgiem un labdabīgiem audzējiem	72
3.5. Siekaldziedzeru labdabīgu audzēju epidemioloģija, klīniskās gaitas īpatnības un patomorfoloģiskā aina	74
3.6. Parafaringeālās telpas audzēju operāciju komplikācijas	83
3.7. Siekaldziedzeru audzēju šūnu proliferācija	87
4. DISKUSIJA	93
5. SECINĀJUMI	108
6. PRAKTISKĀS REKOMENDĀCIJAS	109
7. LITERATŪRAS SARAKSTS	110
8. PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI PAR PĒTĪJUMA TĒMU	124
8.1. Starptautiskās datu bāzēs iekļautās publikācijas (zinātniskie raksti) par pētījuma tēmu.....	124
8.2. Konferenču tēzes par pētījuma tēmu starptautiskās datu bāzēs iekļautos izdevumos un starptautiski citējamās rakstu krājumos.....	124
8.3. Konferenču tēzes vietējās konferencēs	125
8.4. Mutiski ziņojumi (referāti) starptautiskos un vietējos kongresos un konferencēs	125
8.5. Stenda referāti starptautiskos un vietējos kongresos un konferencēs	127
PATEICĪBAS	128
PIELIKUMI	129
1.pielikums. RSU Ētikas komitejas atļauja pētījuma veikšanai	129
2.pielikums. Pacienta piekrišana izmeklēšanai un operācijai (manipulācijai).....	130

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI UN TERMINI

AE1/AE3	Citokeratīni AE1/AE3 ir anticitokeratīnu monoklonālo antivielu divu dažādu klonu AE1 un AE3 maisījums. Katrs no šiem kloniem spēj diagnosticēt noteiktus augstmolekulārus un zemstmolekulārus keratīnus: Monoklonālā antiviela AE1 spēj atpazīt proteīnus (skābo keratīnu apakšgrupas citokeratīnus) ar molekulsmvaru 56,5, 50, 50', 48 un 40 kD kD, pazīstamus arī kā citokeratīns 10, 14, 15, 16 (augstmolekulāri CK) un 19 (zestmolekulārs CK). Monoklonālā antiviela AE3 spēj atpazīt proteīnus (cilvēka bāziskos citokeratīnus) ar molekulsmvaru 65-67, 64, 59, 58, 56 un 52 kD, pazīstamus arī kā citokeratīns 1, 2, 3, 4, 5, 6 (augstmolekulāri CK) un 7, [8] (zestmolekulāri CK). Šo īpašību dēļ abi reaģenti tiek kombinēti, izveidojot vienu reaģentu ar plaša spektra reaktivitāti pret augst- un zemstmolekulāriem citokeratīniem, kurš ir izmantojams kā imūnhistokīmijas marķieris normāla un ļaundabīgi transformēta epitēlija diferencēšanai, zemas diferenciacijas pakāpes ļaundabīgu audzēju epitēliālas izcelsmes noteikšanai.
A20	Antiapoptozes proteīni
Afinitāte	Vielas ķīmiskā tieksme pret citu vielu – tas, cik viegli viela ar to reaģē un veido savienojumu.
Bcl-2	Strukturāli radniecīgu proteīnu grupa (<i>family</i>), kuri kontrolē mitohondriju membrānu caurlaidību un proapoptozes faktora citohroma c atbrīvošanos. Izšķir trīs Bcl-2 proteīnu veidus: - proteīni, kuri inhibē apoptozi (antiapoptozes proteīni); - proteīni, kuri veicina apoptozi (proapoptozes proteīni); - proapoptozes tikai-BH3 proteīni, kuri piesaista un regulē antiapoptozes proteīnus.
Ca	latīn. carcinoma latv. karcinoma (vēzis)
CD3 ⁺ , CD5 ⁺ , CD7 ⁺ , CD8 ⁻	angļu val. <i>cluster of differentiation</i> T limfocītu virsmas molekulas
CD4 ⁺	T limfocītu apakšklase – līdzētājšūnas (<i>T helper</i>)
CD19	normālo un neoplastisko B limfocītu marķieris
CD21 receptors	C3d komplementa receptors
CD44	šūnu adhēzijas molekula

CD68	imūnhistoķīmiskais makrofāgu marķieris
CK5-6	epitēliālo šūnu citokeratīni
CMV	citomegalovīruss, herpes vīruss 5
CNS	centrālā nervu sistēma
DNS	dezoksiribonukleīnskābe
EBNAs 1, 2, 3A, 3B, 3C	EBV kodola antigēni 1, 2, 3A, 3B, 3C
EBV	Epšteina-Bara (<i>Epstein-Barr</i>) vīruss
Eksoni	Eikariota gēna rajoni, kuros iekodēta ģenētiskā informācija par vienu vai otra polipeptīda struktūru (amīnoskābju secību).
Genoms	Visu gēnu kopums, kas ietilpst organisma haploidālajā hromosomu komplektā.
Gēns	DNS daļa, kas kontrolē vienu iedzimto īpašību un parasti atbilst vienai mRNS, kura darbojas kā šablons proteīnu sintēzes laikā.
Grade	Audzēja morfoloģiskās malignitātes pakāpe (histoloģiskās diferenciācijas pakāpe + citi ar audiem saistīti parametri (piem., šūnu kodolu polimorfisms, mitožu daudzums u.c.))
HIV	angl. <i>Human immunodeficiency virus</i> latv. Cilvēka iegūtā imūndeficīta vīruss
HPV	angl. <i>Human papilloma virus</i> latv. Cilvēka papilomas vīruss
HSV 1, 2	angl. <i>herpes simplex virus</i> , cilvēka herpes vīruss 1, 2 latv. 1., 2. tipa cilvēka herpes vīruss
HHV 3,4,5,6,7,8	angl. cilvēka herpes vīruss 3, 4, 5, 6, 7, 8 latv. cilvēka herpes vīruss 3, 4, 5, 6, 7, 8
ICAM, CD40	šūnu adhēzijas molekulas
IgG, IgA, IgM	G, A, M klases imūnglobulīni
IL-6, IL-8	Interleikīni 6 un 8 jeb regulatorie peptīdi
<i>In vitro</i>	ārpus dzīvā organisma
<i>In vivo</i>	dzīvā organismā
Ki-67	šūnu proliferācijas marķieris
LEK	siekaldziedzeru limfoepitēliāla karcinoma
LLEB	siekaldziedzeru labdabīgs limfoepitēliāls bojājums
LMPs 1, 2A un 2B	latentie membrānas proteīni
MHC	angl. <i>Major histocompatibility complex</i> latv. galvenais audu saderības komplekss
MIB-1	Ki-67 antivielas klons
Monoklonālās antivielas	Antiviela (proteīna veids), kuru ir producējis viens noteikts

	šūnu klons un kura atpazīst noteiktu specifisku organisma struktūru – antigēnu – un pievienojas tai, izraisot šūnu apoptozi, tādējādi palīdzot pacienta imūnsistēmai atpazīt un iznīcināt vēža šūnas.
mRNS	angl. <i>messenger RNS</i> latv. matricēs RNS (ribonukleīnskābe), mesendžera RNS
NFK	nazofaringeāla karcinoma
NIH3T3 šūnas	peles embrija fibroblastu šūnu līnija
NK	angl. <i>natural killer</i> [cells] latv. dabiskās galējājšūnas (imūnkompetentas šūnas)
PA	pleomorfa adenoma
PEG	angl. <i>percutaneous endoscopic gastrostomy</i> latv. perkutāna endoskopiska gastrostomija
PĶR	polimerāzes ķēdes reakcija
PVO	Pasaules Veselības organizācija
ready-to-use	gatavs lietošanai
S100	antigēnpresentējošo dendrītisko šūnu imūnhistoķīmiskais marķieris
Ticamības līmenis	Ticamības līmenis norāda varbūtību, ar kādu var tikt atklāta pētāmā parādība. Parasti izmanto 95% ticamību. Angl. <i>Confidence interval (CI)</i>
TNM	angl. <i>Tumor Nodus Metastasis</i> latv. audzējs, limfmezgls, attālas metastāzes Komponenti (kategorijas), kuri ir TNM klasifikācijas pamatā un ļauj iegūt vienotu priekšstatu par klīniskajiem datiem audzēja izplatībā: • T (tumor/audzējs) – par primārā audzēja anatomisko izplatību; • N (nodus/limfmezgls) – par reģionālo limfmezglu stāvokli (metastāžu esamību/neesamību reģionālajos limfmezglos); • M (metastasis/metastāze) – par attālo metastāžu esamību/neesamību.
TP53 p53	audzēja supresijas gēns audzēja supresijas gēns/supresorgēns/nomācējgēns p53
VCA	angl. <i>EBV viral capsid antigen</i> latv. EBV vīrusa kapsīda antigēns
VZV	angl./latīn. <i>varicella zoster virus</i> cilvēka jostas rozes saslimšanas izraisītājs, herpes vīruss 3

IEVADS

Darba aktualitāte

Mutes dobuma vēzis ir astotais biežākais ļaundabīgais audzējs pasaulē. Saslimstība ar mutes dobuma vēzi dažādos pasaules reģionos ir atšķirīga [1, 2]. Saskaņā ar daudzpakāpju kanceroģenēzes teoriju mutes dobuma karcinoma veidojas normāla mutes dobuma epitēlija ļaundabīgas transformācijas rezultātā [2].

Pēc starptautiskās slimību klasifikācijas lūpas, mutes dobuma un rīkles mutes daļas ļaundabīgos audzējus apvieno kopējā grupā, atsevišķi izdalot aizdegunes, rīkles balsenes daļas un siekaldziedzeru audzējus. Latvijā pēdējos 50 gados ir tendence samazināties saslimstībai ar lūpas ļaundabīgiem audzējiem, ko daļēji izskaidro ar pīpes un cigāru lietošanas samazināšanos [3]. Pārējo galvas un kakla ļaundabīgo audzēju skaits ar katru gadu lēnām pieaug [3]. Galvas un kakla ļaundabīgo audzēju izcelsmē ir nozīme gan endogēniem, gan eksogēniem faktoriem, novēro arī atšķirības dažādos ģeogrāfiskajos reģionos un etniskajās grupās [2, 3].

Mutes pamatnes ļaundabīgo audzēju īpatsvars no visiem mutes dobuma un rīkles mutes daļas ļaundabīgajiem audzējiem ir aptuveni 35%. Aizderokļu (retromolārie) un vaigu ļaundabīgi audzēji sastopami 10-20% gadījumu, mēles ļaundabīgie audzēji – 25%, pārējās lokalizācijas sastopamas retāk, t.sk. lūpas audzēji – 10%, smaganu audzēji – 1-5%, bet aukslēju ļaundabīgie audzēji – 2-7% gadījumu [3].

Uzskata, ka ļaundabīgo audzēju attīstība visbiežāk sākas pēc 40 gadu vecuma, sasniedzot maksimumu 55-65 gados, un vīrieši slimo 3,5-5,5 reizes biežāk nekā sievietes. Lai gan pēdējos gados ir veikti dažādi profilaktiski pasākumi, piemēram, smēķēšanas ierobežošana, veikts izglītojošs darbs, ieviesti daudzi jauni diagnostikas standarti, paplašinātas un pilnveidotas audzēju radikālas ārstēšanas metodes (ķirurģiska iejaukšanās, staru terapija), tomēr ļaundabīgie audzēji tiek diagnosticēti arvien biežāk, it īpaši pacientiem pēc 30-40 gadu vecuma [1, 2, 4]. Etiopatoģenēzes mehānismus un slimību riska faktorus ir pieņemts attiecināt uz gados vecu slimnieku populāciju, kas nenoliedzami biežāk slimo ar ļaundabīgiem audzējiem. Savukārt par gados jauniem pacientiem var domāt, ka ir jābūt papildu potenciāliem riska faktoriem un iedzimtām vai iegūtām organisma pārmaiņām, kas tieši vai attālināti saistīti ar ļaundabīgā audzēja attīstību šajā vecumā.

Pētījuma mērķis

Ar klīniskām, morfoloģijas un molekulārās bioloģijas metodēm pētīt siekaldziedzeru, mutes dobuma un nazofaringeālo audzēju klīnisko gaitu un etiopatogēnēzi, analizēt šo saslimšanu saistību ar herpes vīrusu infekciju.

Pētījuma uzdevumi

1. Analizēt siekaldziedzeru audzēju epidemioloģisko situāciju Latvijā, raksturot pacientu grupas un slimības recidīvus siekaldziedzeru labdabīgo audzēju grupā.
2. Raksturot parafaringeālās telpas audzēju operācijas, to komplikācijas un īpatnības.
3. Kvantitatīvi novērtēt Ki-67 šūnu proliferācijas marķiera imūnekspressiju siekaldziedzeru audzējos, analizēt to proliferatīvās īpatnības un klīniskās gaitas atšķirības primāru un recidivējošu audzēju gadījumos.
4. Raksturot šūnas virsmas CD44 hialuronāta receptoru ekspresiju pacientiem ar mutes dobuma un nazofaringeālo karcinomu un siekaldziedzeru audzējiem, noskaidrot tās saistību ar EBV infekciju.
5. Novērtēt herpes vīrusu infekciju saistību ar ne-endēmiskā rajonā konstatētiem siekaldziedzeru audzējiem un oronazofaringeālo karcinomu, nosakot LMP-1 onkoproteīna ekspresiju EBV infekcijas gadījumā un EBV titrus labdabīgos un ļaundabīgos siekaldziedzeru audzējos, oronazofaringeālās plakanšūnu karcinomās.
6. Ar imūnhistoķīmijas metodi noteikt makrofāgu, dendrītisko šūnu un limfocītu lokalizāciju siekaldziedzeru, oronazofaringeālajos audzējos, novērtēt minēto imūnkompetento šūnu nozīmi EBV infekcijas procesā.
7. Ar elektronmikroskopijas metodi noskaidrot herpes vīrusu noteikšanas iespējas siekaldziedzeru un oronazofaringeālo audzēju audos un novērtēt šūnu ultrastruktūru.
8. Noteikt un raksturot EBV, HHV-6 un HHV-7 DNS siekaldziedzeru, mutes dobuma un nazofaringeālā rajona audzēju audos.
9. Veikt iegūto rezultātu statistisko apstrādi un noskaidrot iespējamās korelācijas starp audzēju patomorfoloģisko ainu, klīniku un herpes vīrusu infekciju.

Aizstāvēšanai izvirzītā hipotēze

Mutes dobuma, nazofaringeālie un siekalu dziedzeru audzēji un herpes vīrusu infekcija ir kopā pastāvošas saslimšanas (pavadsaslimšanas), to izpratnei un pareizas ārstēšanas stratēģijas izvēlei ir būtiski novērtēt minēto saslimšanu mijiedarbību.

Darba zinātniskā novitāte un praktiskais pielietojums

Tika veikta padziļināta plakanšūnu vēža, nazofaringeālas karcinomas un siekaldziedzeru audzēju izpēte ar klīniskām, morfoloģiskām un molekulārās bioloģijas metodēm, īpašu uzmanību pievēršot audzēja invāzijai, angiogēnei, metastāzēm un herpes vīrusu nozīmi šajā procesā. Tas deva iespēju izprast intracelulārās pārmaiņas un vīrusu radītos bojājumus minēto audzēju gadījumos, pamatot patoģenēzes mehānismus un izvēlēties ārstēšanas taktiku.

Promocijas darba veikšanas laiks un vieta

Promocijas darbs veikts laikā no 2009. līdz 2011. gadam:

- 1) SIA „Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīca” stacionāra „Latvijas Onkoloģijas centrs” galvas un kakla ķirurģijas nodaļā;
- 2) Rīgas Stradiņa Universitātes (RSU) Anatomijas un antropoloģijas institūta Starpkatedru Elektronmikroskopijas laboratorijā;
- 3) A. Kirhenšteina mikrobioloģijas un virusoloģijas institūtā.

Promocijas darba apjoms un struktūra

Promocijas darbs rakstīts latviešu valodā. Promocijas darba sadaļas: ievads, literatūras apskats, materiāli un metodes, rezultāti, diskusija, secinājumi un izmantotās literatūras saraksts. Darba apjoms ir 130 lappuses. Darbā ir 9 tabulas, 72 attēli un divi pielikumi. Vērēs iekļauti 189 nosaukumi.

Personīgais ieguldījums

Literatūras analīze, pētījuma dizaina izstrādāšana un saskaņošana Rīgas Stradiņa universitātes Ētikas komitejā, paraugu vākšana, pacienšu ārstēšana, paraugu apstrādāšana, analizēšana, iegūto rezultātu analīze, publikāciju, tēžu un promocijas darba rakstīšana.

Ētikas komitejas atļauja pētījuma veikšanai

Pētījums ir apstiprināts ar Rīgas Stradiņa universitātes Ētikas komitejas lēmumu 2010.gada 23.septembrī (1.pielikums).

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Mutes dobuma un nazofaringeālo audzēju raksturojums saistībā ar Herpes vīrusu infekcijām

Latvijā visu galvas un kakla ļaundabīgo audzēju vidū procentuāli lielāko īpatsvaru ieņem mutes dobuma un rīkles mutes daļas audzēji.

Latvijā mutes plakanšūnu vēža īpatsvars ir 6% no visiem ļaundabīgajiem audzējiem [3]. Ļaundabīgo audzēju recidīvi visbiežāk izpaužas lokālā vai reģionālā līmenī [1, 2]. Dzīvildze T_1/T_2 audzēju gadījumos ir 94-76%, bet izplatīta procesa (T_3/T_4) gadījumā – 46-60%. Ja ir metastāzes reģionālajos limfmezglos (N_1), dzīvildze ir 60%, bet izplatītas slimības gadījumā – tikai 46% [1, 2, 3].

Klīniskie simptomi mutes dobuma un orofaringeālam plakanšūnu vēzim var variēt atkarībā no procesa lokalizācijas. Lokāli izplatītu mutes dobuma un rīkles karcinomai raksturīgi tādi simptomi kā veidojumi gļotādā, izčūlojumi, *foetor ex oris*, simptomātika ar raksturīgu sāpju irradiāciju ausīs, zobos, apgrūtināta runāšana, rīšana, mutes atvēršana un košļāšana, asiņošana no gļotādas, plaisas mutes gļotādā, svara kritums, kā arī veidojumi kaklā [3, 4, 5].

Vīrieši slimo 2,5-5 reizes biežāk nekā sievietes. Pacientu vidējais vecums ir 50-65 gadi, tomēr klīniskie novērojumi liecina, ka pēdējo gadu laikā daudz biežāk saslimst arī pacienti 30-40 gadu vecumā [2, 3, 4].

97% mutes dobuma un rīkles audzēju ir dažādas diferenciācijas pakāpes plakanšūnu karcinomas [1, 2]. Sākotnēji audzējs infiltrē gļotādu, pēc tam progresējot izplatās uz mutes pamatnes, parafaringeāliem muskuļiem un uz starpfasciju telpām. Apakšžokļa vai galvaskausa kauli tiek skarti, audzējam infiltrējot periostu, kad audzējs ir IV stadijā. Sākumā audzējs izplatās gar kaulu, tad subperiostāli un iesaistot kaulos izraisa to destrukciju [3]. Gan mutes pamatnes, gan mēles plakanšūnu karcinoma biežāk lokalizējas šo orgānu priekšējās daļās. Mēles saknes un *hypopharynx* plakanšūnu karcinomai raksturīga agrīna dziļa infiltrācija, izplatība uz reģionālajiem limfmezgliem, bieži vien limfmezglu metastāzes var būt abpusējas. Vairumā gadījumu audzēji sākotnēji attīstās nemanāmi un simptomātika ir nespecifiska. Ar to izskaidrojams liels slimnieku skaits ar audzējiem ielaistās stadijās. Pēdējā gadu desmita laikā pieaug gados jaunu pacientu skaits, t.i., pacienti, kuri jaunāki par 45 gadiem [3].

Klīniski audzēja diferenciācijas pakāpei ir prognostiska nozīme. Zemas diferenciācijas pakāpes plakanšūnu karcinomai ir raksturīga agrīna diseminācija un ātra slimības progresija [2, 3].

Smēķēšanas un pārmērīgas alkohola lietošanas loma mutes dobuma un rīkles mutes daļas audzēju attīstībā tiek pētīta jau sen; ir pierādīts, ka abu faktoru kopīgas darbības rezultātā saslimstības risks palielinās gandrīz trīskārtīgi [3]. Tomēr ne visi pacienti ir smēķētāji un alkohola lietotāji. Neapšaubāmi liela nozīme ir arī citiem endogēniem un eksogēniem faktoriem (piem., ķīmiskiem un termiskiem apdegumiem), kuru rezultātā veidojas hroniski atrofiski procesi, plaisas mutes gļotādā, ar laiku izveidojas priekšvēža stāvokļiem pieskaitāmās leukoplakijas un eritroplakijas [2, 3, 4].

Ļaundabīgo audzēju veidošanās mutes dobumā un rīklē ir daudzu un dažādu cēloņu un faktoru kopējas iedarbības rezultāts, kura noteikta sastāvdaļa ir hronisks iekaisuma process [4]. Līdztekus klīniskajiem novērojumiem liela nozīme ir hroniska iekaisuma riska faktoru noteikšanai un to bioloģiskās iedarbības analīzei [1]. Šo pētījumu gaitā iespējams noteikt konkrēto faktoru etioloģisko nozīmi [2, 4, 5].

Mutes dobuma, nazofaringeālajiem un siekaldziedzeru audzējiem ir raksturīga nozoloģiska heterogenitāte [5]. Šiem audzējiem ir dažāda histoloģiskā uzbūve un atšķirīgi riska faktori, bet ir kopēji hroniskā iekaisuma izraisītāji, un viens no tiem ir Herpes grupas vīrusi [6].

Ir astoņi Herpes grupas vīrusi, kas inficē cilvēka audus: *herpes simplex virus 1* (HSV-1), *herpes simplex virus 2* (HSV-2), *varicella zoster virus* (VZV, herpes vīruss 3), Epšteina-Barra vīruss (EBV, HHV-4), cilvēka citomegalovīruss (CMV, HHV-5), cilvēka herpes vīruss 6, 7 un 8 (HHV-6,7,8) [6].

Cilvēka herpes vīruss 1 jeb orālais herpes vīruss izraisa primāro herpētisko gingivostomatītu. Tā ir latentā vīrusa infekcija, kura klīniski manifestējas saaukstēšanās laikā. HHV-2 jeb ģenitāliju herpes dažreiz manifestējas kā mutes patoloģija, klīniski līdzīga HHV-1 [6].

HHV-3 izraisa saslimšanu ar vējbakām un sekundāras reaktivācijas laikā izpaužas kā *herpes zoster* jeb jostas roze [6].

HHV-4 jeb Epšteina-Barra (*Epstein-Barr*) vīrusa (EBV) primārā infekcija ir infekcioza mononukleoze. Vīruss bieži izraisa infekciju pacientiem ar nomāktu imunitāti un ir saistīts arī ar dažādām onkoloģiskām slimībām [5]. Nazofaringeāla karcinoma ir viens no sen zināmiem ļaundabīgiem audzējiem, kas cieši saistīts ar cilvēka herpes vīrusu 4 jeb EBV [6, 7, 8, 9, 10, 11].

HHV-5 jeb citomegalovīrusa infekcija ir hroniska infekcija, kas skar siekaldziedzerus un dažādus citus audus [6, 7].

HHV-6 identificēts 1986.gadā [12]. Tas izdalīts no perifēriskajām asinīm pacientiem ar dažādām limfoproliferatīvām saslimšanām. Literatūras dati liecina, ka HHV-6 persistē hroniski un dažos gadījumos inficē siekaldziedzerus [6, 12]. HHV-6 izpausmes ir drudzis, ādas izsitumi, pneimonija, ir novērota daļēja mielosupresija. Inficēšanās maksimāli izpaužas laikā no 9 mēnešiem līdz 21 mēnesim. HHV-6 uzskata par nopietnu izkaisītās sklerozes, jaundzimušo drudža un encefalīta etioloģisko faktoru [12, 13, 14]. HHV-6 uzskata arī par kofaktoru HIV infekcijai, dažiem dzemdes kakla karcinomu veidiem un nazofaringeālajai karcinomai [13, 14, 15].

HHV-6 ir 160-200 nm liels vīruss ar 162 kapsomēriem un superkapsīdu lipīdu apvalku. Genomu veido DNS dubultspirāle. Izšķir divus HHV-6 veidus: HHV-6A un HHV-6B. A un B variantiem ir atšķirīgs šūnu tropisms *in vitro*, restrikcijas endonukleāžu profils, nukleotīdu secība un reaktivitāte ar monoklonālajām antivielām [6, 14, 15]. HHV-6A infekcija ir novērojama daudz retāk, un vīrusa loma vēl nav skaidra. HHV-6B uzskata par pēkšņas eksantēmas (*Exantema subitum*) pamatpatogēnu. *In vitro* pētījumi parādīja HHV-6 selektīvu tropismu saistībā ar CD4⁺ T šūnām. Šis vīruss spēj inficēt T limfocītus ar CD3⁺, CD5⁺, CD7⁺, CD8⁻ virsmas molekulām. Vīruss replicējas arī monocītu-makrofāgu rindas šūnās un glijas šūnās [6, 12, 13, 14, 15].

Ar persistējošu HHV-6 infekciju saistītām saslimšanām pieskaita limfoproliferatīvas slimības, limfadenopātijas, ļaundabīgas limfomas (neHodžkina limfoma, perifērā T šūnu limfoma, B šūnu limfoma, pleomorfa T šūnu limfoma u.c.), dažas CNS saslimšanas, jaundzimušo pēkšņu eksantēmu, ļaundabīgos audzējus un autoimūnas saslimšanas [14]. Reinfekciju novēro imūnsistēmas nomākuma laikā – orgānu transplantācijas, HIV infekcijas un citos gadījumos [11, 14].

HHV-6 kā onkovīrusa darbība ir pierādīta dzemdes kakla karcinomas gadījumos, vīrusam aktivējot cilvēka papilomas vīrusa E6 un E7 onkoproteīnus [13]. HHV-6 DNS var arī inducēt neoplastisko transformāciju NIH3T3 līnijas šūnās *in vitro* [14]. Slimniekiem ar nazofaringeālo karcinomu veikta polimerāzes ķēdes reakcija (PĶR) siekalās un izdalīta HHV-6 DNS, kā arī noteikts statistiski ticams HHV-6 IgG antivielu titru pieaugums un IgA antivielu parādīšanās salīdzinājumā ar veseliem cilvēkiem [11, 13].

1990.gadā HHV-7 tika izdalīts no perifēro asiņu CD4⁺ T šūnām (*Frenkel et al.*) [16]. Tas izraisa rozeolu veida izsitumus un febrilus krampjus bērniem. HHV-7 ir

līdzīgs HHV-6 un arī izraisa ādas izsitumus, bet šā vīrusa infekcija saistās vēl ar virkni citu simptomu, tādu kā akūta respiratora saslimšana ar drudzi, vemšana, caureja, febrili krampji; reizēm tā norisinās asimptomātiski [14]. 95% populācijas jau kādreiz ir inficējušies un ir imūni pret HHV-7; trīs ceturtdaļas ir inficējušās līdz 6 gadu vecumam [16]. Primārā inficēšanās ar HHV-7 notiek bērniem vecumā no 2 līdz 5 gadiem, un tas nozīmē, ka inficēšanās notiek pēc HHV-6 infekcijas veida [17].

HHV-7 ir 170 nm liels vīruss. Virioniem ir elektronblīvs cilindrisks kapsīds, ārējais apvalks un daļēji HHV-6 līdzīga struktūra [16]. HHV-7 piemīt selektīvs tropisms saistībā ar CD⁺ T šūnām: CD4⁺ šūnu tropisms ir novērots 42%, bet CD8⁺ 4% pacientu [19]. HHV-7 un HIV infekcijas gadījumā vīrusi savstarpēji konkurē, inficējot T šūnas [15, 16, 17]. HHV-7 nozīme vēl nav noskaidrota, to bieži saista ar limfoproliferatīvām saslimšanām, hroniska noguruma sindromu un imūndeficītu [13, 14, 15, 16, 20].

Caselli et al. (2007) autoru publikācijā ir ziņots, ka HHV-6 un HHV-7 vīrusus var bieži noteikt siekaldziedzeru audos, it īpaši zemžokļu siekaldziedzerī [15]. *Sada et al.* (1996) [21] izsaka domu, ka HHV-7 produktīvi inficē siekaldziedzeru audus, bet HHV-6 izraisa latentu infekciju ar zemas intensitātes replikāciju orgānos [19, 21].

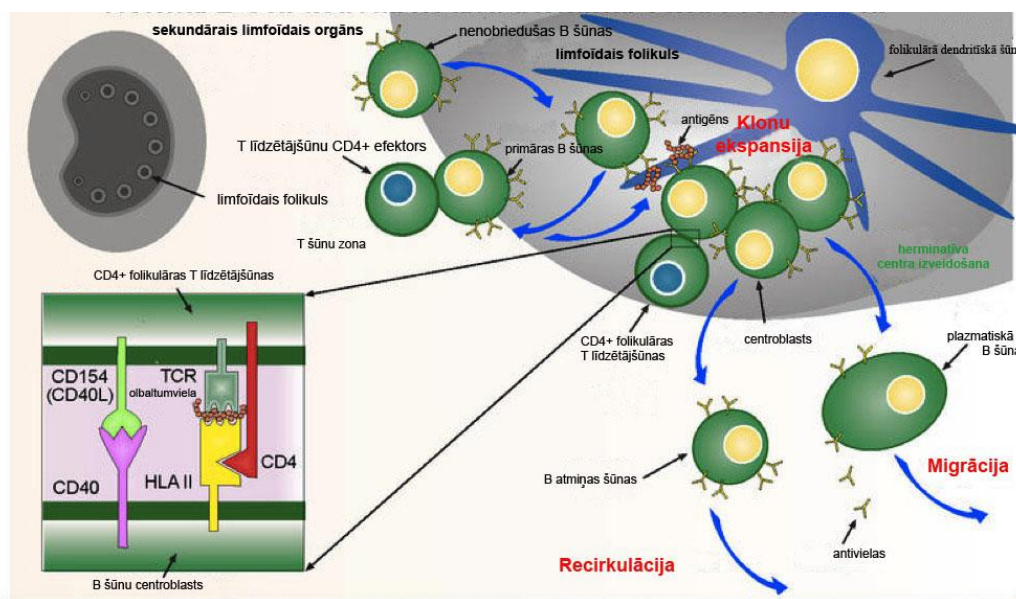
HHV-8 saista ar Kapoši sarkomas un vēderdobuma limfomu izcelsmi. Šis vīruss tika atklāts 1994.gadā, kultivējot Kapoši sarkomas šūnas [6, 19].

HSV-2, kā arī VZV, CMV un HHV-7 normā neinficē mutes dobumu un nav datu, kas liecinātu par to saistību ar mutes dobuma plakanšūnu vēža attīstību [19, 21].

Savukārt EBV ir saistīts ar autoimūnām slimībām – reimatoīdo artrītu, čūlaino kolītu, vaskulītu, kā arī ar ļaundabīgiem limfoīdo šūnu audzējiem – Bērkitā (*Burkitt*) un Hodžkina (*Hodgkin*) limfomām, T un NK šūnu limfomām, epiteliālas izcelsmes audzējiem – nazofaringeālo un kuņģa karcinomu, mezoteliāliem audzējiem, plakanšūnu karcinomu [7, 10, 22, 23, 24, 25], krūts dziedzeru, plaušu, resnās zarnas, prostatas ļaundabīgiem audzējiem [26]. Tika secināts, ka izteikta invāzija un metastazēšanās ir novērojama ar EBV saistītiem audzējiem un it īpaši gados vecāku pacientu vidū [26].

Ar EBV inficējas gandrīz visi cilvēki viņu dzīves laikā, un daži no viņiem var kļūt par vīrusa nēsātājiem visa mūža garumā. Valstīs ar zemu sociālekonomisko līmeni šī inficēšanās notiek agrīnā bērnībā un simptomātika ir subklīniska [7]. Industriālī attīstītās valstīs cilvēki parasti inficējas pieaugušo vecumā vai jaunībā [7, 8]. Imūnkompetentiem pacientiem EBV saslimšanas simptomus neizraisa, bet imūnkompromitētiem pacientiem var attīstīties nopietna slimība [22, 23].

EBV inficē cilvēku, šķērsojot nazofaringeālā reģiona gļotādas epitēlijsūnu barjeru un nokļūstot limfocītos. B limfocītā EBV iekļūst, iesaistot CD21 receptoru, kas ir C3d komplementa receptors [7, 27, 28]. Vīruss var ilgstoši persistēt mandeļu kriptās un ar inficētām šūnām izplatīties uz citiem limfoīdo audu sakopojumiem. B limfocītam aizejot bojā, vīruss nonāk siekalās, bet B limfocītam diferencējoties, veidojas plazmocīti un notiek vīrusa vairošanās [28] (1.1.attēls).



1.1. att. EBV infekcijas mehānisms
[modificēts no <http://www.immunopaedia.org.za/index.php?id=863>]

Ja vīrusu kopiju skaits nav liels, B limfocīta apoptoze nenotiek un izveidojas latentā infekcija [9].

Mutes gļotāda ir galvenā EBV replikācijas vieta. EBV ir spējīgs inficēt ne tikai B limfocītus, bet arī virsmas epitēliju, dziedzeršūnas, mioepiteliālās šūnas, gludos miocītus, T limfocītus, NK šūnas, plazmocītus, folikulārās dendrītiskās šūnas un makrofāgus/Langerhansa šūnas [7, 27, 28, 29]. Ir pierādīts, ka EBV prevalē potenciāli ļaundabīgos audos, nevis veselā mutes gļotādā [30].

Latentai EBV infekcijai raksturīga ierobežota vīrusu proteīnu ekspresija, kas pasargā vīrusu no imūnsistēmas atpazīšanas un iznīcināšanas [7,8]. Proteīns, kas ir EBV kodola antigēns, kura funkcija ir pārnest vīrusa genomu meitas šūnai tās dalīšanas laikā, viens pats nav spējīgs iedarbināt efektīvu citotoksisko imunoloģisko atbildi [9]. Ar to var daļēji izskaidrot, kāpēc EBV nekad nevar eliminēt no organisma [30].

Lai izskaidrotu, kā EBV pāriet no savas latentā stāvokļa B limfocītos uz replikācijas vietu mutes gļotādā, bija izstrādāti vairāki modeļi. Tomēr EBV infekcijas norise un patoģenēze ar EBV saistītiem epiteliāliem ļaundabīgiem audzējiem līdz šim nav noskaidrota [10, 31, 32].

Ir pierādīts 601 gēns, kurš ir iesaistīts mutes dobuma audzēju attīstībā, un salīdzināts ar blakusesošiem kontroles gļotādas audiem [5, 11]. Gēnu ietekmē veidojas ar plakanšūnu vēža attīstības risku saistītie vietējie audu mediatori [11]. Agrīnas ģenētiskas izmaiņas var predisponēt epiteliālās šūnas EBV infekcijai vai vīrusa persistencei, uzturot latento infekciju [7, 8, 9]. Latentu gēnu ekspresija EBV inficētajās šūnās var pastiprināt to transformēšanās iespējas un stimulēt klonu secīgu ekspansiju, kas izraisa audzēja attīstību un palielina karcinomas invāzijas spējas [30, 33].

EBV loma B šūnu inficēšanas procesā ir labi aprakstīta atšķirībā no orofaringeālās gļotādas epitēlija inficēšanas ceļiem, kuri līdz šim vēl nav izzināti [28, 29, 30].

EBV transformēta šūnu kultūra pazīstama kā limfoblastu šūnu līnija, kas satur multiplas vīrusa kopijas vīrusu episomu veidā un ekspresē nelielu daļu no vīrusu gēniem, kurus dēvē par latentiem proteīniem, un tiem ir seši kodolu antigēni (EBNAs 1, 2, 3A, 3B, 3C un LP) un trīs latenti membrānas proteīni (LMPs 1, 2A un 2B) [7]. LMP-1 ir galvenais transformējošais EBV proteīns, tam ir vairākas funkcijas, kuru rezultātā notiek šūnu adhēzijas molekulu ekspresija, antiapoptozes proteīnu aktivācija (Bcl-2, A20) un IL-6, IL-8 produkcijas stimulācija [9]. Pēdējie pētījumi parādījuši, ka LMP1 funkcionāli caur virkni signālu pārraides ceļu aktivē audzēju nekrozes faktoru receptoru [7]. EBV receptori ir ekspresēti gan uz normālu, gan malignu šūnu virsmām, kas liek domāt, ka EBV var inficēt mutes gļotādas epitēlijšūnas [30, 32].

Ir pierādīts, ka sekretēti EBV onkoproteīni, it īpaši LMP1, ir bioloģiski aktīvi un ir iesaistīti NFK onkoģenēzē, kā arī mutes dobuma priekšvēža stāvokļu un vēža izraisīšanā [33].

Pasaules literatūras datu analīze liecina, ka informācija par LMP1 esamību mutes dobuma gļotādas šūnās ir ļoti pretrunīga. Tā piemēram, *González X.* ar līdzautoriem, pētot mutes dobuma mataino leukoplakiju, noteica LMP1 ekspresiju [34], bet tā netika atrasta ne Ungārijas pētnieku darbā, kurā bija analizēti plakanšūnu karcinomas gadījumi [35], ne *Horiuchi K. et al.* [36] darbā.

EBV DNS ir noteikta ar PĶR palīdzību, analizējot dažādus mutes dobuma priekšvēža stāvokļus un vēža gadījumus nelielās pacientu grupās [23, 25, 26, 27, 37, 38,

39]. Izmantojot imūnhistoķīmijas metodes EBV onkoproteīnu diagnostikā, noskaidroja, ka EBV onkoproteīni ekspresējas NFK daudz biežāk, nekā uzskatīja agrāk, un šim nozīmīgajam faktam ir pievēršama lielāka uzmanība [33].

EBV infekcijai NFK gadījumā raksturīga II tipa latence, kad ekspresējas EBV kodola antigēns (EBNA-1) un latentais membrānas proteīns-1 (LMP1), bet ne imunogēnais EBNA2-6. EBV kodēta agrīna RNS (EBERs) arī ir bagātīgi ekspresēta. BZLF (*Zebra*) proteīns, kas ekspresējas lītiskas infekcijas laikā, nav noteikts [33, 40].

NFK gadījumos ir atrastas multiplas ģenētiskas izmaiņas. Abas 3p un 9q hromosomu delēcijas tika noteiktas zemas malignitātes pakāpes displastiskos bojājumos un normālā nazofaringeālajā epitēlijā – tas liecina, ka ģenētiskās izmaiņas ir notikušas agrāk NFK patoģenēzes mehānismā un tās varēja kalpot par predisponējošo faktoru turpmākai EBV infekcijai [40]. Šūnai inficējoties, latentie EBV gēni nodrošina zināmu augšanas un izdzīvošanas spēju pieaugumu, kuru paša organisma imūnsistēma nespēj kontrolēt, un tad, iedarbojoties citiem endogēniem un eksogēniem faktoriem, var attīstīties NFK [42-46].

EBV receptori ir ekspresēti gan uz normālu, gan uz malignu šūnu virsmām, kas liek domāt, ka EBV var inficēt mutes dobuma gļotādas epitēlija šūnas [32, 45].

Nesen atklāja, ka EBV DNS koncentrācijas noteikšanu asins plazmā NFK gadījumā var izmantot slimības gaitas prognozēšanai [40]. Seroloģiskie dati liecina, ka palielināti anti-EBV virālo kapsīdu antigēna IgA vai anti-kodola antigēna IgG titri nav specifiski slimības rādītāji siekaldziedzeru limfoepiteliālo karcinomu gadījumos endēmiskajos rajonos. Ne-endēmiskajos rajonos palielināti EBV antivielu titri netika konstatēti [41]. VCA IgM vīrusu kapsīda antigēns un VCA IgG agrīnais antigēns ir ekspresēti vīrusu replikācijas periodā, VCA IgG EB kodola antigēns (EBNA) liecina par iepriekšēju EBV infekciju. Savukārt EBNA ir ekspresēts latentas infekcijas periodā [41, 42, 43]. Ķīniešu autori, pētot NFK gaitu, noteica EBV antivielas – IgA VCA un IgA EA ar mērķi uzlabot NFK ārstēšanas gaitas kontroli [41].

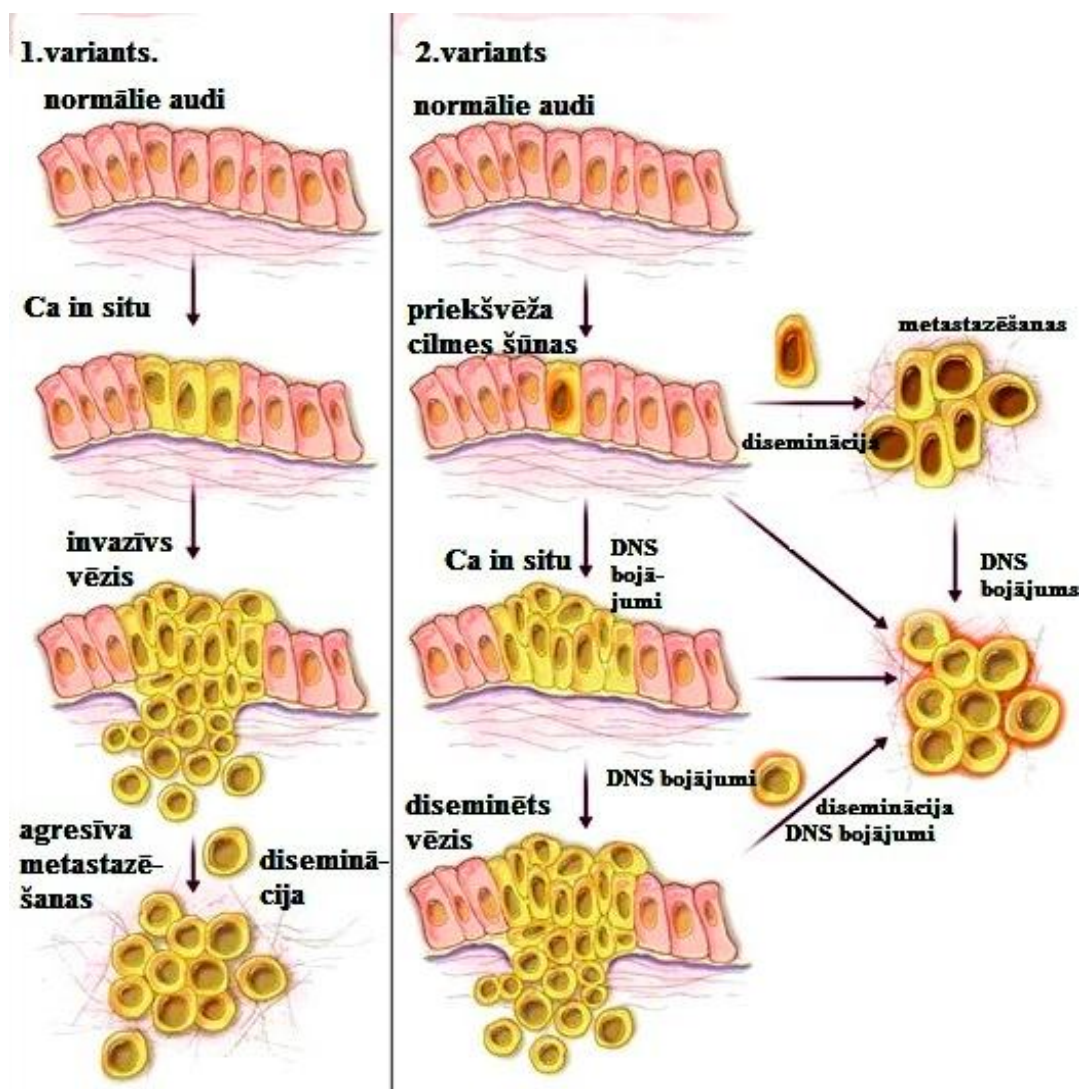
Atsevišķos pētījumos, iekļaujot konkrētas etniskās grupas – eskimosus, ķīniešus, japāņus un taizemiešus, ir izdevies demonstrēt LEK un EBV infekcijas saistību [46]. Literatūras analīze liecina, ka dažādos pasaules reģionos ir atšķirīga EBV infekcijas un siekaldziedzeru limfoepiteliāla bojājuma saistība [46, 47]. Ir pētījumi, kuros pierādīts, ka lielo siekaldziedzeru labdabīgs limfoepiteliālais bojājums un limfoepiteliālā karcinoma nav patoģenētiski saistīti [48, 49]. LEK attīstās no metaplastiska duktāla epitēlija, un tas nav labdabīga limfoepiteliāla siekaldziedzeru bojājuma malignas

transformācijas rezultāts [46, 50]. LEK 80% gadījumu skar pieauss siekaldziedzeri, otrajā vietā liekams zemžokļa siekaldziedzeris. LEK var skart arī mazos siekaldziedzerus, bet daudz retāk – *oropharynx* un *hypopharynx* rajonus [48]. Lielo siekaldziedzeru limfoepiteliālā karcinoma ir rets galvas un kakla ļaundabīgs audzējs, sastopams tikai 0,4% gadījumu no visiem siekaldziedzeru ļaundabīgiem audzējiem [51]. LEK raksturīga agresīva klīniskā gaita. Slimība skar gados jaunus pacientus. Šis ir endēmisks audzējs, biežāk sastopams eskimosiem Grenlandē, Ķīnas dienvidaustrumu reģionos un Japānā [48]. Patomorfoloģiski LEK raksturīgs zemu diferencēts epiteliālais komponents un izteikta limfocitāra infiltrācija audzēja stromā [51, 52]. Šī morfoloģiskā īpatnība apgrūtina audzēja diferencēšanu no nediferencētas nazofaringeālās karcinomas metastāzēm [52]. Siekaldziedzeru audzēju gadījumos diagnozi var noteikt tikai morfoloģiski, jo radioloģiskās izmeklēšanas atrade ir nespecifiska [52].

Nav izzināts, kā EBV iespējams pārnest no limfocītiem uz siekaldziedzeru epitēliju un vai EBV var replicēties epitēlija šūnās [53]. Vīrusu ģenētiskais materiāls episomas veidā saglabājas inficētajā epitēlijā, kas turpina proliferēt, bet tā diferenciācija ir nomākta [47]. Ar EBV inficēts metaplastisks epitēlijs ātri iegūst ļaundabīgu fenotipu un veidojas bazālās membrānas bojājums [8].

1.2. Šūnas virsmas glikoproteīna CD44 un imūnkompetento šūnu nozīme orālās un nazofaringeālās patoloģiju malignajā transformācijā

Pēc literatūras datiem, orofaringeālo audzēju gadījumos sākotnējās izmaiņas veidojas epitēlija bazālajā slānī. Uzskata, ka šajā transformācijā nozīme ir dūmiem, alkoholam un/vai citiem kancerogēniem [2]. Kancerogēnu iedarbības rezultātā sākas TP53 un citu audzēja supresorgēnu dezaktivācija [11]. Normāla epitēlija pāreja invazīvā karcinomā ir pakāpenisks process ar epitēlija šūnu proliferāciju, kuru veicina angiogēnēzes intensificēšanās un vietējo faktoru jeb mikrovides izmaiņas [11]. Klasiskos gadījumos cilvēka ļaundabīga audzēja attīstībā attālo metastāžu izveidošanās atspoguļo pēdējo stadiju kancerogēnēzes kaskādē (1.2.attēls 1.variants) [49]. Jaunākajos pētījumos tiek atzīmēta epiteliālās-mezenhimālās pārejas loma ļaundabīgā audu transformācijā un vienlaicīgā metastāžu diseminācijā (1.2.attēls 2.variants). Šajā gadījuma ļaundabīga audzēja šūnu diseminācija var notikt jebkurā laikā no karcinomas veidošanās brīža [49].



1.2. att. Kanceroģenēzes un metastazēšanas procesu alternatīvie varianti
[modificēts no: The Crossroads of Oncogenesis and Metastasis. Sánchez-García I, N Engl J Med 2009; (1)360:297-299. 15, 2009. DOI: 10.1056/NEJMcibr0808031]

Savukārt LMP-1 onkoproteīna ekspresija ļaundabīgo audzēju šūnās liecina par EBV līdzdalību patoloģiskajā audu pārveidē [44]. LMP1 ir EBV vīrusu proteīns ar transformējošām īpašībām, kas, pēc *Young et al.* (2003) [7] domām, var inducēt mutes dobuma gļotādas epitēlijsūnu hiperplāziju un kavēt epitēlija diferenciāciju, pastiprināt ICAM-1, CD40, CD44 un citu adhēzijas molekulu darbību, kā arī aktivēt kodola faktoru κB un inducēt epidermas augšanas faktora receptoru ekspresiju mutes dobuma gļotādā. EBV darbība lielā mērā ir atkarīga no mikrovides apstākļiem [11, 49]. Mainoties vietējiem audu faktoriem, organisma imunitātes krituma laikā notiek vīrusa replikācija un pieaug ar EBV inficēto šūnu skaits [44]. *Shannon-Lowe et al.* (2011) izdevies parādīt bazolaterālas epitēlijsūnas virsmas CD44v3 un EBV inficēta B limfocīta mijiedarbību, kas ir būtiska EBV infekcijas uzturēšanai [53]. Adhēzijas loma dabīgā epitēlija šūnas

inficēšanas procesā joprojām nav skaidra. Adhēzijas molekulu ekspresija un izvietojums ir atšķirīgs premaligno un maligno audzēju gadījumos [54]. Uzskata, ka adhēzijas molekulām ir būtiska nozīme EBV infekcijā [46]. EBV genoms saglabājas nelielā B limfocītu frakcijā mūžīgi. Katrā audu biopsijas materiālā var atrasties B limfocīti, tāpēc tajā ir amplificējams EBV DNS daudzums [55]. Šajā gadījumā asins plazmā ir necīgs EBV DNS daudzums un EBV ir identificējams tikai tad, ja notiks infekcijas reaktivācija [10].

CD44 ir adhēzijas molekulu grupai piederošs glikoproteīns, kurš iesaistīts šūnu mijiedarbībā [56]. CD44 gēni ir unikāli un to izoformas kopumā veido 19 eksonus. 1.-5. un 16.-19.eksons ir saistīti, kopā veidojot transkriptu, kas ir pazīstams kā CD44 „S“-standarta izoforma, bet 6.-15.eksons veido dažādas molekulu izoformas – variantus [56]. Izoformu dažādība nosaka atšķirīgu spēju saistīties ar hialuronskābi. Ir pierādīts, ka aberanta CD44 un to izoformu ekspresija saistīta ar vēža invāziju un metastāžu attīstību, kuru dēļ slimības prognoze ir slikta [56, 57].

Pasaules literatūras analīze liecina, ka trūkst pētījumu, kas demonstrētu CD44 virsmas molekulu lokalizāciju un ekspresiju EBV-inficētos mutes dobuma audzējos, kā arī šie dati nekorelē ar audzēju audu DNS mērījumiem un imūnkompetento šūnu izvietojumu [60, 61].

Jaunākie pētījumi liecina, ka polimerāzes ķēdes reakcija tika veiksmīgi izmantota EBV klātbūtnes noteikšanā premalignā un malignā orālā un orofaringeālā patoloģijā [62, 63].

Kobayashi et al. (1999) [38] un *Assimakopoulos et al.* (2002) [64] pierādīja, ka CD44 ektodomena stimulē dažādi faktori, veicinot šūnu adhēziju un migrāciju ārpusšūnu matricē. CD44, mijiedarbojoties ar ligandiem, modulē šūnu piesaistīšanas spējas, kustīgumu, ārpusšūnu matricē sadalīšanos, šūnu proliferāciju un izdzīvošanu [61, 64].

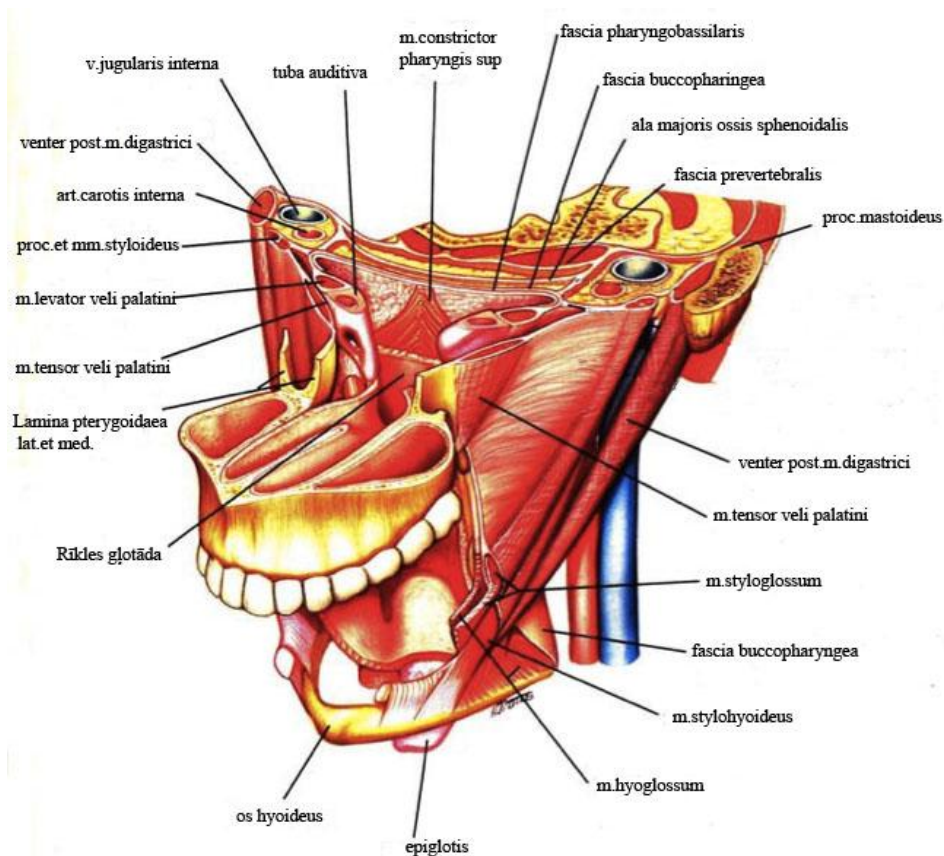
1.3. Parafaringeālās telpas audzēju operācijas un to īpatnības

Labdabīgo siekaldziedzeru audzēju pamatārstēšanas metode ir ķirurģiska – audzēja ekstirpācija [65]. Ļaundabīgi siekaldziedzeru audzēji ir ārstējami ķirurģiski, kā arī ir iespējams izmantot staru terapiju [3, 51, 52, 66]. Tradicionāli valdīja uzskats, ka siekaldziedzeru audzēju lokalizācija atbilst dziedzeru anatomiskajām robežām [67, 68].

Tomēr ir jāatceras arī pieauss siekaldziedzeru audzēju anatomiskās lokalizācijas īpatnības, t.i., dziļās daivas audzēji var atrasties parafaringeālajā telpā [69, 70].

Labdabīgo siekaldziedzeru audzēju operācijas mērķis ir pilnīga audzēja evakuācija, ekstirpācijas laikā ievērojot ablastikas principu, jo precīza morfoloģiskā diagnoze tiek noteikta tikai pēc operācijas [51, 52]. Parafaringeālajā telpā var attīstīties gan pieauss siekaldziedzera dziļās daivas audzēji, gan neirogēnas dabas audzēji, gan t.s. ārpusorgānu audzēji. Primārie siekaldziedzeru audzēji var izplatīties no pieauss siekaldziedzera dziļās daivas tieši uz parafaringeālo telpu, bet tur var veidoties arī metastātiskie audzēji gadījumos, kad primārais audzējs atrodas jebkurā citā organisma vietā [72, 73, 74]. Uzskata, ka siekaldziedzeru audzēju izcelsmē nav specifisku veicinošu faktoru, tomēr ir novērojumi par ilgstoši neārstētu un recidivējošu labdabīgu audzēju malignizāciju [51, 52].

Parafaringeālie audzēji klīniski manifestējas kā veidojumi kakla augšējā trešdaļā vai kā orofaringeāla masa [75]. Šiem audzējiem raksturīga daudzveidīga simptomātika: Eistahijas caurules disfunkcija vienā pusē (unilaterāla), disfāģija, obstruktīva miega apnoja, kraniālo nervu funkciju traucējumi, Hornera sindroms, sāpes kakla rajonā, trizms [76]. Tomēr nereti pat lielu parafaringeālu audzēju gadījumā simptomātika ir minimāla vai gaita ir asimptomātiska, tādēļ šos audzējus atklāj, veicot kakla attēldiagnostiku cita iemesla dēļ [77, 78]. Analizējot saslimstību ar parafaringeālās telpas audzējiem, var secināt, ka tie ir diezgan reti sastopami un ļoti svarīga ir to precīzas anatomiskās lokalizācijas noteikšana un individuālās ārstēšanas taktikas izvēle [69, 78]. Audzēja apjomam palielinoties, parafaringeālā telpa izveidojas kā anatomisks reģions piramīdas formā, kuras pamatne ir deniņu kaula rajonā, bet virsotne vērsta lejup. Telpa izplatās kaudālā virzienā un tās virsotne ir *cornu majoris ossis hyoideae* (1.3.attēls).



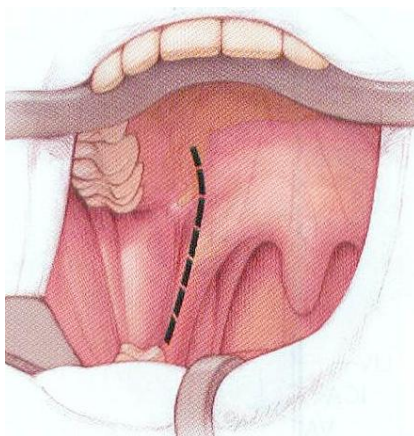
1.3. att. Parafaringeālās telpas uzbūve
[modificēts no Som PM, Curtin HD. Normal Anatomy of the Head and Neck. In: Head and Neck Imaging; 1996:730]

Mugurpusē telpu norobežo *fascia et mm.prevertebralis* un *vertebrae cervicalis*. Sānu robežu veido *venter posterior m. digastrici*, *ramus ascendens, proc.coronoideus* un *proc.condylaris mandibulae* ar *mm.pterygoideus med.* Parafaringeālās telpas trīs robežas veido kauli, tā norobežojot audzēju, kas veidojas šajā reģionā. Tādēļ, izmēriem palielinoties, audzēji izplatās uz priekšu, kaudāli un mediāli. Mediālo robežu veido *fascia buccopharyngea* un *m.constrictor pharyngis sup.* Priekšējo robežu veido *raphe pterygomandibularis* un *fascia m.pterygoideae*. *M.levator veli palatini* fascijas daļa, kas sniedzas uz *proc.styloideus*, sadala telpu pre- un poststiloīdajā daļā. Prestiloīdajā telpā atrodas *m.pterygoideus med.* un *lat.*, *proc.styloideus*, *gl.parotis* dziļā daiva, *a.maxillaris*, taukaudi, limfmezgli un spinālo nervu zari. Poststiloīdajā daļā atrodas *a.carotis interna*, *v.jugularis interna*, *n.vagus*, *n.glossopharyngeus*, *n.accessorius*, *n.hypoglossus* un limfmezgli. Simpātisko nervu gangliju ķēdīte atrodas pie dziļās kakla fascijas un nervu zari šķērso poststiloīdo telpu [71].

Ķirurģiskās pieejas mērķis, izņemot parafaringeālās telpas audzēju, ir audzēja adekvāta vizualizācija, radikāla ekstirpācija, pēc iespējas saglabājot apkārtējo nervu un

asinsvadu integritāti, un hemorāģijas kontrole. Ķirurģiskās pieejas ir ļoti dažādas un ir plaši aprakstītas literatūrā [71-75]. Par galvenajām tiek uzskatītas transcervikāla un transparotidāla pieeja. Pēc literatūras datiem, šīs divas pieejas izmanto gan izolēti, gan kombinācijā ar mandibulotomiju [75-79]. *Ariel et al.* (1954) [80] bija pirmais, kas aprakstīja mandibulotomiju kā parafaringeālās telpas piekļuves paņēmienu. Vēlāk tika piedāvātas dažāda veida osteotomijas [81, 82]; pēdējā ir *Fisch et al.* (1978) aprakstītā *orbitozygomatic*, lai vizualizētu *fossa cranii medialis* [83].

Transorāla pieeja tiek veikta vispārējā anestēzijā, izmantojot mutes plētēju (t.s. mutes „korķi”). Ja pacientam ir mandeles, vispirms veic tonsilektomiju, tad pārdala gļotādu virs audzēja izvelvējuma. Ja audzējs ir liels, gļotādas incīziju turpina aukslēju virzienā, pārdalot *m.constrictor pharyngis sup.* (1.4.attēls).

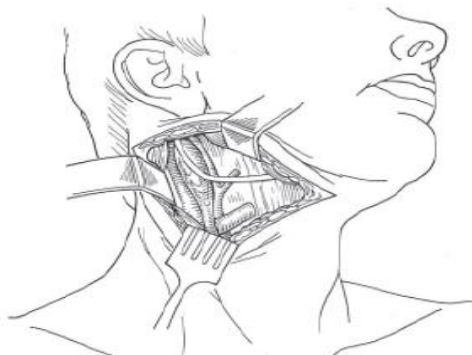


1.4. att. Shematisks transorālas ķirurģiskas pieejas attēls
[modificēts no *Ducic Y, Oxford L. Transoral approach to the superomedial parapharyngeal space. Otolaryngol-Head Neck Surg* 2006; 134:466-470]

Mīkstos audus preparē ļoti rūpīgi, cenšoties neievainot audzēja mezgla kapsulu. Disekciju uzsāk no mediālās puses pie audzēja augšējā un apakšējā pola, tad turpina virzienā uz priekšu un uz mugurpusi. Nobeigumā audzējs tiek pilnībā mobilizēts neasā ceļā laterālā virzienā un izņemts. Ja audzējam ir hanteles forma, ir nepieciešama *lig.stylomandibularae* pārdalīšana [84].

Transcervikāla pieeja sākas ar ārējo zemžokļa incīziju; lielo audzēju gadījumos *gl.submandibularis* var ekscidēt, *ramus marginalis mandibulae* pēc identifikācijas tiek saglabāts un piepacelts. Šajā posmā audzēja masa ir palpējama; audi, aiz kuriem atrodas audzēja mezgls, parasti sastāv no *m.styloglossum* un *lig.stylohyoideus*, tos pārdalot turpina neasā ceļā preparēt audzēju jau tieši parafaringeālajā telpā. Ļoti lielu audzēju gadījumos apakšžokļa zaru ne tikai izvērza uz priekšu, bet arī veic leņķa

mandibulotomiju. Tā kā audzēja preparēšanu bieži vien veic aklā veidā ar ķirurga pirkstu, šīs tehnikas trūkumi varētu būt slikta vaskulāro struktūru kontrole un neradikāla audzēja izņemšana [85] (1.5.attēls).



1.5. att. Transcervikāla ķirurģiska pieeja (shematisks attēls)
[modificēts no http://www.drtbalu.com/para_phamass.html]

Lielu audzēju, kā arī pieauss siekaldziedzera dziļās daivas audzēju gadījumos, izmanto transparotidālo ķirurģisko pieeju. Ādas incīziju veic gar apakšžokļa zaru (*ramus mandibulae*); pieauss un kakla ādu; zemādu un *m.platysma* atpreparē lēvera veidā, identificē sejas nervu un tā zarus, apakšējos zarus piepaceļ un pārvieto uz augšu – tādā veidā tiek atpreparēta dziļā daiva un audzējs ekscidēts *en bloc*.

Šī pieeja dod iespēju vizualizēt un kontrolēt miega artēriju, jugulāro vēnu un zemāk esošos kraniālos nervus. Ja ir nepieciešams papildu operācijas lauks, arī šajā gadījumā var veikt apakšžokļa osteotomiju (1.6.attēls). Šī pieeja ir neadekvāta tikai galvaskausa pamatnes audzēju gadījumos [83, 85].



1.6. att. Paplašināta ķirurģiska pieeja ar mandibulotomijas pielietošanu (shematisks attēls)
[modificēts no http://www.drtbalu.com/para_phamass.html]

1.4. Siekaldziedzeru audzēju iedalījums un proliferācijas marķiera ekspresijas raksturojums

Pleomorfa adenoma ir biežāk sastopamais labdabīgais siekaldziedzeru audzējs – ap 60% [87]. Pasaules populācijā kopumā saslimstība ar šo audzēju ir 2,4-3,05 gadījumi uz 100 000 cilvēkiem gadā [88, 89]. Pleomorfa adenoma biežāk ir sastopama vidēja vecuma sievietēm un biežāk lokalizējas pieauss siekaldziedzerī. Audzēja izmēri lēni palielinās, un neārstēts audzējs atsevišķos gadījumos var malignizēties [52].

1992.gadā *Seifert* ar līdzautoriem izveidoja pleomorfas adenomas klasifikāciju, aprakstot audzēja četrus variantus: (1) audzēji, kuriem dominē stroma, (2) audzēji ar vienādām epiteliālā komponenta un stromas proporcijām, (3) audzēji, kuriem dominē epiteliālais komponents, un (4) audzēji ar krasi izteiktu epiteliālo komponentu [51, 87]. Ir publicēti klīnisko novērojumu rezultāti, kas liecina, ka pēdējam variantam piemīt recidivēšanas īpatnības [87]. Lokāls audzējs pēc operācijas recidivē 1-5% gadījumu. Pleomorfas adenomas malignizēšanās notiek 2-9% gadījumu [88].

Epiteliālie un stromas komponenti ir ļoti dažādi – hondroīdas, mukoīdas vai oseoīdas uzbūves. Pētījumu rezultāti liecina, ka audzējs var būt mioepiteliālas vai duktālas izcelsmes un agrīnā attīstības stadijā audzējs ir vairāk celulārs, nekā vēlīnā stadijā [66]. Hondromiksoīdas stromas apjoms ar laiku palielinās, bet šūnu daudzums samazinās [65, 66]. Savukārt recidivējošai pleomorvai adenomai var būt raksturīga gan hiper-, gan hipocelularitāte un nepilnīga inkapsulācija [81]. *Ductus intercalatus* sienīgas bazālās šūnas un ekskretoro izvadu bazālās šūnas spēj ātri proliferēt, diferencējoties par siekaldziedzeru izvadu sienīgas un sekretorās daļas šūnām, kā arī veidot neoplastiskas šūnas [81].

Saskaņā ar augstāk minēto un literatūras datiem [65, 66, 87, 88] *ductus intercalatus* kambiālās cilmes šūnas var būt adenocistiskas karcinomas, acināras karcinomas, kā arī labdabīgu pleomorfu un monomorfu adenomu izcelsmes pamatā.

Audzēju izcelsmē būtiska nozīme ir arī mioepiteliālajām šūnām [88], bet joprojām nav vienota uzskata par mioepitēlija lomu un līdzdalību pleomorfas adenomas un dažu ļaundabīgo siekaldziedzeru audzēju attīstībā [89]. Tomēr ar iespējamo kopējo audzēju šūnu izcelsmi no *ductus intercalatus* bazālajām šūnām nevar izskaidrot dažādo saslimstības biežumu un klīniskās gaitas atšķirības siekaldziedzeru audzējiem [87].

Lai gan pēdējās desmitgades laikā siekaldziedzeri ir intensīvi pētīti [87-89], siekaldziedzeru parenhīmas audzēju izcelsmes avots joprojām nav atrasts. Pēdējie šūnu

inženierijas pētījumi parāda, ka siekaldziedzeru epitēlijšūnām ir īpašas plazmatiskās membrānas molekulas – $\alpha 6\beta 1$ integrīni un tām piemīt cilmes šūnu īpašības [67, 68]. *Sugito et al.* [91] pieņem, ka vietējie siekaldziedzeru mediatori, tādi kā audzēju nekrozes faktoram līdzīgais apoptozes induktors, caur receptoru Fn14 var izraisīt epitēlijšūnu proliferāciju.

Proliferējošas šūnas kodola marķieri Ki-67 jau vairākas desmitgades izmanto audzēja proliferācijas spēju novērtēšanai [91, 92]. Ki-67 ir ekspresēts visās šūnu cikla fāzēs, izņemot G_0 . Pētījumos noteikts, ka Ki-67 kā šūnu proliferācijas biomarķieris ir jutīgāks nekā mitožu noteikšana [92]. To uzskata par obligātu marķieri ļaundabīgo audzēju agresivitātes noteikšanai. Ki-67 ekspresija korelē ar mitotisko aktivitāti, audzēja diferenciācijas pakāpi un tā klīnisko gaitu [91-96]. Pleomorfas adenomas gadījumā Ki-67 nav ekspresēts vai tā ekspresija ir zema [93]. Tas liecina, ka pleomorfa adenomai kā labdabīgam audzējam ir zema proliferācijas intensitāte un laba prognoze [94].

Audzēja šūnu proliferācija, izmantojot Ki-67 kā marķieri dažādu siekaldziedzeru labdabīgu audzēju gadījumos, Latvijas populācijā līdz šim nav pētīta. Tādēļ pētījumam par Ki-67 ekspresiju dažādu siekaldziedzeru labdabīgu audzēju gadījumos un tā saistību ar audzēju klīnisko gaitu ir liela praktiska nozīme mutes, sejas un žokļu ķirurģijas klīnikā.

2. MATERIĀLI UN METODES

2.1. Pētījuma veids un pētījuma grupas

Pētījuma veids – retrospektīvs pētījums.

Pētījumā tika iekļauti pacienti ar siekaldziedzeru labdabīgiem un ļaundabīgiem audzējiem un oronazofaringeāliem ļaundabīgiem audzējiem:

- 1) 15 pacienti ar mutes dobuma un nazofaringeāliem audzējiem: mutes pamatnes karcinomu (n=4), nazofaringeālu karcinomu (n=1) un ļaundabīgiem un labdabīgiem pieauss siekaldziedzeru audzējiem (n=10), kuri tika izmeklēti un operēti Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas (RAKUS) Latvijas Onkoloģijas centra (LOC) Galvas un kakla ķirurģijas nodaļā laikā no 2009.gada janvāra līdz 2011.gada janvārim – šiem pacientiem noteica Herpes grupas vīrusu DNS un EBV antivielu titrus;
- 2) dati no stacionāra pacientu medicīniskajām kartēm (veidlapa Nr.003/u) par 322 pacientiem ar siekaldziedzeru labdabīgiem audzējiem, kuri bija ārstēti Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas (RAKUS) Latvijas Onkoloģijas centra (LOC) Galvas un kakla ķirurģijas nodaļā 1996.-2007.gadā;
- 3) dati no stacionāra pacientu medicīniskajām kartēm (veidlapa Nr.003/u) par 32 pacientiem ar parafaringeāliem ļaundabīgiem un labdabīgiem audzējiem, kuri tika izmeklēti un ārstēti RAKUS LOC 2001.-2006.gadā.

Pētījuma protokols tika apstiprināts ar Rīgas Stradiņa universitātes Ētikas komitejas lēmumu 2010.gada 23.septembrī (1.pielikums).

Katrs pētījumā iekļautais hospitalizētais pacients deva rakstisku piekrišanu izmeklēšanai un operācijai (manipulācijai) (2.pielikums).

2.2. Pacienti ar mutes dobuma un nazofaringeāliem audzējiem

Šajā pētījuma grupā bija iekļauti četri pacienti ar mutes pamatnes vēzi un viens pacients ar nazofaringeālo karcinomu, kuri ārstējās Latvijas Onkoloģijas centrā laikā no 2009.gada janvāra līdz 2011.gadam janvārim.

Kontroles nolūkā tika izmeklētas divas patientes – viena paciente bija klīniski vesela, bez onkoloģiskas saslimšanas; otrai pacientei pirms diviem gadiem bija operēts

ādas bazālo šūnu vēzis (bazalioma) un veikta pēcoperācijas staru terapija, divu gadu laikā pēc ārstēšanas pabeigšanas audzēja recidīvs nebija konstatēts.

Viens no pētījuma grupas pacientiem bija strādājis ķīmiskajā ražotnē, bet pārējie pacienti arodkaitīgumu neatzīmēja.

No stacionāra pacientu medicīniskajām kartēm tika iegūta informācija par audzēja lokalizāciju, audzēja izmēru, dati par reģionālām metastāzēm (kakla limfmezglos) un attālām metastāzēm, TNM stadiju, PVO klasifikācijai atbilstošu audzēju morfoloģiju (histoloģiskajām diagnozēm) [5].

Operācijas laikā tika paņemti audu gabaliņi no visiem audzējiem – siekaldziedzeru labdabīgiem un ļaundabīgiem audzējiem, mutes dobuma plakanšūnu karcinomas un nazofaringeālās karcinomas. Visas plakanšūnu karcinomas un NFK diagnozes bija morfoloģiski (histoloģiski) apstiprinātas, noteiktas ļaundabīgo audzēju morfoloģiskās malignitātes (diferenciācijas) pakāpes (*Grade*): G1 – labi diferencēts audzējs, G2 – vidēji diferencēts audzējs, G3 – vāji (zemu) diferencēts audzējs.

2.3. Pacienti ar siekaldziedzeru labdabīgiem audzējiem un ļaundabīgu limfoepiteliālo karcinomu

Pētījumā izmantoti dati no slimības vēsturēm par 322 pacientiem – 212 sievietēm un 110 vīriešiem, kuri tika ārstēti Latvijas Onkoloģijas centrā 1996.-2007.gadā un kuriem bija morfoloģiski pierādīts (verificēts) siekaldziedzeru labdabīgs audzējs.

Dati par pacientu vecumu, dzimumu, audzēja veidu, slimības ilgumu un klīnisko gaitu, audzēju anatomisko lokalizāciju un klīniskajām īpašībām iegūti no stacionāra pacientu medicīniskajām kartēm.

Pieauss, zemžokļa un aukslēju labdabīgajos siekaldziedzeru audzējos tika noteikta šūnu proliferācija.

Siekaldziedzeru labdabīgu limfoepiteliālo bojājumu, limfoepiteliālo karcinomu un normālu (veselu) siekaldziedzeru audiem tika imūnhistoķīmiski noteikta LMP1, HHV-6, CD44, CD19, CD68, CK5, CK6 un S100 antivielu ekspresija. Kontrolei paredzētie audi tika ņemti operācijas laikā no klīniski intakta siekaldziedzera rajona.

2.4. Pacienti ar parafaringeālās telpas audzējiem

RAKUS LOC Galvas un kakla ķirurģijas nodaļā laikā no 2001.gada 1.janvāra līdz 2006.gada 31.decembrim tika operēti (vai veikta audu biopsija) 32 pacienti ar parafaringeāliem audzējiem. Pēc parafaringeālā audzēja veida pacienti tika iedalīti četrās grupās: grupa A (n=22) – labdabīgi siekaldziedzeru audzēji; grupa B (n=5) – ļaundabīgi siekaldziedzeru audzēji; grupa C (n=4) – neirogēni audzēji; grupa D (n=1) – ārpusorgānu audzēji.

Turpmāko trīs gadu laikā tika kontrolētas augstākminēto stacionāra pacientu medicīniskās kartes atkārtotas hospitalizācijas gadījumos, lai iegūtu datus par iespējamiem audzēju recidīviem un ķirurģisko komplikāciju ietekmi uz ārstēšanas rezultātiem.

2.5. Materiāla sagatavošana gaismas mikroskopijai

Preparāti izpētei gaismas mikroskopā tika pagatavoti, ieguldot audu gabaliņus parafīnā. Vispirms tie tika fiksēti, izmantojot formalīna fiksējošās īpašības. Formalīns vispirms reaģē ar audu un šūnu olbaltumvielām, saistās ar ūdeņraža saturošām grupām, veido oksimetilgrupu. Šī grupa kondensācijas reakcijā reaģē ar citu līdzīgu grupu, kura satur aktīvo ūdeņraža atomu un veido metilēntiltni.

Pēc fiksācijas preparāti atūdeņoti pieaugošas koncentrācijas etilspirtā. Atūdeņošana sākas 50° etilspirtā, pēc tam turpinās 70°, 90°, 95° un absolūtajā etilspirtā. Pēc tam audu gabaliņi ieguldīti izkausētā parafīnā un parafīna bloki sacietināti. No parafīna blokos ielietā sacietējušā audu materiāla ar mikrotomu pagatavoti 4-6 mkm biezi audu histoloģiskie griezumumi.

Ar mikrotomu pagatavotos audu griezumus pārnes uz priekšmetstikliņa, tad žāvē istabas temperatūrā vai ievieto termostātā +25°C temperatūrā. Pēc tam griezumus deparafinē un krāso ar Harisa hematoksilīnu 4-5 minūtes istabas temperatūrā. Krāsu noskalo ar krāna ūdeni, pēc tam krāso ar 2% eozīna šķīdumu 2-3 minūtes. Tad nokrāsotos audu griezumus atūdeņo etilspirtos, padara caurspīdīgus ksilolā un iegremdē caurspīdīgā vidē (Kaizera (*Kaiser*) glicerola līmē).

Gaismas mikroskopijai izmantota *Leitz DMRB* optika ar digitālo kameru DC 300F. Preparāti aplūkoti gaismas mikroskopā 100-, 200-, 250-, 400- un 1000-kārtīgā palielinājumā.

2.6. Pētījumā izmantotās imūnhistoķīmiskās reakcijas

Imūnhistoķīmijas metode ļauj noteikt audos makromolekulāro komponentu, kuram piemīt antigēna īpašības. Pētījumā izmantotas monoklonālās un poliklonālās antivielas.

Monoklonālās antivielas ir homogēnās antivielas, kas producē hibrīdu šūnas, kuras spēj sintezēt viena tipa specifiskus imūnglobulīnus. Galvenā monoklonālo antivielu īpašība ir antivielu savienošana tikai ar noteiktu antigēna fragmentu (epitopu), kas nodrošina to absolūtu specifiskumu. Monoklonālās antivielas ir viendabīgas ne tikai pēc specifiskuma, bet arī pēc citām bioloģiskām īpašībām, tai skaitā pēc stabilitātes, afinitātes u.c. Savu nozīmi daļēji saglabā arī dzīvnieku imunizācijā iegūtās poliklonālās antivielas, kas savienojas ar vairākiem antigēna epitopiem.

Monoklonālās antivielas ir izteikti specifiskas, un tās papildus jāmarķē pirms vai pēc antigēna-antivielas reakcijas veikšanas. Antivielu marķēšanai izmanto smago metālu sāļus, radioaktīvas vielas, fermentus. Ir zināms, ka neiezīmēto antivielu (molekulu izmērs nav palielināts) izmantošana atvieglo antigēnu atklāšanu. Neiezīmēto antivielu molekulas ātrāk un dziļāk var iekļūt audos. Šādas antivielas vieglāk šķērso plazmatisko membrānu un vieglāk reaģē ar intracelulārajiem aģentiem [97].

Netiešās iezīmēšanas metodes gadījumā antigēna un antivielas reakcijas vizualizācijai tiek izmantotas ar fermentu (peroksidāzi un sārmaino fosfatāzi) vai fluorescējošu krāsvielu (fluorescīna izotiocianātu, rodamīnu) iezīmētas sekundārās antivielas jeb polimēri. Kā sekundārās antivielas lielākoties tiek izmantoti serumi pret peļu imūnglobulīniem. Vizualizācijas rezultāts atkarīgs no antigēna lokalizācijas šūnu membrānā, citoplazmā vai kodolā [97-100].

Mūsu pētījuma laikā izmeklējamie audu gabaliņi tika fiksēti 10% bufera formalīnā un ieguldīti parafīnā. Pēc tam tika iegūti 4-5 mkm biezi histoloģiskie griezumumi, kurus deparafinizēja ksilolā, uz laiku iemērcā absolūtā spirtā – graduētās spirtu sērijās un pēc tam izvadīja caur peroksidāzi bloķējošu šķīdumu (DAKO REAL

Peroxidase-Blocking Solution, kods S2023), lai mazinātu endogēnās peroksidāzes aktivitāti. Tad griezumus trīs reizes skaloja bidestilētā ūdenī.

Preparāta sagatavošanas procesā tika veikta epitopa apstrāde ar siltumu, karsējot preparātu 20 minūtes *DakoCytomation Target Retrieval* šķīdumā (kods S1700). Pēc tam preparāts tika inkubēts ar primārajām antivielām istabas temperatūrā 1 stundu vai atstājot pa nakti ledusskapī +4⁰C temperatūrā. Procedūra tika veikta, stingri ievērojot antivielu ražotāja instrukcijas. 2.1.tabulā uzskaitītas mūsu pētījumā izmantotās antivielas, to ieguves avots, darba atšķaidījums un ražotājfirma.

2.1.tabula

Pētījumā izmantotās antivielas (imūnhistoķīmijas marķieri)

Antiviela	Dzīvnieks, no kā iegūta antiviela	Klons	Darba atšķaidījums	Ražotājfirma
LMP1	pele	CS.1-4	1:100	Dako Glostrup, Denmark
HHV-6	pele	sc-65463	1:100	Santa Cruz Biotech
CD44	pele	DF 1485	1:50	Dako A/S, Glostrup, Denmark
CD19	pele	LE D19	1:50	Dako A/S, Glostrup, Denmark
CD68	pele	PG-M1	1:100	Dako A/S, Glostrup, Denmark
S100	trusis	M3562	1:150	Dako Corporation, Glostrup, Denmark, ready-to-use
Ki-67	trusis	MIB	1:100	Dako A/S, Glostrup, Denmark
CK 5,6	trusis	D5/16B4	1:100	Dako A/S, Glostrup, Denmark
AE1/AE3	pele	AE1-AE3	1:50	Dako A/S, Glostrup, Denmark
CD8	pele	CD8/144B	1:100	Dako A/S, Glostrup, Denmark

2.6.1. CD44 un imūnkompetento šūnu noteikšana, izmantojot anti-CD8, -CD19, -CD68 un -S100 antivielas

Šajā apakšpētījumā tika iekļauti pacienti, kas ārstējas RAKUS Latvijas Onkoloģijas Centra galvas un kakla ķirurģijas nodaļā no 2010.gada 1.janvāra līdz 2011.gada 31.decembrim.

Visiem pacientiem izvērtēta anamnēze un klīniskais stāvoklis. Pacientiem tika veikta galvas un kakla kompjuertomogrāfija un/vai izmeklējumi ar magnētisko

Dati par audzēja lokalizāciju un lielumu, invāziju reģionālajos (kakla) limfmezglos, attālām metastāzēm (TNM atbilstoši PVO apstiprinātai klasifikācijai) tika iegūti no stacionāra pacientu medicīniskajām kartēm: četriem pacientiem bija lokāli izplatīta mutes dobuma plakanšūnu karcinoma III un IV stadijā (T_3 - T_4 , un N_1 - N_2), vienam pacientam bija mutes pamatnes karcinoma II stadijā ($T_2N_0M_0$). Mēles saknes audzējs bija vienam pacientam, mutes pamatnes audzējs bija četriem pacientiem. Pacienti ($n=5$) bija vecumā no 39 līdz 77 gadiem; no 5 pacientiem viena bija sieviete un četri vīrieši.

Mēs izmantojām monoklonālo peles antivielu pret CD44 (klons DF 1485), (atšķaidījumā 1:50) (*Dako Cytomatien, Glostrup, Denmark* (Dānija)) glikoproteīna CD44 hialuronāta receptora ekspresijas noteikšanai uz šūnas virsmas.

Imūnhistoķīmisko reakciju rezultātu vizualizācijai izmantoti *Dako REAL EnVision Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse* un *EnVision Flex*. Nobeigumā preparāti tika skaloti destilētā ūdenī, šūnu kodoli krāsoti ar Harisa hematoksilīnu, pēc tam preparāti skaloti ar krāna ūdeni un pārklāti ar segstikliem. Negatīvajā kontrolē netika pierādīta attiecīgā antigēna (epitopa) klātbūtne (ekspresija). Griezumi ar mandeles (CD44, CD68), resnās zarnas (S100) un limfmezgla (CD8,

CD19) audiem saskaņā ar antivielu ražotāja instrukcijām tika izmantoti kā kontroles preparāti [61, 64].

CD44 ekspresija tika novērtēta pēc šūnu membrānu brūnā krāsojuma. Audzēju šūnu, limfocītu un makrofāgu CD44, CD68, CD19 un S100 ekspresijas pakāpe tika vērtēta atsevišķi. S100 un CD68 ekspresija attiecās uz šūnu citoplazmu, bet CD19 ekspresija – uz šūnu membrānu.

CD44, CD68, CD19 un S100 ekspresijas pakāpe tika vērtēta ar puskvantitatīvo metodi un dalījās šādi [101]:

- minimāla ekspresija – dažas pozitīvas šūnas (<10%);
- vidēja ekspresija – vidējs pozitīvo šūnu daudzums (<50%);
- difūza ekspresija – lielākā daļa no šūnām ir pozitīvas (>50%).

2.6.2. Siekaldziedzeru audzēju diferenciāldiagnostika un audzēju šūnu proliferācijas noteikšana ar imūnhistokīmijas metodēm

Operāciju laikā iegūtie siekaldziedzeru audu gabaliņi tika fiksēti 10% formalīnā, skaloti, mērcēti dažādas koncentrācijas spirta atšķaidījumos, ksilola šķīdumā, tad ieguldīti parafīnā *Paraplast* +60⁰C temperatūrā. Audu pārskata griezumumi (5μm) tika krāsoti ar hematoksilīnu un eozīnu. Lai precizētu siekaldziedzeru audzēju epiteliālo izcelsmi un imūnhistoķīmiski veiktu audzēju diferenciāldiagnostiku, zemi diferencētu audzēju gadījumos izmantoja pancitokeratīnu grupas antivielas CK5,6, kā arī AE1/AE3 [91]. Parafīnā ieguldīto papildu audu griezumus izmantoja imūnhistoķīmisko reakciju veikšanai ar anti-Ki-67 monoklonālo antivielu (*Dako A/S, Glostrup, Denmark*), kas reaģē ar Ki-67 kodolu antigēnu [96, 97]. Šajā pētījumā siekaldziedzeru audzēju šūnu proliferācijas imūnhistoķīmiskai noteikšanai tika izmantota anti Ki-67 antigēnu formalīnā fiksētos un parafīnā ieguldītos audos [96].

Inkubācija ar primāro antivielu (anti-Ki-67, klons MIB-1) veikta atšķaidījumā 1:100, atstājot griezumus pa nakti ledusskapī +4°C temperatūrā. Tad veikta 30 minūšu ilga inkubācija ar biotinēto antivielu (*Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA*) atšķaidījumā 1:500 un 30 minūšu ilga inkubācija ar streptavidīna-biotīna-peroksidāzes kompleksu (*BioGenex Laboratories, San Ramon, CA, USA*) atšķaidījumā 1:250. 3,3'-diaminobenzidīnu tetrahidrohlorīds (50 mg uz 100 ml PBS ar 0,03% ūdeņraža pārskābi) izmantots kā hromogēns. Šūnu kodoli tika krāsoti ar Harisa hematoksilīnu un nosegti ar

Kaizera (*Kaiser*) glicerola līmi. Reakcijas rezultātā pozitīvo šūnu kodoli iekrāsojās brūnā krāsā. Negatīvā kontrole tika izmantota, lai pierādītu attiecīgā antigēna klātbūtnes neesamību. Limfmezgla audu griezumi bija izmantoti kā pozitīvā kontrole reakcijai ar MIB-1.

2.6.3. EBV onkoproteīna LMP1 un HHV-6 antivielu noteikšana

Monoklonālas peles antivielas anti-EBV, LMP1 klons CS.1-4 (atšķaidījums 1:100) no *Dako* (*Glostrup, Denmark*) un anti-HHV-6 no *Santa Cruz Biotech* bija izmantotas darbā, ievērojot publikācijās atrodamās rekomendācijas [98, 99]. Imūnhistoķīmisko reakciju rezultātu vizualizācija tika veikta, izmantojot *Dako EnVision Detection System, Peroxidase/DAB+* un *Dako LSAB+System+HRP*. Nobeigumā griezumi tika skaloti ar destilēto ūdeni un veikta šūnu kodolu krāsošana ar Harisa hematoksilīnu, pēc atkārtotas skalošanas krāna ūdenī griezumi tika pārsegti ar segstikliņiem. LMP1 proteīna ekspresija izpaudās kā šūnu membrānas un citoplazmas brūns krāsojums, bet HHV-6 reakcijas gadījumā – kā šūnu citoplazmas krāsojums.

Negatīvā kontrole veikta, pierādot attiecīgā antigēna klātbūtnes neesamību vienā no diviem griezumiem uz stikla. Hodžkina slimības pacientu audu griezumi tika izmantoti kā pozitīvā kontrole reakcijām ar LMP1.

2.7. Imūnhistoķīmisko reakciju rezultātu novērtēšana ar puskvantitatīvo un kvantitatīvo metodi

2.7.1. LMP1, CD44, CD19, CD68 un S100 ekspresijas novērtēšana ar puskvantitatīvo metodi

LMP1 ekspresija, tāpat kā CD44, CD19, CD68 un S100 ekspresija, tika analizēta visās pacientu grupās, izmantojot šādu puskvantitatīvā novērtējuma skalu:

- 0 – imūnhistoķīmiski LMP1 ekspresija netika konstatēta;
- 1 – LMP1 pozitīvās šūnas ir 1-10% redzes laukā;
- 2 – LMP1 pozitīvās šūnas ir 11-30%;
- 3 – LMP1 pozitīvās šūnas ir 31-75%;
- 4 – LMP1 pozitīvās šūnas ir vairāk nekā 75% redzes laukā.

2.7.2. Siekaldziedzeru audzēju šūnu proliferācijas novērtēšana ar kvantitatīvo metodi

Reakcijas rezultāti tika novērtēti kvantitatīvi, mikroskopā 400-kārtīgā palielinājumā skaitot Ki-67-pozitīvās audzēju šūnas visos preparātu rajonos. Ki-67-pozitīvo šūnu skaits mikroskopa redzes laukā tika salīdzināts ar kopējo audzēja šūnu skaitu šajā laukā. Nosakot Ki-67-pozitīvo šūnu kodolu skaitu uz 1000 šūnu kodoliem, aprēķināja šūnu proliferācijas indeksu. Tika noteikta Ki-67 ekspresija un tās ticamības intervāls.

2.8. EBV antivielu titru noteikšana

EBV antivielu titru noteikšana veikta pacientiem ar siekaldziedzeru audzējiem (n=322), mutes dobuma plakanšūnu karcinomu (n=4) un NFK (n=1).

Siekaldziedzeru audzēju grupā EBV antivielas noteiktas 10 pacientiem – septiņām sievietēm un trīm vīriešiem. Pacienti bija vecumā no 37 līdz 83 gadiem (vidējais vecums 56,2 gadi). No siekaldziedzeru audzējiem septiņi bija ļaundabīgi, bet trīs – labdabīgi. Audzēja persistence bija 4-36 mēneši.

No ļaundabīgiem siekaldziedzeru audzējiem četri bija epidermoīdas karcinomas: divi gadījumi bija II stadijā, viens – III stadijā un vēl viens IV stadijā; viens gadījums bija ļaundabīga limfoepiteliāla karcinoma IV stadijā, vēl viens gadījums – adenokarcinoma II stadijā un viens gadījums – duktāla karcinoma IV stadijā.

Divos no septiņiem gadījumiem audzēji bija zemas diferenciācijas pakāpes, pārējie – vidējas diferenciācijas pakāpes.

Visi pacienti pēcoperācijas periodā tika novēroti 4-12 mēnešus. Novērošanas perioda laikā divas patientes nomira slimības progresijas un attālu metastāžu izveidošanās rezultātā. Astoņiem pacientiem audzēja recidīvus vai metastāzes nenovēroja. Visi labdabīgie siekaldziedzeru audzēji (n=2) bija pleomorfas adenomas, no tiem vienā gadījumā primārs audzējs un otrā gadījumā recidivējoša pleomorfa adenoma.

Mutes dobuma plakanšūnu karcinoma bija 5 pacientiem – četriem vīriešiem un vienai sievietei vecumā no 51 līdz 66 gadiem (vidējais vecums 59,7 gadi). Viens patients III stadijā, viens patients IV stadijā un divi pacienti II stadijā. Mutes plakanšūnu vēža persistence bija 2-24 mēneši (vidēji $6,5 \pm 6,9$ mēneši). Trijos gadījumos

ļaundabīgais process tika konstatēts mutes pamatnē, bet vienā gadījumā lūpu kaktiņā ar izplatību vaiga gļotādā.

Pacients ar NFK IV stadijā bija 26 gadus vecs. Audzēja persistence ilga 4 mēnešus. Visi audzēji bija vidēji diferencēti. Visus pacientus novēroja 4-24 mēnešus. Novērošanas laikā nevienam no pacientiem nekonstatēja audzēja recidīvu.

2.9. EBV, HHV6, HHV7 DNS noteikšana ar PĶR pacientiem ar mutes dobuma un nazofaringeālo karcinomu

Polimerāzes ķēdes reakcija ar intracelulāro praimēšanu (nPĶR) bija izmantota EBV, HHV-6 un HHV-7 genomu secības noteikšanai no asinīm, no šūnām un audiem brīvas plazmas izolētā DNS. DNS no 0,5 ml asiņu un aptuveni 40 mg audu izolēja ar fenola-hloroforma metodi, bet DNS no 0,2 ml plazmas izdalīja ar *QIAamp Blood Kit* (*Qiagen*, Vācija) darba komplekta kolonnu metodi. Lai pārbaudītu no asinīm un audiem izolētas DNS kvalitāti un izslēgtu plazmas DNS kontamināciju ar šūnu DNS, tika veikta β -globīna gēna PĶR. EBV, HHV6 un HHV7 DNS identifikācija bija veikta saskaņā ar *Landgren M. et al.* [116].

Katrā PĶR reakcijā obligāti noteica DNS, kas satur vīrusa genoma kopiju (pozitīvā kontrole), un DNS, kas nesatur vīrusa genoma kopiju (negatīvā kontrole), kā arī veica ūdens kontroli.

Amplifikācijas produkti ir pārbaudīti elektroforēzes ceļā agarozes gēlā, izmantojot elektroforēzes aparātu *CAMBRIDGE Protein analysis & DNA sequencing Electrophoresis* (Lielbritānija). Gēlu krāsoja ar etīdijbromīdu un analizēja ultravioletajā starojumā UV transiluminatorā (*Transiluminator LKB 2001 Macrovue*, Zviedrija), pēc marķiera nosakot amplificētās DNS garumu.

2.10. Elektronmikroskopija

Lai sagatavotu audu materiālu izpētei elektronmikroskopā, materiāls tika sasmalcināts 1 mm³ lielos gabaliņos, tad fiksēts 2,5% glutāraldehīda šķīdumā 0,1 M fosfāta buferī (pH=7,4) 2-4 stundas +4°C temperatūrā. Papildu fiksācija veikta ar 1% osmijskābi 0,1 M fosfāta buferī 1 stundu +4°C temperatūrā. Pēc tam preparātu trīs reizes skaloja fosfāta buferšķīdumā bez saharozes, ik pēc 10 minūtēm šķīdumu mainot

+4°C temperatūrā. Tad audu materiāls atūdeņots etilspirtā, pakāpeniski palielinot tā koncentrāciju (50°, 70°, 80°, 90°, 96° un 100°), katras koncentrācijas spirtu nomainot 2-3 reizes ik pēc piecām minūtēm +4°C temperatūrā. Pēc 70° spirta audu gabaliņus diennakti turēja 2% uranilacetāta 70° spirta šķīdumā. Audu materiālu pakāpeniski piesātināja ar epoksīda sveķu komponentu un acetona maisījumu, iztuotot termostatā +37°C temperatūrā vienu stundu. Pēc tam audu gabaliņus pa nakti atstāja epoksīda sveķu maisījumā (bez katalizatora DMP-30) istabas temperatūrā. Materiālu ieguldīja epoksīda sveķu maisījumā (ar katalizatoru) speciālās plastmasas kapsulās un uz 24 stundām ievietoja termostatā +60°C temperatūrā. No epoksīda sveķos ieguldītā audu materiāla, izmantojot ultramikrotomu, izgatavoti 1-2 mkm biezi t.s. pusplānie griezumī, izmantojot speciāli pagatavotus vienreizējas lietošanas stikla nažus. Ultraplāno griezumu iegūšanai izmantoja rūpnieciski izgatavotus dimanta nažus, kuru asmenis izdara precīzākus paraugu griezumus un kalpo ilgāk.

Audu griezumus (1-2 mkm) pārnēsa uz priekšmetstikliņa, uz kura iepriekš uzpīlināts ūdens pīliens, un žāvēja uz elektriskās plīts. Tādā veidā izžāvēti audu griezumī iztaisnojas un pīlīp pīe priekšmetstikla. Pēc žāvēšanas audu griezumus krāsoja ar 1% toluidīnzīlā šķīdumu (pH 9,0). Uz priekšmetstikla ar griezumīem uzlēja krāsu un sīldīja apmēram pusmīnūti. Tad noskaloja ar destīlētu ūdenī un žāvēja. Nokrāsotos audu griezumus ieslēdza Kanādas balzāmā un pārklāja ar segstīkliņu.

Pusplānie 1-2 mkm biezie audu griezumī pētīti gaismas mikroskopā dažādos pīlielinājumos. Pēc 1 mkm biezu (pusplāno) audu griezumu novērtēšanas gaismas mikroskopā, kad tiek izvēlēta noteikta elektronmikroskopiskai analīzei derīga audu materiāla vieta preparātā, jāatrod tā pati vieta blokā, lai pagatavotu 60-80 nm biezus (ultraplānos) griezumus. Griešanas procedūra līdzīga kā pusplāno audu griezumu izgatavošanas gadījumā. Pēc tam epoksīdsveķos ielīeto audu ultrapīlanos griezumus krāsoja (kontrastēja). Darbā izmantota dubultkrāsošana (kontrastēšana) ar uranīlacetātu un svīna citrātu. Sīetiņus ar audu griezumīem ievīetoja 2% uranīlacetāta šķīdumā uz 20 mīnūti, tad noskaloja ar destīlētu ūdenī un izžāvēja. Pēc tam veīca krāsošanu ar svīna citrātu. Petri traucīņā uz tēflona virsmas, kur kā mītruma absorbenti izmantoti vairāki atūdeņoti NaOH graudiņi, sīetiņus ar audu griezumīem novīetoja svīna citrāta pīlienā tā, lai griezumī saskartos ar pīliena virsmu, un turēja 6 mīnūtes, sīetiņus rūpīgi noskaloja destīlētā ūdenī un ļāva izžūt.

Pagatavoto kontrastvielu 5-10 minūtes centrifūgēja centrifūgā ar 5000 apgriezieniem minūtē un filtrēja (pagatavoto kontrastvielu var uzglabāt ledusskapī 6 mēnešus, pirms lietošanas tā jāfiltrē).

Pēc griezumu krāsošanas tos var pētīt elektronmikroskopā. Tālāk aprakstītās darbības ir iespējamas pēc JEM 1011 elektronmikroskopa ieslēgšanas un elektronu stara noregulēšanas. Preparātu – sietiņu ar audu griezumiem ar pincetes palīdzību ievietoja preparāta turētājā. Preparāta turētāju ievadīja elektronmikroskopa priekškamerā, no kuras atsūknēja gaisu.

Pirmo preparāta apskati veica mazā elektronmikroskopa palielinājumā (ap 2000-3000x). Pēc tam, kad vajadzīgais šūnu griezumš tika atrasts, to analizēja, aprakstīja un, ja nepieciešams, fotografēja rezultātu dokumentēšanai. Pēc tam turpināja preparāta apskati dažādos lielākos elektronmikroskopa palielinājumos, turpinot tos aprakstīt un fotografēt. Pētījumā preparātu analīze veikta 2000-90000-kārtīgā palielinājumā.

2.11. Datu statistiskā apstrāde

Mūsu pētīto antigēnu ekspresijas un tās savstarpējo attiecību (korelācijas) novērtēšanai pēc imūnhistoķīmisko reakciju veikšanas tika izmantots Spīrmena tests (*Spearman's rank* korelācijas koeficients). Korelācijas starp antigēnu ekspresijām un klīniskajiem datiem tika analizētas, izmantojot χ^2 statistiku. Par statistiski ticamu tika uzskatīta p vērtība $<0,05$.

Pētījuma rezultāti par parafaringeālajiem audzējiem apkopoti, izmantojot aprakstošās statistikas metodi.

Ķirurģisko komplikāciju veidi un biežums apkopoti *Microsoft Excel* tabulās.

Datu statistiskā apstrāde veikta, izmantojot profesionālās statistiskās apstrādes programmatūru SPSS 20.00 (*SPSS Inc.*, ASV).

3. REZULTĀTI

3.1. Mutes dobuma un nazofaringeālo audzēju Herpes grupas vīrusu DNS noteikšana un analīze

Pieciem no sešiem pacientiem ar mutes plakanšūnu karcinomu (mēles saknes rajonā – 1, mutes pamatnes rajonā – 3, NFK – 1) tika noteikta EBV DNS ar polimerāzes ķēdes reakciju. Vienam pacientam (1/6) ar vidējas diferenciācijas pakāpes mutes pamatnes vēzi II stadijā EBV DNS netika konstatēta. Pārējiem pieciem pacientiem ar vidējas diferenciācijas pakāpes mutes plakanšūnu karcinomu III un IV stadijā tika konstatēta EBV DNS: šo izmeklējumu rezultāti atainoti 3.1. un 3.2. tabulā.

3.1.tabula

EBV DNS atrade ar PĶR RAKUS LOC 2009.-2011.gadā ārstētajiem pacientiem ar mutes plakanšūnu karcinomu (n=5/6)

Pauga veids/Diagnoze	EBV DNS atrade		
	perifēriskajās asinīs	plazmā	audos
Ca mēles saknē	pozitīvs	negatīvs	pozitīvs
Ca mutes pamatnē (nr.1)	pozitīvs	negatīvs	pozitīvs
Ca mutes pamatnē (nr.2)	pozitīvs	negatīvs	pozitīvs
Ca mutes pamatnē (nr.3)	negatīvs	negatīvs	negatīvs
Ca aizdzerokļu rajonā	pozitīvs	negatīvs	pozitīvs
NFK	pozitīvs	negatīvs	pozitīvs
LLEB	pozitīvs	negatīvs	pozitīvs
Audzēja robežaudi ar iekaisuma pazīmēm	negatīvs	negatīvs	pozitīvs
Normāls siekaldziedzeris	pozitīvs	negatīvs	negatīvs
Normāla vaiga gļotāda	negatīvs	negatīvs	negatīvs

Ca – plakanšūnu karcinoma (vēzis)

NFK – nazofaringeāla karcinoma

LLEB – siekaldziedzeru labdabīgs limfoepiteliāls bojājums

EBV DNS netika atrasta:

- vidējas diferenciācijas pakāpes II stadijas mutes pamatnes plakanšūnu karcinomas audos;
- normālos siekaldziedzeru audos un klīniski veselajā vaiga gļotādā.

**Pacienti ar mutes plakanšūnu karcinomu (n=3) un nazofaringeālu karcinomu (n=1),
siekaldziedzeru labdabīgu limfoepiteliālu bojājumu (n=1): dati par EBV klīniskiem un
morfoloģiskiem izmeklējumiem un PĶR rezultātiem**

Pacients nr.	1	2	3	4	5		6	7		8
Izmeklēto lokalizāciju skaits	1	1	1	1	2		1	2		1
Pacientu dzimums, V/S	V	V	S	V	V		V	V		S
Vecums, gadi	25	39	50	60	61		63	66		77
Ca mēles saknē		X								
Ca mutes pamatnē					X			X		X
Ca aizdzerokļu rajonā							X			
TNM	T ₄ N ₀ M ₀	T ₂ N ₂ M ₀			T ₄ N ₀ M ₀		T ₃ N ₀ M ₀	T ₂ N ₀ M ₀		T ₄ N ₁ M ₀
Audzēja stadija	IV	IV			IV		III	II		IV
Diferenciācijas pakāpe (Grade)	Gr3	Gr2			Gr2		Gr2	Gr2		Gr2
NFK	X									
LLEB			X							
Audzēja robežaudu rajons ar iekaisuma reakciju						X				
Normāls siekaldziedzeris				X						
Normāla vaiga gļotāda									X	
EBV PĶR	poz	poz	poz	neg	poz	poz	poz	neg	neg	poz

Ca – plakanšūnu karcinoma (vēzis)

NFK – nazofaringeāla karcinoma

LLEB – siekaldziedzeru labdabīgs limfoepiteliāls bojājums

EBV DNS tika atrasta:

- izplatīta IV stadijas mutes pamatnes gļotādas audzēja rezekcijas līnijās (audzējam līdzāsesošajā gļotādā);
- labdabīga siekaldziedzeru limfoepiteliāla bojājuma audos.

Izmeklējot RAKUS LOC 2009.-2011.gadā ārstēto mutes plakanšūnu karcinomas pacientu (n=7) asinis ar PĶR, atklājās, ka visos šajos gadījumos EBV DNS plazmā nevarēja konstatēt, kas skaidri liecina par to, ka izmeklējamiem pacientiem nav aktīvas EBV infekcijas.

No augstāk minētajiem 7 pacientiem diviem pacientiem ar mutes pamatnes audzējiem tika izmeklēti ne tikai šo audzēju audi, bet arī citas lokalizācijas gļotādu fragmenti: vienam pacientam tika veikta audzēja rezekcijas līniju audu un otram – normālas vaiga gļotādas izmeklēšana. Bez tam tika izmeklēti arī viena klīniski vesela pacienta neizmainīta siekaldziedzera audi.

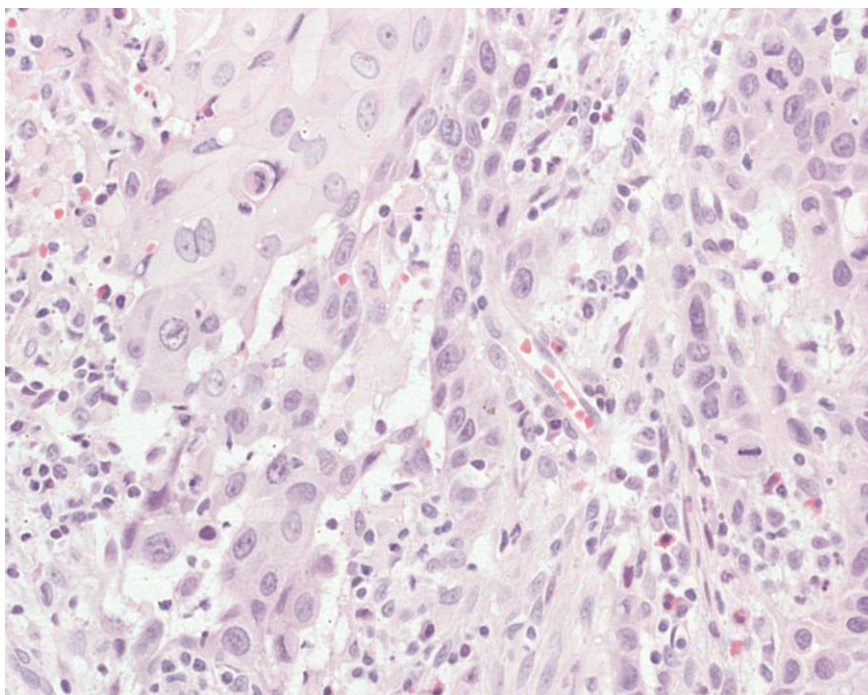
Minētajiem 3 pacientiem EBV DNS netika konstatēta plazmā (resp., nebija aktīvas EBV infekcijas), bet pacientam ar neizmainītu siekaldziedzeri EBV DNS tika konstatēta perifēriskajās asinīs, kas liecina par latentu infekciju.

Pacientam ar neliela izmēra II stadijas mutes pamatnes plakanšūnu karcinomu un normālu vaiga gļotādu EBV DNS netika konstatēta ne izmeklētajos audos, ne plazmā.

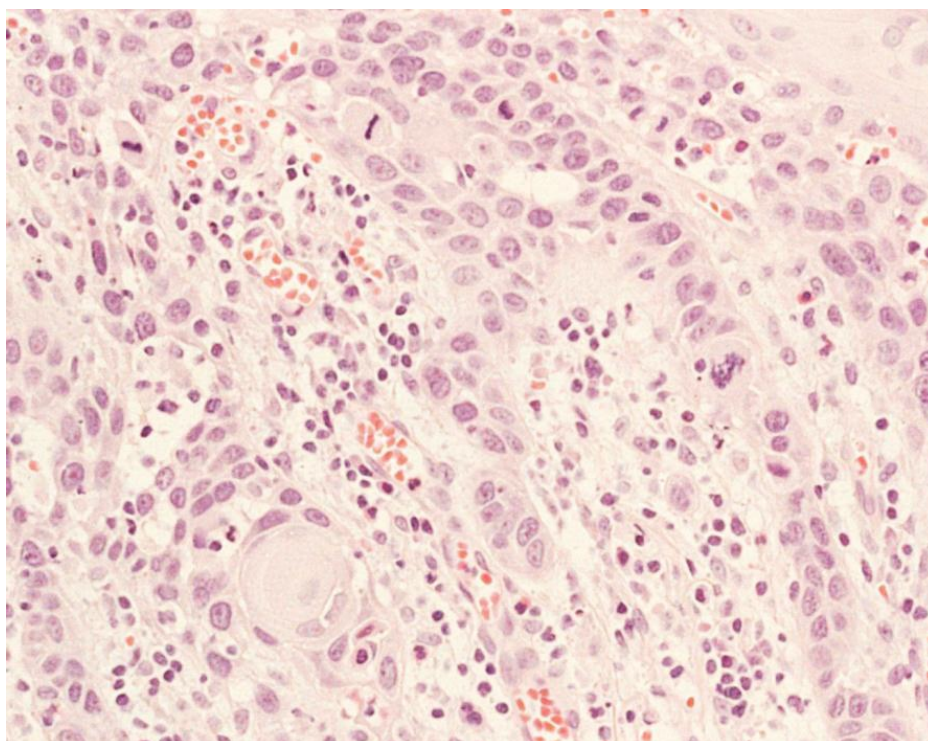
Pārējiem sešiem pacientiem histoloģiskajā izmeklēšanā tika konstatēta vidējas diferenciācijas pakāpes mutes dobuma plakanšūnu karcinoma. Nebija ticamas korelācijas starp audzēja diferenciācijas pakāpi un slimības prognozi, bet bija redzams, ka, jo zemāka diferenciācijas pakāpe, jo straujāk notiek audzēja augšana un metastazēšanās.

3.2. Mutes dobuma un nazofaringeālo audzēju morfoloģiskās un imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas rezultāti

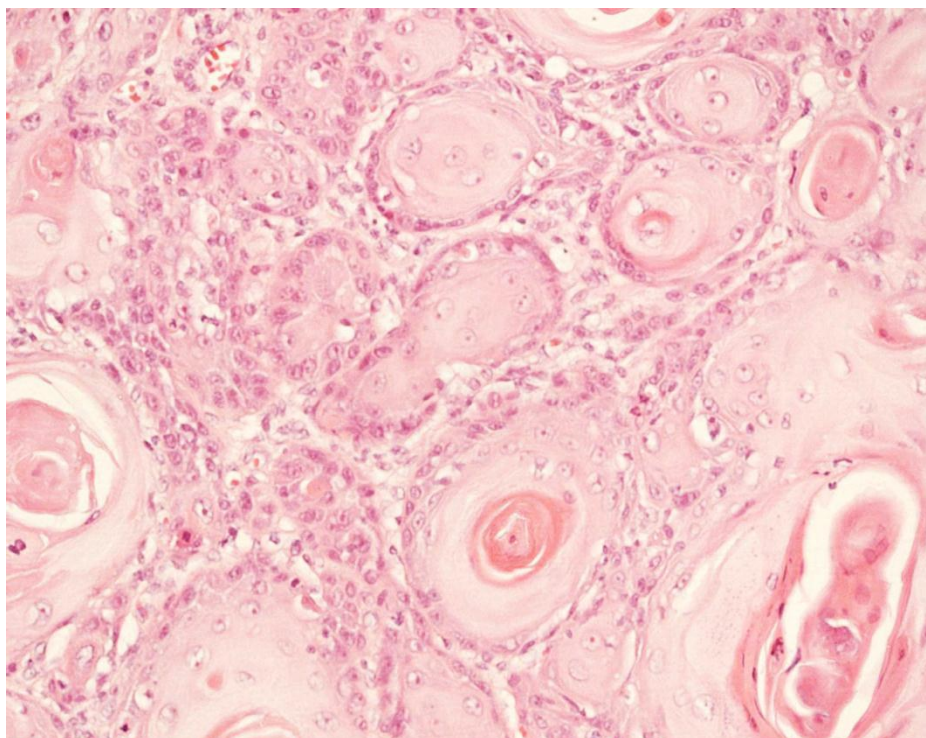
3.1.apakšnodaļā minētajiem septiņiem pacientiem tika konstatēta gan keratinizēta, gan nekeratinizēta mutes dobuma invazīva plakanšūnu karcinoma, audzēju šūnas veidoja pavedienus jeb šūnu joslas, šūnas bija dažāda izmēra. Audzēju audus infiltrēja limfocīti un granulocīti (3.1., 3.2., 3.3., 3.4.attēls).



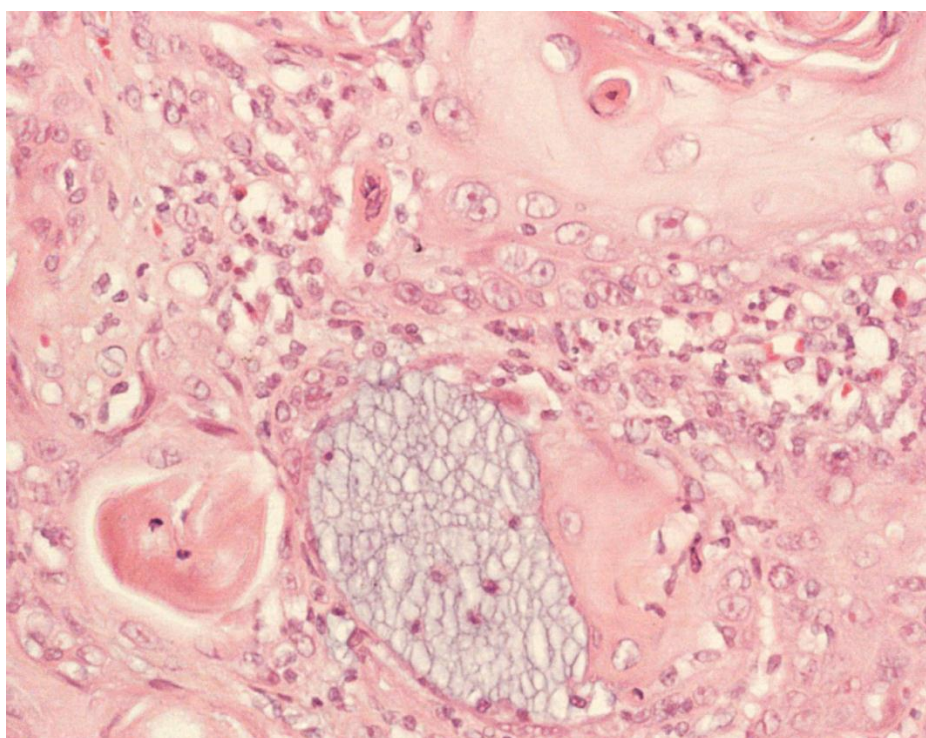
3.1. att. Mutes dobuma plakanšūnu vēzis. Audzēja pavedieniem jeb šūnu joslām raksturīgs šūnu un kodolu polimorfisms, saskatāmas mitožu figūras. Audzēju infiltrē limfocīti, granulocīti. H&E. x 400



3.2. att. Mutes dobuma plakanšūnu vēzis. Audzēja šūnu joslas un asinsvadu pilnasinība. H&E. x 400

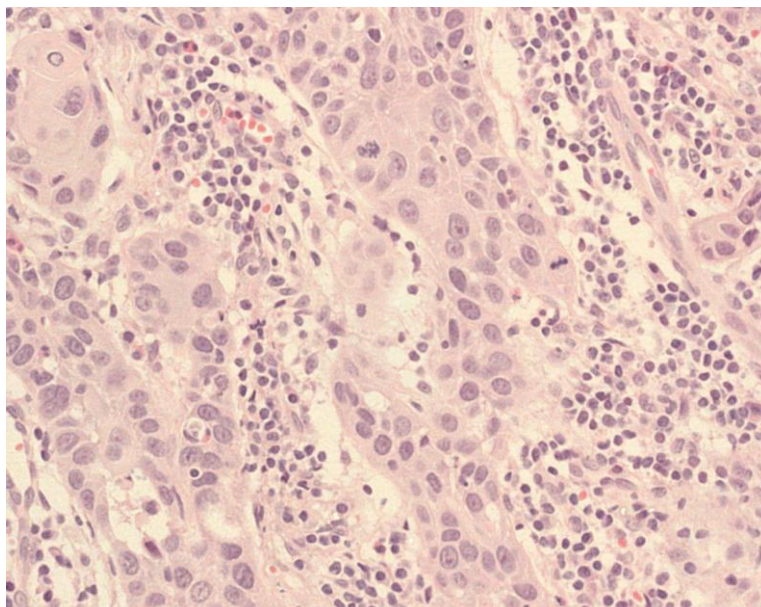


**3.3. att. Aizdzerokļu rajona plakanšūnu vēzis. Audzēja šūnas ar keratinizācijas pazīmēm.
H&E. x 250**

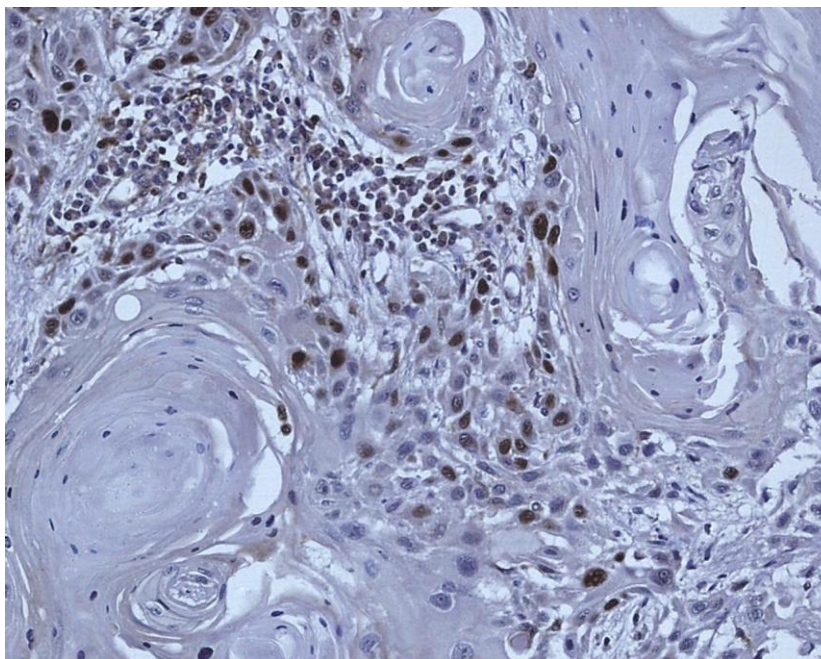


**3.4. att. Aizdzerokļu rajona plakanšūnu vēzis. Izteikts audzēja šūnu un šūnu kodolu
polimorfisms. H&E. x 400**

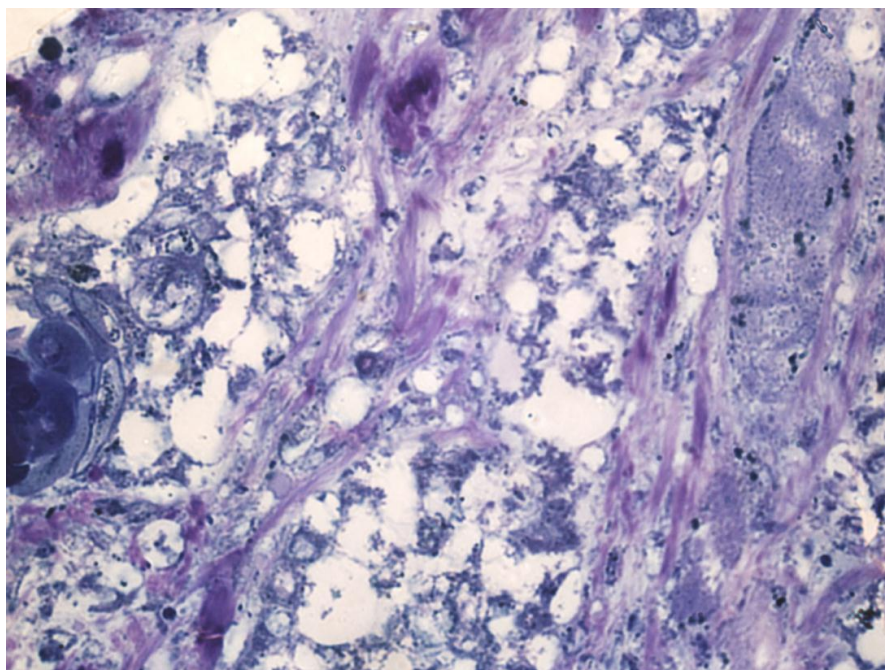
Par invazīvu audzēju liecina perivaskulārs šūnu sakopojums. Karcinomas šūnām raksturīgs šūnu un kodolu polimorfisms, liels mitožu skaits, palielināts kodoliņu skaits audzēja šūnas kodolā (3.5., 3.6., 3.7.attēls). Granulocītu un limfocītu skaits audu stromā bija variabls. Bija redzami arī intraepiteliāli limfocīti (3.5.attēls).



3.5. att. Mutes dobuma plakanšūnu vēzis. Audzēja šūnu un kodolu polimorfisms, izteikta mitotiska aktivitāte, redzamas patoloģiskas mitozes, limfocīti un granulocīti. H&E. x 400

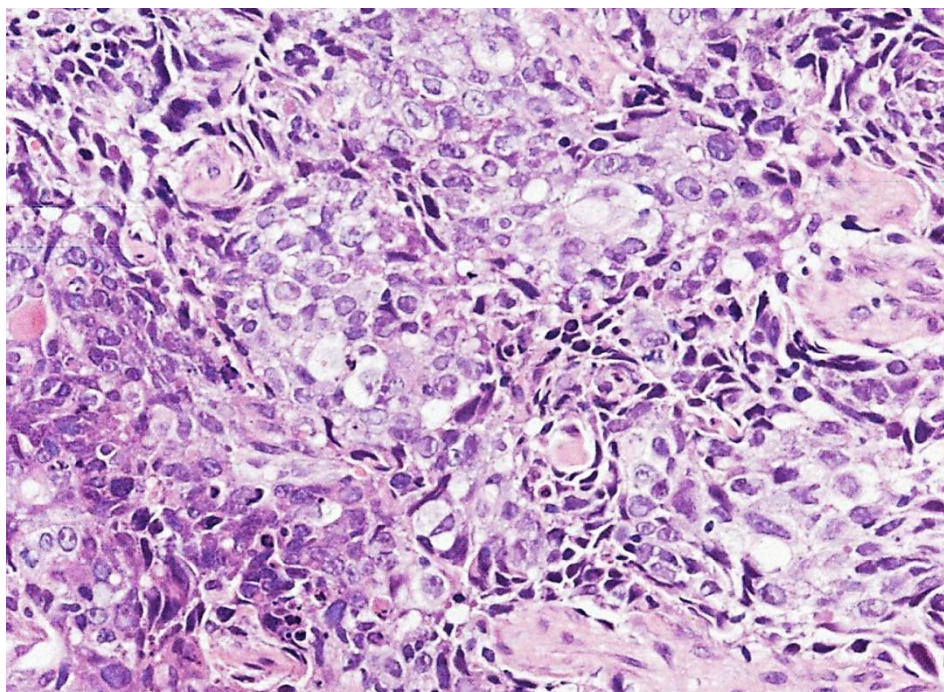


3.6. att. Mutes dobuma plakanšūnu vēzis. Šūnu proliferācijas marķiera ekspresija audzēja šūnu kodolos, imūnhistoķīmiskajā reakcijā izmantojot anti-Ki-67 antivielu. x 250



3.7. att. Mutes dobuma plakanšūnu vēzis. 1 μ m biezs preparāta griezumš, kurā redzami audzēja šūnu sakopojumi (ieguldīts epoksīda sveķos, krāsots ar 1% toluidīnzilo). x 400

Griezumos NFK audi bija bez keratinizācijas pazīmēm, ar kohezīvi saistītām šūnām un labi diferencējamām šūnu robežām (3.8.attēls).



3.8. att. Nazofaringeālā karcinoma. Vidēja diferenciacijas pakāpe, bez keratinizācijas pazīmēm. Kohezīvs augšanas veids. Šūnu un kodolu polimorfisms. H&E. x 400

3.3. CD44 un imūnsistēmas šūnu un Herpes vīrusu onkoproteīnu imūnhistoķīmiska noteikšana pacientiem ar mutes dobuma un siekaldziedzera audzējiem

CD44 ir viens no svarīgākajiem papildu marķieriem, pētot EBV infekcijas nozīmi orofaringeālo audzēju attīstībā. Lai novērtētu CD44 hialuronāta receptora iesaistīšanos šūnu adhēzijā un EBV un inficēto šūnu mijiedarbībā mutes dobuma kancerogēneses procesā, tika noteikta ļaundabīgi transformētā epitēlija, limfocītu un makrofāgu CD44 ekspresija.

Imūnkompetento šūnu izvietojums tika vērtēts, izmantojot imūnhistoķīmiskos marķierus CD19, CD68 un S-100. CD19 ir imūnglobulīnu saimei piederoša adhēzijas molekula. Tās ekspresija novērota normālās un neoplastiskās B šūnās un izpaužas kā membrānas krāsojuma izmaiņas. CD68 ir viens no liposomāliem plazmas membrānas glikoproteīniem, tas piedalās endocitozes procesā un lizosomu pārveidošanā.

Pacientiem ar mutes dobuma un rīkles ļaundabīgiem audzējiem, ar iekaisuma reakciju audzējam līdzāsesošajos audos (audzēja rezekcijas līnijās), siekaldziedzera labdabīgu limfoepitēliālu bojājumu un normāliem siekaldziedzera un mutes gļotādas audiem tika noteikta CD44, LMP1, CD19, CD68 un S100 ekspresija. Rezultāti apkopoti 3.3. un 3.4.tabulā.

3.3.tabula

Antigēnu CD44 un LMP1 ekspresija mutes dobuma plakanšūnu karcinomā, NFK, siekaldziedzera labdabīgā limfoepitēliālā bojājumā (LLEB) un normālā mutes dobuma (vaigu) gļotādā RAKUS LOC 2009.-2011.gadā ārstētajiem pacientiem (n=8)

Parauga veids, diagnoze	Antigēni						
	CD44			LMP1			
	min	vid	dif	0	min	vid	dif
Mutes dobuma plakanšūnu karcinoma	42 (15,5%)	82 (30,3%)	147 (54,2%)	217 (50,4%)	188 (43,6%)	26 (6,0%)	0 (0,0%)
NFK	15 (16,7%)	43 (47,8%)	32 (35,5%)	123 (91,1%)	9 (6,7%)	3 (2,2%)	0 (0,0%)
LLEB	0 (0,0%)	11 (17,%)	51 (82,3%)	41 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Audzēja robež- audu rajons ar iekaisuma reakc.	2 (12,5%)	10 (62,5%)	4 (25,0%)	9 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Normāli siekal- dziedzera audi	12 (22,2%)	19 (35,2%)	23 (42,6%)	35 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)

3.3.tabulas turpinājums							
Normāla mutes gļotāda	0 (0,0%)	0 (0,0%)	8 (100,0%)	0 (0,0%)	14 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)

NFK – nazofaringeāla karcinoma

LLEB – siekaldziedzeru labdabīgs limfoepiteliāls bojājums

3.4.tabula

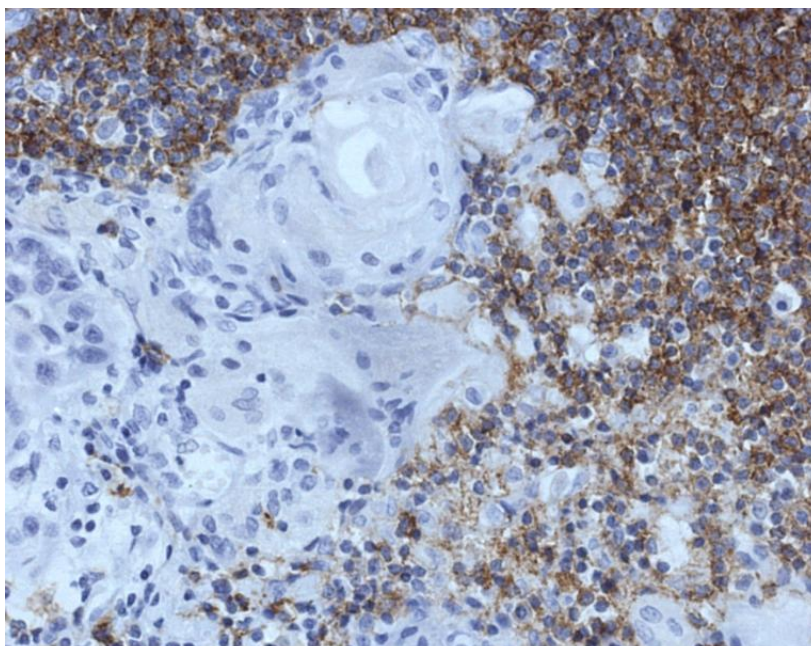
Imūnkompetento šūnu marķieru CD19, CD68 un S100 ekspresija mutes dobuma plakanšūnu karcinomā, NFK, siekaldziedzeru labdabīgā limfoepiteliālā bojājumā (LLEB) un normālā mutes dobuma (vaigu) gļotādā RAKUS LOC 2009.-2011.gadā ārstētajiem pacientiem (n=8)

Parauga veids, diagnoze	Antigēni								
	CD19			CD68			S100		
	min	vid	dif	min	vid	dif	min	vid	dif
Mutes dob. plakanšūnu karcinoma	131 (69,7%)	32 (17,0%)	25 (13,3%)	43 (22,4%)	80 (41,7%)	69 (35,9%)	218 (70,8%)	73 (23,7%)	17 (5,5%)
NFK	35 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	6 (11,5%)	22 (42,3%)	24 (46,2%)	107 (90,7%)	11 (9,3%)	0 (0,0%)
LLEB	20 (33,3%)	19 (31,7%)	21 (35,0%)	0 (0,0%)	26 (43,3%)	34 (56,7%)	42 (58,3%)	30 (41,7%)	0 (0,0%)
Audzēja robežaudu rajons ar iekaisuma reakciju	7 (46,7%)	8 (53,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	5 (41,7%)	7 (58,3%)	2 (33,3%)	4 (66,7%)	0 (0,0%)
Normāli siekaldzie- dzera audi	54 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	28 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	54 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Normāla mutes gļotāda	8 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	8 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	8 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)

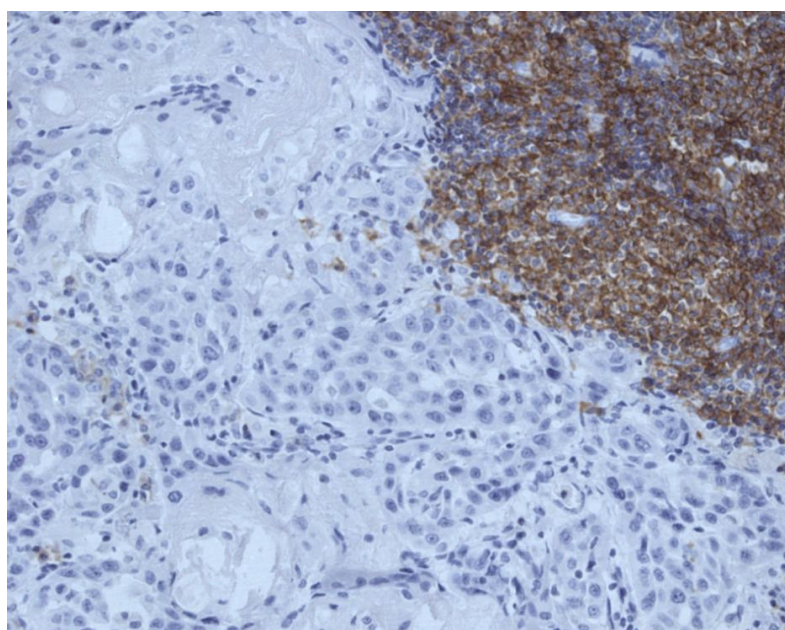
NFK – nazofaringeāla karcinoma

LLEB – siekaldziedzeru labdabīgs limfoepiteliāls bojājums

Nosakot imūnkompetento šūnu klātbūtni un izvietojumu audzēju audos ar imūnhistoķīmiskām metodēm, mēs noteicām starp neoplastiskajām šūnām izvietojušos CD19-pozitīvos B limfocītus, kas un bieži vien izteikti infitrēja audzēju (3.9., 3.10.attēls).



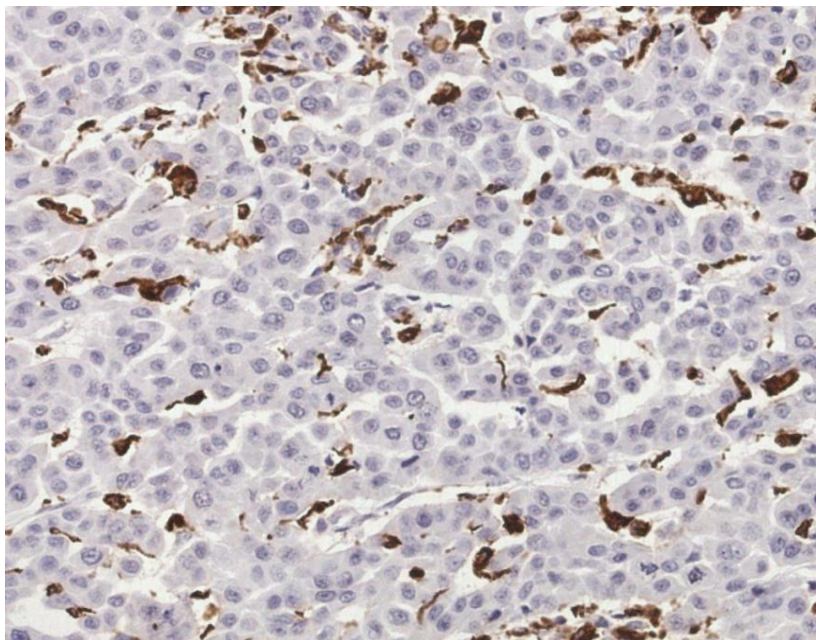
**3.9. att. Mutes dobuma plakanšūnu vēzis. CD-19-pozitīvi limfocīti infiltrē audzēju.
x 400**



**3.10. att. Mutes dobuma plakanšūnu karcinoma. CD-19-pozitīvs limfocītu sakopojums gar
audzēju. x 400**

Nosakot Langerhansa dendrītisko šūnu klātbūtni ar anti-S100 antivielu pacientiem ar plakanšūnu karcinomu un NFK, mēs atradām šīs šūnas NFK stromā un dažas šūnas pašā audzēja masā pavedienam līdzīgu sakopojumu veidā. Mutes dobuma gļotādā S100-pozitīvas dendrītiskās šūnas visbiežāk tika atrastas epitēlija slānī, tās izvietojās difūzi starp bazālā slāņa un dzeloņainā slāņa (*stratum spinosum*) šūnām, kā

arī difūzi audzēja masā. Izdarot imūnhistoķīmiskas reakcijas ar anti-CD68 antivielām, konstatējām, ka CD68-pozitīvās šūnas atrodas audzēja masā un ir saistītas ar asinsvadiem (3.11.att.).

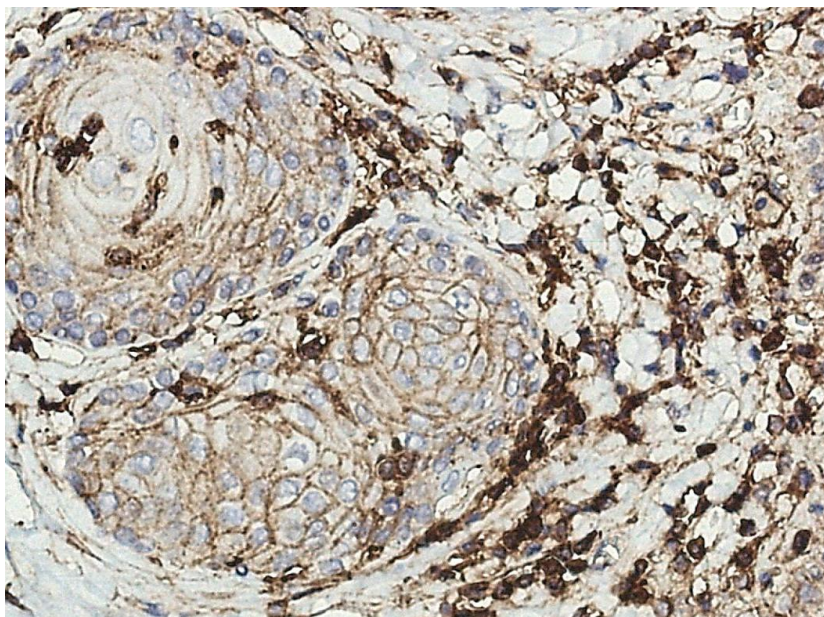


3.11. att. Mutes dobuma plakanšūnu karcinoma. CD-68-pozitīvi perivaskulāri makrofāgi. x 250

Izmeklējot mutes dobuma ļaundabīgos audzējus imūnhistoķīmiski, tika atrasta tieša korelācija starp imūnšūnu CD19 un S100 marķieru ekspresiju ($r=0,151$; $p<0,03$). Salīdzinot CD19, CD68 un S100 ekspresiju, kura atspoguļo imūnkompetento šūnu klātbūtni oronazofaringeālajos ļaundabīgajos epiteliālajos audzējos, tika atrastas statistiski ticamas atšķirības starp CD19 un S100 (CD19: $\chi^2=14,255$; $df=2$; $p<0,001$; S100: $\chi^2=19,887$; $df=2$; $p<0,001$), bet ne starp CD19 un CD68. CD19, CD68 un S100 ekspresija ļaundabīgo audzēju gadījumā statistiski ticami atšķīrās arī no ekspresijas labdabīgu patoloģiju gadījumos (attiecīgi CD19: $\chi^2=26,162$; $df=2$; $p<0,002$; S100: $\chi^2=12,244$; $df=2$; $p<0,002$; CD68: $\chi^2=18,274$; $df=2$; $p<0,001$ un CD19: $\chi^2=40,303$; $df=2$; $p<0,001$; S100: $\chi^2=27,644$; $df=2$; $p<0,001$).

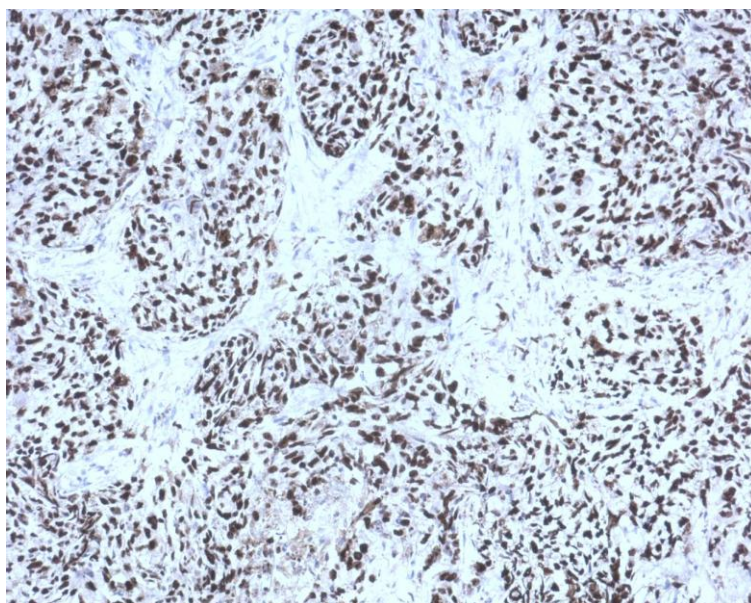
Plakanšūnu karcinomas un NFK gadījumos pozitīva CD44 ekspresija bija uz audzēja šūnu un limfocītu virsmām (3.12. attēls), kā arī stromas makrofāgu citoplazmā.

To atradām arī uz bazālo un suprabazālo epitēlijsūnu membrānām normālā mutes dobuma gļotādas epitēlijā.

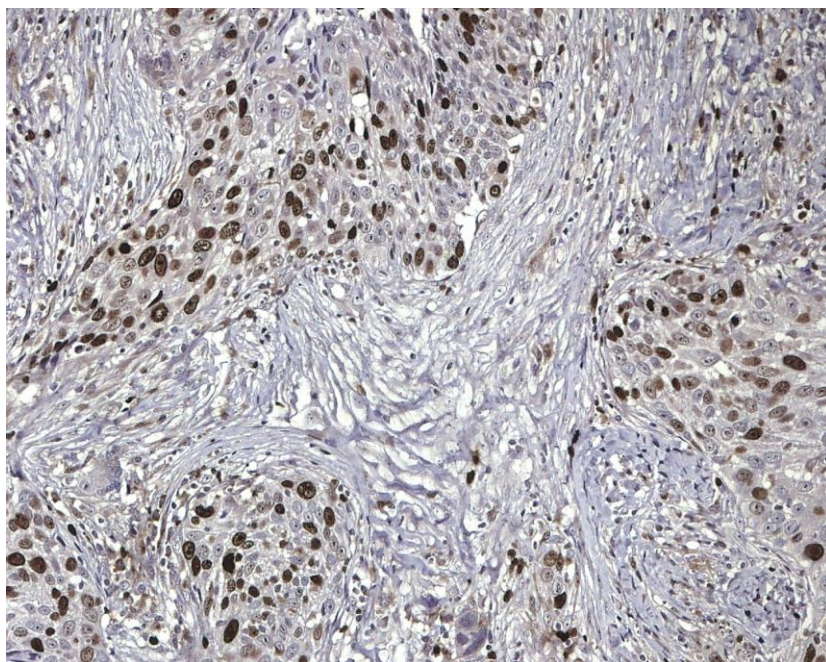


3.12. att. Mutes dobuma plakanšūnu karcinoma. Vidēja diferenciācijas pakāpe. CD44 ekspresija kā šūnas virsmas reakcija audzēja šūnās un limfocītos, kā arī makrofāgu citoplazmā un šūnapvalkā. x 400

NFK un mutes dobuma plakanšūnu karcinomā parasti novērojama izteikta audzēja šūnu proliferācijas marķiera Ki-67 ekspresija (3.13., 3.14. attēli).

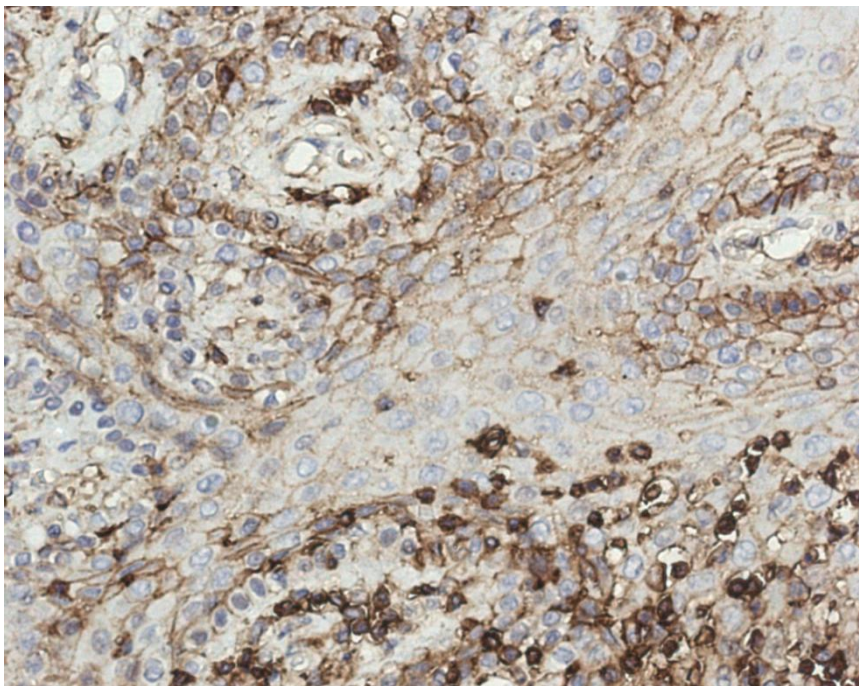


3.13. att. Nazofaringeāla karcinoma. Izteikta šūnu proliferācijas marķiera ekspresija audzēja šūnu kodolos, imūnhistoķīmiskajā reakcijā izmantojot anti-Ki-67 antivielu. x 200



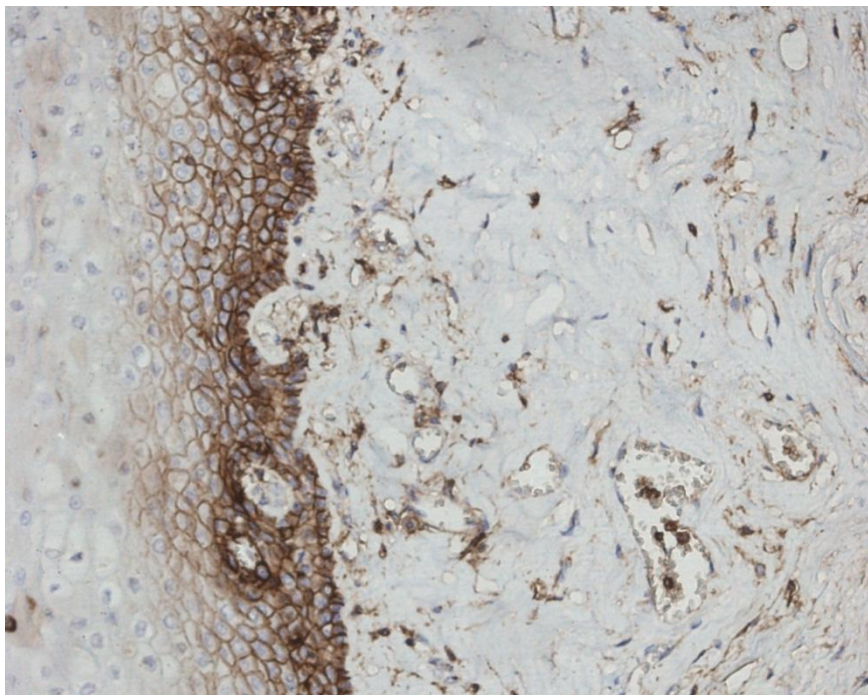
3.14. att. Mutes dobuma plakanšūnu vēzis. Izteikta šūnu proliferācijas marķiera ekspresija audzēja šūnu kodolos, imūnhistoķīmiskajā reakcijā izmantojot anti-Ki-67 antivielu. x 200

CD44 pozitīva ekspresija epiteliālās un neoplastiskās šūnās tika atrasta tikai uz šūnu membrānām, bet stromas makrofāgos – uz membrānām un citoplazmā (3.15. attēls).



3.15. att. Mutes dobuma plakanšūnu karcinoma. CD44 ekspresija kā šūnas virsmas reakcija audzēja šūnās un limfocītos, kā arī makrofāgu citoplazmā un šūnapvalkā. x 400

CD44-pozitīva audzēja šūnu imūnreaktivitātei raksturīgas maz izteiktas šūnu virsmas kontūras, turpretī veselā mutes gļotādā epiteliālo šūnu virsma ir izteikti konturēta. Šī atrade korelē ar CD44 ekspresijas atšķirībām ļaundabīgos audzējos salīdzinājumā ar normālu vaiga gļotādu (3.16.att.).



3.16. att. Mutes dobuma gļotāda. Izteikta CD44 ekspresija mutes dobuma epitēlija bazālajā un suprabazālajā slānī, dermas makrofāgos un limfocītos. x 250

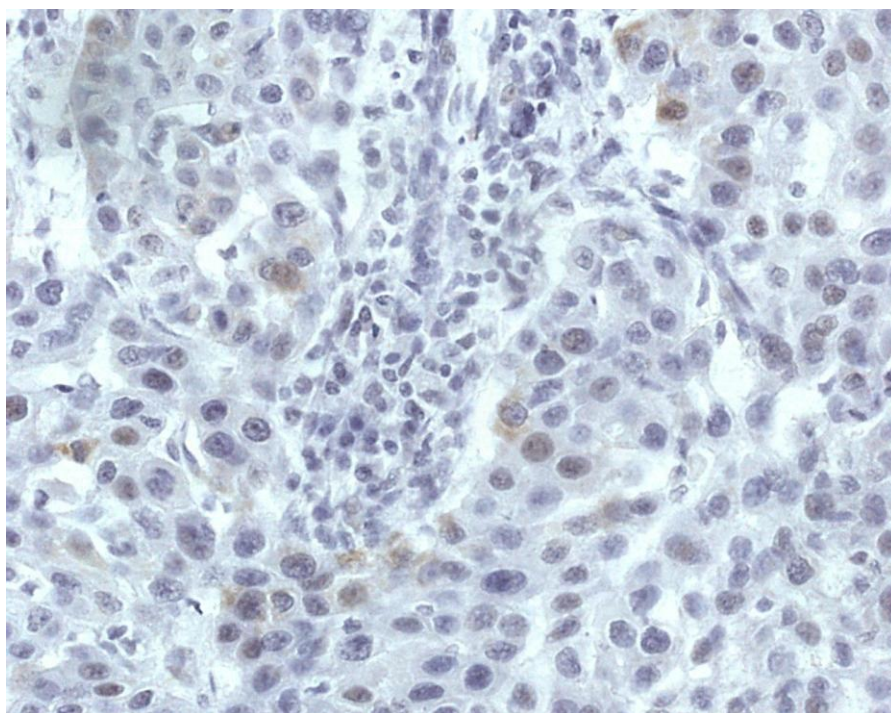
Mūsu pētījumā tika konstatētas statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot CD44 ekspresiju:

- 1) plakanšūnu karcinomas un nazofaringeālās karcinomas gadījumā: $\chi^2=10,806$; $df=2$, $p<0,005$;
- 2) plakanšūnu karcinomas un labdabīga siekaldziedzera bojājuma gadījumā: $\chi^2=19,099$; $df=2$; $p<0,001$;
- 3) normālu siekaldziedzera audu un labdabīga limfoepitēliāla bojājuma gadījumā: $\chi^2=24,292$; $df=2$; $p<0,001$.

Lielākā daļa ar audzēja masu saistīto limfocītu intensīvi iezīmējās ar anti-CD44 antivielu, liecinot par membrānas imūnreaktivitāti. Infiltrātos, kas iespiedās audzējā, CD44-negatīvo limfocītu skaits bija ļoti mazs. Plakanšūnu karcinomas gadījumā tika konstatēta CD44 un EBV onkoproteīna ekspresijas korelācija ($r=0,482$; $p<0,001$).

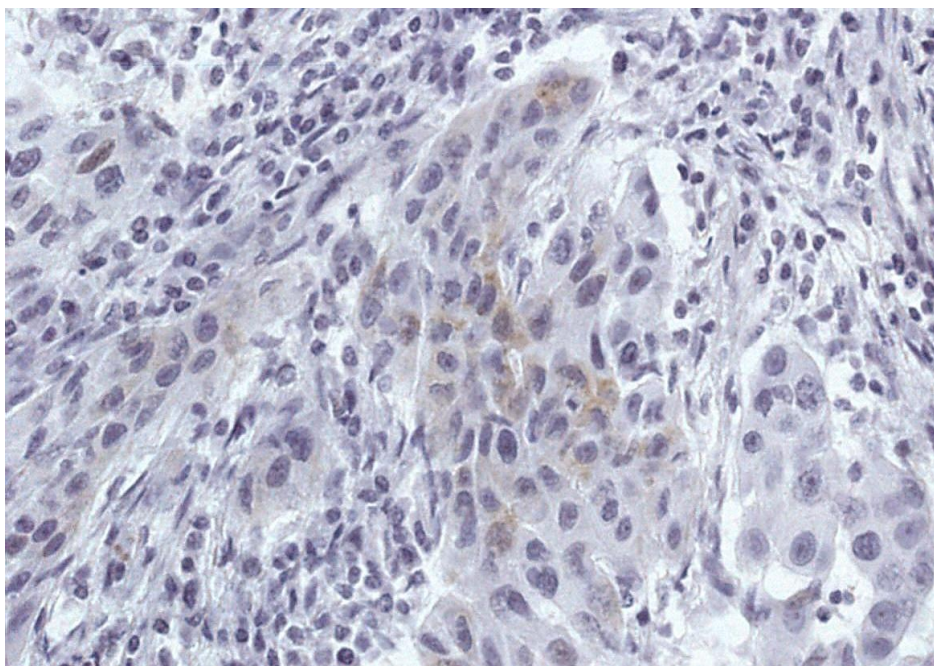
Papildus EBV DNS un CD44 ekspresijai tika noteikta arī LMP1 ekspresija – noskaidrojās, ka CD44 hialuronāta receptora difūzā ekspresija mutes dobuma un rīkles ļaundabīgos audzējos ir mazāk izteikta nekā normālā mutes dobuma gļotādā.

Veicot imūnhistoķīmiskās reakcijas ar anti-EBV LMP1 antivielu, audzēja šūnās bija redzams brūns citoplazmas krāsojums. Mēs nekonstatējām LMP1 ekspresiju limfocītos, kas iespiežas audzējā vai izvietojas ap audzēju. LMP1 ekspresija tika noteikta visos EBV-pozitīvos audzējos, un tā bija izteikti variabla. Mutes plakanšūnu karcinomas gadījumos LMP1-pozitīvās audzēja šūnas bija gan izplatītas difūzi, gan koncentrētas lokāli kādā atsevišķā vietā (3.17. attēls).



**3.17. att. Vidējas diferenciacijas pakāpes plakanšūnu karcinoma mutes pamatnē.
EBV LMP-1 onkoproteīna ekspresija audzēja šūnu citoplazmā. x 400**

LMP1 onkoproteīna ekspresija netika atrasta arī uz ne-neoplastisko šūnu virsmām. Puskvantitatīvā novērtējumā LMP1 onkoproteīna ekspresija variēja no ekspresijas iztrūkuma līdz minimālai un vidējai ekspresijai – 50,3%, 43,6%, 6,0% un 91,1%, 6,7%, 2,2% attiecīgi plakanšūnu karcinomas un nazofaringeālas karcinomas gadījumos. LMP1-pozitīvas audzēja šūnas plakanšūnu vēža audos bija gan izplatītas difūzi, gan izvietotas pavedienu veidā (3.18. attēls)

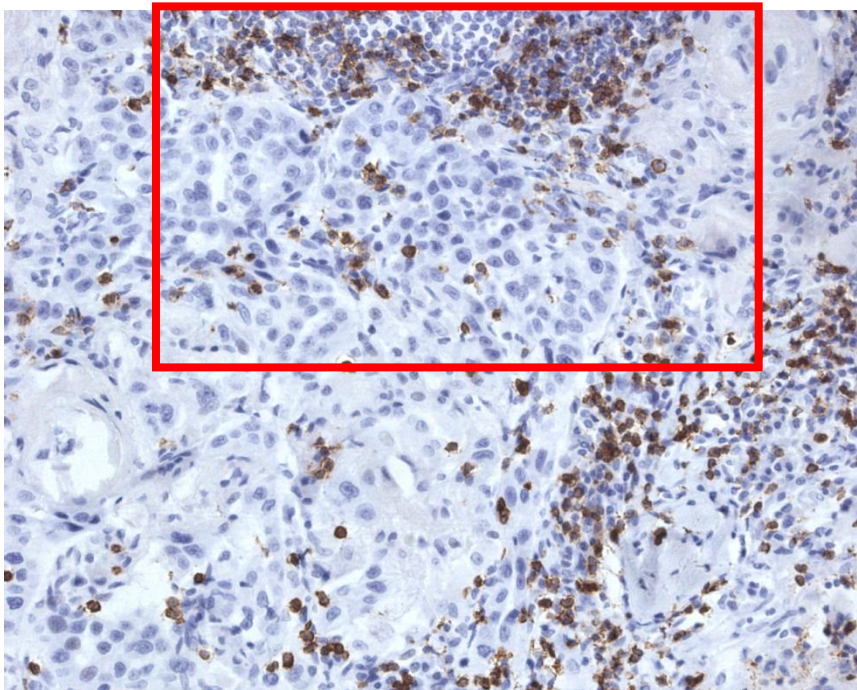


3.18. att. Mutes dobuma plakanšūnu karcinoma. EBV LMP-1 onkoproteīna ekspresija audzēja šūnu citoplazmā. x 400

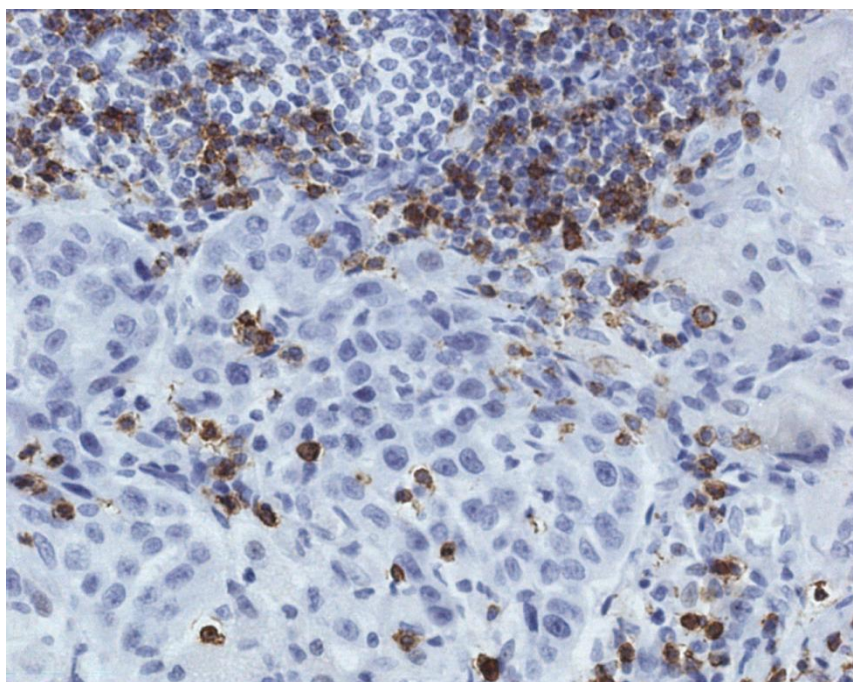
Dažos gadījumos plakanšūnu karcinomas šūnas ar vidēji pozitīvu LMP1 ekspresiju veidoja blīvus pavedienus audzēja bazālajā rajonā tuvu stromas apvidiem. Minimālā un vidējā onkoproteīna ekspresija tika noteikta arī mutes plakanšūnu karcinomas gadījumā atrastajās milzu šūnās. LMP1 ekspresija netika atrasta:

- normālos siekaldziedzeru audos un klīniski veselajā vaiga gļotādā;
- EBV-pozitīvajā labdabīgā siekalu dziedzeru bojājuma audos un audzēja rezekcijas līnijās (audzējam līdzāsesošajos audos) ar iekaisuma pazīmēm.

Izmeklējot imūnhistoķīmiski, konstatējām, ka cieši līdzās audzēja šūnām atrodas CD8-pozitīvi limfocīti (3.19., 3.20. attēli). Limfocīti, kuri infiltrēja audzēju, bija LMP1-negatīvi. LMP1 onkoproteīna ekspresija variēja no difūzas līdz lokālai. Dažos gadījumos LMP1 pozitīvās šūnas izvietojās lineāri gar audzēja šūnu sakopojumu bazālo daļu.



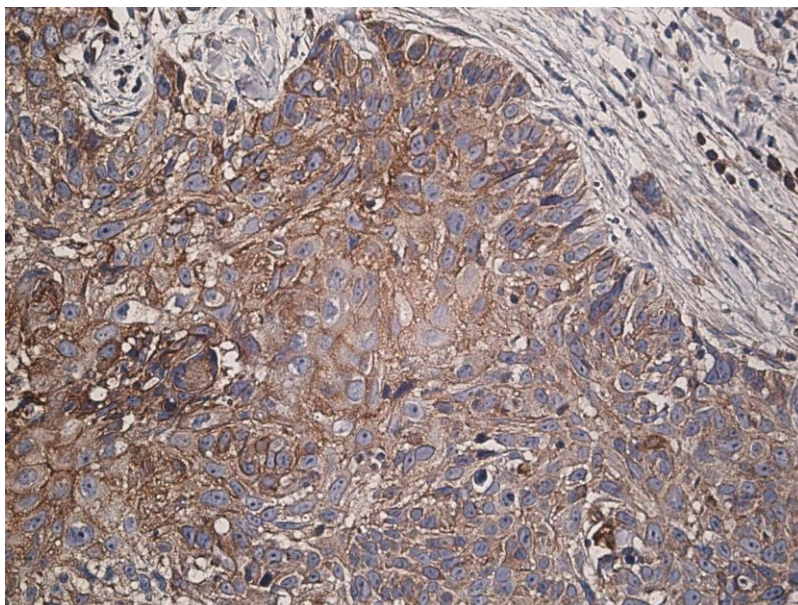
3.19. att. Mutes dobuma plakanšūnu karcinoma. CD-8-pozitīvi limfocīti ciešā saskarē ar audzēja šūnām. x 250



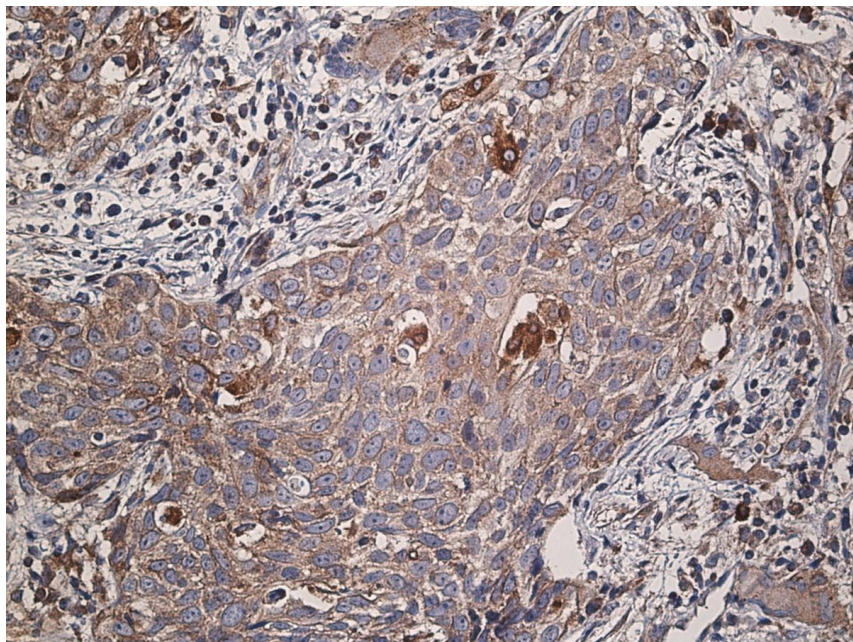
3.20. att. Mutes dobuma plakanšūnu karcinoma (3.19.attēla fragments). CD-8-pozitīvi limfocīti infiltrē audzēja masu. x 250

Izmantojot anti-HHV6 antivielas, mēs novērojām intensīvu ekspresiju mutes dobuma plakanšūnu karcinomas audos (3.21., 3.22. attēli). Mēs nekonstatējām anti-HHV6 ekspresiju audzēju stromā (3.21.attēls), tā bija novērojama tikai malignajos

keratinocītos. Lai precizētu iespējamo vīrusu klātbūtni audzēju šūnās, tika izmantota elektronmikroskopija.

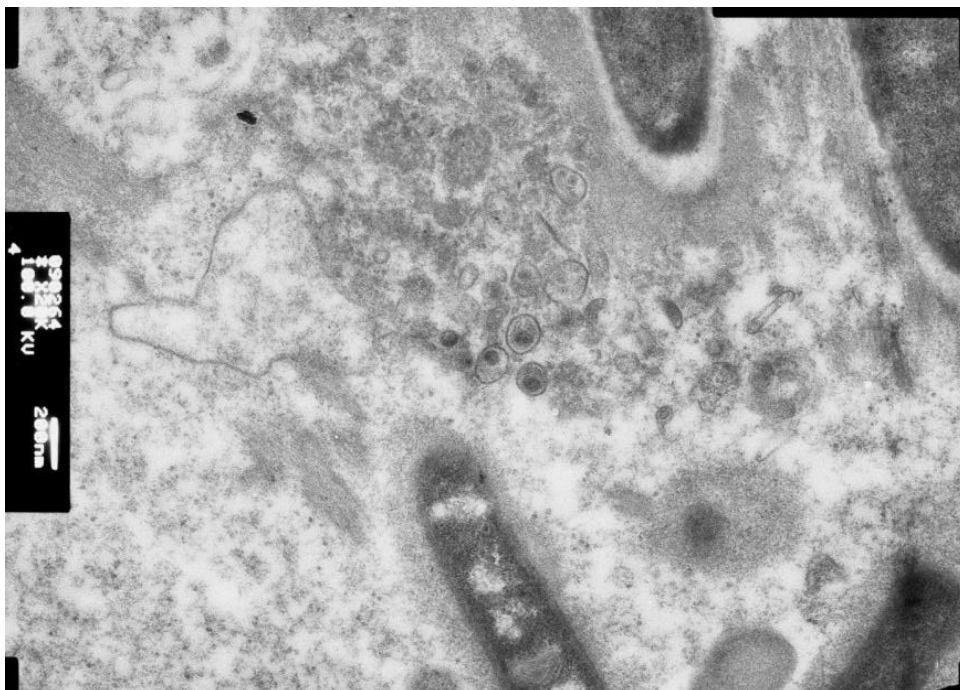


3.21. att. Mutes dobuma plakanšūnu karcinoma. Audzēja šūnās novērojama variabla imūnekspressija, imūnhistoķīmiskajā reakcijā izmantojot anti-HHV-6 antivielu. Audzēja stromā nav HHV-6 ekspresijas. x 250



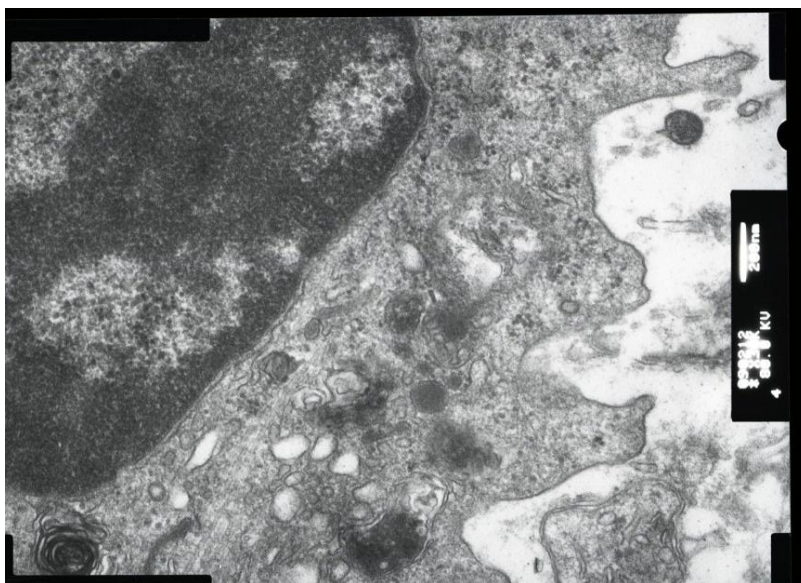
3.22. att. Mutes dobuma plakanšūnu karcinoma. Audzēja šūnās novērojama variabla imūnekspressija, imūnhistoķīmiskajā reakcijā izmantojot anti-HHV-6 antivielu. x 250

Izmeklējot nazofaringeālās karcinomas audus, tika konstatētas audu nekrotiskas izmaiņas un baktēriju klātbūtne (3.23. attēls).

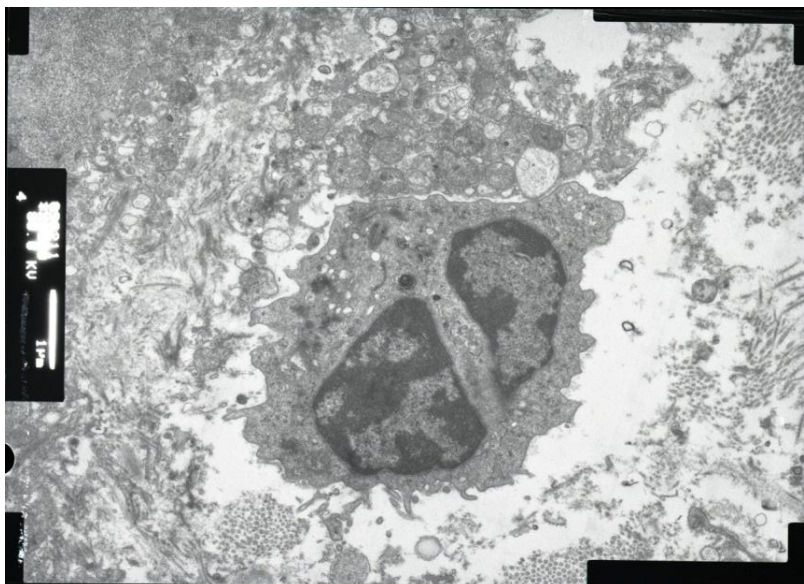


3.23. att. Nazofaringeāla karcinoma. Audu nekrotiskas izmaiņas un baktēriju klātbūtne audzējā. x 20000

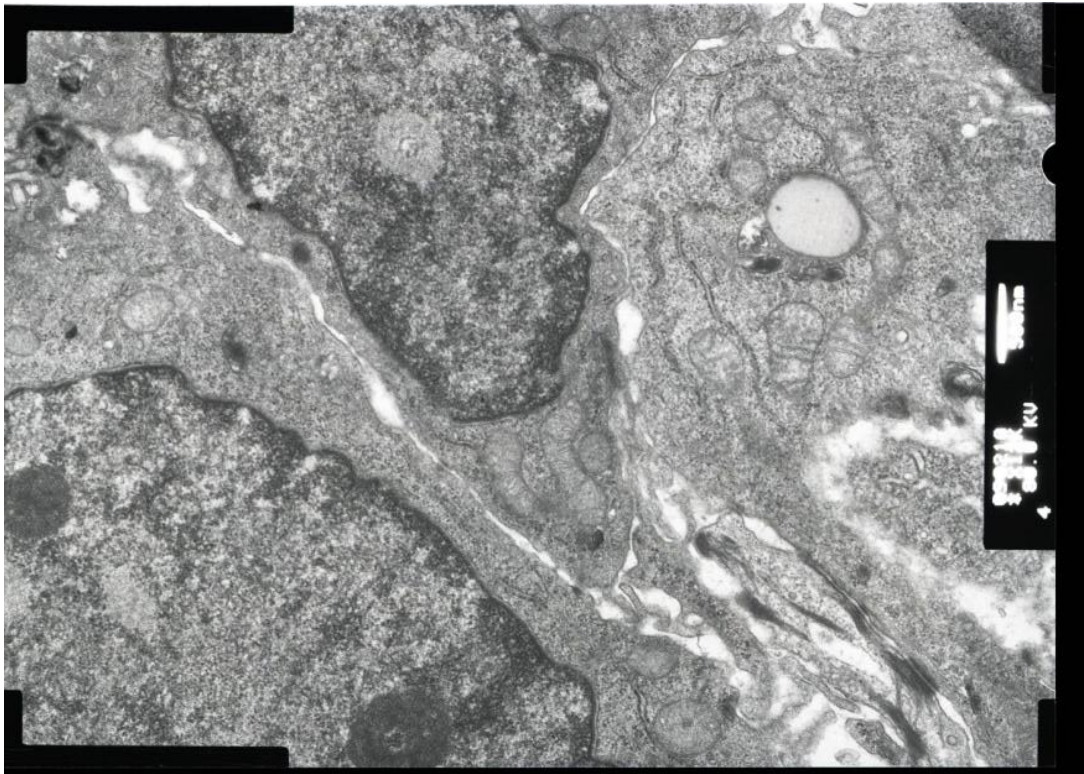
Ultrastrukturāla siekalu dziedzeru adenokarcinomas izmeklēšana parādīja šūnu citoplazmatiskus izspīlējumus, kodola fragmentus, graudaino endoplazmatiskā tīkla cisternas, Goldži kompleksu, ribosomas, mitohondrijas, vakuolas, pseidomielīna figūras (3.24., 3.25., 3.26., 3.27. attēli).



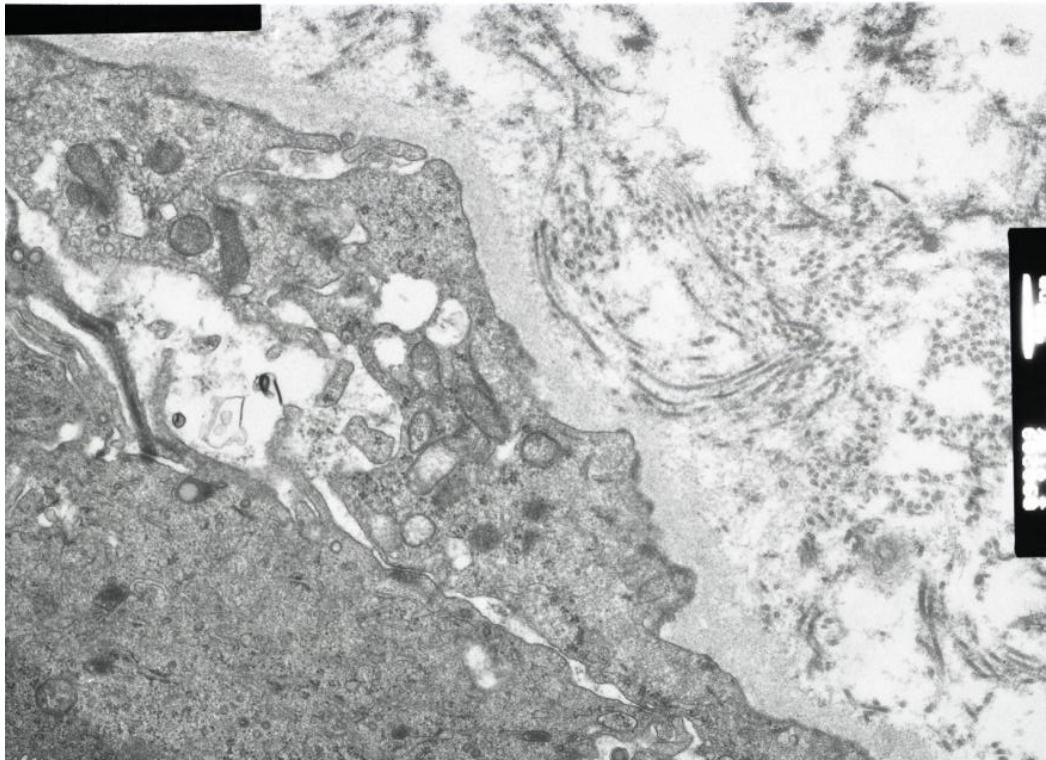
3.24. att. Pieauss siekaldziedzera adenokarcinoma. Audzēja šūnas fragments ar neregulāras formas citoplazmas izvelvējumiem. Citoplazmā šūnas kodola fragments, graudaina endoplazmatiskā tīkla cisternas, Goldži kompleksi, ribosomas, vakuolas, pseidomielīna figūras. x 30000



3.25. att. Pieauss siekaldziedzera adenokarcinoma. Audzēja šūnu fragmenti un limfocīts; tā citoplazmā centriolas. Dažāda lieluma šūnas atdala kolagēno šķiedru mikrofibrilas, to diametrs ir variabls. Kolagēno šķiedru mikrofibrilas atdala dažāda lieluma šūnas. x 8000

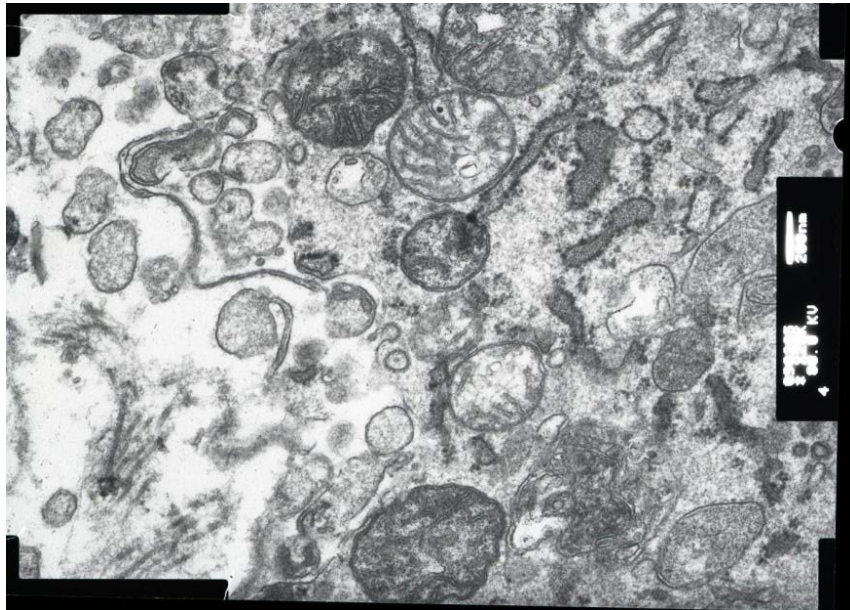


3.26. att. Pīcauss siekaldziedzera adenokarcinoma. Audzēja šūnu blīvs sakopojums, savstarpēji tās saista jūgles. x 12000

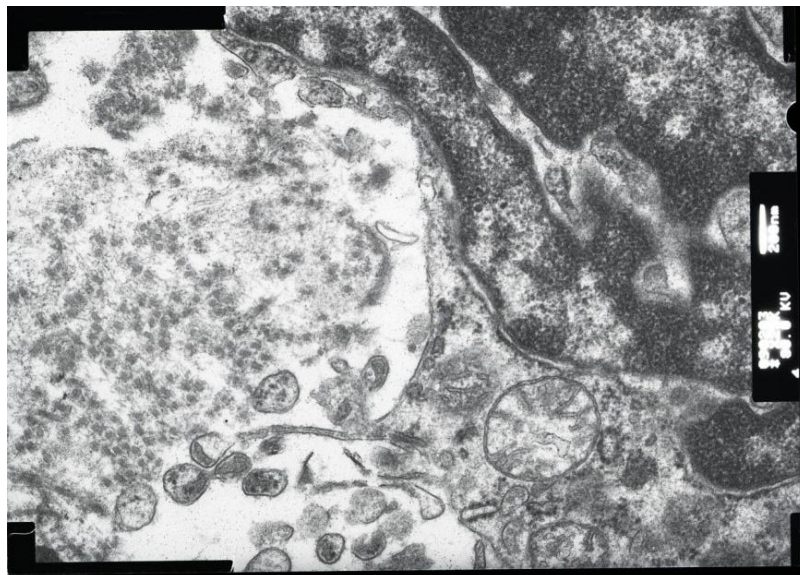


**3.27. att. Pieauss siekaldziedzera adenokarcinoma. Audzēja šūnas uzguļ bazālajai membrānai, savstarpēji tās saistās ar desmosomām, liels daudzums pinocitotisko pūslīšu.
x 12000**

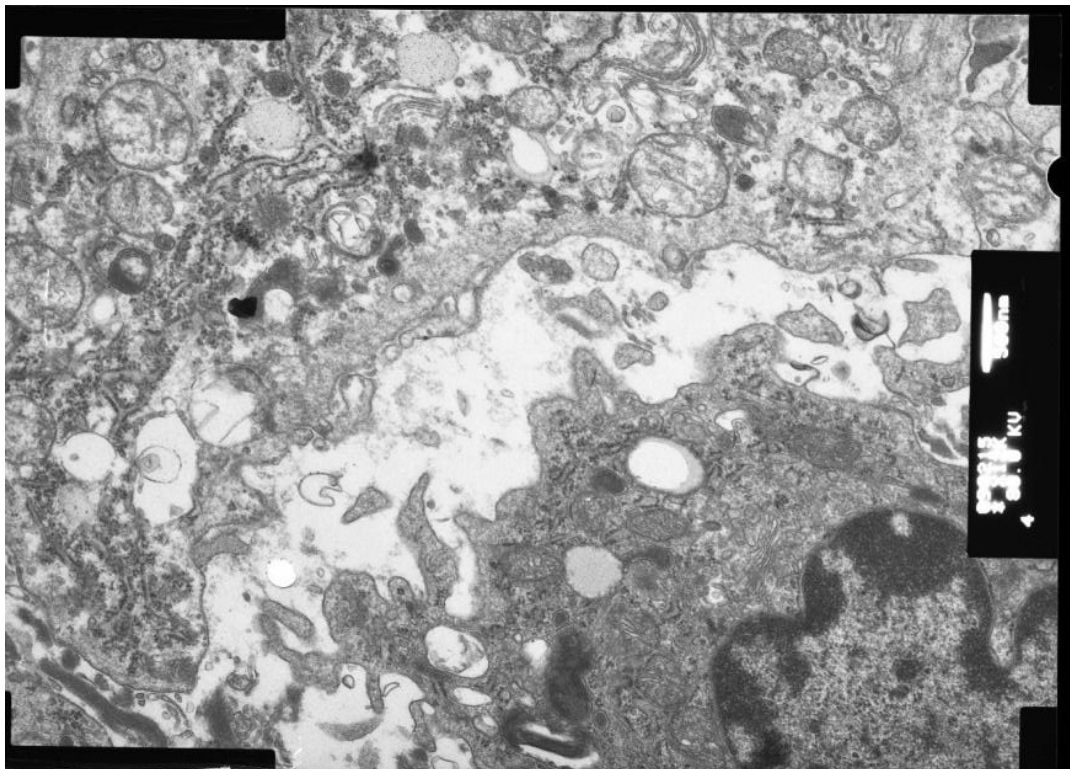
Šūnu ultrastruktūra liecina par aktīvu metabolismu, olbaltumvielu sintēzi un endocitozi. Audzēja šūnas uzguļ bazālajai membrānai blīva sakopojuma veidā, savstarpēji tās saista desmosomas (3.28., 3.29., 3.30. attēli). Vīrusam līdzīgas struktūras izmeklētajā materiālā netika atrastas.



3.28. att. Pieauss siekaldziedzera adenokarcinoma. Audzēja šūnas fragments. Šūnas citoplazmā daudzveidīgi mitohondriji, paplašinātas graudainā endoplazmatiskā tīkla cisternas. x 25000



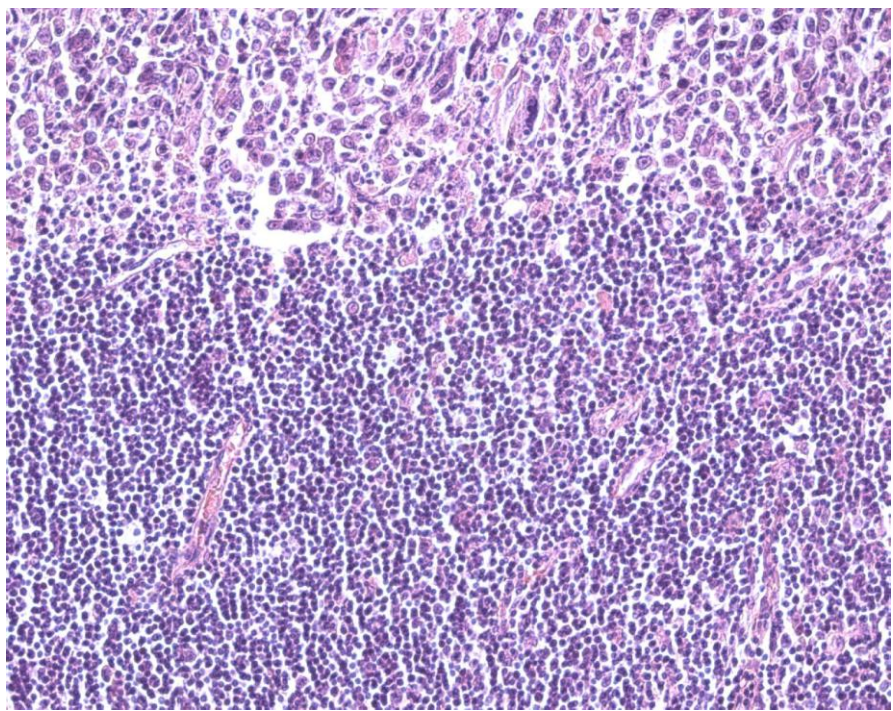
3.29. att. Pieauss siekaldziedzera adenokarcinoma. Audzēja šūna ar neregulāras formas citoplazmas izvelvējumiem un šūnas kodolu; citoplazmā uzbrieduši mitohondriji, graudainā endoplazmatiskā tīkla cisternas, ribosomas. x 25000



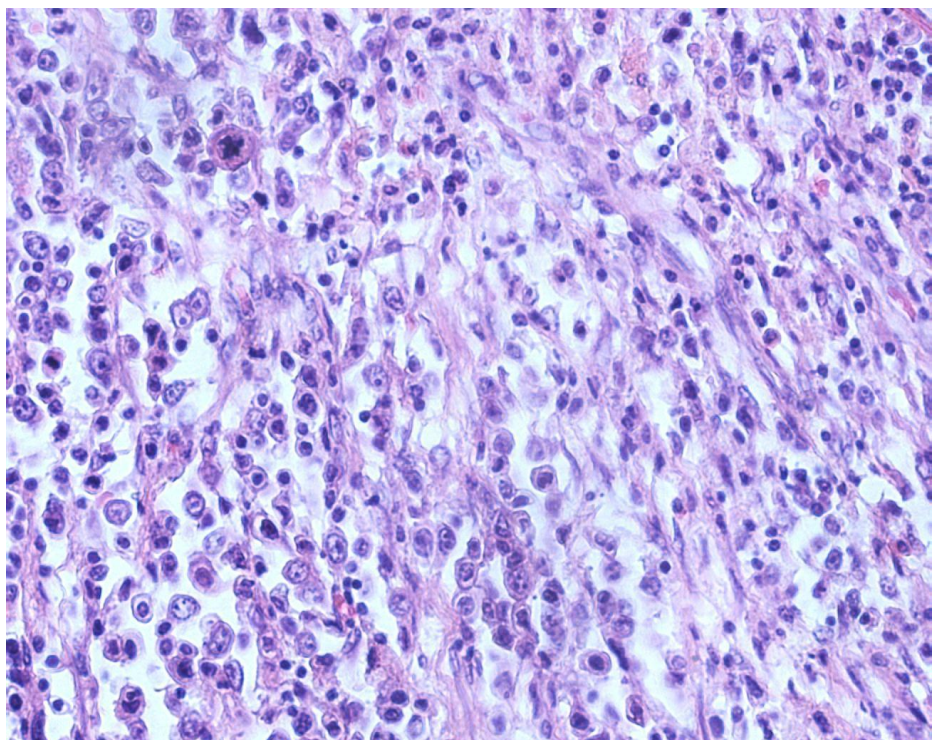
3.30. att. Pieauss siekaldziedzera adenokarcinoma. Audzēja šūnu fragmenti ar neregulāras formas citoplazmas izvelvējumiem. Citoplazmas elektronoptiskais blīvums variē, tajā atrodas polimorfī mitohondriji, graudainā endoplazmatiskā tīkla cisternas, Goldži kompleksi, ribosomas, vakuolas. x 12000

Siekaldziedzeru limfoepiteliālas karcinomas gadījumā ir krasi izteikts limfoīdais komponents (3.31. attēls), bet audzēja epiteliālajam komponentam ir izteikta Ki-67 ekspresija un diseminācijas pazīmes (3.31., 3.32.-3.36. attēli).

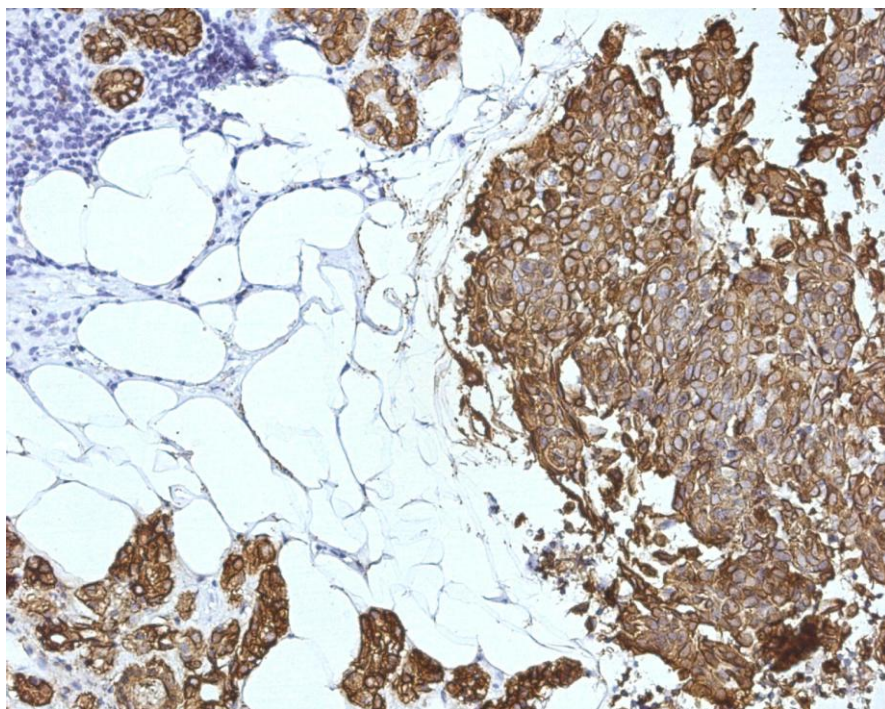
Lai precizētu zemas diferenciācijas pakāpes siekaldziedzeru audzēju diagnozi un noskaidrotu audzēju epiteliālo izcelsmi, veiktas dažādas imūnhistoķīmiskas reakcijas un izmantotas antivielas CK5, 6 un AE1/AE3 (3.32. un 3.33. attēls



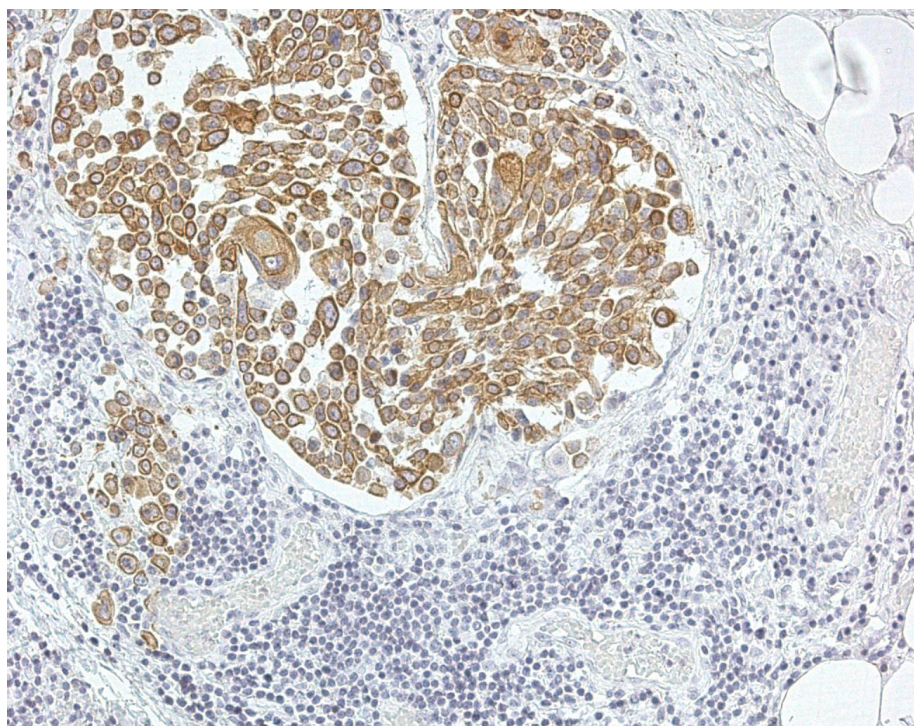
3.31. att. Limfoepiteliāla pieauss siekaldziedzera karcinoma. Karcinomas maligns epiteliālais komponents un izteikta limfocitāra infiltrācija. H&E. x250



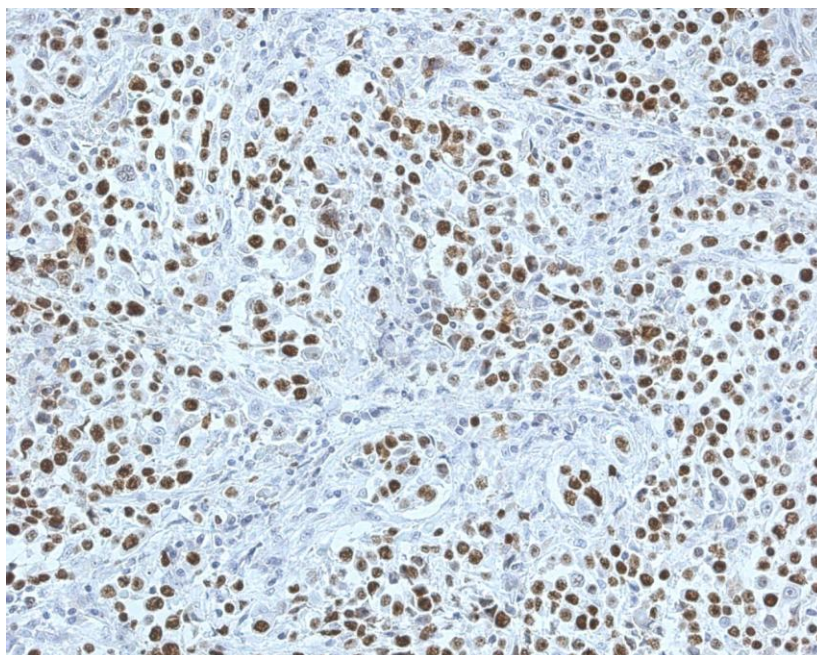
3.32. att. Limfoepiteliāla pieauss siekaldziedzera karcinoma. Audzēja šūnu metastazēšanās H&E. x 400



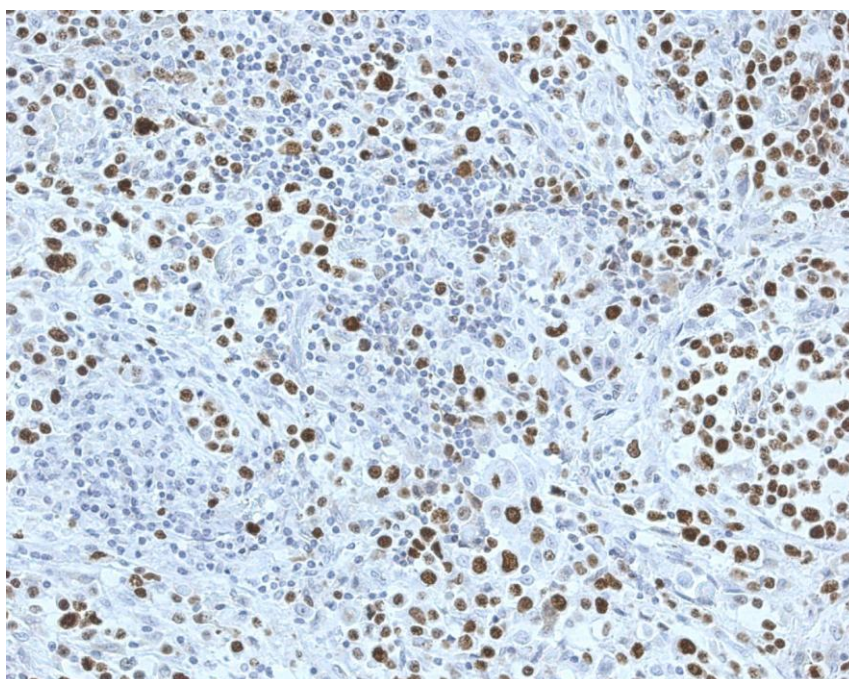
3.33. att. Limfoepiteliāla pieauss siekaldziedzera karcinoma. Izteikta citokeratīnu ekspresija audzēja šūnās, imūnhistoķīmiskajā reakcijā izmantojot anti-AE1-3 antivielu. x 250



3.34. att. Limfoepiteliāla pieauss siekaldziedzera karcinoma. Citokeratīnu ekspresija audzēja šūnās, imūnhistoķīmiskajā reakcijā izmantojot anti-CK5-6 antivielu. x 250

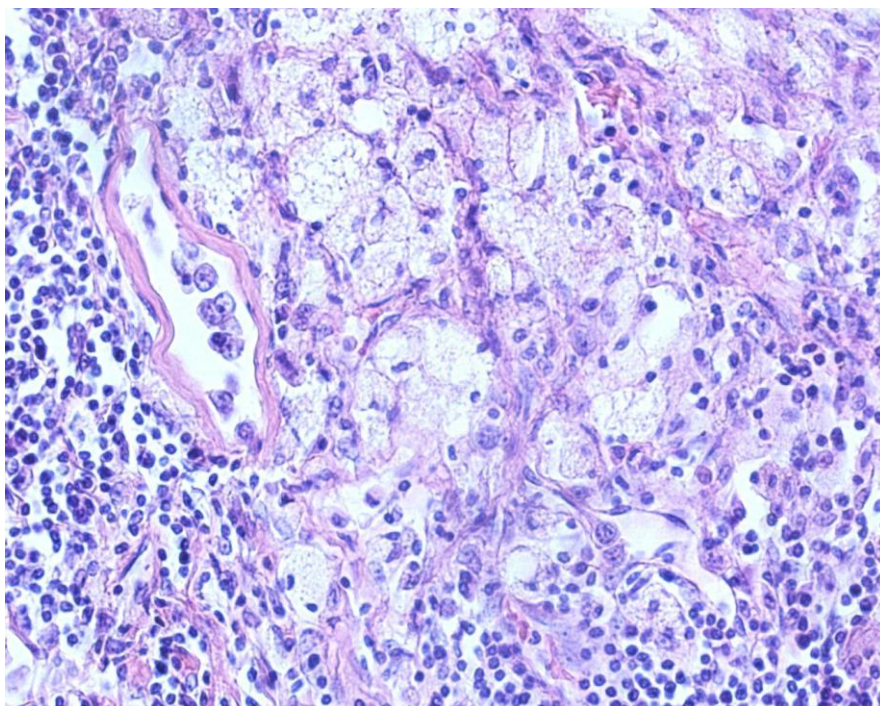


3.35. att. Limfoepiteliāla pieauss siekaldziedzera karcinoma. Izteikta šūnu proliferācijas marķiera ekspresija audzēju šūnu kodolos, imūnhistoķīmiskajā reakcijā izmantojot anti-Ki-67 antivielu. x 250



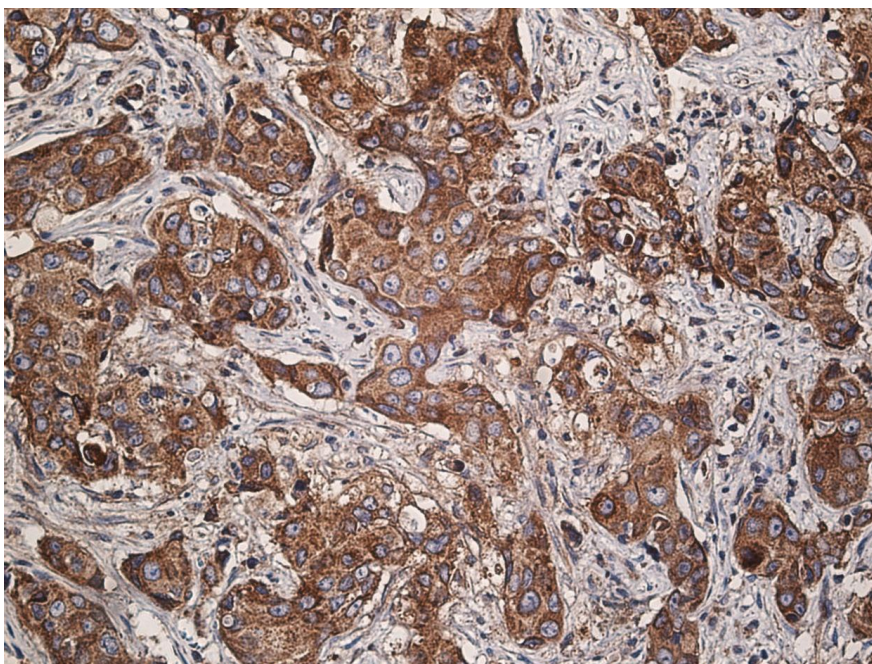
3.36. att. Limfoepiteliāla pieauss siekaldziedzera karcinoma. Izteikta šūnu proliferācijas marķiera ekspresija audzēju šūnu kodolos, imūnhistoķīmiskajā reakcijā izmantojot anti-Ki-67 antivielu. x 250

Atsevišķos audzēja fragmentos ir skaidri saskatāmas dziedzeru struktūras (3.37. attēls).

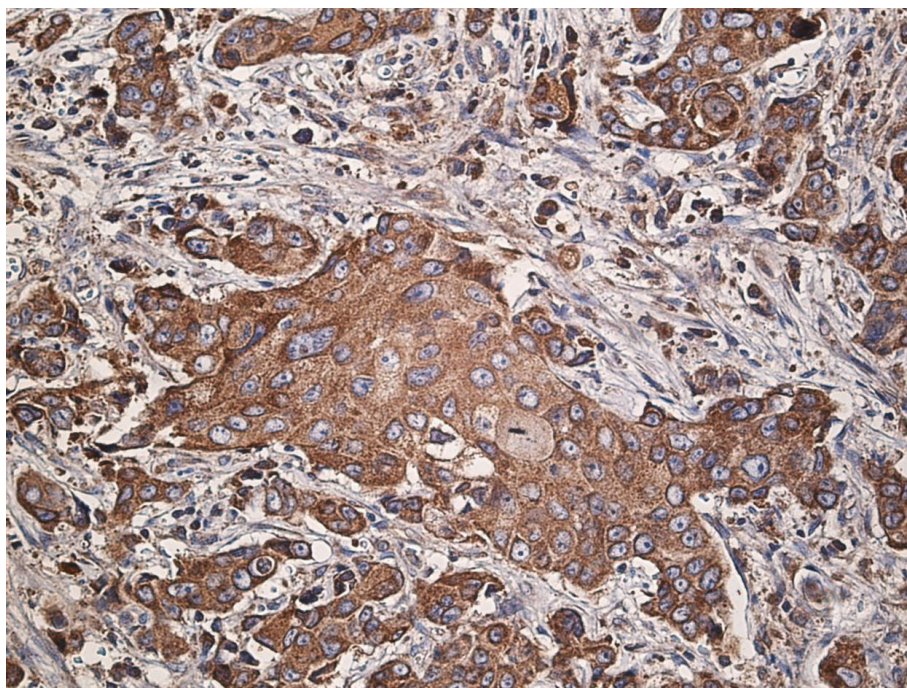


3.37. att. Limfoepiteliāla pieauss siekaldziedzeru karcinoma. Tubulāro acinusu fragmenti, infiltrācija. H&E. x 400

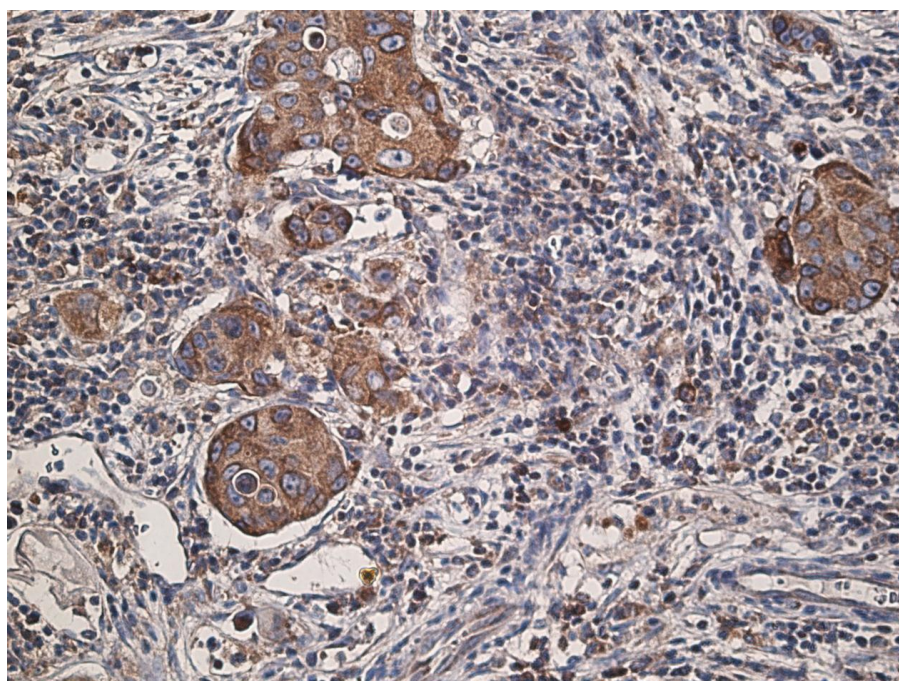
Dati, kas iegūti, izmantojot HHV-6 antivielas, liecina, ka pieauss siekaldziedzeru duktālajā karcinomā notiek intensīva anti-HHV6 antivielu ekspresija (3.38., 3.39., 3.40. attēls).



3.38. att. Pieauss siekaldziedzeru duktāla karcinoma. Izteiktu imūnekspresiju novēro audzēja šūnās, imūnhistokīmiskajā reakcijā izmantojot anti-HHV-6 antivielu. x 250

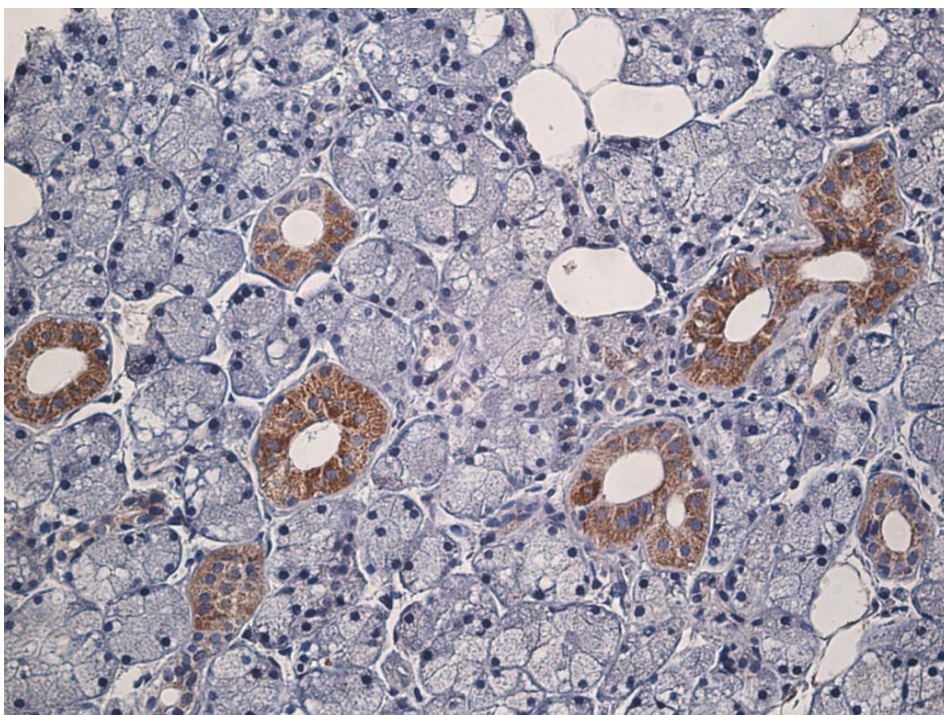


3.39. att. Pieauss siekaldziedzera duktāla karcinoma. Izteiktu imūnekspresiju novēro audzēja šūnās, imūnhistoķīmiskajā reakcijā izmantojot anti-HHV-6 antivielu. x 250

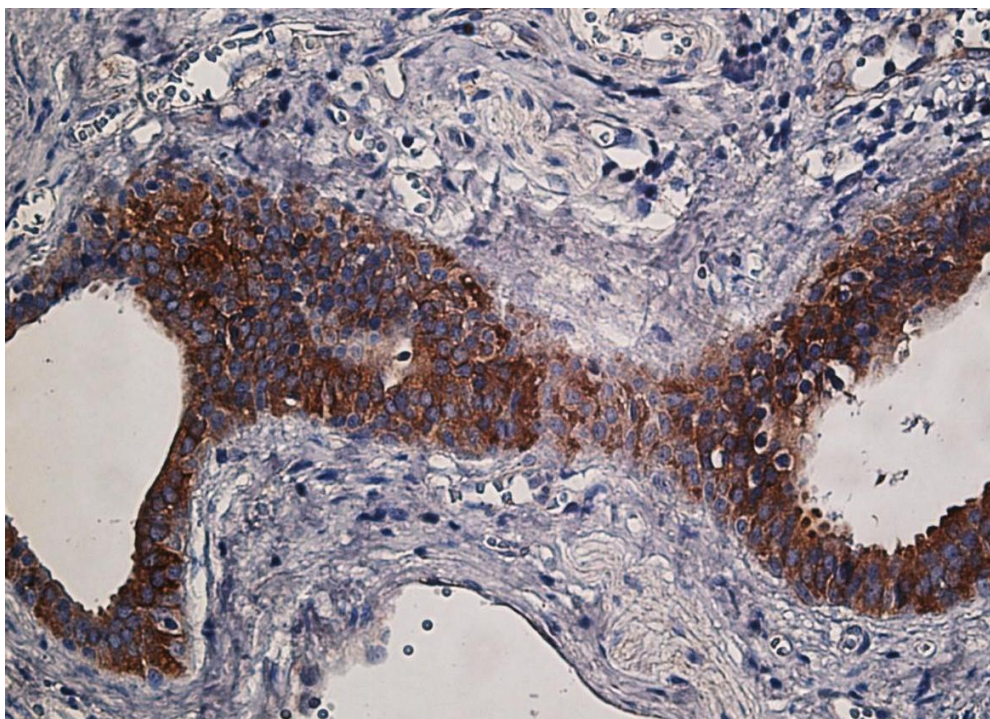


3.40. att. Pieauss siekaldziedzera duktāla karcinoma. Imūnekspresiju novēro audzēja šūnās, imūnhistoķīmiskajā reakcijā izmantojot anti-HHV-6 antivielu. Limfocīti ap audzēja šūnu sakopojumiem neekspresē HHV-6. x 250

Interesants ir fakts, ka pārliedzinošu anti-HHV6 antivielu ekspresiju mēs konstatējam arī normālās siekalu dziedzeru tubulārajās struktūrās (3.41., 3.42.attēls).



3.41. att. Pieauss siekaldziedzeris, norma. Imūnekspresiju novēro daiviņas izvadu sieniņas šūnās, imūnhistoķīmiskajā reakcijā izmantojot anti-HHV-6 antivielu. x 250



3.42. att. Pieauss siekaldziedzeris, norma. Imūnekspresiju novēro starpdaiviņas izvada sieniņas šūnās, imūnhistoķīmiskajā reakcijā izmantojot anti-HHV-6 antivielu. x 250

3.5.tabulā ir atspoguļoti HHV6, HHV7 un EBV DNS mutes dobuma plakanšūnu karcinomu un NFK audzēju šūnās. Mēles saknes karcinomas gadījumā tika noteikta latentā HHV-6 un HHV-7 infekcija. Salīdzināšanai izmeklēta normāla vaigu gļotāda.

3.5.tabula

EBV, HHV-6 un HHV-7 DNS rezultāti mutes dobuma karcinomas un NFK pacientiem audzēju audos

Pacientu		Audu parauga lokalizācija, TNM, stadija	Patohistoloģiskā izmeklējuma rezultāts	Herpes vīrusu DNS		
vecums, gadi	dzimums			EBV	HHV-6	HHV-7
39	vīr.	Mēles sakne T ₂ N ₂ M ₀ IV stadija	Plakanšūnu Ca Gr3	poz	poz	neg
25	vīr.	NFK T ₄ N ₀ M ₀ IV stadija	NFK, keratinizētais veids	poz	poz	poz
77	siev.	Mutes pamatne T ₄ N ₁ M ₀ IV stadija	Plakanšūnu Ca Gr3	poz	neg	neg
61	vīr.	Mutes pamatne T ₄ N ₀ M ₀ IV stadija	Plakanšūnu Ca Gr2	poz	neg	poz
63	vīr.	Aizdzerokļu raj. T ₃ N ₀ M ₀ III stadija	Plakanšūnu Ca Gr2	poz	poz	poz
66	vīr.	Normāla vaiga gļotāda	Nav patoloģijas	neg	neg	neg

Ca – karcinoma

Gr – *Grade* (audzēja morfoloģiskās malignitātes pakāpe (šeit: histoloģiskās diferenciacijas pakāpe))

Mēs izanalizējām, kādā stāvoklī ir EBV infekcija – latentā vai aktīvā. Mūsu rezultāti liecina, ka aizdzerokļu rajona plakanšūnu karcinomas, mutes pamatnes un nazofaringeālās karcinomas gadījumā tika atrasta latentā EBV infekcija (labākam pārskatam tās klātbūtne 3.6.tabulā ir iekrāsota zilā krāsā). Bez tam pacientam ar aizdzerokļa rajona plakanšūnu karcinomu aktīva bija arī HHV-6 un HHV-7 infekcija. Pacientam ar nazofaringeālo karcinomu tika konstatēta aktīva HHV-6 infekcija, bet HHV-7 infekcija bija latentā. Savukārt abiem pacientiem ar mutes pamatnes karcinomu tika atrasta aktīva HHV-7 (3.6.tabulā iekrāsota sarkanā krāsā).

**EBV, HHV-6 un HHV-7 DNS atrade RAKUS LOC 2009.-20011.gadā ārstētajiem mutes
dobuma karcinomas un NFK pacientiem (n=6)**

Slimības diagnoze, audzēja lokalizācija	Pacientu vecums, gadi	EBV			HHV-6			HHV-7		
		as	tu	pl	as	tu	pl	as	tu	pl
Mēles saknes Ca	39	poz	poz	neg	neg	poz	neg	poz	neg	neg
Mutes pamatnes Ca	77	poz	poz	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz
Aizdzerokļu rajona Ca	63	poz	poz	neg	poz	poz	poz	poz	poz	poz
Nazofaringeāla Ca	25	poz	poz	neg	neg	poz	poz	poz	poz	neg
Mutes pamatnes Ca	61	poz	poz	neg	neg	neg	neg	poz	poz	poz
LLEB	50	poz	poz	neg	poz	poz	poz	poz	poz	poz

as – perifēriskās asinis; tu – audzēja audi; pl – plazma
LLEB – siekaldziedzeru labdabīgs limfoepiteliāls bojājums

3.4. EBV antivielu titri pacientiem ar mutes dobuma ļaundabīgiem un siekaldziedzeru ļaundabīgiem un labdabīgiem audzējiem

EBV antivielu titri tika noteikti 10 pētījumā iekļautajiem pacientiem – četriem pacientiem ar mutes pamatnes plakanšūnu karcinomu, vienam pacientam ar pieauss siekaldziedzera limfoepiteliālo karcinomu III stadijā, vienam pacientam – ar pieauss siekaldziedzera adenokarcinomu II stadijā, vienam pacientam – pieauss siekaldziedzera duktilā karcinoma IV stadijā, vienam pacientam – ar nazofaringeālo karcinomu IV stadijā. Divos gadījumos audzēji bija zemas diferenciācijas pakāpes, pārējos gadījumos vidējas diferenciācijas pakāpes. Pacienti tika novēroti 4-12 mēnešus. Novērošanas laikā vienam pacientam bija pleomorfās adenomas recidīvs; astoņiem pacientiem ar ļaundabīgiem audzējiem recidīvi netika konstatēti. Divi pacienti slimībai progresējot nomira. Konstatējām, ka visiem pacientiem ar histoloģiski apstiprinātu siekaldziedzera plakanšūnu karcinomu II un IV stadijā VCA IgG un EBNA IgG antivielu titri bija ievērojami lielāki nekā pacientiem ar citiem audzējiem (3.7. tabula). Šī atrade liecina par latentas EBV infekcijas klātbūtni ne tikai nazofaringeālas karcinomas gadījumā, bet arī citiem pacientiem ar mutes pamatnes plakanšūnu karcinomu un siekaldziedzeru ļaundabīgiem audzējiem.

Mutes pamatnes karcinomas un siekaldziedzeru ļaundabīgu un labdabīgu audzēju preparātos tika novērtēta LMP1 onkoproteīna ekspresija, kas izpaudās kā brūns citoplazmas krāsojums. Tā variēja no ekspresijas pilnīga trūkuma (0) līdz intensīvai (3) ekspresijai karcinomas gadījumā, kura bija attīstījusies no pleomorfās adenomas. Limfocīti, kuri infiltrēja audzēju, bija LMP1-negatīvi. LMP1 onkoproteīna ekspresija variēja no difūzas līdz lokālai – rezultāti ir apkopoti un atspoguļoti 3.7. tabulā.

Dažos gadījumos LMP1-pozitīvās šūnas izvietojās lineāri gar audzēja šūnu sakopojumu bazālo daļu.

3.7.tabula

EBV antivielu titri un LMP1 ekspresija RAKUS LOC 2009.-2011.gadā ārstētajiem pacientiem ar siekaldziedzeru labdabīgiem un ļaundabīgiem audzējiem (n=10)

Siekaldziedzeru audzēji	EBV antivielu titri				LMP1 ekspresija
	IgM EA	IgM VCA	IgG VCA normā ≤20	IgG EBNA	
Plakanšūnu Ca (1.)	neg	neg	>200	118	datu nav
Plakanšūnu Ca (2.)	neg	neg	253	neg	0
Plakanšūnu Ca (3.)	neg	neg	136	55	datu nav
CaexPa	neg	neg	136	neg	3
Duktāla karcinoma	neg	neg	25	neg	0
Adenokarcinoma	neg	neg	neg	86	datu nav
Pleomorfa adenoma (1.)	neg	neg	158	neg	datu nav
Pleomorfa adenoma (2.)	neg	neg	neg	91	datu nav
Recidivējoša pleomorfa adenoma	neg	neg	156	23	0
LEK	neg	neg	259	neg	datu nav

CaexPa – plakanšūnu karcinoma, kas attīstījusies no pleomorfās adenomas

LEK – siekaldziedzeru limfoepiteliālā karcinoma

Pacientiem ar mutes pamatnes karcinomu un palielinātiem EBV antivielu titriem, izmantojot polimerāzes ķēdes reakciju, audzējā tika noteikta EBV DNS. LMP1 ekspresijas intensitāte pacientam ar lūpas kaktiņa karcinomu netika konstatēta, bet pārējiem četriem pacientiem tā bija mērena vai izteikta. Kontrolei izmantoja vesela pieaugušā un izārstēta bazaliomas (bez recidīva) pacienta analīžu datus. EBV antivielu titri, LMP1 ekspresijas un EBV DNS rezultāti attēloti 3.8.tabulā.

**EBV antivielu titru, LMP1 ekspresija un EBV DNS atrade RAKUS LOC 2009.-2011.gadā
ārstētajiem pacientiem ar mutes dobuma karcinomu (n=4) un NFK (n=1)**

Slimības diagnoze, TNM, stadija	EBV antivielu titri				LMP-1	EBV DNS audzēja audos
	IgM EA	IgM VCA	IgG VCA	IgG EBNA		
Mutes pamatnes karcinoma T ₂ N ₀ M ₀ , II stadija	neg	neg	>200	152	2	poz
Mutes pamatnes karcinoma T ₂ N ₂ M ₀ , IV stadija	neg	neg	>200	119	3	poz
Mutes pamatnes karcinoma T ₄ N ₀ M ₀ , IV stadija	neg	neg	>200	166	2	poz
Lūpu kaktiņa karcinoma T ₃ N ₀ M ₀ , III stadija	neg	neg	77	175	0	datu nav
Nazofaringeāla karcinoma, IV stadija	neg	neg	>200	99	2	poz
Bazālo šūnu vēzis anamnēzē, bez recidīva	neg	neg	88	neg	datu nav	datu nav
Vesels pieaugušais	neg	neg	74	80	datu nav	datu nav

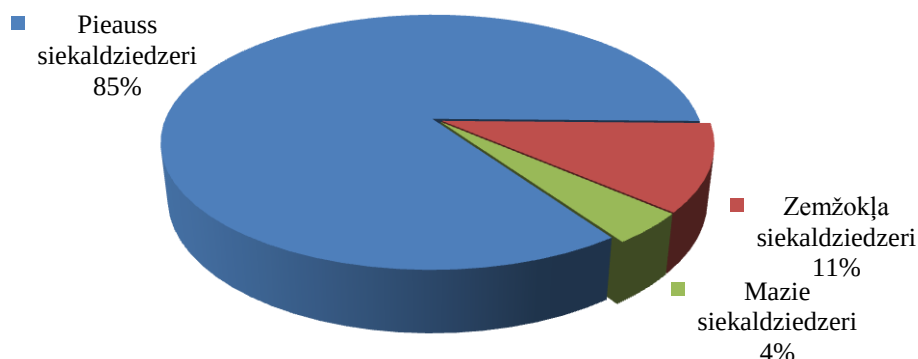
3.5. Siekaldziedzeru labdabīgu audzēju epidemioloģija, klīniskās gaitas īpatnības un patomorfoloģiskā aina

Lielākajai daļai pacientu pieauss siekaldziedzera labdabīgo audzēju primārā klīniskā manifestācija bija palpējams un/vai saskatāms lielāks vai mazāks veidojums vienā kakla pusē (unilaterāli). Tādas parādības kā sāpes un sejas nerva parēze bija novērojamas ļoti reti un bija saistītas tikai ar ļaundabīgiem audzējiem. Zemžokļa rajonā esošie labdabīgie audzēji parasti izpaudās kā lēni augoši nesāpīgi veidojumi. Aukslēju siekaldziedzeru audzēji manifestējās kā unilaterāls veidojums, biežāk mīksto un cieto aukslēju savienošanās vietā. Par sāpēm pacienti sūdzējās reti un tikai saistībā ar gļotādas izcūlojumu. Nevienam pacientam netika konstatētas metastāzes reģionālajos limfmezglos vai attālas metastāzes.

Labdabīgie audzēji bija attīstījušies gan lielajos (pieauss, zemžokļa un zemmesles), gan mazajos (aukslēju) siekaldziedzeros.

Pieauss siekaldziedzera audzēji tika konstatēti 274 (85%) gadījumos no visiem siekaldziedzeru labdabīgajiem audzējiem. Lielākā daļa pieauss siekaldziedzeru labdabīgo audzēju bija lokalizējušies virspusējā daivā. Zemžokļa siekaldziedzeru

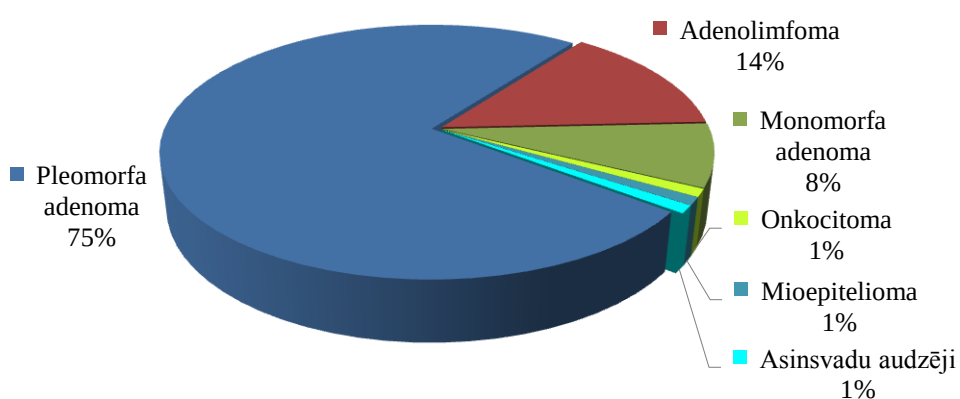
labdabīgi audzēji tika konstatēti 35 (11%), bet mazo siekaldziedzeru labdabīgi audzēji – 13 (4%) pacientiem (3.43.attēls).



3.43. att. Labdabīgo audzēju lokalizēšanās īpatsvars (%) dažādās siekaldziedzeru grupās RAKUS LOC 1996.-2007.gadā ārstētajiem pacientiem (n=322)

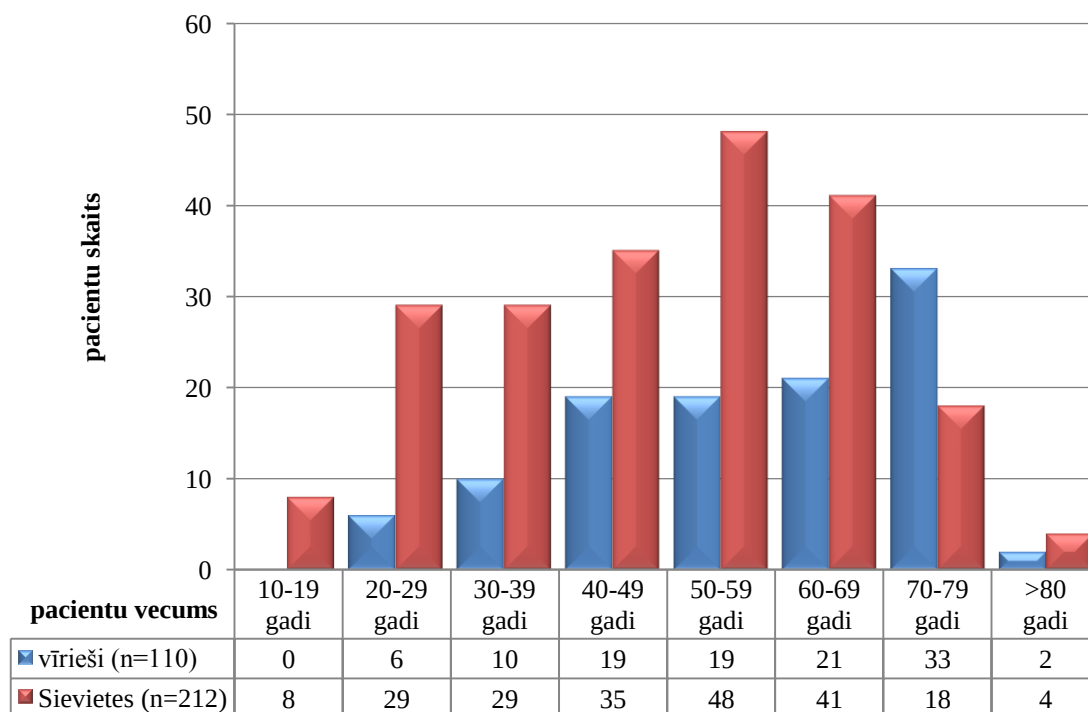
Pleomorfa adenoma bija biežākais siekaldziedzeru labdabīgs audzējs un to diagnosticēja 242 (75%) pacientiem. Adenolimfomu jeb Vārtina audzēju (*Wartin's tumor*) konstatēja 45 pacientiem (14%), monomorfo adenomu – 29 pacientiem (8%). Pleauss siekaldziedzeris bija vienīgais dziedzeris, kur tika diagnosticēta adenolimfoma un monomorfa adenoma.

Retāk bija sastopama onkocitoma – 2 (1%), mioepitelioma – 2 (1%) un asinsvadu audzēji – 2 pacientiem (1%) (3.44. attēls).



3.44. att. Dažādu labdabīgo siekaldziedzeru audzēju morfoloģisko veidu īpatsvars (%) RAKUS LOC 1996.-2007.gadā ārstētajiem pacientiem (n=322)

Pacientu ar labdabīgiem siekaldziedzeru audzējiem vecums variēja no 17 līdz 86 gadiem. Vislielākais saslimstības biežums ar labdabīgiem siekaldziedzeru audzējiem sievietēm bija 50-59 gadu vecumā, bet vīriešiem – 70-79 gadu vecumā (3.45.attēls).



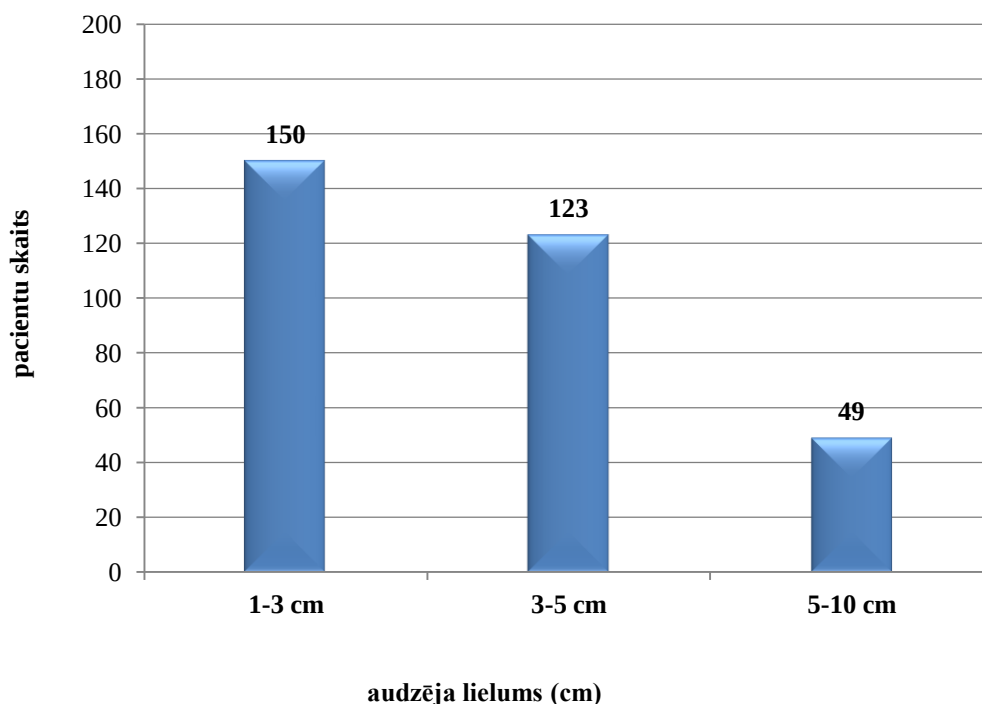
3.45. att. RAKUS LOC 1996.-2007.gadā ārstēto siekaldziedzeru labdabīgo audzēju pacientu sadalījums pēc vecuma un dzimuma (n=322)

Sievietēm siekaldziedzeru labdabīgi audzēji visās vecuma grupās bija diagnosticēti biežāk nekā vīriešiem, izņemot 70-79 gadu vecumu, kad vīriešiem šie audzēji bija konstatēti statistiski ticami biežāk ($p=0,05$) nekā sievietēm. Vislielākā saslimšanas gadījumu skaita atšķirība starp sievietēm un vīriešiem bija vērojama 50-59 gadu vecumā – šajā vecuma grupā sieviešu dominance pār vīriešiem bija visizteiktā ($p=0,05$) salīdzinājumā ar visām pārējām vecuma grupām.

Analizējot pacientu slimības vēstures, netika atrastas korelācijas starp audzēju persistenci, audzēja izmēru un recidivēšanas epizodēm.

Operācijas gaitā katram pacientam tika noteikts siekaldziedzeru labdabīgo audzēju lielums; pēc lielākā šķērsizmēra audzēji tika iedalīti trijās grupās – audzēji, kuru lielākais šķērsizmērs bija:

- 1-3 cm – 150 pacientu (47%);
- 3-5 cm – 123 pacienti (38%);
- 5-10 cm – 49 pacienti (15%) (3.46.attēls).



3.46. att. RAKUS LOC 1996.-2007.gadā ārstēto siekaldziedzeru labdabīgo audzēju sadalījums pēc lieluma (n=322)

Onkocitomai griezuma virsma parasti bija brūnā krāsā un audzējs bija lobulāras uzbūves.

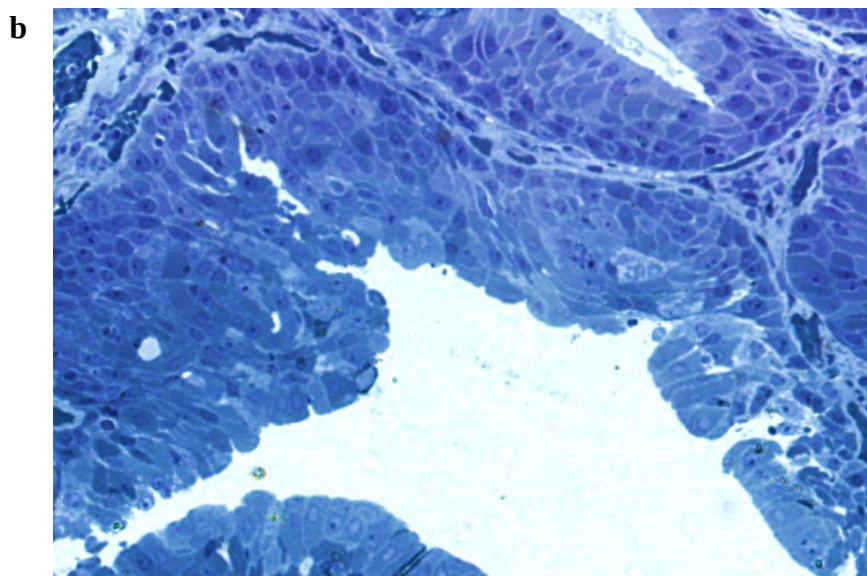
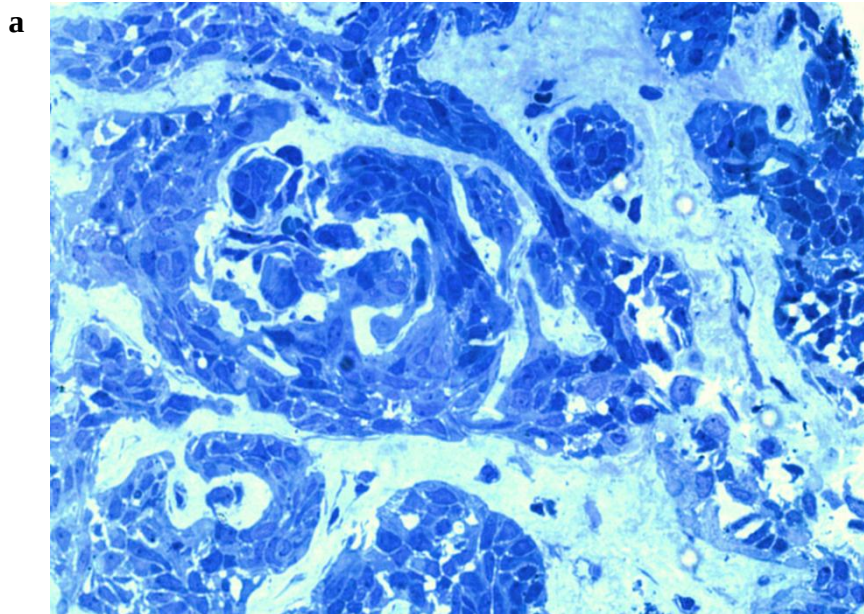
Adenolīmfomai jeb Vārtina audzējam (*Wartin's tumor*) bieži bija multicistiska uzbūve un sīkgraudainu virsma.

Lielākā daļa recidivējošo labdabīgo siekaldziedzeru audzēju bija pleomorfa adenoma. Recidivējoša pleomorfa adenoma visbiežāk bija multinodulāras uzbūves un tās mezglu daudzums bija izteikti variabls. Pleomorfas adenomas gadījumā audzējs lielākoties bija neliels, labi norobežots, iekapsulēts mezglveida veidojums 1-10 cm lielākajā šķērsizmērā. Makroskopiski pleomorfa adenoma bija homogēns audzējs gaiši pelēcīgā (līdz pat brūnai) krāsā, griezuma virsma spīdīga, dažreiz skrimšļaina pēc izskata.

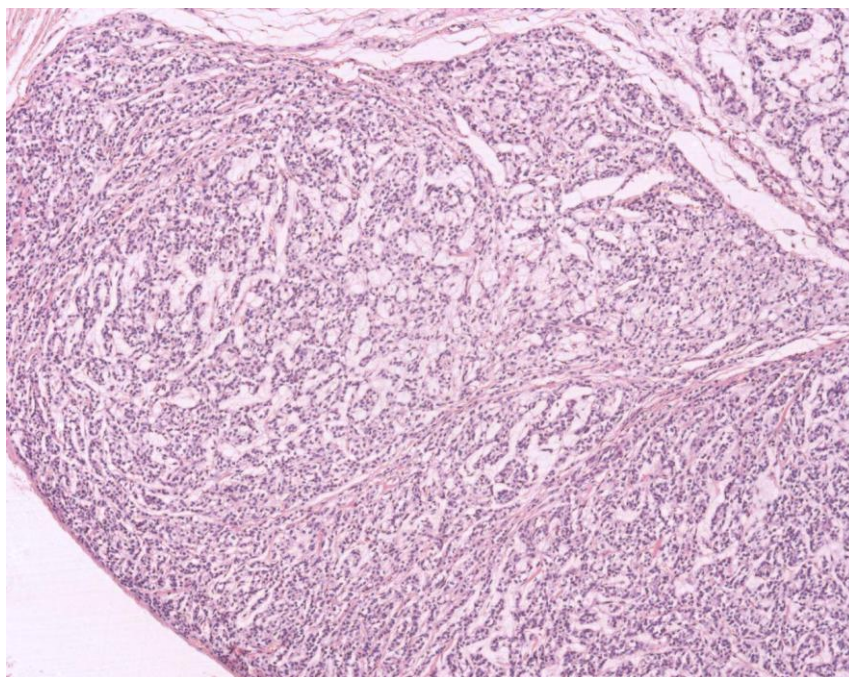
Netika atrasta saistība starp pleomorfas adenomas persistenci, izmēru un patohistoloģisko tipu, tomēr, analizējot bieži sastopamās siekaldziedzeru pleomorfās adenoma klīnisko gaitu un ārstēšanas rezultātus, mēs secinājām, ka šo audzēju nedrīkst nenovērtēt.

Pleomorfas adenomas histoloģisko pamatu veidoja epiteliālais komponents, kuram bija raksturīga šūnu dažādība – kubveida, bazaloīdās, vārpstveida un gaišās šūnas

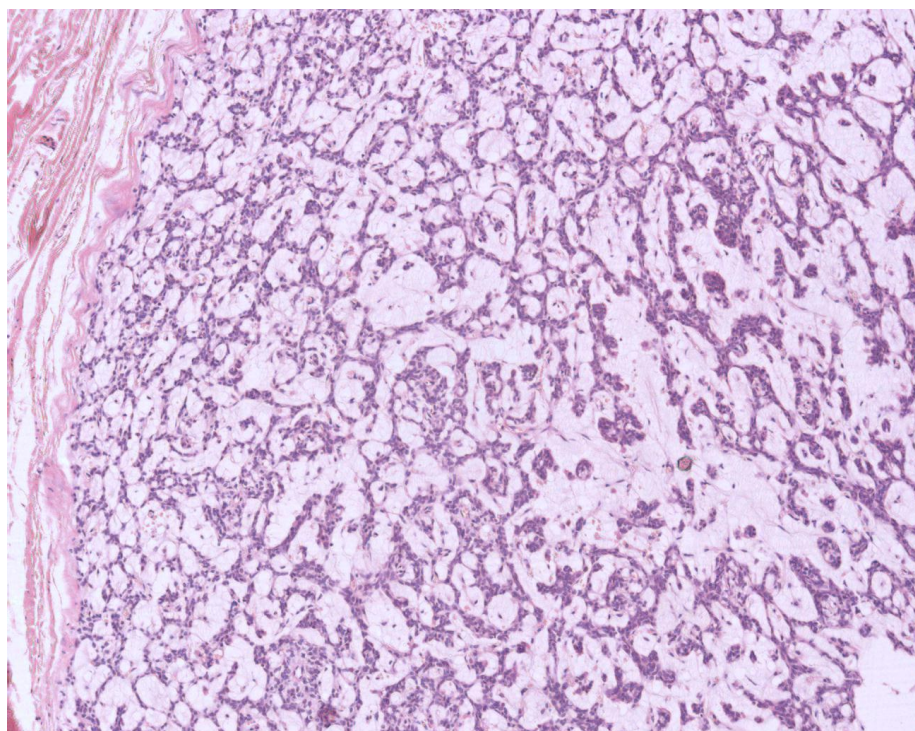
(3.47.a. un 3.47.b., 3.48., 3.49., 3.50., 3.51. attēls). Monomorfa adenoma makroskopiski bija līdzīga pleomorfa adenomai.



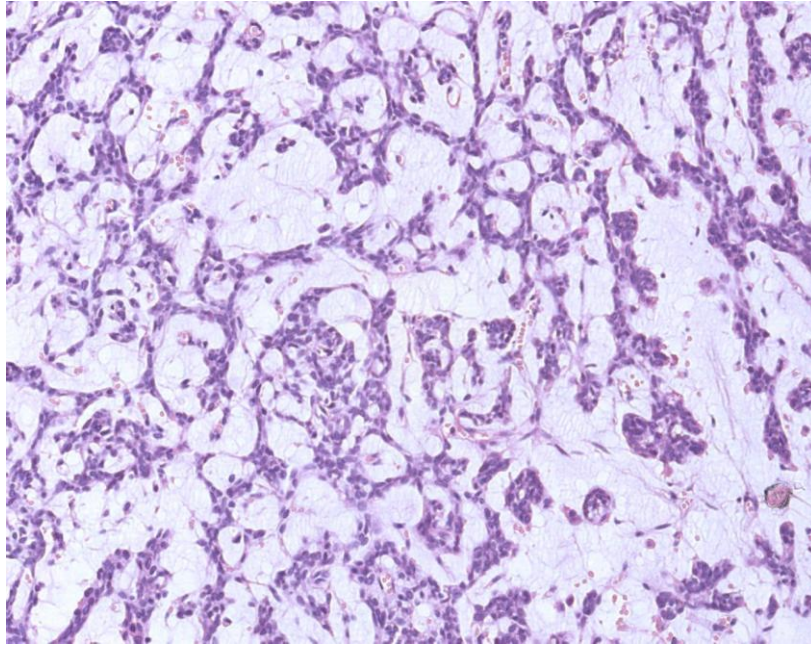
3.47. a., b. att. Recidivējoša pleomorfa adenoma. 1 μ m preparāta griezumā, kurā redzamas tubulāras struktūras ar haotiski izvietotām, polimorfām šūnām, audzēja stroma šaura slāņa veidā (ieguldīts epoksīda sveķos, krāsots ar 1% toluidīnzilo). x 200



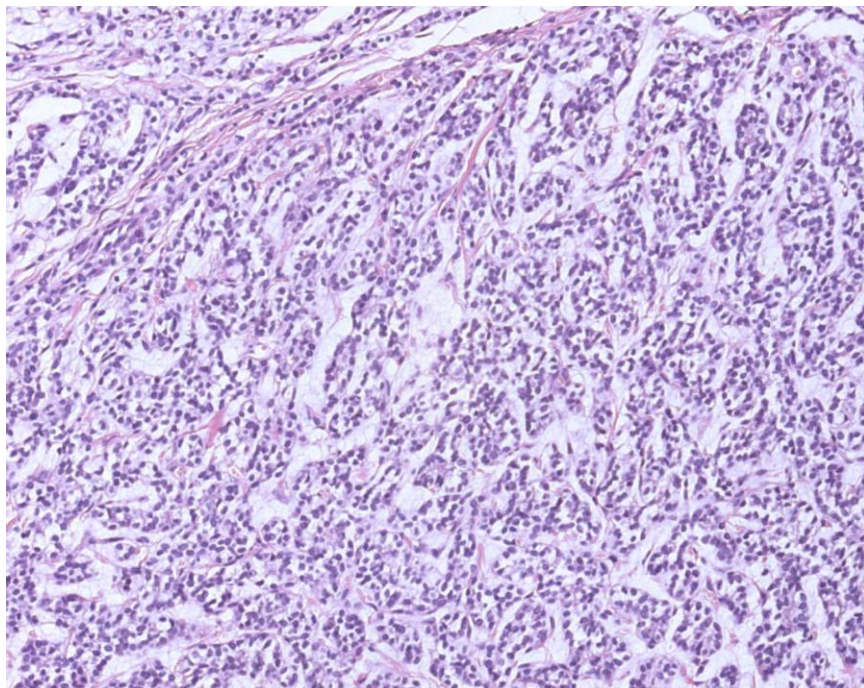
3.48. att. Pleomorfa adenoma. Audzēja šūnas sakārtotas pavedienos, neregulāras formas grupiņās, vāji norobežotas no miksoīdas stromas. H&E. x 100



3.49. att. Pleomorfa adenoma. Audzēja šūnas sakārtotas pavedienos, kopā ar miksoīdo stromu veido poraino struktūru. H&E. x 100

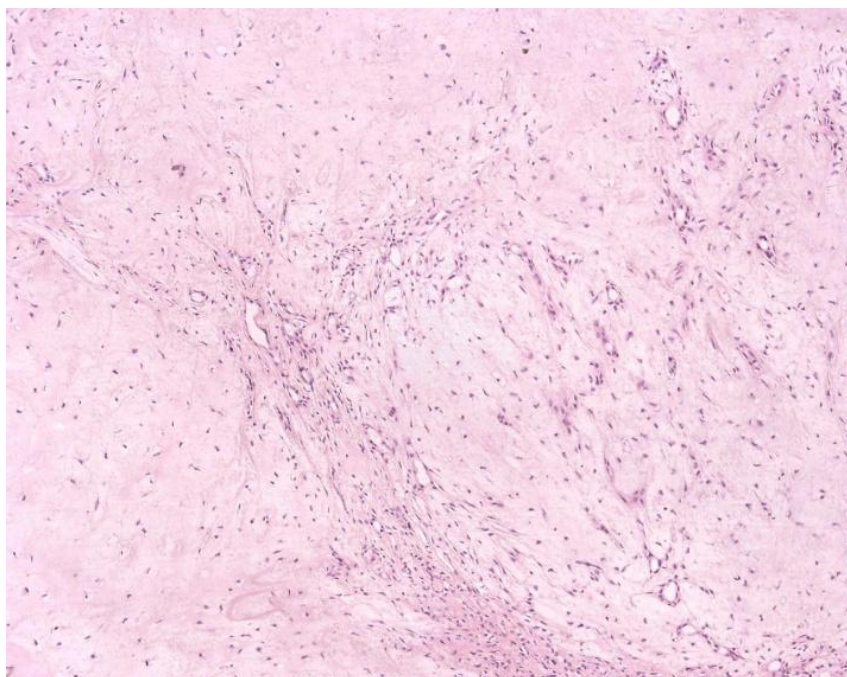


3.50. att. Pleomorfa adenoma. Audzēja šūnas sakārtotas pavedienos, gredzenveidīgās struktūrās, un vāji norobežotas no miksoīdas stromas. H&E. x 200



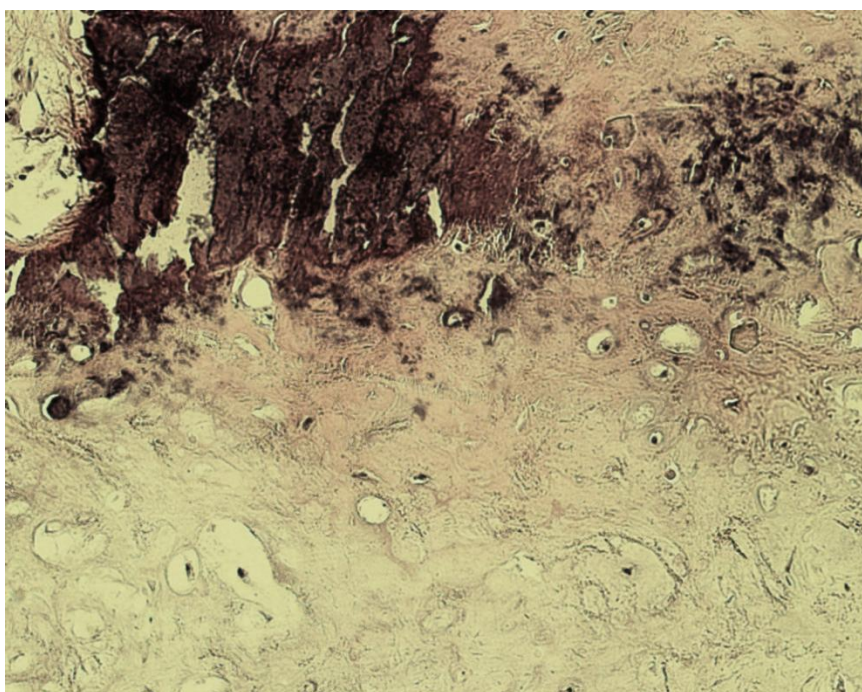
3.51. att. Pleomorfa adenoma. Blīva, trabekulāra audzēja struktūra ar gaišām šūnām. H&E. x 200

Stromālā tipa audzēja masā bija vienādā mērā pārstāvēti gan stromas, gan epiteliālie komponenti (3.52. attēls).

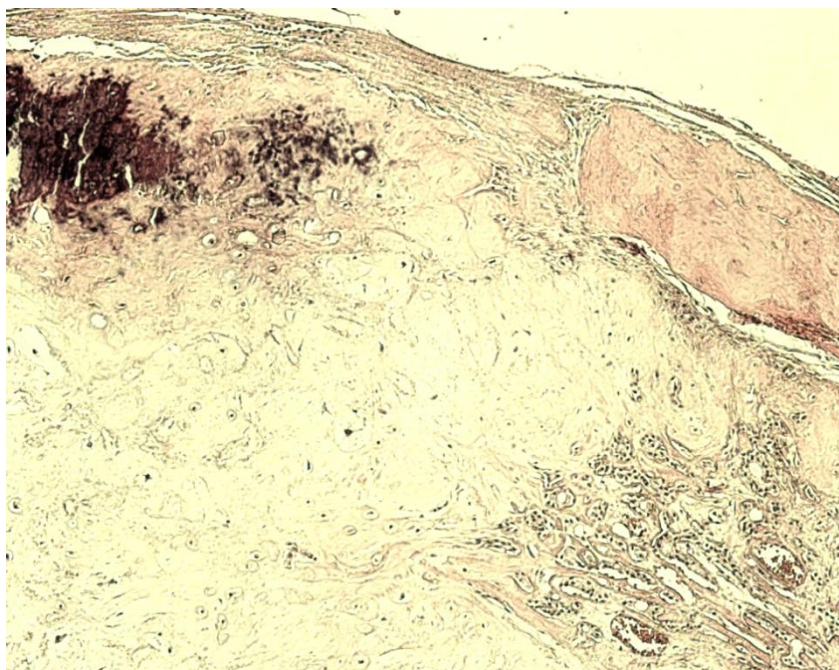


3.52. att. Pleomorfa adenoma. Audzēja fragmentā dominē miksoīda stroma, tajā redzamas vārpstveida mioepiteliālas šūnas. H&E. x 100

Stromas komponents bija mukoīdas/miksoīdas, skrimšļainas vai kaulainas dabas (3.53., 3.54.attēli). Šajā siekaldziedzeru audzēju grupā dominēja miksoīdais apakštips.



3.53. att. Pleomorfa adenoma. Audzēja fragmentā dominē hondroīda un oseoīda stroma.H&E. x 100



6.54. att. Pleomorfa adenoma. Audzēja fragmentā redzama hondroīda un oseoīda stroma. H&E. x 200

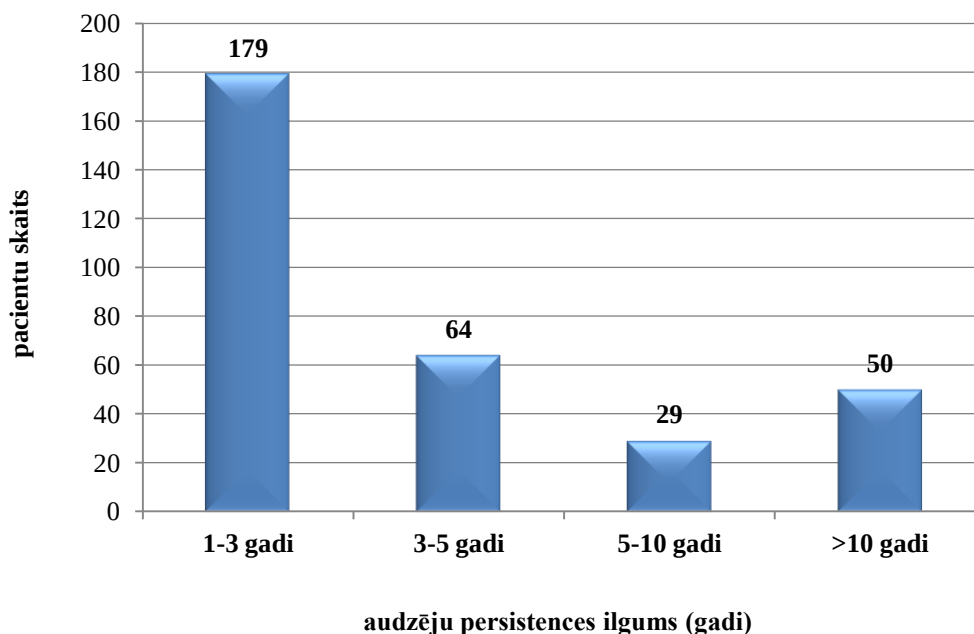
Adenolinfomai bija raksturīgs izteikts limfoīdo šūnu daudzums, kuras apņēma epiteliālās šūnas. Epiteliālā komponenta šūnas veidoja papildāros izaugumus un tām bija onkocītiskas īpašības.

Onkocitomas gadījumā onkocīti veidoja solīdas un trabekulāras struktūras; šūnu citoplazma bija graudaina un acidofila (rutīnas histoloģiskajos izmeklējumos).

Mioepiteliomai bija raksturīgas solīdas trabekulāras struktūras un to izaugumi, kas robežojās ar šūnām ar gaišu citoplazmu.

Pētījumā iekļauto pieauss, zemžokļa un aukslēju pleomorfo adenomu persistences ilgums bija ļoti dažāds:

- 1-3 gadi – 179 pacienti (55,5%);
- 3-5 gadi – 64 pacienti (19,8%);
- 5-10 gadi – 29 pacienti (9%);
- >10 gadi – 50 pacienti (15,5%) (3.55. attēls).

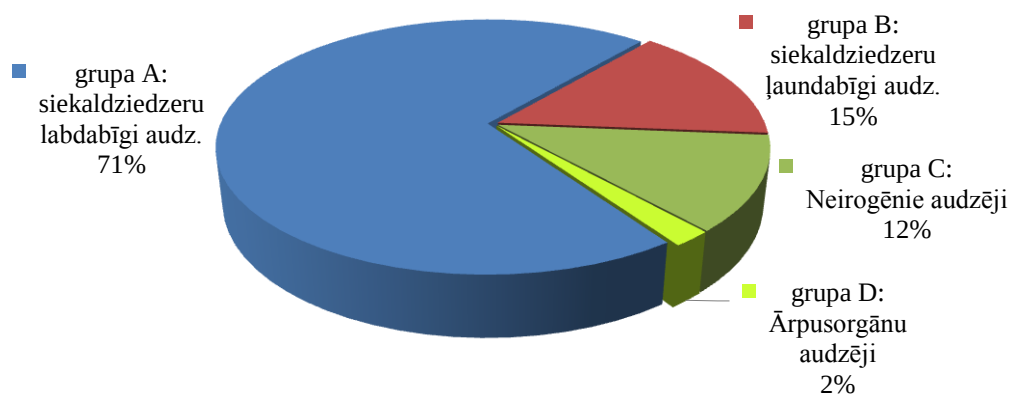


3.55. att. Siekaldziedzeru labdabīgo audzēju persistences ilgums (gadi) RAKUS LOC 1996.-2007.gadā ārstētajiem pacientiem (n=322)

3.6. Parafaringeālās telpas audzēju operāciju komplikācijas

Lielākā daļa pieauss siekalu dziedzeru audzēju atradās virspusējā daivā un to operāciju laikā tika veiktas dažāda apjoma parotidektomijas, saglabājot sejas nervu. Dziļās daivas audzēji atradās parafaringeālajā telpā, tādēļ to ķirurģiska ārstēšana bija daudz sarežģītāka un saistīta ar dažādām īpatnībām.

Savā pētījumā mēs saskārāmies ar dažādiem parafaringeālo audzēju veidiem un pētījām dažādas ķirurģiskās pieejas parafaringeālo audzēju ekstirpācijas gadījumos. Papildus izvērtējam komplikācijas pēc dažādām audzēju ekstirpācijām, to biežumu. Apkopojot pētījuma rezultātus par ķirurģiskām aktivitātēm parafaringeālās telpas apvidū, kas tika veiktas RAKUS LOC Galvas un kakla ķirurģijas nodaļā laikā no 2001.gada 1.janvāra līdz 2006.gada 31.decembrim, un rezultātus par pēcoperāciju komplikācijām, mēs konstatējām, ka lielākā parafaringeālo audzēju daļa bija labdabīgi siekaldziedzeru audzēji – 71% (22 gadījumi (grupa A)) (3.56. attēls).



3.56. att. Dažādu parafaringeālās telpas audzēju veidu īpatsvars (%) RAKUS LOC 2001.-2006.gadā ārstētajiem pacientiem (n=32)

Grupa A	Parafaringeāli labdabīgi siekaldziedzeru audzēji
Grupa B	Parafaringeāli ļaundabīgi siekaldziedzeru audzēji
Grupa C	Parafaringeāli neirogēni audzēji
Grupa D	Ārpusorgānu heterogēni audzēji un attīstības anomālijas

No visiem parafaringeālās telpas audzējiem astoņdesmit procenti bija pleomorfa adenoma (grupa A). 15% bija ļaundabīgi siekaldziedzeru audzēji (5 pacienti (grupa B)) – biežākais audzējs šajā grupā bija mukoepidermoīda karcinoma, tai sekoja karcinoma, kas bija attīstījusies no pleomorfas adenomas (*carcinoma ex pleomorphic adenoma*).

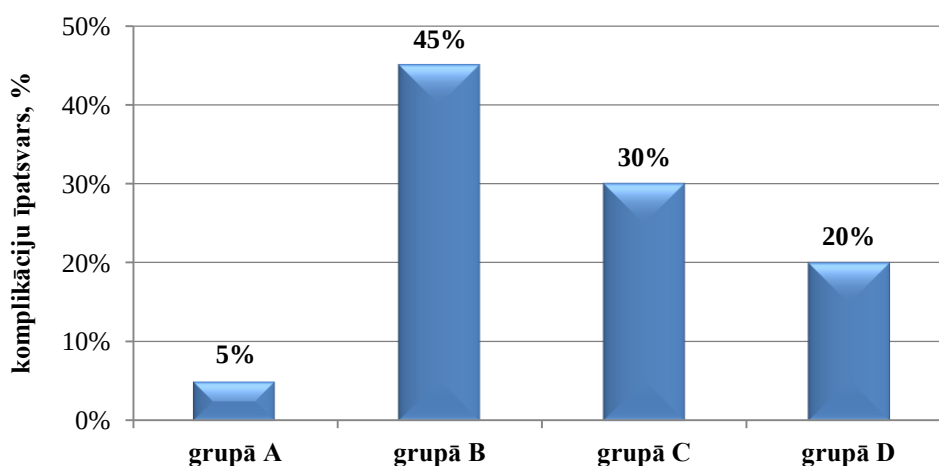
Parafaringeālie neirogēnie audzēji (grupa C) bija sastopami 12% gadījumu (4 pacienti) – šiem audzējiem raksturīgs bija poststiloīdajā telpā palpējams veidojums, un tie dalījās paragangliomās, vagāļajās paragangliomās vai švannomās un *glomus caroticum* audzējos (hemodektomās).

Ārpusorgānu – heterogēnie audzēji un attīstības anomālijas (grupa D) bija sastopamas 2% gadījumu (1 pacients, kuram bija palpējams limfomas mezgls). Šai grupai pieskaitamas limfomas, hemangiomas, teratomas, lipomas un arteriovenozas malformācijas.

Atkarībā no parafaringeālā audzēja veida un izplatības tika izmantotas dažādas ķirurģiskas pieejas. Transorālā pieeja tika izmantota 1% gadījumu, ekstirpējot mazu labdabīgu siekaldziedzeru audzēju, kas izgāja no prestiloīdās telpas un klīniski manifestējās kā orofaringeālā masa. Šīs operatīvās pieejas trūkumi ir ierobežots operāciju laukums un gan maģistrālo asinsvadu, gan sejas nerva bojājuma risks, audzēja kapsulas plīsuma iespējas, un līdz ar to gan labdabīga, gan potenciāli ļaundabīga audzēja recidīvi. Mazkustīgu lielo siekaldziedzeru audzēju gadījumos transorālo pieeju kombinē ar ārējo pieeju caur kaklu.

Kakla-zemžokļa pieeja mūsu pētījumā tika pielietota visbiežāk, t.i., 56% gadījumos. Apakšžokļa retrakcija un *lig.stylomandibulare* pārdalīšana palielina operācijas laukumu un uzlabo audzēja mezgla vizualizāciju. Pieeja caur pieauss siekalu dziedzeri un caur kaklu jeb transparotidāli-transcervikāli tika pielietotas 25% gadījumos. Izdarot transparotidālu ķirurģisko pieeju, tiek veikta parotidektomija, sejas nerva stumbra un apakšējo zaru vizualizācija ar pieeju caur kaklu. Šī metode tika izmantota, kad audzējs bija fiksēts un nevarēja izslēgt tā malignitāti, kā arī gadījumos, kad tas tieši attīstās no pieauss siekaldziedzera dziļās daivas. Ļaundabīgo audzēju gadījumos pielietojām paplašinātas ķirurģiskas pieejas metodes ar apakšžokļa pārdalīšanu, kuras rezultātā bija iespējama izcili laba parafaringeālā audzēja vizualizācija, bet kura bija saistīta ar virkni komplikāciju. Tādēļ to pielietojām galvenokārt asinsvadu audzēju gadījumos, kā arī recidivējošas pleomorfas adenomas gadījumos, kad bija klīniski novērojami multipla mezglveida audzēja recidīvi. Paplašinātas ķirurģiskas pieejas, izmantojot mandibulotomiju, tika izdarītas 17% gadījumos. Osteotomijas vietas bija dažādas – apakšžokļa ķermenī, lenķī, zarā un parasimfizes apvidū. Ja audzējs lokalizējās galvaskausa pamatnes rajonā, tika veikta pieeja caur *fossa infratemporalis* – 1% gadījumos.

Dažādās grupās bija atšķirīgs operāciju komplikāciju biežums – tas grafiski atainots 3.57. attēlā.



3.57. att. Parafaringeālās telpas operāciju komplikāciju biežums (%) dažādu vēža lokalizāciju gadījumos Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Latvijas Onkoloģijas centrā 2001.-2006.gadā ārstēto pacientu grupās (n=32)

Grupā A	Parafaringeāli labdabīgi siekaldziedzeru audzēji
Grupā B	Parafaringeāli ļaundabīgi siekaldziedzeru audzēji
Grupā C	Parafaringeāli neirogēni audzēji
Grupā D	Ārpusorgānu heterogēni audzēji un attīstības anomālijas

Visbiežāk pēcoperācijas komplikācijas tika novērotas ļaundabīgo siekaldziedzeru audzēju grupā (grupa B) – 45% gadījumu. Vismazāk pēcoperācijas komplikāciju bija pacientiem ar siekaldziedzeru labdabīgiem audzējiem (grupa A) – 5% gadījumu.

Pēc parafaringeālās telpas operācijām biežākā komplikācija bija t.s. “pirmā kodiena sindroms” – 30% visu komplikāciju. Citas komplikācijas, t.sk. pārejošs sejas nerva funkcijas vājums, tika novērotas retāk. Pārejoša sejas nerva parēze saistīta ar trakcijas spēkiem operācijas laikā, kad neadekvātas nerva preparēšanas rezultātā izveidojas persistējošs sejas nerva bojājums, – šīs komplikācijas kopumā bija 4 pacientiem (1% ķirurģisko iejaukšanos).

Kraniālo nervu bojājumus novēroja 20% gadījumu, un tie bija saistīti ar poststiloīdas telpas audzēju ekstirpāciju.

N.accessorius bojājums bija novērots 15% gadījumos, un tas manifestējās kā trapecveida muskuļa vājums, lāpstiņas deviācija un adhezīvu kapsulas iekaisums.

0,5% gadījumu, kad pēc parafaringēlā audzēja rezekcijas bija izveidojies multipls kraniālo nervu funkciju traucējums, elpceļu pasargāšanas nolūkā tika veikta traheostomija. Aukslēju muskuļu vājums, balss saišu parēze un fistula tika novērotas reti (0,5%). Cerebrospināla šķidruma tecēšana tika novērota 1% gadījumu, ekstirpējot pie jugulārās atveres lokalizētu audzēju vai audzēju ar tendenci uz intrakraniālo izplatību. Lai atjaunotu smadzeņu apvalku integritāti, tika izmantoti fascijas, taukaudu vai muskuļaudu gabaliņi.

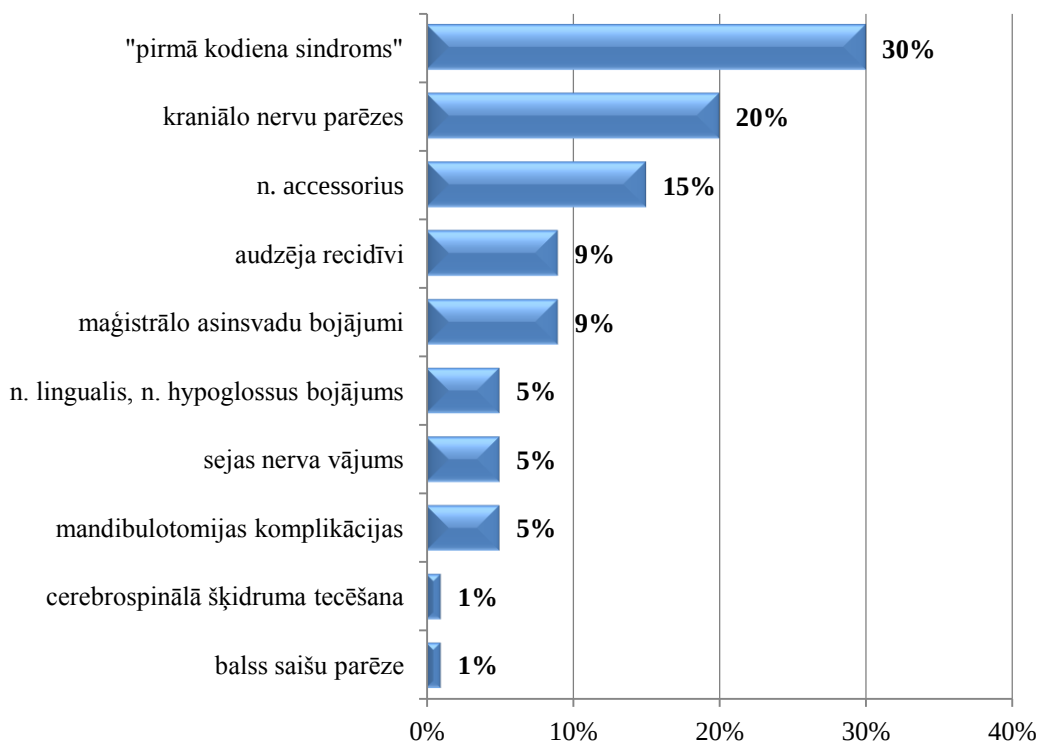
Asinsvadu komplikācijas visbiežāk bija saistītas ar asinsvadu audzēju vai neirogēnas dabas audzēju ekstirpāciju. Šajā pētījumā poststiloīdās telpas audzēju gadījumā intraoperatīvo asinsvadu bojājumi bija apmēram 9% pacientu. Miega artērijas vilkšanas un saspiešanas (operācijas laikā) rezultātā reizēm izveidojās artērijas sienas ārējā apvalka jeb adventīcijas mikroperforācijas, kas bija par iemeslu asiņošanai. Primāri artērijas sieniņas perforāciju slēdzām, izmantojot vēnas sieniņas fragmentus.

Izdarot transcervikālo pieeju, attīstījās *n.lingualis* un *n.hypoglossus* bojājumi; veicot manipulācijas zemžokļa apvidū, šīs komplikācijas novēroja 5% gadījumu. Izolēts *n.hypoglossus* bojājums parasti būtiski nemainīja runāšanas vai rīšanas funkciju.

Mūsu pētījumā konstatējām, ka operāciju laikā visbiežāk tika bojāts *n.vagus* – bojājums izpaudās kā balss saišu parēze. Ja bija bojājumi virs *ganglium nodosum*, novērojām balsenes glotādas jušanas funkcijas samazināšanos.

5% gadījumu tika novērotas komplikācijas pēc mandibulotomijas – infekcijas, temporomandibulārās locītavas disfunkcija, nesaaugšana osteotomijas vietās, osteosintēzes plates atgrūšana un osteotomijas vietai tuvu esošu zobu zaudējums (ja osteotomijas grieziens gāja caur zobu kabatu).

Parafaringeālo labdabīgo siekaldziedzeru audzēju recidīvi pēc audzēju ekstirpācijām bija novērojami 9% gadījumu (3.58. attēls).



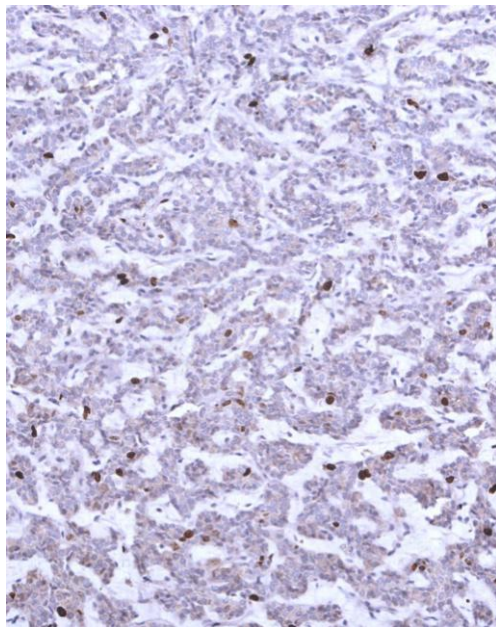
3.58. att. Parafaringeālās telpas audzēju operāciju komplikāciju spektrs un īpatsvars (%) RAKUS LOC ārstētajiem pacientiem ar parafaringeālo labdabīgo siekaldziedzeru audzēju recidīviem pēc audzēju ekstirpācijām

3.7. Siekaldziedzeru audzēju šūnu proliferācija

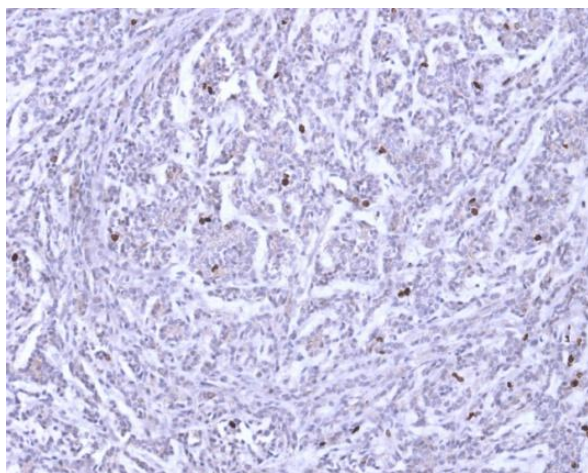
Ki-67-pozitīvi šūnu kodoli tika atrasti visos audu griezumos, t.sk. arī kontroles preparātos. Siekaldziedzeru pleomorfas adenomas gadījumā Ki-67 ekspresija bija novērota gan stromas, gan epiteliālā komponenta šūnās.

Izmantojot MIB-1 antivielas izoformu, tika novērota viegli pozitīva ekspresija dažos siekaldziedzeru audzējos epiteliālā komponenta šūnu citoplazmā. Primāras un recidivējošas pleomorfas adenomas gadījumos MIB-1-pozitīva ekspresija šūnu kodolos tika konstatēta dažāda tipa šūnās, t.sk. asinsvadu endoteliņā.

Vislielākais šūnu daudzums un Ki-67-pozitīvo šūnu kodolu skaits vienā redzes laukā bija novērots recidivējošas pleomorfas adenomas gadījumos – vidējais skaits Ki-67-pozitīvo šūnu redzes laukā bija $2,14 \pm 1,60^1$ (95% CI² 1,47-2,47), bet primārās pleomorfas adenomas gadījumos tas attiecīgi bija 1,43 (95% CI 0,97-1,55) (3.59., 3.60. attēli).



3.59. att. Siekaldziedzeru pleomorfa adenoma. Šūnu proliferācijas marķiera ekspresija epiteliālā komponenta šūnu kodolos, imūnhistoķīmiskā reakcijā izmantojot anti-Ki-67 antivielu. x 250



3.60. att. Siekaldziedzeru pleomorfa adenoma. Šūnu proliferācijas marķiera ekspresija epiteliālā komponenta šūnu kodolos, imūnhistoķīmiskā reakcijā izmantojot anti-Ki-67 antivielu. x 100

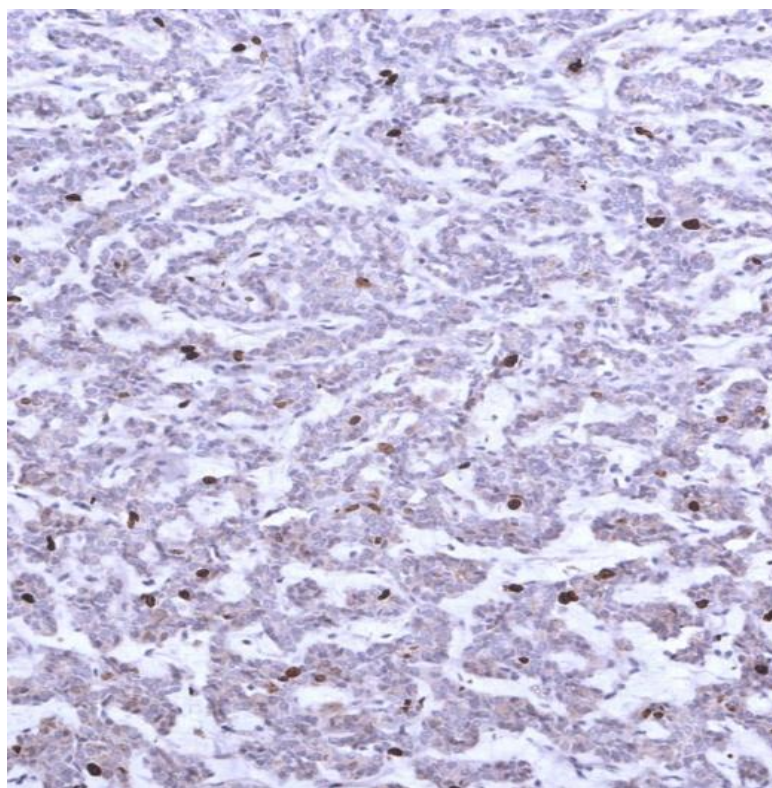
¹ Vidējā standartklūda (SE)

² Interval of confidence – Ticamības intervāls

Šī atšķirība kļuva vēl izteiktāka, kad bija ņemtas vērā recidivējošas pleomorfas adenomas morfoloģiskās uzbūves īpatnības un novērtēts šūnu proliferācijas marķiera ekspresijas līmenis.

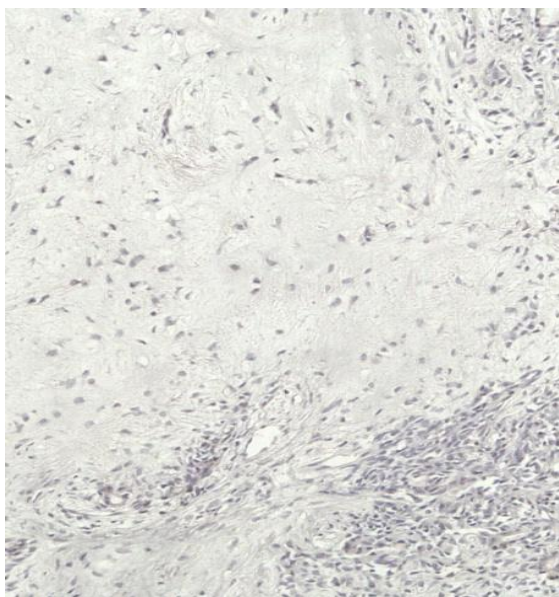
Ki-67-pozitīvo kodolu skaits redzes laukā pleomorfas adenomas epiteliālajā komponentā un stromas komponentā variēja attiecīgi no $0,07 \pm 0,03$ (95% CI 0,01-0,14) līdz $4,81 \pm 0,60$ (95% CI 3,61-6,02) un no 0 līdz $0,79 \pm 0,11$ (95% CI 0,57-1,00).

Liela Ki-67 ekspresija bija novērota pleomorfā adenomā ar izteiktu epiteliālu komponentu (3.61. attēls).



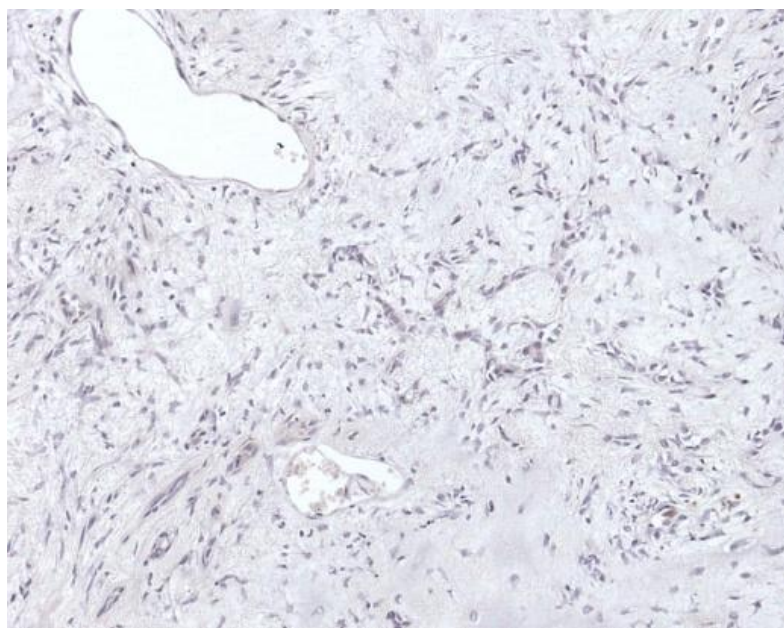
3.61. att. Liels skaits Ki-67 pozitīvo šūnu kodolu siekaldziedzeru pleomorfas adenomas epiteliālajā komponentā x 200

Daudz mazāk izteikta Ki-67 marķiera ekspresija bija novērota tajos pleomorfas adenomas gadījumos, kad dominēja stromālais komponents (3.62. attēls).



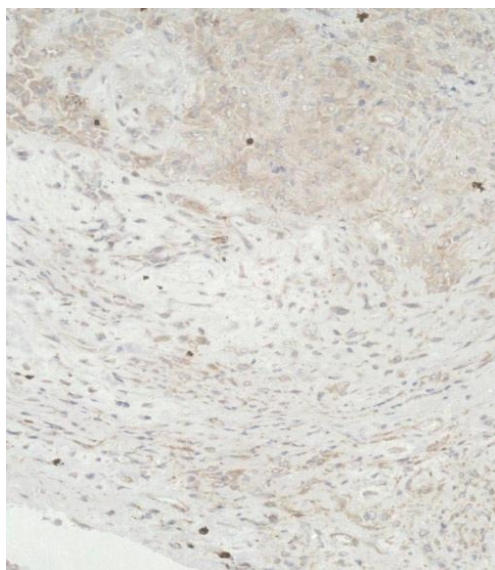
3.62. att. Siekaldziedzeru pleomorfa adenoma. Miksoīda audzēja stroma un neliels epiteliālā komponenta fragments nesatur Ki-67 pozitīvas šūnas. x 200

Ki-67 ekspresija hondroīda apakštipa pleomorfās adenomas stromā gandrīz nebija novērota (3.63. attēls).



3.63. att. Pleomorfa adenoma. Šūnu proliferācijas marķiera ekspresijas iztrūkums audzēja šūnu kodolos, imūnhistoķīmiskā reakcijā izmantojot anti-Ki-67 antivielu. x 100

Toties miksoīdā audzēja apakštipa gadījumā novēroja ļoti izteiktu proliferācijas marķiera ekspresiju (3.64. attēls).

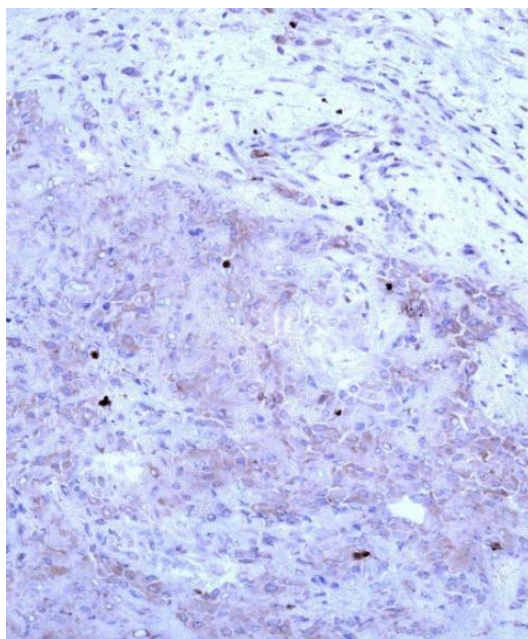


3.64. att. Pleomorfa adenoma. Ki-67-pozitīvas šūnas audzēja epiteliālajā un stromālajā komponentā. x 200

Mūsu pētījumā nav atrasta ievērojama statistiska atšķirība starp Ki-67-pozitīvo šūnu skaitu redzes laukā pleomorfai adenomai ar dominējošu stromas variantu un kontroles audiem – attiecīgi $0,14 \pm 0,04$ (95% CI 0,05-0,22) un $0,04 \pm 0,03$ (95% CI 0-0,09).

Daži pētījumā iekļautie pacienti bija jau divas vai trīs reizes atkārtoti operēti sakarā ar pleomorfās adenomas recidīviem, un pēdējā recidīva attīstības laiks bija viens gads. Visi recidīvi tika novēroti pieauss siekaldziedzerī. Aptuvenus pleomorfās adenomas recidivēšanas biežums bija 4%. Recidivēšanas risks bija lielāks pieauss siekaldziedzerī ar iepriekš novērotiem recidīviem. Nākamā recidīva biežums pēc primārās ķirurģijas sakarā ar pleomorfu adenomu pieauss siekaldziedzerī ir 25%. Nākamais recidīvs izveidojās ātrāk gadījumos, kad iepriekš jau bija veikta pleomorfās adenomas operācija.

Atkārtoto audzēju recidīvu gadījumos konstatēta augstāka Ki-67 ekspresija (3.65. attēls).



3.65. att. Recidivējoša pleomorfa adenoma. Ki-67-pozitīvas šūnas audzēja epiteliālajā un stromālajā komponentā. x 200

Atkārtotu pleomorfas adenomas recidīvu gadījumos tika novērota daudz lielāka Ki-67 ekspresija abos audzēja komponentos (epiteliālajā un stromas) salīdzinājumā ar primāru pleomorfas adenomu – attiecīgi 7,15 un 3,27. Pārsvārā epiteliālas un izteikti epiteliālas atkārtoti recidivējošas pleomorfas adenomas gadījumos Ki-67 proliferācijas marķiera vidējā vērtība bija 1,87 (0,23-4,81), bet audzēja pirmā recidīva gadījumā – 1,59 (1,33-1,86), savukārt stromāla tipa recidivējošos audzējos – 0,32 (0-0,79) un 0,24 (0,22-0,27). Ievērojams Ki-67 ekspresijas pieaugums tika konstatēts visu recidivējošo pleomorfo adenomu stromālajos komponentos atšķirībā no primāriem audzējiem un normāliem siekaldziedzeru audiem: vidējā Ki-67-pozitīvo šūnu vērtība bija attiecīgi $0,79 \pm 0,11$ (95% CI 0,57-1,00); $0,14 \pm 0,04$ (95% CI 0,05-0,22) un $0,04 \pm 0,03$ (95% CI 0-0,09).

Ne siekaldziedzeru adenolimfomas, ne citu tipu monomorfas adenomas gadījumos mēs nekonstatējām palielinātu Ki-67 ekspresiju.

4. DISKUSIJA

Veicot kompleksus morfoloģiskus un molekulārus asins, audu un plazmas paraugu izmeklējumus pacientiem ar EBV-pozitīvu mutes pamatnes karcinomu un salīdzinot to ar veseliem kontroles audiem, mēs konstatējām, ka dažādu diagnostikas metožu kombinācija ir vērtīga un konstruktīva. Tā kā mūsu pētamo pacientu grupa bija neliela un iegūtās informācijas daudzums ierobežots, tika veikta salīdzināšana ar literatūrā minēto citu autoru izmeklēto pacientu skaitu. Kopumā šis skaits ir līdzīgs un sadalās šādi: *González-Moles et al.* (2002) – 14 mutes plakanšūnu karcinomu pacientiem molekulāra izmeklēšana veikta 12 gadījumos [44]; *Sand et al.* (2002), analizējot 37 mutes dobuma karcinomu gadījumus, veica molekulāru izmeklēšanu 11 pacientiem [30]; *Bagan et al.* (2008) autoru kolektīvs molekulāro izmeklēšanu veica 10 mutes dobuma karcinomu pacientiem, no kuriem trijiem bija mēles karcinoma [25]. Jautājumā par audzēja diferenciācijas pakāpi un EBV infekciju iepazīnāties ar autoru *González-Moles et al.* (1998) pētījumu, kur no visiem mutes dobuma ļaundabīgajiem audzējiem 26,3% bija labi diferencēta plakanšūnu karcinoma, bet pārējie 73,7% bija vidēji vai zemu diferencētas plakanšūnu karcinomas [39]. Mūsu pētījumā galvenokārt bija pacienti ar vidējas diferenciācijas pakāpes plakanšūnu karcinomu, tādēļ mēs nevaram apgalvot, ka EBV infekcijas priekšnosacījums ir zema karcinomas diferenciācijas pakāpe.

Acīmredzama ir arī EBV-pozitīvo mutes dobuma plakanšūnu karcinomas lokalizācijas prevalēšana, kas saskan ar literatūras datiem (*González-Moles et al.* 1998) [39]. Abos minētajos pētījumos 63,1% mutes dobuma plakanšūnu karcinomu bija EBV DNS pozitīvas un to lokalizācijas vieta galvenokārt bija mēles sānu virsma. Mūsu pētījumā tika analizēti mandelēm tuvu novietoti audzēji – mēles, rīkles un aukslēju rajonos. *Horiuchi et al.* (1995) pētījumā tika demonstrēta EBV/CD21 mRNS receptora ekspresija mandeles epitēlijā [36].

Mūsu pētījumā tika konstatēts tāds interesants fakts, ka audzēja tuvumā esošajos veselajos audos ir EBV DNS, kas dod pamatu pārdomām par ķirurģisko taktiku un audu ekscīzijas apjomu operācijas laikā. Daļēji mūsu atrade sakrita ar *Grinstein et al.* (2002) datiem, kas pieļauj EBV lomu onkoģenēzē bieži sastopamos mutes dobuma plakanšūnu karcinomu audos, kā arī hiperplāzijās un displāzijās, kuras ir priekšteči karcinomas attīstībai [26]. Mūsu pētījumā audiem, kas robežojās ar audzēja masu un bija EBV

pozitīvi, histoloģiskajā atradē bija raksturīga iekaisuma reakcija un liels imūnkompetento šūnu skaits, ko varētu izskaidrot ar EBV DNS klātbūtni šajā rajonā.

Analizējot autoru *Lo et al.* (2004), *Langren et al.* (1994) darbu rezultātus par NFK un EBV DNS klātbūtni, varam secināt, ka EBV DNS atrade plazmā varētu kļūt par labu diagnostisko un prognostisko molekulāro marķieri NFK pacientu izmeklēšanā. Šie rezultāti arī parāda, ka EBV DNS klātbūtne audzēju audos ir pārāk maz pētīta [33, 116].

Literatūrā dati par plakanšūnu karcinomu skaitu un EBV DNS atradi variē plašās robežās un ir ļoti atšķirīgi – 15,2 % (*Kobayashi et al.* 1999), 19,2% (*González-Moles et al.* 2002.), 25 % (*D'Costa et al.* 1998), 40% (*Bagan et al.* 2008), 50% (*Mao et al.* 1993) un 100% (*Cruz et al.* 1997) [38, 44, 102, 25, 63, 62]. Mūsuprāt, viens no pieņemamiem izskaidrojumiem tam ir izdarīts *González-Moles et al.* (2002) pētījumā, kur ziņots, ka nav iespējams noteikt, kādas šūnas (audzēja šūnas, limfocīti) piedalās vīrusa DNS amplifikācijas procesā, ka būtiska ir arī audu heterogenitāte un paraugu savākšanas procedūra [44]. Analizējot minēto autoru pētījumus, tika konstatēts, ka izmeklētais materiāls ir ļoti daudzveidīgs – nokasījumi, mutes dobuma skalojumu materiāls, biopsijas, ķirurģiskas ekscīzijas preparāti un sasaldēts ķirurģiskais materiāls.

Pašlaik pieejamajā literatūrā netika atrastas publikācijas par pētījumiem, kur izmantota dubultu paraugu vākšana. Mēs savā pētījumā iekļāvām vienu mutes dobuma plakanšūnu karcinomas pacientu, kuram tika veiktas divas EBV DNS izmeklēšanas: viena no audzēja audiem, bet otra no kontroles mutes dobuma veselās gļotādas rajona. Šajā gadījumā audzējs bija EBV-negatīvs. Lai pārskatītu esošo materiālu saistībā ar EBV, tika veikta LMP1 imūnhistoķīmiskā noteikšana, kas parāda EBV lokalizāciju audos un dod priekšstatu par EBV-pozitīviem audzējiem. Konstatējām LMP1 ekspresiju visos šajā pētījumā imūnhistoķīmiski izmeklētajos audzējos (imūnpozitīvi). LMP1 ekspresija bija variabla – 0, minimāla vai vidēji izteikta – attiecīgi 50,3%, 43,6%, 6,0% plakanšūnu karcinomas un 91,1%, 6,7%, 2,2% nazofaringeālas karcinomas gadījumā. EBV-pozitīvam labdabīgam siekaldziedzera limfoepiteliālajam bojājumam un ļaundabīgā audzēju rezekcijas līnijās LMP1 ekspresija netika novērota. Nedaudz mazāka LMP1 ekspresija (85,7%) neoplastiskajās šūnās EBV-pozitīvās plakanšūnu karcinomas gadījumā ir aprakstīta *González-Moles et al.* darbā (2002) [44]. Turpretī *Kis et al.* (2009) un *Horiuchi et al.* (1995) nenovēroja LMP1 ekspresiju mutes dobuma karcinomā – šie dati neatbilst mūsu pētījuma rezultātiem [35, 36].

Mūsu novērojumi attiecībā uz NFK kopumā atbilst literatūras datiem, kuri iegūti, pētot LMP1 ekspresiju ne-endēmiskajos NFK (Lo *et al.* 2004) [33]. Zviedru autoru grupa (Taheda-Kadhoda *et al.* 2009) [99] demonstrēja LMP1 ekspresiju 33% viņu izmeklētās grupas pacientu un apgalvoja, ka LMP1 atrade ir būtisks novērojums ne-endēmiskajā NFK onkoģenēzē gados jauniem pacientiem, kā arī karcinomas invazivitātes novērtējumā. LMP1 onkoproteīns var inducēt šūnu olbaltumvielu ekspresiju, kuras ir atbildīgas par šūnas proliferāciju un transformāciju (Damania 2004) [102]. LMP1 ir zināms arī kā audzēja invazivitātes pastiprinātājs ekstracelulārajā matricē (Anagnostopoulos *et al.* 1989) [103]. Citi EBV onkoproteīni veicina pārmaiņas mikrovidē no avaskulārās uz vaskulāro fāzi. Šī angiogēnēzes atbilde tiek regulēta ar pro- un antiangiogēnēzes faktoru līdzsvaru audzēja mikrovidē. EBV onkoproteīnu ekspresija stimulē mikroasinsvadu veidošanos un audzēja progresiju (Damania 2004) [102].

LMP1-pozitīvo šūnu skaits mūsu pētījumā bija ļoti variabls. Dažas no EBV inficētajām audzēja šūnām difūzi lokalizējās audzēja masā, bet dažas, veidojot pavedienvēda struktūras, lokalizējās kompakti. Dažas no pētījumā izmeklētajām plakanšūnu karcinomām LMP-pozitīvās šūnas demonstrēja lineāru sakārtojuma veidu – tās izvietojās gar neoplastisko šūnu kūlīšu bazālo robežu stromālā komponenta tuvumā.

Mūsu pētījumā tika novērota LMP1 ekspresija citoplazmā. Savukārt citu autoru pētījumos ir demonstrēta LMP1 ekspresija uz membrānas un citoplazmā (Georgolios *et al.* 2006) [54]. Izvērtējot materiālus ar Hodžkina limfomu (Murray *et al.* 1992), šo parādību izskaidro ar olbaltumu fosforilāciju un saistību ar citoskeletu [98].

Franci *et al.* (2001) pētījumā tika atklāta korelācija starp CD44 imūnohistohīmisko ekspresiju, audzēja diferenciācijas pakāpi un stromas invāziju siekaldziedzeru audzējos [104]. Kā jau tika minēts, mēs konstatējām, ka plakanšūnu karcinoma demonstrē LMP1-pozitīvās šūnas, kuras bieži lokalizējās gar bazālo epitēlija robežu. Neoplastiskās šūnas šajā lokalizācijā izceļas ar vāju vai vidēju viegli viļņaino membranozu CD44 imūnreaktivitāti. CD44 imūnreaktivitātes pakāpe neoplastiskām šūnām bija daudz zemāka salīdzinājumā ar normālu mutes gļotādu, kā arī CD44 ekspresija korelēja ar LMP1 ekspresiju plakanšūnu karcinomas gadījumā ($r=0,482$; $p<0,001$).

Ir pierādīts, ka EBV infekcija tiek iniciēta, vīrusa virsmas glikoproteīnam gp350 mijiedarbojoties ar CD21 receptoru uz B limfocītu virsmas. Pētot šo procesu epitēlijšūnu kultūrā, Shannon-Lowe *et al.* (2011) [53] ziņo, ka tālāk seko mijiedarbība

starp CD11b uz B limfocīta virsmas un heparānsulfāta molekulas CD44v3 fragmentu uz kultivētas epiteliālās šūnas. Limfocīti, kurus demonstrējām mūsu pētījumā, atrodas kopā ar neoplastiskajām šūnām. Daži no limfocītiem atradās intraepiteliāli. Izmantojot imūnhistoķīmijas metodes, tika atrasti B limfocīti, kuri lielā skaitā infiltrēja audzēja masu. Lielāko daļu izpētīto limfocītu var raksturot kā CD44-pozitīvus. Ir zināms, ka CD44 kā viena gēna produkts var eksistēt dažādās izoformās, un viena vai vairākas CD44 izoformas var būt dažādi ekspresētas dažādos audžējos. *Assimakopoulos et al.* (2002) [64] pētījumā bija demonstrēta samazināta CD44 ekspresija galvas un kakla plakanšūnu karcinomas gadījumos. Ir arī parādīts, ka samazināta CD44 ekspresija korelē ar sliktu slimības prognozi [60, 105], un CD44 glikoproteīna zudums pieguļošajā neļaudabīgajā mutes dobuma epitēlijā tiek uzskatīts par agrīnām ļaundabīgām pārmaiņām mēlē [56, 57].

Salīdzināšanai iepazīnāties ar vairāku autoru pētījumiem, kuros tika izmeklēta CD44 ekspresija un tās īpatnības plakanšūnu karcinomu gadījumos. Vāja CD44 imūnreaktivitāte bija konstatēta zemas diferenciācijas pakāpes mutes plakanšūnu karcinomā [106], bet vidēja un izteikta CD44 ekspresija bija atrasta vidēji un labi diferencētās karcinomās. *Reategui et al.* (2006) publicētie dati [107] norāda, ka audzēja audi ekspresē CD44v3 un ekspresija ir 4,5 reizes lielāka nekā normālos audos. *Wang un Bourguignon* (2011) saista CD44v3, -v6 un v10 receptoru un to izoformu parādīšanos galvas un kakla plakanšūnu karcinomās ar audzēja progresiju [108]. Saskaņā ar *Bánkfalvi et al.* (2002) [109] un *Abdulmajeed et al.* (2011) [110], palielināta CD44 receptora un to izoformu ekspresija ir pierādīta lielākajai daļai displastisko mutes dobuma gļotādas bojājumu, bet selektīva CD44s, v3, v4 un v9 akumulācija notiek plakanšūnu karcinomas audos no audzēja invazīvās puses [111]. CD44s, v4, v7 receptoru izžušana vienlaicīgi ar v9 ievērojamu palielināšanos ir novērota plakanšūnu karcinomas metastāzēs un recidivējošajās karcinomās [109]. Izmeklējot plakanšūnu karcinomas cilmes šūnu imūnfenotipu, tika noteikts, ka to var raksturot CD44 imūnekspressijas īpatnības [112]. Agrāk veiktajos pētījumos [61], izmantojot anti-CD44 antivielu, bija atrastas korelācijas starp šīs antivielas ekspresiju un audzēja šūnu invāzijas pakāpi.

CD44 ekspresijas dati izmantoti arī karcinomas audu proliferatīvo īpatnību un metastazēšanās fenotipu pētīšanai [113]. *Oliveira et al.* (2011) [115] rezultāti liecina, ka CD44-pozitīva imūnfenotipa gadījumā ir izteikti atšķirīgi dzīvildzes rādītāji un tas var kalpot par neatkarīgu faktoru sliktai slimības prognozei multivariantu analīzē. Šis

novērojums sakrīt ar datiem, kas ir iegūti no citiem pētījumiem par audzēja gaitas prognozēšanu, kuros apgalvots, ka CD44 ekspresijas izmaiņas atkarīgas no stadijas audzēja diagnosticēšanas brīdī [108, 116]. *Kokko* (2011) un līdzautoru pētījumā ir konstatētas ciešas sakarības starp izteikto CD44 ekspresiju un sliktiem 5-gadu dzīvildzes rādītājiem pacientiem ar mutes dobuma un *hypopharynx* plakanšūnu karcinomu [117]. Nesenajā CD44 pētījumā *Rajajaran et al.* (2012) [118] demonstrēja, ka CD44 ir plaši ekspresēts mutes dobuma un rīkles ļaundabīgajos audzējos un, atšķirībā no citu orgānu sistēmu vēžiem, orofaringeālām plakanšūnu karcinomām CD44 ekspresija nav haotiska. Ir nepieciešami papildu pētījumi, lai noskaidrotu, kura no CD44 izoformām nosaka paaugstinātas izdzīvošanas iespējas jeb vēža cilmes šūnu īpašības maligniem keratinocītiem. Citi pētnieki [119] atzīmē arī ierobežojumus CD44 izmantošanā par vēža cilmes šūnu marķieri. Pētnieku grupām vienojošais motīvs ir tas, ka CD44 molekulu ekspresija ir nozīmīgs un sarežģīts faktors, kas vienā gadījumā ir saistīts ar sliktu slimības prognozi, pārējos gadījumos CD44 ekspresija var liecināt par metastazēšanās potenciāla pieaugumu. Kā jau tika minēts, EBV infekcijas sākums ir saistīts ar galvenā vīrusa apvalka glikoproteīna gp350 mijiedarbību ar komplementa receptoru CD21 uz B limfocītu virsmas. *Shannon-Lowe* un *Rowe* (2011) [53] noteica, ka tālāk procesā iesaistās CD11b no B limfocīta puses un epiteliālo šūnu virsmas CD44v3. Ekstracelulāra matrice veido aizsargbarjēru epitēlija inficēšanai ar brīvi eksistējošu EBV, bet limfocītu integrīnu un fibronektīna mijiedarbība pastiprina limfocītu migrāciju epitēlijā [53].

Busson vadītā zinātnieku grupa apgalvo, ka NFK šūnas var sekretēt 40-100 nm lielas eksosomas, kas satur galektīnu 9 un/vai LMP1, kas ir pietiekoši stabili, lai difundētu no audzēja uz perifērajām asinīm [119, 120]. Eksosomas ir spējīgas ietekmēt dažādas mērķa šūnas, tai skaitā antigēnprezentējošās dendrītiskās šūnas. Tāpēc mūsu pētījumā tika pētīta stromālo šūnu loma un imūnkompetentās šūnas, kuras ir galvenie EBV infekcijas starpnieki un audzēja mikrovides modulatori. *Walling et al.* (2007) publikācijā norādīts, ka mikrovide ir unikāla katra epitēlija gadījumā un epitēlijšūnu EBV infekciju var pārnest caur tām [29]. Autori demonstrēja, ka EBV inficēti Langerhansa šūnu priekšteči kalpo par EBV „transporta rīkiem” epitēlijā un paši pilnībā diferencējas tajā. Mēs atklājām, ka makrofāgi un dendrītiskās šūnas saistās ar mutes dobuma gļotādas epitēliju un LMP1-pozitīvajām audzēja šūnām, kuras demonstrē CD44 ekspresiju [29]. Tādēļ pieļaujam, ka dendrītiskās šūnas var piedalīties EBV infekcijas pārņemšanā uz epiteliālajām šūnām. *Tugizov et al.* (2007) parādīja, ka EBV inficēti B

limfocīti ļoti reti migrē gļotādas epitēlijā, tai pašā laikā inficēti monocīti bieži kalpo par EBV transmisijas vektoriem starp asinīm un mutes dobuma epitēliju [28].

S100 ir kalcija jonus saistoša olbaltumviela, kura ir atrasta antigēnprezentējošās dendrītiskās šūnās un kura, pēc literatūras datiem, tiek demonstrēta normālā mutes dobuma gļotādā, patoloģiju gadījumos, kā arī siekaldziedzeros [51, 58]. Izmantojot S100 imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas rezultātus, mēs konstatējam, ka antigenprezentējošās dendrītiskās šūnas cieši piekļaujas mutes dobuma gļotādas epitēlijam.

Kopumā mūsu rezultāti apstiprina aizstāvēšanai izvirzīto hipotēzi, ka mutes dobuma un rīkles jeb orofaringeālās gļotādas stromas sastāvs, audzēja mikrovide, vaskularizācija un imūnsistēmas darbība arī ir faktori, kas piedalās EBV infekcijas persistēšanā.

EBV infekcijas īpatnības un tās persistēšanu orofaringeālās gļotādas epitēlijā, ko daļēji nosaka šī rajona anatomiskās īpatnības, kā arī ļaundabīgas transformācijas indukciju *in vivo*, ir jāturpina pētīt.

Mūsu dati apstiprina, ka CD44 šūnas virsmas hialuronāta receptors ir atrasts uz ļaundabīgajām orofaringeālā epitēlija šūnām, limfocītiem, stromas makrofāgiem EBV infekcijas gadījumā pacientiem ar mutes dobuma plakanšūnu karcinomu un NFK. Wang *et al.* (2011) apgalvo, ka hialuronskābe ir ekstracelulāras matricas glikozaminoglikāns un primārs ligands CD44 molekulai un ir konstatējama galvas un kakla audzēju audos [121].

Ir skaidrs, ka CD44 ir multistrukturāla un multifunkcionāla šūnas virsmas molekula, kas piedalās šūnas proliferācijā, diferenciācijā, migrācijā, angiogēnēzē, citokīnu, augšanas faktoru un to receptoru prezentācijā [122]. Visas šīs īpašības ir svarīgas normālo šūnu funkcijā, kā arī saistītas ar neoplastisko šūnu aktivitātēm [123]. Eksperimentālie dati liecina, ka, iedarbojoties ar anti-CD44 antivielām, tiek ievērojami samazināta ļaundabīgo šūnu aktivitāte dažādos audzējos un pastiprināts CD44 molekulas terapeitiskais potenciāls [124]. Dažādos audzējos iespējama dažādu CD44 izoformu klātbūtne alternatīva *splaisinga* (*splicing*) rezultātā, tādēļ nākotnē iespējams radīt anti-CD44 audzējspecifisku aģentu ar terapeitiskām īpašībām [125, 126]. Diskutabls ir fakts, ka dažos audzējos izteikta CD44 ekspresija ne vienmēr asociējas ar sliktu slimības prognozi [122].

Audzēja cilmes šūnu atklāšana un izpēte varētu noskaidrot dažus no audzēju recidivēšanas iemesliem [128]. Dažādo terapijas stratēģiju neveiksmju pamatā ir nespēja

iedarboties tieši uz audzēju cilmes šūnu līniju, jo līdz šim nebija iespēju to precīzi identificēt [129, 130]. Pašreiz molekulāro pētījumu rezultātā ir izdevies konstatēt, ka viens no perspektīviem galvas un kakla audzēja cilmes šūnu marķieriem varētu būt CD44 molekula, bet šie dati ir pretrunīgi, jo ekspresija ir audžējspecifiska [131, 132, 133]. Papildus eksperimentālajos pētījumos ir jānoskaidro CD44 molekulas terapeitiskā nozīme un pielietojums.

Ir izpētīta HPV loma orofaringeālos audzējos. HPV prevalence orofaringeālos audzējos pēc literatūras datiem ir 20-26% [134]. Svarīga īpašība šiem audzējiem ir izteikta p16 ekspresija, kas ir raksturīga HPV-pozitīvus orofaringeālos audzējus [135]. Uzskata, ka HPV-pozitīvai orofaringeālai karcinomai ir relatīvi labvēlīga klīniskā gaita, un atzīmē, ka tā ir jutīga pret staru un ķīmijterapiju [136]. Ir piedāvājums, pievienojot antivirālo terapiju, uzlabot audzēja jutīgumu pret citotoksisko terapiju un samazināt nepieciešamo ķīmijterapijas preparātu devas, kā arī ar to saistīto toksicitāti. Ķīmijterapijas pielietojums ļaundabīgo audzēju ārstēšanā vienmēr ir saistīts ar toksiskām blakusiedarbēm uz normālām šūnām [129]. CD44 šūnas virsmas proteoglikāns ir ievērojams arī kā audzēja cilmes šūnas marķieris [130, 136-140]. Literatūrā ir aprakstīti pētījumi, kad CD44 proteoglikāns selektīvi saistās ar terapeitisko aģentu un kalpo par transporta sistēmu ķīmijterapijas preparātiem [141]. Pētījumā bija izmantoti metastātiskas melanomas audi un rezultātā atzīmēta audzēja izmēra reducēšanās par 60% [140]. Tas ir jauns ar nanotehnoloģiju pamatots zāļu transportēšanas mehānisms.

Vadoties pēc mūsu pētījuma rezultātiem, mēs domājam, ka HHV6, HHV7 un EBV inficē jau esošās audzēja šūnas, nevis izraisa epitēlija malignizāciju, kā tas varētu būt HPV infekcijas kontekstā. Mēs demonstrējam audzējus, kuros nebija neviena vīrusa. Visi trīs iepriekš minētie vīrusi tika atrasti aizdzerokļu rajona karcinomā, NFK un siekaldziedzeru labdabīgā limfoepiteliālā bojājumā. Šīs patoloģijas vienojošā pazīme ir limfoīdais komponents, kurš ir tuvu audzējam vai arī ir daļa no tā un kalpo kā starpnieks, piemēram, EBV infekcijai. Jāatzīmē, ka mutes dobuma gļotādas un siekalu dziedzeru veselajos audos netika atrasts neviens vīruss. Aizdzerokļu rajona karcinomā un siekaldziedzeru labdabīgajā limfoepiteliālajā bojājumā mēs konstatējām aktīvas HHV6 un HHV7 infekcijas. Latenta EBV infekcija tika konstatēta visiem mūsu izmeklētajiem pacientiem, kuriem, pēc mūsu domām, imunitātes statuss atbilda onkoloģisko slimnieku sekundāra imūndeficīta stāvoklim. Datus par aktīvo HHV6 infekciju papildina mutes pamatnes plakanšūnu karcinomas un pieauss siekaldziedzera

duktālās karcinomas imūnhistoķīmiskie rezultāti par izteiktu HHV6 ekspresiju. Imūnhistoķīmijas dati parāda, ka HHV6 atrodas tieši epiteliālās audzēja šūnās. Tomēr pieņemot, ka, jo zemāka epitēlija šūnu diferenciācija, jo vieglāk tās pakļaujas HHV6 infekcijai, nevaram izskaidrot, kāpēc HHV6 DNS nav konstatēta divos mutes pamatnes karcinomu gadījumos. Mēs pieļaujam, ka HHV6 nonāk audzēja šūnās no siekaldziedzeriem, kur, kā zināms [15], tās persistē hroniski un, iespējams, ar limfocītiem inficē audzējus, kas ir tuvāk limfoīdo audu sakopojumiem, t.sk. mēles saknes, retromolāra karcinoma un NFK. Literatūras avotos ir noskaidrots, ka HHV6 hroniski persistē siekaldziedzeros, bet par HHV7 rezervuāru var kalpot smaganu audi [15, 142]. Cassai *et al.* (2003) un Rotola *et al.* (2008) HHV7 prevalenci periodontālos audos konstatēja slimību gadījumos un veseliem indivīdiem tad, kad HHV6 un HHV8 praktiski nebija konstatēti [142, 143]. Pētnieku secinājumi liecina, ka HHV7, ja indivīds ir inficēts, persistē latentā veidā periodonta audos. Toties EBV galvenokārt asociējas tikai ar periodontālo patoloģiju [142]. Tādēļ mēs varam pieņemt, ka mutes pamatnes karcinomas gadījumos, kad audzēja audos tiek konstatēts HHV7 un EBV DNS, ir iespējams, ka vīrusi iekļūst audzējā no periodonta audiem.

In vitro hemopoētisko šūnu pētīšanas dati liecina, ka HHV-6 uz eritrocītiem, granulocītiem/makrofāgiem un megakariocītiem iedarbojas nomācoši [142]. Turpretī HHV-7 nedemonstrē nevienu no supresīvās iedarbības veidiem [15-18]. HHV6 klātbūtne plakanšūnu karcinomas audos pastiprina jau esošo imūnsistēmas supresiju, tādēļ mēs domājam, ka antivirālās terapijas lietošana mutes dobuma un nazofaringeālo audzēju pacientiem var aktivizēt antitumorozo imunoloģisko atbildi un uzlabot pacientu ārstēšanas rezultātus. Pasaules literatūrā, piemēram, Monioni *et al.* (2004), plaši tiek apspriesti HIV pacientu antiretrovirālās terapijas antitumorošie efekti [147]. Ir pierādīts, ka antivirālā terapija var bloķēt audzēja inducēto angiogēnēzi un samazināt audzēja radīto iekaisumu [145, 146]. Ginges *et al.* (2006) ir pētījis HIV-asociēto audzēju skaita samazināšanos pēc antiretrovirālās terapijas pielietošanas [147]. HIV infekcija ir asociēta ar Kapoši sarkomu, ne-Hodžkina limfomu un invazīvu dzemdes kakla karcinomu. Tās ļaundabīgas slimības kā Hodžkina limfoma, plaušu vēzis, anogēnītāls vēzis, multipla mieloma, CNS ļaundabīgi audzēji nav saistīti ar HIV infekcijas progresiju, bet to incidence ir lielāka starp HIV inficētām personām nekā populācijā kopumā [146]. Pēc antiretrovirālās terapijas saņemšanas samazinās HIV replikācija, kam seko CD4+ un CD8+ šūnu skaita pieaugums. Normalizējas B-limfocītu funkcija un atjaunojas imunoloģiskā kontrole, kā rezultātā samazinās arī ar HIV-asociēto

ļaudabīgo audzēju skaits. Novēro arī audzēju regresiju un labākus dzīvildzes rezultātus [145].

Pētījuma rezultāti pacientiem ar mutes dobuma karcinomu un siekaldziedzeru audzējiem ar palielinātiem antivielu titriem dod papildu informāciju, lai izvērtētu iespējamo orofaringeālo audzēju saistību ar EBV infekciju. Palielināti antivielu titri pret EBV un latentā EBV infekcija tika konstatēti 80% izmeklēto mutes dobuma karcinomas gadījumos. Vienā labdabīgā siekaldziedzeru limfoepiteliālā bojājuma gadījumā mēs nekonstatējām palielinātus EBV antivielu titrus. Netika atrasta arī LMP1 ekspresija. Pārējos gadījumos tā bija ļoti variabla. Literatūrā minēts, ka LMP1 ekspresija EBV-pozitīvos audzējos variē no 19% līdz 65% [42, 44, 99]. Palielināti VCA IgG titri tika atrasti mutes pamatnes un pieauss siekaldziedzera plakanšūnu karcinomās, kā arī limfoepiteliālas karcinomas gadījumos. Mūsu pētījuma rezultāti liecina, ka palielināti EBV titri, LMP1 ekspresija un EBV DNS mutes pamatnes karcinomās un NFK ir audzēju III un IV stadijā. Pētījuma populācija ir nav tik liela, lai viennozīmīgi demonstrētu EBV līdzdalību audzēju attīstībā, bet EBV koinfekcija pastāv visos audzēja III-IV stadiju gadījumos. Nelielai pacientu grupai ar siekaldziedzeru audzēju tika konstatēta LMP1 ekspresija audzēju audos. Izņemot vienu pacientu, pārējiem tā bija negatīva. Pētot jaunākos literatūras avotus, noskaidrojām, ka LMP1 onkoproteīna ekspresija nav sevišķi jutīgs rādītājs attiecībā uz EBV infekciju [148, 149]. Turpinot savus pētījumus, mutes dobuma karcinomu gadījumos EBV DNS noteicām ar PĶR, it īpaši peritonsilārajā rajonā, kas saskan ar *Jiang et al.* (2008) datiem [150]. Papildinot LMP1 imūnohistokīmijas datus, konstatējām, ka EBV DNS ir atrasta audzējos, kuros iepriekš bija novērota ievērojama LMP1 ekspresija. Tādējādi mūsu rezultāti raksturo LMP1 imūnekspressiju kā informatīvu attiecībā uz EBV infekciju audzēju audos. Šo hipotēzi atbalsta arī fakts, ka LMP1 ekspresija nav novērota veselos audos [151].

Kā jau tika minēts, CD44 molekulu raksturo šūnu adhēzijas, migrācijas un augšanas regulācijas spējas [152-154]. Šīs unikālās īpašības varētu izmantot īpaši sarežģītos klīniskos gadījumos, pētot audzēju disemināciju. Ir jāatzīst, ka no klīniskā viedokļa lielāko daļu metastātisko audzēju var uzskatīt par inkurabliem [155]. Šajā gadījumā, attīstoties onkolītiskai vīrusterapijai, rodas iespēja šo situāciju mainīt [156]. Pievienojot vīrusterapiju onkoloģisko slimnieku kombinētajai terapijai (staru, ķīmijterapija), ir iespējams uzlabot pacientu dzīvildzes rādītājus [157, 158]. Klīniskais pielietojums tiek balstīts uz vīrusu spējām atšķirt ļaundabīgi transformētās šūnas no veselām šūnām un tieši inficēt ļaundabīgi transformētās šūnas, kā rezultātā notiek

citolīze [159]. Vīrusu darbība ir divējāda – pirmkārt, pēc vīrusu specifiskas replikācijas notiek tieša šūnas iznīcināšana un, otrkārt, audzēja šūnas ģenētiska modificēšana, kad vīruss inkorporē antineoplastiskos gēnus, darbojoties kā ģenētiski modificēts vektors. Papildus tam vīrusa darbība arī tieši stimulē antineoplastisko imunitāti [160].

Cruz et al. (2000) pētījuma rezultāti demonstrē, ka EBV nav ietekmes uz orofaringeālo audzēju veidošanu [161]. Saskaņā ar to ir jāmeklē vēl kāds ceļš, kā iedarboties uz audzēju, izmantojot imunoloģisko sistēmu. Ir pierādīts, ka interferons ir klīniski efektīvs antivirāls un antineoplastisks preparāts, kuru lieto jau vairāk nekā 16 gadus [162]. Caur virkni citokīnu un to receptoru interferons regulē un vada imunoloģisko atbildi. Tas stimulē iedzimto celulāro imūnsistēmas atbildi, piedaloties tās pārveidošanā, efektīvi iegūtā jeb adaptīvā reakcijā. Interferons vada CD8⁺ šūnu darbību un uztur CD4⁺ palīgšūnu populāciju līdzsvaru [162].

Interferonam alfa ir nozīmīga loma audzēja augšanas kontrolē, ietekmējot CD8⁺ atmiņas šūnu proliferāciju. MHC antigēna ekspresijas traucējums ir onkoģenēzes un metastazēšanās spēju svarīgākais moments [162]. Lielākā audzēju šūnu daļa demonstrēja daļēju vai pilnīgu MHC antigēna zudumu uz šūnu virsmas. *Mesquita et al.* (2009) ar imūnhistoķīmijas palīdzību ir izpētījis dendrītisko šūnu izvietojumu mutes dobuma limfomās [163]. Ļaundabīgā audzēja ietekmes rezultātā antigenprezentējošo dendrītisko šūnu skaits audzējos ir samazināts, un tam seko T limfocītu aktivitātes trūkums. Audzēja šūnas spēj ekspresēt NK šūnu inhibējošo receptoru, kas negatīvi ietekmē citotoksisko imūnsistēmas atbildi. Onkoloģiskiem pacientiem ir zems vai nenosakāms citotoksisko T limfocītu skaits perifēriskajās asinīs. Antineoplastiskās terapijas mērķis ir samazināt imunoloģisko novirzi, pastiprinot MHC gēnu ekspresiju audzēju šūnās. Ir arī jāatceras, ka antineoplastisko efektu uztur un nodrošina ne tikai citotoksiskie T limfocīti, bet arī NK šūnas un makrofāgi. Metastāžu veidošanā piedalās citokīni un hemokīni, kurus izdala audzēja šūnas. Neoplastiskās šūnas maldina antigēnspecifiskas imūnsistēmas šūnas ar citokīnu signāliem [11]. Ir pretējas korelācijas starp interferona ekspresiju audzēja limfocītos un slimības stadiju [162]. Savukārt ģenētiski modificēto audzēju specifisku vīrusu radīšana ir onkolītiskās vīrusterapijas attīstības stūrakmens.

Savā darbā mēs analizējām siekaldziedzeru audzējus, kuri ir atsevišķa galvas un kakla audzēju grupa, un ir 2-6,5% no visiem galvas un kakla audzējiem. Audzēju sastopamības biežumu raksturo ģeogrāfiskās un etniskās variācijas. Siekaldziedzeru audzējiem ir izteikta morfoloģiskā dažādība – un vienā un tajā pašā audzēja masā var

atrast morfoloģiski dažādas audzēja šūnas [86]. Daudzos literatūras avotos [163-173] ir aprakstītas korelācijas starp audzēja šūnu proliferācijas intensitāti, slimības prognozi un metastazēšanās iespējām ļaundabīgo siekalu dziedzeru audzēju gadījumos, bet ir tikai daži raksti par labdabīgo siekalu dziedzeru audzēju klīnisko gaitu [92, 93, 174, 175].

Mūsu pētījuma retrospektīvajā daļā tika iekļauti dati par Latvijas Onkoloģijas centra galvas un kakla ķirurģijas nodaļā 1996.-2007.gadā ārstētajiem pacientiem ar labdabīgiem siekalu dziedzeru audzējiem. Mēs noskaidrojām, ka daudzu gadu laikā saslimstība ar labdabīgiem audzējiem bija diezgan stabila, bez izteiktām svārstībām. Pētījumā iegūtie dati reprezentē situāciju visā Latvijas populācijā. Visbiežāk sastopamā lokalizācija bija pieauss siekaldziedzera labdabīgi audzēji (85% visu labdabīgo siekaldziedzera audzēju), otra biežākā lokalizācija bija zemžokļa siekaldziedzera labdabīgi audzēji (11%), bet trešā – aukslēju mazo siekaldziedzera labdabīgi audzēji (4%).

Pieauss siekalu dziedzera pleomorfā adenoma pēc mūsu datiem bija biežākais siekalu dziedzeru labdabīgs audzējs Latvijas populācijā, un tā veido 75% no visiem siekalu dziedzeru labdabīgiem audzējiem. Citu autoru pētījumos šie dati variē no 33% līdz 70% no visu audzēju kopskaita un, no 70,6% līdz 90% no labdabīgo audzēju kopskaita [92-100]. Lielajās Eiropas un Amerikas populācijās ir līdzīga statistika. Atbilstoši šo datu ziņām siekalu dziedzera pleomorfas adenomas incidence Slovērijā [171] un Itālijā [164] ir 53,9% un 57,3% attiecīgi, Brazīlijas populācijā [165] – 54,2%, bet Irānā ir nedaudz augstāka – 65,4% [167]. Toties ASV Klusā okeāna reģionos incidence ir zemāka – tikai 39,2% [167].

Kā iepriekš tika minēts, labdabīgie siekaldziedzera audzējus biežāk novēro sievietēm [170] – ārstēto sieviešu skaits divkārt pārsniedza ārstēto vīriešu skaitu (attiecīgi 1,9:1). Šī atrade korelē ar citu autoru darbiem, kuri secināja, ka siekaldziedzera labdabīgie audzēji ir biežāk sastopami sievietēm – ziņojumos minētas tādas vīriešu un sieviešu skaita attiecības kā 1:1,02 [164] un 1:2,0 [167]. Lielākajā daļā publikāciju par pētījumiem, kuros bija iekļauti pacienti no dažādiem ģeogrāfiskiem reģioniem, sniegtie dati liecina par saslimstības prevalēšanu sieviešu populācijā [165, 170, 171, 176, 177, 178]. Mūsu pētījums papildina Eiropas pētnieku datus par pleomorfas adenomas incidenci [166, 170, 171].

Mēs noteicām, ka siekaldziedzera labdabīgos audzējus biežāk sastop sievietēm 50-60 gadu vecumā, bet vīriešiem 70-80 gadu vecumā. Šie rezultāti ir līdzīgi citu autoru pētījumiem [164, 168, 172]. Pētījuma gaitā iegūtie klīniski dati liecina, ka biežākie

labdabīgo siekaldziedzeru audzēju izmēri bija 1-3 cm, bet nākamais biežākais lielums bija 3-5 cm.

Ārstēšanās uzsākšanas laikā lielākās labdabīgo siekaldziedzeru audzēju daļas persistence bija 1-3 gadi. Šie dati par audzēju lielumu un slimības ilgumu kopumā atbilst literatūras datiem [51].

Ki-67 imūnreaktivitāte tiek plaši lietota cilvēka ļaundabīgo audzēju, t.sk. siekaldziedzeru karcinomu, analizēšanā [92, 93, 95, 179, 180]. Tā, piemēram, *Skalovas et al.* (1994) [95] pētījumā norādīts, ka nevienam no pacientiem ar zemu MIB-1 ekspresiju ilgstošā laika periodā neattīstījās acinozo šūnu karcinomas recidīvs. Dažos rakstos Ki-67 ekspresija tika analizēta retos un īpašu lokalizāciju audzējos [91]. *Alves et al.* (2004) [94] pierādīja, ka Ki-67 ekspresija bija par 5% mazāka pleomorfās adenomas gadījumā, rēķinot uz 1000 šūnām. Citas publikācijas liecina, ka Ki-67 ekspresijas vērtības ir lielākas liela izmēra audzējos un recidīvu gadījumos [93, 166]. *Luka et al.* (2006) [166] pētījumā, kur siekalu dziedzeru audzēja šūnu proliferācijas pakāpe tika noteikta kā Ki-67/mm² rādītājs, tas tiek uzskatīts par vērtīgu audzēja klīniskās gaitas indikatoru. Tiek turpināti arī pētījumi saistībā ar jaunu jūtīgu proliferācijas marķieru radīšanu, kurus varētu izmantot dažādu siekalu dziedzeru audzēju diferenciāldiagnostikā. Tajā pašā laikā Ki-67 olbaltums ir plaši aprakstīts molekulārā līmenī un intensīvi izziņāts dažādos pētījumos, kautgan tā funkcionālā nozīme pilnībā vēl nav nodefinēta.

Jāatzīmē, ka Ki-67 marķieris kā prognostiskais faktors primārai un recidivējošai pleomorfai adenomai ar plašu histopatoloģisko un klīniskās gaitas variabilitāti, līdz šim nav pētīts. Mūsu pētījuma rezultāti liecina, ka Ki-67 proliferācijas marķiera parādīšanās stromā un tā pieaugums recidivējošas pleomorfas adenomas gadījumos var būt atbildīgs par agresīvo klīnisko gaitu.

Mūsu pētījums paplašina mūsu zināšanas par siekalu dziedzeru pleomorfās adenomas struktūru un to nozīmīgumu klīniskajā praksē. Analizējot labdabīgos siekalu dziedzeru audzējus, it īpaši recidivējošos audzējus, klīniskos datus ir jāpapildina ar audzēju šūnu proliferācijas intensitātes noteikšanu, pielietojot imūnhistoķīmiskos marķierus. Nākamie prospektīvie pētījumi ir nepieciešami. Lai prognozētu šūnu proliferācijas marķieru vērtību, slimību gaitu un recidīvus, vajadzētu šos pētījumus turpināt izmantojot lielas pacientu populācijas.

Veiktais pētījums apstiprina, ka saslimstības ar labdabīgiem siekaldziedzeru audzējiem biežums Latvijas populācijā ir līdzīgs kopējam saslimstības biežumam

pārējās Eiropas valstīs, tomēr Latvijā mēreni prevalē sieviešu saslimstība (vidēji izteikta tendence). Biežāk novēro pieauss siekalu dziedzeru labdabīgos audzējus, no tiem ievērojami biežāk sastopama pleomorfa adenoma; tai seko adenolimfoma un dažāda tipa monomorfās adenomas. Šūnu uzbūves dažādība pleomorfas adenomas gadījumos izpaužas ar izteiktām variācijām šūnu proliferācijas intensitātē, ko atspoguļo Ki-67 ekspresijas līmenis. Lai precizētu stromas komponentu lomu recidivējošā un atkārtoti recidivējošā pleomorfajā adenomā, nākamajiem patoloģiskajiem un imūnhistoķīmiskajiem datiem jābūt apkopotiem atbilstošos klīniskos un patoloģiskos pētījumos.

Runājot par parafaringeālo telpu audzēju operāciju un ar to saistīto komplikāciju analīzi, varam secināt, ka primārie parafaringeālie audzēji ir relatīvi reti sastopami un ir lokalizēti komplicētā anatomiskā apvidū. Klīniskās izpausmes šiem audzējiem var būt maskētas [181, 182]. Parafaringeālie siekalu dziedzeru audzēji ir biežākā audzēju grupa un parasti to novēro prestiloidajā rajonā. Ārstēšanās standarts parafaringeālās telpas audzējiem ir ķirurģiskā ekscīzija [183]. Transcervikāli transparotideālā pieeja ir biežākā un to lieto vairums ķirurgu. Transorāla pieeja tiek lietota ļoti reti ar to saistīto komplikāciju un neradikalitātes dēļ.

“Pirmā kodiena sindroms” ir biežākā komplikācija, kas ir saistīta ar pieauss siekalu dziedzeru simpatiskās inervācijas mehānisko bojājumu operācijas laikā [184]. Pieauss siekalu dziedzeru mioepiteliālās šūnas veic supramaksimālu kontrakciju, iedarbojoties ēdiena stimuliem, izraisot izplešanās tipa sāpes vai diskomfortu. *Costa et al.* (2012) nesen ir aprakstījis, ka A tipa botulīna toksīns (*botulin toxin type A*) veiksmīgi atrisina šīs komplikācijas izpausmes [184].

Saskaņā ar literatūras datiem pēcoperācijas kraniālo nervu funkciju traucējumu risks variē no 11-57% [71, 72, 183], ar augstākiem rādītājiem pētījumos, kur ir daudz ļaundabīgo un neiroģēnas dabas audzēju. Izolēts kraniālā nerva bojājums nerada izteiktus funkcionālus traucējumus.

Intraoperatīvā sejas nerva pārdalīšana ir vislabāk kompensējama ar nerva graftu primārās ķirurģijas laikā. Nepieciešamo acu aizsardzību veido ar t.s. zelta plātnītes implantāciju pēcoperācijas periodā.

Lielākā daļa pacientu izolētu, unilaterālo *n.vagus* bojājumu panes labi, bet ja bojājums ir lokalizēts augstāk vai kombinējas ar *n.glossopharyngeus* vai *n.hypoglossus* bojājumiem, var rasties būtiskas problēmas ar rīšanu un pastāv aspirācijas risks. Pacienta rīšanas funkcijai ir jābūt rūpīgi izvērtētai pirms perorālas barošanas

uzsākšanas. Ja rīšana ir stipri traucēta, ir alternatīvas metodes šīs problēmas risināšanai, tai skaitā nazogastrāla barošana vai PEG [78].

Gados vecāki pacienti vai pacienti ar multipliem kraniālo nervu bojājumiem būs riska grupā iespējamo rīšanas problēmu dēļ. Ja rīšanas traucējumu rehabilitācija ir ieilgusi, tad indicēta gastrostomijas caurule. Savukārt pacientiem ar mutes dobuma sekrētu norīšanas problēmām tiek indicēta traheostomija, lai pasargātu elpošanas ceļus no aspirācijas.

N.accessories funkcionālus traucējumus pēcoperācijas periodā var novērst pielietojot fizioterapiju.

Pēc *Khafif et al.* (2005), ja ir nepieciešama *n.accessorius* intraoperatīva pārdalīšana, vislabākā rehabilitācija ir nerva graftēšanas procedūras veikšana operācijas laikā, tā daļēji saglabājot nerva funkciju [72].

Hornera sindroms ir kakla simpātiskās ķēdītes bojājuma rezultāts un izpaužas kā ahidroze, kas tiek ārstēta simptomātiski.

Tā kā primārie parafaringeālie audzēji ir reti sastopami, literatūrā ir maz kohortas tipa pētījumu. *Shahab et al.* (2005) ir nopublicējis 114 parafaringeālo audzēju gadījumu, kuri tika operēti 27 gadu laikā [78]. Otrs lielākais pētījums ir *Som et al.* (1984), kurā tika izanalizēti 104 gadījumi [183].

Pēc literatūras datiem [70, 71, 74], paragangliomas recidivē 5% gadījumos, bet 10% paragangliomas ir multicentriskas. Ja ģimenes anamnēzē ir dati par paragangliomu, risks, ka pacientam attīstīsies multicentriskais audzējs, ir 35%. Neoperētu paragangliomu gadījumā malignas transformācijas risks ir apmēram 10%, un klīniski to atspoguļo sen persistējošā audzēja straujā augšana [71]. Pirms operācijas pacientiem ar aizdomām par paragangliomu vai *glomus catoticum* audzējiem ir jāveic kateholamīnu testēšana [85].

Parafaringeālas telpas ļaundabīgie audzēji recidivē daudz biežāk (25-77%), un recidivēšanas biežums ir atkarīgs no audzēju histoloģijas, ķirurģiskās ārstēšanas apjoma novērošanas ilguma [72]. Fibrosarkomas ir biežākais sarkomas veids šajā lokalizācijā. [85].

Pēcoperācijas staru terapijas pielietošana parafaringeālo audzēju gadījumos ir ierobežota, jo nav lielu pētījumu par parafaringeālo audzēju apstarošanu [72, 78].

5 un 10 gadu dzīvildze labdabīgiem parafaringeāliem audzējiem ir 100%. Ļaundabīgo audzēju gadījumos 5 gadu dzīvildze ir 93%, un 10 gadu dzīvildze ir 57%. Šie dati liecina, ka pacientiem ar labdabīgiem parafaringeāliem audzējiem dzīvildze

netiek ietekmēta, tādēļ ķirurģiskajām indikācijām ir jābūt rūpīgi un individuāli izvērtētām. Lai gan operācija ir parafaringeālo audzēju ārstēšanas zelta standarts, riska pacientiem staru terapija varētu būt alternatīva ārstēšanas metode.

Mandibulotomija tiek rekomendēta vaskulāro audzēju gadījumos, kas izplatās parafaringeālās telpas augšējā daļā, kā arī ļaundabīgo audzēju gadījumos, kas izplatās uz galvaskausa pamatni [81, 82, 84, 187, 188].

Vaskulāro audzēju embolizāciju veic, lai samazinātu asins zudumus, parafaringeālo vaskulāro audzēja disekcijas laikā, kā arī rekomendē audzējiem, kas ir lielāki par 3 cm un kuru barojošie asinsvadi ir identificējami angiogrāfijas laikā [77, 183]. Paragangliomu gadījumos embolizācijas indikācijas ir pretrunīgas [72, 183]. *Glomus vagal* audzējiem reti kad ir viens barojošs asinsvads, *glomus caroticum* audzējiem embolizācija var izprovocēt iekaisuma reakciju, bet disekcijas laikā – asiņošanu zem adventīcijas. Pastāv risks, ka embolizācija var traucēt kraniālo nervu asins apgādi. Ja ir veicama embolizācija, tad to izdara 24 stundas pirms veidojuma rezekcijas [183].

Costa et al. (2012) publikācijā demonstrēja, ka tādi faktori, kā pacientu vecums un audzēju daudzums ir saistīti ar neiroloģisko bojājumu, un dažos gadījumos novērošana dinamikā ir labākā stratēģija tehniski rezecējamiem audzējiem [184].

Ir svarīgi izvairīties no bilaterālā kraniālo nervu bojājuma pacientiem ar multipliem audzējiem anamnēzē, it īpaši *n.vagus*, *n.hypoglossus*. Audzēja lēna augšana (1mm gadā) ir arguments, kas lika izvēlēties novērošanas taktiku labdabīgiem parafaringeālās telpas audzējiem, ir [74].

5. SECINĀJUMI

1. Labdabīgie siekaldziedzeru audzēji Latvijas populācijā ir sastopami gandrīz tikpat bieži kā citās Eiropas valstīs, bet atšķirībā no tām Latvijā mēreni prevalē sieviešu saslimstība. Toties mutes dobuma un orofaringeālie audzēji, it īpaši vēlīnās stadijās, Latvijā ir sastopami biežāk nekā citās valstīs.
2. Ki-67 proliferācijas marķiera parādīšanās un tā ekspresijas pieaugums recidivējošas pleomorfās adenomas stromālajā komponentā var būt saistīts ar audzēja agresīvo klīnisko gaitu.
3. Parafaringeālo audzēju ķirurģiskajām indikācijām ir jābūt rūpīgi un individuāli izvērtētām. Lai gan operācija ir ārstēšanas pamatstandarts, staru terapija var būt alternatīva ārstēšanas metode riska pacientiem.
4. Šūnas virsmas CD44 hialuronāta receptora ekspresija uz mutes dobuma un nazofaringeālajām audzēja šūnām, limfocītiem un makrofāgiem EBV infekcijas gadījumā pacientiem ar plakanšūnu vēzi un NFK liecina par šīs molekulas nozīmi EBV infekcijas izplatīšanā un minēto audzēju patoģenēzē.
5. EBV infekcija ir neoplasmas pavadoša patoloģija, tā sastopama visos izplatītāko oronazofaringeālo audzēju gadījumos, par to liecina palielināti EBV titri, izteikta LMP1 ekspresija un EBV DNS atrade pacientiem ar šiem audzējiem III un IV stadijā. Acīmredzami prevalē EBV-pozitīva mutes dobuma plakanšūnu karcinoma.
6. EBV, HHV-6 un HHV-7 DNS ir konstatēta siekaldziedzeru, mutes dobuma un nazofaringeālā reģiona audzēju audos – šī atrade liecina par iespējamo vīrusu līdzdalību oronazofaringeālo karcinomu attīstībā. Pētījuma rezultāti liecina par nepieciešamību veikt divas paralēlas vīrusa DNS izmeklēšanas – audzēja audos un kā kontroli mutes dobuma veselās gļotādas rajonā, lai precizētu beta- un gamma-herpes vīrusu nozīmi audzēju attīstībā.
7. Elektronmikroskopija papildina klīniski laboratoriskās, molekulārās virusoloģijas un citas morfoloģiskās izmeklēšanas metodes, sniedzot papildu informāciju par herpes vīrusu noteikšanas iespējām un šūnu ultrastruktūru siekaldziedzeru, mutes dobuma un nazofaringeālo audzēju audos.

6. PRAKTISKĀS REKOMENDĀCIJAS

1. Siekaldziedzeru recidivējošas pleomorfas adenomas gadījumā ieteicams noteikt audzēju šūnu proliferācijas marķieri un novērtēt Ki-67 marķiera ekspresijas pieaugumu stromas komponentā kā agresīvas klīniskas gaitas prognostisko faktoru.
2. Par pamatotu uzskatāma morfoloģisko un virusoloģisko diagnostikas metožu kompleksa lietošana atsevišķu mutes dobuma un nazofaringeālo audzēju gadījumos beta- un gamma-herpes grupas vīrusu identifikācijai.
3. Ja pierādīta herpes grupas vīrusu klātbūtne dažādos mutes dobuma un nazofaringeālos audzējos, ir apsverams antivirālās terapijas lietošanas lietderīgums, plānojot kombinēto terapiju pacientiem.

Nākotnes perspektīvas

Ņemot vērā mūsu darba rezultātus par EBV, HHV6 un HHV7 DNS klātbūtni oronazofaringeālo audzēju audos, var izteikt pieņēmumu, ka nākotnē ģenētiski modificētu vīrusu, inficējot audzēja mērķšūnu un izraisot tās citolīzi, būs iespējams izmantot ļaundabīgu audzēju ārstēšanā.

7. LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Jerjes W, Upile T, Petrie A, Riskalla A, Hamdoon Z, Vourvachis M, et al. Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. *Head Neck Oncol* 2010; 20(4); 2-9.
2. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: IARC Press. 2005; 83-106.
3. Baltiņa D, Baltiņš M, Doniņa S, Emziņš D, Gordins S, Krūmiņš V, Kudaba I, Pavāre I, Siliņš I, Strebnijs A, Stengrēvics A, Tārs J, Zītare I, Zvaigznīte M. *Klīniskā onkoloģija*. Rīga: Zvaigzne ABC. 1999; 128-180.
4. Scully C, Bagan JV. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implication. *Oral Diseases* 2009; 15:388-399.
5. Slootweg PJ, Eveson JW. Tumour of oral cavity and oropharynx. In: L. Barnes, J.W. Eveson, P. Reichart, D. Sidransky, editors. *WHO Classification of Tumours Pathology&Genetics Head and Neck Tumours*, IARC Press Lyon, 2005, pp. 166-180.
6. Edelman D. Human herpesvirus 8 – A novel human pathogen. *Virol J* 2005, 2:78 doi:10.1186/1743-422X-2-78.
7. Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:757-768.
8. Shimakage M, Horii K, Tempaku A, Kakudo K, Shirasaka T, Sasagawa T. Association of Epstein-Barr virus with oral cancers. *Hum Pathol* 2002; 33:608-614.
9. Young LS, Murray PG. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* 2003; 22:5108-5121.
10. Gulley ML. Molecular Diagnosis of Epstein-Barr Virus-Related Diseases. *J Mol Diag* 2001; 3:1-10.
11. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70.
12. Salahuddin S, Ablashi D, Markham P, Josephs S, Sturzenegger S, Kaplan M, Halligan G, Biberfeld P et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* 1986; 234: 596-601.
13. Arbuckle JH, Medveczky PG. The molecular biology of human herpesvirus-6 latency and telomere integration. *Microbes and Infection* 2011; 13(8):731-41.
14. Reeves WC, Stamey FR, Black JB, Mawle AC, Stewart JA, Pellett PE. Human Herpesviruses 6 and 7 in Chronic Fatigue Syndrome: A Case-Control Study. *Clin Inf Dis* 2000; 31(1):48-52.
15. Caselli E, Di Luca D. Molecular Biology and Clinical Associations of Roseoloviruses

- Human Herpesvirus 6 and Human Herpesvirus 7. *New Microbiologica* 2007; 30(3):173-187.
16. Frenkel N, Schirmer EC, Wyatt LS, Katsafanas G, Roffman E, Danovich RM, June CH. Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells. *Proc Nat Acad Sci. USA.* 1990; 87(2):748-752.
 17. Jackson MA, Sommerauer JF. Human Herpesviruses 6 and 7. *Pediatric Infectious Dis J* 2002; 21(6):565-566.
 18. Clark DA. Human Herpesvirus 6 and Human Herpesvirus 7: Emerging Pathogens in Transplant Patients. *Int J Hematology* 2002; 76:246-252.
 19. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 1994; 16:1865-1869.
 20. Chapenko S, Krumina A, Kozireva S, Nora Z, Slutanova A, Viksna L, Murovska. Activation of human herpesviruses 6 and 7 in patients with chronic fatigue syndrome. *J Clinical Virol* 2006; 37 Suppl.1 S47-S51.
 21. Sada E, Yasukawa M., Ito C, Takeda A, ShiosakaT, Tanioka H, Fujita S. Detection of human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 in the submandibular gland, parotid gland, and lip salivary gland by PCR. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2320-2321.
 22. Lorenzini S, Andreone P, Gramenzi A, Morelli C, Zinzani PL, Grazi GL. Posttransplant Lymphoproliferative Disorders in Liver transplanted patients: A Report of Four Cases. *Transpl Proc* 2006; 38:1477-1480.
 23. Yancoski J, Danielian S, Ibariez J, Turconi A, Cuarterolo M, Zelazko M, Niesters M, Hubert GM. Quantification of Epstein-Barr virus load in Argentinean transplant recipients using real-time PCR. *J Clin Virol* 2004; 31:58-65.
 24. Sankaran-Walters S, Ransibrahmanakul K, Grishina I, Hung J, Martinez E, Prindiville T, Dandekar S. Epstein-Barr virus replication linked to B cell proliferation in inflamed areas of colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Virol* 2011; 50:31-36.
 25. Bagan J, Jimenez Y, Murillo J, Poveda R, Diaz J, Gavalda C, et al. Epstein-Barr virus in oral proliferative verrucous leukoplakia and squamous cell carcinoma: A preliminary study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008; 13:110-113.
 26. Grinstein S, Preciado MV, Gattuso P, Chabay PA, Warren WH, Matteo E, Gould V. Demonstration of Epstein-Barr Virus in Carcinomas of Various Sites. *Cancer Res* 2002; 62:4876-4878.
 27. Benders AA, Tang W, Jaap M, Middeldorp K, Astrid EG, Leigh B, Thorne LB. Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 is not Associated with Vessel Density nor with Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Expression in Nasopharyngeal Carcinoma Tissue.

- Head and Neck Pathol 2009; 3:276-282.
28. Tugizov S, Herrera R, Velupillai P, Greenspan J, Greenspan D, Palefsky JM. Epstein-Barr Virus (EBV)- Infected Monocytes Facilitate Dissemination of EBV within the Oral Mucosal Epithelium. *J Virol* 2007; 81:5484-5496.
 29. Walling DM, Ray AJ, Nichols JE, Flait CM, Nichols CM. Epstein-Barr Virus Infection of Langerhans Cell Precursors as a Mechanism of Oral Epithelial Entry, Persistence, and Reactivation. *J Virol* 2007; 81:7249-7268.
 30. Sand LP, Jalouli J, Larsson PA, Hirsch JM. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma, oral lichen planus, and normal oral mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 93:586-592.
 31. Margaret L, Tang W, Tang G. The Laboratory Assays for Epstein-Barr virus Related Disease. *J Mol Diagnostics* 2008; 13:25-31.
 32. Walling DM, Flaitz CM, Nichols CM, Hudnall SD, Adler-Storthz K. Persistent Productive Epstein-Barr Virus Replication in Normal Epithelial Cells In Vivo. *J Infect Dis* 2001; 184:1499-1507.
 33. Lo KW, To KF, Huang DP. Focus on nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Cell* 2004; 5:423-428.
 34. González X, Correnti M, Rivera H, Perrone M. Epstein Barr Virus detection and latent membrane protein 1 in oral hairy leukoplakia in HIV + Venezuelan patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010; 15:297-302.
 35. Kis A, Fehér E, Gáll T, Tar I, Boda R, Tóth ED. Epstein-Barr virus prevalence in oral squamous cell cancer and in potentially malignant oral disorders in an eastern Hungarian population. *Eur J Oral Sci* 2009; 117:536-540.
 36. Horiuchi K, Mishima K, Ichijima K, Sugimura M, Ishida T, Kirita T. Epstein-Barr virus in the proliferative disease of squamous epithelium in the oral cavity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Radiol Endod* 1995; 79:57-63.
 37. Hausen H, Schulte-Holthausen H, Klein G, Henle W, Henle G, Clifford P. EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinoma of the nasopharynx. *Nature* 1970; 228:1056-1058.
 38. Kobayashi I, Shima K, Saito I, Kiyoshima T, Matsuo K, Ozeki S. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 1999; 189:34-39.
 39. González-Moles M, Gutiérrez J, Ruiz I, Fernández JA, Rodríguez M, Aneiros J. Epstein-Barr virus and oral squamous cell carcinoma in patients without HIV infection: viral detection by polymerase chain reaction. *Microbios* 1998; 96:23-31.
 40. Lawrence S, Rickinsons B. Role of Epstein-Barr virus in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Nature Rev Cancer* 2004; 4:757-768.
 41. Shao JY, Li YH, Gao HY, Wu QL, Cui NJ, Zhang L, et al. Comparison of plasma

- Epstein-Barr virus (EBV) DNA levels and serum EBV immunoglobulin A/virus capsid antigen antibody titers in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 2004; 100(6):1162-1170.
42. Houali K, Wang X, Shimizu Y, Djennaoui D, Nicholls J, Fiorini S. New Diagnostic Marker for Secreted Epstein - Barr virus Encoded LMP1 and BARF1 Oncoproteins in the Serum and Saliva of Patients with Nasopharyngeal Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13:4993-5000.
 43. Zheng H, Li LL, Hu DS, et al. Role of Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 in the carcinogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Cell Mol Immunol* 2007; 4:185-196.
 44. Gonzalez-Moles M, Gutiérrez J, Rodriguez M, Ruiz-Avila I, Fernández JA, Rodriguez-Archilla A. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP-1) expression in oral squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2002; 112:482-487.
 45. Corso B, Eversole LR, Hutt-Fletcher L. Hairy leukoplakia: Epstein-Barr virus receptors on oral keratinocyte plasma membranes. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology* 1989; 67:416-421.
 46. Larbcharoensub N, Cert NT, Praneetvatakul V, Pongtippan A, Leopairat J, Sirikulchayanonta V. Epstein-Barr Virus Associated Lymphoepithelial Carcinoma of the Parotid Gland; A Clinicopathological Report of Three Cases. *J Med Assoc Thai* 2006; 89:1536-1541.
 47. Nagao T, Ishida Y, Sugano I, Tajima Y, Matsuzaki O, Hino T, et al. Epstein-Barr virus-associated undifferentiated carcinoma with lymphoid stroma of the salivary gland in Japanese patients. Comparison with benign lymphoepithelial lesion. *Cancer* 1996; 78:695-703.
 48. Huang DP, Ng HK, Ho YH, Chan KM. Epstein-Barr virus (EBV)-associated undifferentiated carcinoma of the parotid gland. *Histopathology* 1988; 13:509-517.
 49. Sánchez-García I. The Crossroads of Oncogenesis and Metastasis. *N Engl J Med* 2009; (1)360:297-299. 15, 2009DOI: 10.1056
 50. Raab-Traub N, Rajadurai P, Flynn K, Lanier A. Epstein-Barr virus infection in carcinoma of the salivary gland. *J Virol* 1991; 65:7032-7036.
 51. Seifert G, Miehke A, Haubrich J, Chilla R. Diseases of the salivary glands. Stuttgart: Georg Thieme Verlag Thieme Inc 1986; pp.182-222.
 52. Auclair PL, Ellis GL, Gnepp DR, Wenig BM, Janney CG. Salivary gland neoplasms: general considerations. In: Ellis GL, Auclair PL, Gnepp DR, eds *Surgical Pathology of the Salivary Glands*, Philadelphia: W.B. Saunders Co 1991; pp. 135–164.
 53. Shannon-Lowe C, Rowe M. Epstein-Barr Virus Infection of Polarized Epithelial Cells via the Basolateral Surface by Memory B Cell-Mediated Transfer Infection. *PLoS Pathog.*

- 2011;7(5):e1001338.
54. Georgolios A, Batistatou A, Charalabopoulos A, et al. The role of CD44 adhesion molecule in oral cavity cancer. *Exp Oncol* 2006; 28:94-98.
 55. Goldenberg D, Benoit NE, Begum S, Westra WH, Cohen Y, Koch WM. Epstein-Barr virus in head and neck cancer assessed by quantitative polymerase chain reaction. *Laryngoscope* 2004; 114:1027-1031.
 56. Gonzalez-Moles M, Bravo M, Ruiz-Avila I, Esteban F, Rodriguez-Archilla A, Gonzalez-Moles S, Arias B. Adhesion molecule CD44 as a prognostic factor in tongue cancer. *Anticancer Res* 2003; 23:5197-5202.
 57. Gonzalez-Moles M, Bravo M, Ruiz-Avila I, et al. Adhesion molecule CD44 expression in non-tumour epithelium adjacent to tongue cancer. *Oral Oncol* 2004; 40:281-286.
 58. Negishi A, Mogi K, Yamaguchi T. Histopathological study on the distribution of Langerhans Cells in Oral Mucosa. *Kitakanto Med J* 2007; 57:307-310.
 59. Van Weering DH, Baas PD, Bos JL. PCR-based method for the analysis of human CD44 splice products. *PCR Methods Appl* 1993; 3:100-106.
 60. Carinci F, Stabellini G, Calvitti M, et al. CD44 as prognostic factor in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Craniofac Surg* 2002; 13:85-89.
 61. Özer E, Kuyucuo-Lu F. Correlation of CD44 expression with prognostic factors in oral squamous carcinoma. *Eastern J Med* 1999; 4:61-64.
 62. Cruz I, Van Der Brule AJC, Steenbergen RDN, Snijders PJF, Meijer CJL, Walboomers JM. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinomas, premalignant lesions and normal mucosa. A study using the polymerase chain reaction. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1997; 33:182-188.
 63. Mao EJ, Smith CJ. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) DNA by the polymerase chain reaction (PCR) in oral smears from healthy individuals and patients with squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1993; 22:12-17.
 64. Assimakopoulos D, Kolettas E, Patrikakos G, Evangelou A. The role of CD44 in the development and prognosis of head and neck squamous cell carcinomas. *Histol Histopathol* 2002; 17:1269-1281.
 65. Mendenhall WM, Mendenhall CM, Werning JW, Malyapa RS, Mendenhall NP. Salivary gland pleomorphic adenoma. *Am J Clin Oncol* 2008; 31:95-99.
 66. Dalati T, Hussein MR. Juvenile pleomorphic adenoma of the cheek: a case report and review of literature. *Diagn Pathol* 2009; 4:32-36.
 67. Guzzo M, Locati LD, Prott FJ, et al. Major and minor salivary gland tumors. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010; 74:134-135.
 68. Spiro RH. Salivary neoplasms: overview of a 35-year experience with 2,807 patients. *Head Neck Surg* 1986; 8:177-179.

69. Varghese BT, Sebastian P, Abraham KE, Mathews A. Pleomorphic adenoma of minor salivary gland in the parapharyngeal space. *World J Surg Oncol* 2003; 1:2.doi: 10.1186/1477-7819-1-2.
70. Hughes KV, Olsen KD, McCaffrey TV. Parapharyngeal space neoplasms. *Head Neck* 1995; 17:124-130.
71. Olsen KD. Tumors and surgery of the parapharyngeal space. *Laryngoscope* 1994; 104:1-28.
72. Khafif A, Segev Y, Kaplan DM, Gil Z, Fliss DM. Surgical management of parapharyngeal space tumors: a 10-year review. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 132:401-406.
73. Ahmad F, Waqar-uddin, Khan MY, Khawar A, Bangush W, Aslam J. Management of parapharyngeal space tumours. *J Coll Physicians Surg Pak* 2006; 16:7-10.
74. Boedeker CC, Ridder GJ, Schipper J. Paragangliomas of the head and neck: diagnosis and treatment. *Fam Cancer* 2005; 4:55-59.
75. Cohen SM, Burkey BB, Netterville JL. Surgical management of parapharyngeal space masses. *Head Neck* 2005; 27:669-675.
76. Bozza F, Vigili MG, Ruscito P, Marzetti A, Marzetti F. Surgical management of parapharyngeal space tumours: results of 10-year follow-up. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2009; 2:10-15
77. Sang J, Lou W, Zhang Y. Diagnosis and surgical approach of parapharyngeal space neoplasms. *Oral Maxillofac Surg* 2011; 4:211-216.
78. Shahab R, Heliwell T, Jones AS. How we do it: A series of 114 primary pharyngeal space neoplasms. *Clinical Otolaryngology* 2005; 30:364-367.
79. Flood TR, Hislop WS. A modified surgical approach for parapharyngeal space tumours: use of the inverted 'L' osteotomy. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1991; 4:82-86.
80. Ariel IM, Jerome AP, Pack GT. Treatment of tumors of the parotid salivary gland. *Surgery* 1954; 35(1):124-158.
81. Lazaridis N, Antoniadis K. Double mandibular osteotomy with coronoidectomy for tumours in the parapharyngeal space. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2003; 41(3):142-146.
82. Teng MS, Gender EM, Buchbinder D, Urken ML. Subcutaneous mandibulotomy: a new surgical access for large tumors of the parapharyngeal space. *Laryngoscope* 2003; 113:1893-1897.
83. Fisch U. Infratemporal fossa approach to tumours of the temporal bone and base of the skull. *J Laryngol Otol* 1978; 92(11):949-967.
84. Ducic Y, Oxford L. Transoral approach to the superomedial parapharyngeal space. *Otolaryngol-Head Neck Surg* 2006; 134:466-470.
85. Betka J, Chovanec M, Klozar J, Taudy M et al. Transoral and combined transoral-

- transcervical approach in the surgery of parapharyngeal tumors. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2010; 267:765-772.
86. Shahinian H, Dornier C, Fisch U. Parapharyngeal space tumors. The infratemporal fossa approach. *Skull Base Surgery* 1995; 5(2):73-81.
 87. Seifert G. World Health Organization International Histological Classification of Tumours: Histological Typing of Salivary Gland Tumours, 2nd edn. Berlin: Springer-Verlag 1992; pp. 1-113.
 88. Eveson JW, Kusafuka K, Stenman G, Nagao T. Pleomorphic adenoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. eds *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*, Lyon: IARC Press 2005; pp. 254-258.
 89. Denny PC, Chai Y, Klauser DK et al. Parenchymal cell proliferation and mechanisms for maintenance of granular duct and acinar cell populations in adult male mouse submandibular gland. *Anat Rec* 1993; 235:475-485.
 90. Redman RS. Proliferative activity by cell type in the developing rat parotid gland. *Anat Rec* 1995; 241:529-540.
 91. Sugito T, Mineshiba F, Zheng C, Cotrim AP, Golsmith CM, Baum BJ. Transient TWEAK overexpression leads to a general salivary epithelial cell proliferation. *Oral Diseases* 2009 15:76-81.
 92. Gimotty PA, Belle P, Elder DE, Murry T, Montone KT, Xu X, Hotz S, Raines S, Ming ME, Wahl P, Guerry DP. Biologic and prognostic significance of dermal Ki-67 expression, mitoses, and tumorigenicity in thin invasive cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2005; 23:8048-8056.
 93. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182:311-322.
 94. Xin W, Paulino AF. Prognostic factors in malignant mixed tumors of the salivary gland: correlation of immunohistochemical markers with histologic classification. *Ann Diagn Pathol* 2002; 6:205-210.
 95. Alves FA, Pires FR, de Almeida OP, Lopes MA, Kowalski LP. PCNA, Ki-67 and p53 expressions in submandibular salivary gland tumours. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33:593-597.
 96. Skalova A, Leivo I, Von Boguslawsky K, Saksela E. Cell proliferation correlates with prognosis in acinic cell carcinomas of salivary gland origin. Immunohistochemical study of 30 cases using the MIB 1 antibody in formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1994; 173:13-21.
 97. Burry RW. *Immunocytochemistry A Practical Guide for Biomedical Research*. USA Springer Science+Business Media, LLC 2010.
 98. Lin F, Prichard J. (eds.). *Handbook of Practical Immunohistochemistry: Frequently*

Asked Questions, DOI 10.1007/978-1-4419-8062-5_13, © Springer Science+Business Media, LLC 2011, 619 pp. Chapter 13, Salivary Gland and Other Head Neck Structures. Conrad Schuerch, pp. 173-196.

99. Murray PG, Young LS, Rowe M, Crocke J. Immunohistochemical demonstration of the Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein in paraffin sections of Hodgkin's disease. *J Pathol* 1992; 166:1-5.
100. Taheri-Kadkhoda Z, Magnusson B, Svensson M, Mercke C, Björk-Eriksson B. Expression modes and clinical manifestations of latent membrane protein 1, Ki-67, cyclin-B1, and epidermal growth factor receptor in nonendemic nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck* 2009; 31:482-492.
101. Wang SJ, Wong G, De Heer AM. CD44 variant isoforms in head and neck squamous cell carcinoma progression. *Laryngoscope* 2009; 119:1518-1530.
102. D'Costa J, Saranath D, Sanghvi V, et al. Epstein-Barr virus in tobacco-induced oral cancer and oral lesions in patients from India. *J Oral Pathol Med* 1998; 27:78-82.
103. Damania B. Oncogenic γ -herpesviruses comparison of viral proteins involved in tumorigenesis. *Nature* 2004; 2:656-668.
104. Anagnostopoulos I, Herbst H, Niedobitek G, et al. Demonstration of monoclonal EBV genomes in Hodgkin's disease and Ki-1 positive anaplastic large cell lymphoma by combined Southern blot and in situ hybridization. *Blood* 1989; 74:810-816.
105. Franchi A, Moroni M, Paglierani M, Santucci M. Expression of CD44 standard and variant isoforms in parotid gland and parotid gland tumours. *J Oral Pathol Med* 2001; 30:564-568.
106. Sato S, Miyauchi M, Takekoshi T, et al. Reduced expression of CD44 variant 9 is related to lymph node metastasis and poor survival in squamous cell carcinoma of tongue. *Oral Oncol* 2000; 36:545-549.
107. Simionescu C, Margaritescu C, Surpateanu M, et al. The study of E-cadherine and CD44 immunoexpression in oral squamous cell carcinoma. *Romanian J Morphol Embriol* 2008; 49:189-193.
108. Reategui EP, De Mayolo AA, Das PM, et al. Characterization of CD44v3-Containing Isoforms in Head and Neck Cancer, *Cancer Biol. Ther.* 2006; 5:1163-1168.
109. Wang SJ, Wreesmann VB, Bourguignon LY. Association of CD44 V3-containing isoforms with tumor cell growth, migration, matrix metalloproteinase expression, and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Head Neck* 2007; 29:550-558.
110. Bánkfalvi A, Kraßort M, Buchwalow IB, et al., Gains and losses of adhesion molecules (CD44, E-cadherin, and β -catenin) during oral carcinogenesis and tumour progression. *J Pathol* 2002; 198:343-351.
111. Abdulmajeed S, Stein S, Chan A, et al. Immunoexpression of putative cancer stem cell

- markers in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma, Third World Congr. Intern. Acad. Oral Oncol 2011; 46S.
112. Sterz CM, Kulle C, Dakic B, et al. A basal-cell-like compartment in head and neck squamous cell carcinomas represents the invasive front of the tumor and is expressing MMP-9. *Oral Oncol* 2010; 46:116-122.
 113. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104:973-978.
 114. Biddle A, Liang X, Gammon L, Fazil B, Harper LJ, Emich H, Costea DE, Mackenzie IC. Cancer stem cells in squamous cell carcinoma switch between two distinct phenotypes that are preferentially migratory or proliferative. *Cancer Res* 2011; 71:5317-5326.
 115. Oliveira LR, Oliveira-Costa JP, Araujo IM, et al. Cancer stem cell immunophenotypes in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2011; 40:135-142.
 116. Landgren M, Kyllerman M, Bergström T, Dotevall L, Ljungström L, Ricksten A. Diagnosis of Epstein-Barr virus - induced central nervous system infections by DNA amplification from cerebrospinal fluid. *Ann Neurol* 1994; 35:631-635.
 117. Kokko LL, Hurme S, Maula SM, et al. Significance of site-specific prognosis of cancer stem cell marker CD44 in head and neck squamous-cell carcinoma. *Oral Oncol* 2011; 47:510-516.
 118. Rajarajan A, Stokes A, Bloor BK, et al. CD44 Expression in Oro-Pharyngeal Carcinoma Tissues and Cell Lines. *PLoS ONE* 7 2012; e28776.
 119. Margaritescu C, Pirici D, Simonescu C et al. The utility of CD44, Cd17 and CD133 in identification of cancer stem cell (CSC) in oral squamous cell carcinomas (OSCC). *Romanian J Morphol Embriol* 2011; 52:985-993.
 120. Gourzones C, Gelin A, Bombik I, Klibi J, Verillaud B, Guigay J. Extra-cellular release and blood diffusion of BART viral micro-RNAs produced by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Virol J* 2010; 7:271-282.
 121. Keryer-Bibens C, Pioche-Durieu C, Villemant C, Souquere S, Nishi N, Hirashim M. Exosomes released by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells convey the viral Latent Membrane Protein 1 and the immunomodulatory protein galectin 9. *BMC Cancer* 2006; 6:283-290.
 122. Wang SJ, Bourguignon LY. Role of Hyaluronan-Mediated CD44 Signaling in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Progression and Chemoresistance. *Am J Pathol* 2011; 178:956-963.
 123. Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L, Faitelson Y. CD44 in cancer *Crit Rev Clin Lab Sci* 2002; 39(6):527-579.
 124. Fonseca I, Pereira T, Rosa-Santos J, Soares J. Expression of CD44 isoforms in squamous

- cell carcinoma of the border of the tongue: a correlation with histological grade, pattern of stromal invasion, and cell differentiation. *J Surg Oncol* 2011; 76:115-120.
125. Uwa N, Kataoka TR, Torii I, et al. CD44 expression is related to poor prognosis of hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2011; 131:323-329.
 126. Allegra E, Trapasso S, Sacco A, et al. CD44 sol salivary levels detected by ELISA as a diagnostic test for laryngeal carcinomas. *JCST* 2012; 4(10):333-334.
 127. Franzmann EJ, Reategui EP, Pereira LH, et al. Salivary protein and solCD44 levels as a potential screening tool for early detection of head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2012; 34:687-695.
 128. Carvalho AL, Jeronimo C, Kim MM, et al. Evaluation of promoter hypermethylation detection in body fluids as a screening/diagnosis tool for head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14:97-107.
 129. Joshua B, Kaplan MJ, Doweck I, et al. Frequency of cells expressing CD44, a head and neck cancer stem cell marker: correlation with tumor aggressiveness. *Head Neck* 2012; 34:42-49.
 130. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Tsakmaki V, Danielidis V, Sivridis E. Cancer stem cell phenotype relates to radio-chemotherapy outcome in locally advanced squamous cell head-neck cancer. *Br J Cancer* 2012; 106:846-853.
 131. Trapasso S, Allegra E. Role of CD44 as a marker of cancer stem cells in head and neck cancer. *Biologics* 2012; 6:379-383.
 132. Lu S, Tian J, Lv Z, et al. The probable role of tumor stem cells for lymph node metastasis in supraglottic carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2011; 17:33-38.
 133. Yüce I, Bayram A, Çağlı S, Canöz O, Bayram S, Güney E. The role of CD44 and matrix metalloproteinase-9 expression in predicting neck metastasis of supraglottic laryngeal carcinoma. *Am J Otolaryngol* 2011; 32:141-146.
 134. Richard V, Pillai MR. The stem cell code in oral tumorigenesis: 'The cancer stem cell shift hypothesis. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1806:146-162.
 135. Dayyani F, Etzel C, Liu M, Ho CH, Lippman SM, Tsao AS. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head Neck Oncol* 2010; 2:15 doi:10.1186/1758-3284-2-15.
 136. Hansson BG, Rosenquist K, Antonsson A, Wennerberg J, Schildt EB, Bladström A, Andersson G. Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol* 2005; 125(12):1337-1344.
 137. Atula S, Auvinen E, Grenman R, Syrjänen S. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus in epithelial carcinomas of the head and neck region. *Anticancer Res* 1997;

- 17(6D):4427-4433.
138. Kosunen A, Pirinen R, Ropponen K, Pukkila M, Kellokoski J, Virtaniemi J, R. Sironen et al. CD44 expression and its relationship with MMP-9, clinicopathological factors and survival in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2007; vol.43(1):51-59.
 139. Bourguignon LY, Earle C, Wong G, Spevak CC, Krueger K. Stem cell marker (Nanog) and Stat-3 signaling promote MicroRNA-21 expression and chemoresistance in hyaluronan/CD44-activated head and neck squamous cell carcinoma cells. *Oncogene* 2012; 31(2):149-160.
 140. Bidaud P, Chasle J, Sichel F, Rousseau S, Petit P, Pottier D et al. Expression of p53 family members and CD44 in oral squamous cell carcinoma (OSCC) in relation to tumorigenesis. *Histol Histopathol* 2010; 25(3):331-339.
 141. Bloor BK, Rajarajan A, Jaafary-Haghighat K, Odell EW. Transcription and expression of CD44 variant exons by oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2002; 4:907-913.
 142. Ndinguri MW, Zheleznyak A, Lauer JL, Anderson CJ, Fields GB. Application of Collagen-Model Triple-Helical Peptide-Amphiphiles for CD44-Targeted Drug Delivery Systems *J Drug Deliv* 2012: 592602. Published online 2012 November 14. doi: 10.1155/2012/592602.
 143. Cassai E, Galvan M, Trombelli L, Rotola A. HHV-6, HHV-7, HHV-8 in gingival biopsies from chronic adult periodontitis patients. A case-control study. *J Clin Periodontol* 2003; 30(3):184-191.
 144. Rotola A, Cassai E, Farina R, Caselli E, Gentili V, Lazzarotto T, Trombelli L. Human herpesvirus 7, Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus in periodontal tissues of periodontally diseased and healthy subjects. *J Clin Periodontol* 2008; 35(10):831-837.
 145. Monini P, Sgadari C, Toschi E, Barillari G, Ensoli B. Antitumour effects of antiretroviral therapy. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:861-875.
 146. Kostense S, Otto SA, Knol GJ et al. Functional restoration of human immunodeficiency virus and Epstein-Barr virus-specific CD8 T cells during highly active antiretroviral therapy is associated with an increase in CD4 T cells. *Eur J Immunol* 2002; 32:1080–1089.
 147. International Collaboration on HIV and Cancer. Highly active antiretroviral therapy and incidence of cancer in human immunodeficiency virus-infected adults. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:1823–1830.
 148. Gingues S, Gill MJ. The impact of highly active antiretroviral therapy on the incidence and outcomes of AIDS-defining cancers in Southern Alberta. *HIV Medicine* 2006; 7:369–377.
 149. Eliopoulos AG, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: LMP1 masquerades as an active

- receptor. *Curr Biol* 1998; 8:196-198.
150. Shamaa AA, Zyada MM, Wagner M, Awad SS, Osman MM, Azeem AA. The significance of Epstein Barr Virus (EBV) & DNA Topoisomerase II alpha (DNA-Topo II alpha) immnoreactivity in normal oral mucosa, Oral Epithelial Dysplasia (OED) and Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC). *Diagnostic Pathol* 2008; 3:45-57.
 151. Jiang R, Gu X, Nathan CO, Hutt-Fletcher I. Laser-capture microdissection of oropharyngeal epithelium indicates restriction of Epstein - Barr virus receptor/CD21 mRNA to tonsil epithelial cells. *J Oral Pathol Med* 2008; 37:626-633.
 152. Gärtner B, Preiksaitis JK. EBV viral load detection in clinical virology. *J Clin Virol* 2010; 48:82-90.
 153. Marhaba R, Zöller M. CD44 in Cancer Progression: Adhesion, Migration and Growth Regulation. *J Mol Histol* 2004; 35:211-231.
 154. Nagano O, Saya H. Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Sci* 2004; 95:930-935.
 155. Van Weering DH, Baas PD, Bos JL. PCR-based method for the analysis of human CD44 splice products. *PCR Methods Appl* 1993; 3:100-106.
 156. Cummings BJ, Clark RM. Squamous cell carcinoma of the oral cavity. *J Otolaryngol* 1982; 11:359-364.
 157. Ottolino-Perry K, Diallo JS, Lichty BD, Bell JC, Andrea McCart J. Intelligent Design: Combination Therapy With Oncolytic Viruses. *Molecular Therapy* 2010; 18 (2):251-263. doi:10.1038/mt.2009.283.
 158. Pandha H, Melcher A, Harrington K, Vile R. Oncolytic Viruses: Time to Compare, Contrast, and Combine? *Molecular Therapy* 2009; 17 (6):934-935; doi:10.1038/mt.2009.86.
 159. FongY, Kim T, Bhargava A, Schwartz L, Brown K et al. A Herpes Oncolytic Virus Can Be Delivered Via the Vasculature to Produce Biologic Changes in Human Colorectal Cancer. *Molecular Therapy* 2009; 17(2):389-394 doi:10.1038/mt.2008.240.
 160. Shillitoe EJ, Gilchrist E, Pellenz C, Murrah V. Effects of herpes simplex virus on human oral cancer cells, and potential use of mutant viruses in therapy of oral cancer. *Oral Oncol* 1999; 35(3):326-332.
 161. Meerani S,Yao Y. Oncolytic viruses in cancer therapy. *European J Scientific Research* 2010; Vol.40:156 -171.
 162. Cruz I, Van Den Brule AJC, Brink AA, *et al.* No direct role for Epstein-Barr virus in oral carcinogenesis: a study at the DNA, RNA and protein levels. *Int J Cancer* 2000; 86:356-361.
 163. Brassard LD, Grace MJ, Bordens RW. Interferon - as an immunotherapeutic protein. *J Leukoc Biol* 2002; 71: 565–581.

164. Triantafillidou K, Dimitrakopoulos J, Iordanidis F, Koufogiannis D. Management of adenoid cystic carcinoma of minor salivary glands. *J Oral Maxillofac Surg* 2006; 64:1114-1120.
165. Fiorella R, Di Nicola V, Fiorella ML, Spinelli DA, Coppola F, Luperto P, Madami L. Major salivary gland diseases. Multicentre study. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2005; 25:182-190.
166. Ito FA, Ito K, Vargas PA, de Armeida OP, Lopes MA. Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 496 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005; 34:533-536.
167. Luka H, Klemi P, Leivo I, Vahlberg T, Grenman R. Prognostic significance of Ki-67 and p53 as tumor markers in salivary gland malignancies in Finland: An evaluation of 212 cases. *Acta Oncol* 2006; 45:669-675.
168. Ansari MH. Salivary gland tumors in an Iranian population: A retrospective study of 130 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 2007; 65:2187-2194.
169. Buchner A, Merrell PW, Carpenter WM. Relative frequency of intra-oral minor salivary gland tumors: a study of 380 cases from northern California and comparison to reports from other parts of the world. *J Oral Pathol Med* 2007; 36:207-214.
170. Rivera-Bastidas H, Ocanto RA, Acevedo AM. Intraoral minor salivary gland tumors a retrospective study of 62 cases in a Venezuelan population. *J Oral Pathol Med* 1996; 25:1-4.
171. Jones AV, Craig GT, Speight PM, Franklin CD. The range and demographics of salivary gland tumours diagnosed in a UK population. *Oral Oncology Head & Neck Oncology & Pathology* 2008; 44:407-417.
172. Satko I, Stanko P, Longauerova I. Salivary gland tumours treated in the stomatological clinical in Bratislava. *J Cranio Maxill Surg* 2000; 28:56-61.
173. Huvos AG. Oncocytoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. ed.: *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. Lyon: IARC Press, 2005: 266.
174. Simpson RHW, Eveson JW. Warthin tumour. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. ed.: *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. Lyon: IARC Press 2005: 263-265.
175. Lazzaro B, Cleveland D. P53 and Ki-67 antigen expression in small oral biopsy specimens of salivary gland tumours. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; 89:613-617.
176. Le A, Saverin M, Hand AR. Distribution of Dendritic Cells in Normal Human Salivary Glands. *Acta Histochem Cytochem* 2011; 44:165-173.
177. Marioni G, Marino F, Stramare R, Marchese-Ragona R, Staffieri A. Benign metastasizing pleomorphic adenoma of the parotid gland: a clinicopathologic puzzle. *Head Neck* 2003;

- 25:1071-1076.
178. Schwartz –Arad D, Michaeli Y, Zajicek G. Compensatory hyperplasia of the rat submandibular gland following unilateral extirpation. *J Dent Res* 1991; 70:1328-1331.
 179. Toida M, Shimokawa K, Makita H, Kato K, Kobayashi A, Kusunoki Y, Hatakeyama D, Fujitsuka H, Yamashita T, Shibata T. Intraoral minor salivary gland tumors: a clinicopathological study of 82 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005; 34:528-532.
 180. Vargas PA, Cheng Y, Barrett AW, Craig GT, Speight PM. Expression of Mcm-2, Ki-67 and geminin in benign and malignant salivary gland tumours. *J Oral Pathol Med* 2008; 37:309-318.
 181. Van der Wal JE, Snow GB, Van der Wal I. Histological reclassification of 101 intraoral salivary gland tumours (new WHO classification). *J Clin Pathol* 1992; 45:834–835.
 182. Bradley PJ, Bradley PT, Olsen KD. Update on the management of parapharyngeal tumours. *Laryngoscope* 1994; 5:1-28.
 183. Dimitrijevic MV, Jesic SD, Mikic AA, Arsovic NA, Tomanovic NR. Parapharyngeal space tumors: 61 case reviews. *Laryngoscope* 2010; 8:1557-1562.
 184. Som PM, Biller HF, Lawson W, Sacher M, Lanzieri CF. Parapharyngeal space masses: an updated protocol based upon 104 cases. *Radiology* 1984; 153:149-156.
 185. Costa TP, de Araujo CE, Filipe J, Pereira AM. First-bite syndrome in oncologic patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2012; 1:265-273.
 186. Fernandez FM, Fernandez SJ, Lopez CA, Sandoval GJ, Lopez DE, Sanchez A. Surgical treatment of benign parapharyngeal space tumours. Presentation of two clinical cases and revision of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008; 13:61-64.
 187. Stambuk HE, Patel SG. Imaging of the parapharyngeal space. *Otolaryngol Clin North Am* 2008; 41:77-101.
 188. Yu GY, Zhang L, Guo , Huang MX, Mao C, Peng X. Pre-mental foramen mandibulotomy for resecting tumors of tongue base and parapharyngeal space. *Chin Med J* 2005; 118:1803-1807.
 189. Ducic Y, Oxford L. Transoral approach to the superomedial parapharyngeal space. *Otolaryngol-Head Neck Surg* 2006; 134:466-470.

8. PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI PAR PĒTĪJUMA TĒMU

8.1. Starptautiskās datu bāzēs iekļautās publikācijas (zinātniskie raksti) par pētījuma tēmu

1. Kazanceva A, Groma V, Kornevs E, Lauskis G, Bigestans A, Sperga G. Biological behaviour of recurrent salivary gland pleomorphic adenoma: clinical and morphological study. Stomatoloģija, Baltic Dental and Maxillofacial Journal, 2006, Suppl. I, 6:32-33.
2. Kazanceva A, Groma V, Smane L, Kornevs E, Teibe U. Proliferative potential in benign mixed salivary gland tumors and its value in primary and recurrent neoplasms. Stomatologija 2011; 13 (2): 35-41.
3. Groma V, Kazanceva A, Murovska M, Nora-Krukle Z. 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. Pathology – Research and Practice 2012, 208, 518-526.
4. Ivanova A, Tars J, Groma V. Surgical approaches and postoperative complications of parapharyngeal space tumours. Acta Chirurgica Latviensis, 2012, 1, 12: 20-23.

8.2. Konferenču tēzes par pētījuma tēmu starptautiskās datu bāzēs iekļautos izdevumos un starptautiski citējamos rakstu krājumos

1. Groma V, Kazanceva A, Kornevs E. Nerve growth factor p75 receptor, cytokeratin 18 neoantigen expression and TUNEL data in normal salivary gland and pleomorphic adenoma. Virchows Archiv, 2006, vol. 448, N 5, 682.
2. Kazanceva A, Groma V, Kornevs E, Bagante I, Smane L. Actin expression and vasculogenesis in salivary gland pleomorphic adenoma and some malignant tumors. Eur Arch Otorhinolaryngol 2010, 267, S176.
3. Kazanceva A, Tars J, Kornevs E, Sokolovs J, Pastars K, Groma V. Clinical and Pathomorphological Results of 30 Patients with Head and Neck Reconstructions Using Microvascular Flaps and Bone Graft. Eur Arch Otorhinolaryngol 2010, 267, S33.
4. Kazanceva A, Tars J, Kornevs E, Lauskis G, Pastars K, Keirans A, Groma V. Clinical and pathomorphological results of 50 patients with head and neck

reconstructions using microvascular flaps and bone grafts. Proc. 7th Congr. Baltic Association Maxillofacial and Plastic Surgery, Riga, 2010, p. 44-45.

8.3. Konferenču tēzes vietējās konferencēs

1. Kazanceva A., Groma V, Beļajevs D, Šalms Ģ, Skaģers A. Imūnhistoķīmiskā un elektronmikroskopiskā smaganu mīksto audu izpēte un to nozīme sekmīgajā zobu implantu ielikšanas procesā. *RSU Medicīnas nozares zinātniskas konferences materiāli*, 2004, Rīga, lpp.155.
2. Kazanceva A., Kornevs E., Groma V., Tārs J. Kakla limfonodulektomija: klīniskā un morfoloģiskā izpēte. *RSU Zinātniskā konference*, 2010, lpp. 249.
3. Ivanova A., Groma V, Tarasov M. Lielo siekalu dziedzeru limfoepiteliālas karcinomas klīniskā un patomorfoloģiskā izpēte. *RSU Zinātniskās konferences materiāli*, 2012, Rīga, lpp. 294.
4. Kornevs E, Kazanceva A., Tārs J, Lausks G. Pieauss siekalu dziedzeru ļaundabīgo audzēju ārstēšanas rezultāti RAKUS. *RSU Zinātniskās konferences materiāli*, 2012, Rīga, lpp.241.
5. Kornevs E, Kazanceva A., Tārs J, Lausks G. Bazalioma galvas un kakla rajonā: faktori, kas norāda uz audzēja agresivitāti. *RSU Zinātniskās konferences materiāli*, 2013, Rīga, lpp.241.

8.4. Mutiski ziņojumi (referāti) starptautiskos un vietējos kongresos un konferencēs

1. Kazanceva A., Groma V, Beļajevs D, Šalms Ģ, Skaģers A. Imūnhistoķīmiskā un elektronmikroskopiskā smaganu mīksto audu izpēte un to nozīme sekmīgajā zobu implantu ielikšanas procesā *RSU Zinātniskā konference 13-14.03.2008.* Rīga, Latvija.
2. Kazanceva A., Kornevs E, Lauskis G, Bigestans A, Sperga G. Biological behaviour of recurrent salivary gland Pleomorphic adenoma: clinical and morphological study.

- Riga-Rostok Symposium, 5th Condress of Baltic Association for Maxillofacial and Plastic Surgery 25-28.05.2008. Rīga, Latvija.*
3. Kazanceva A, Tārs J, Korņevs E, Pastars K, Keirans A. Reconstructive Surgery in the Head and Neck Oncology. *Pirmais Baltijas valstu rekonstruktīvās, rokas un estētiskās ķirurģijas iepazīšanās kongress. 22.05.2009. Rīga, Latvija.*
 4. Kazanceva A, Kornevs E, Groma V, Tārs J. Kakla limfonodulektomija: klīniskā un morfoloģiskā izpēte. *RSU Zinātniskā konference 18-19.03.2010. Rīga, Latvija.*
 5. Pastars K, Tars J, Kazanceva A, Keirans A. Reconstruction of Complex Mandible, Intra Oral and Extra Oral Soft Tissue Defects with Double Paddle Free fibular flap case reports. *4th World Congress of International Federation of Head and Neck Oncologic Societies, 22-24.06.2010. Seula, Dienvidkoreja.*
 6. Kazanceva A, Pastars K, Tars J, Kornevs E, Lauskis G. Clinical results of 50 patients with head and neck reconstructions using microvascular flaps and bone grafts. *7th Condress of Baltic Association for Maxillofacial and Plastic Surgery. 20-22.05.2010. Rīga, Latvia.*
 7. Kazanceva A, Pastars K, Keirans A, Tars J. Reconstructions after the mandibular defects with vascularised and nonvascularised bone grafts.. *7th Condress of Baltic Association for Maxillofacial and Plastic Surgery. 20-22.05.2010. Rīga, Latvija.*
 8. Vasilchenko I, Kazanceva A. Malignant Histiocitoma: report of the case. *7th Condress of Baltic Association for Maxillofacial and Plastic Surgery. 20-22.05.2010. Rīga, Latvija.*
 9. Kazanceva A, Kornevs E, Tars J, Pastars K, Keirans A. *Merck Simpozijs: Galvas un kakla audzēju jaunākas terapijas iespējas: Ķirurģiskas iespējas metastātiska un recidivējoša galvas un kakla vēža ārstēšanā. 24.11.2010. Rīga, Latvija.*
 10. Ivanova A, Pastars K, Keirans A, Tars J. Reconstruction of head and neck soft tissue defects with free flaps after tumor extirpation. *5th Baltic Otorhnolaryngology Congress. 16-18.09.2011. Rīga, Latvija.*
 11. Korņevs E, Ivanova A, Mača I. Apakšlūpas vēzis – operatīvas ārstēšanas radikalitāte. *RSU Zinātniskā konference 14-15.04.2011. Rīga, Latvija.*
 12. Ivanova A, J.Tars, B.Paulina, K.Pastars, A.Keirans, Z.Pilaps, E.Kornevs, I.Traucina, J.Libietis, V.Ustinins, G.Lauskis, J.Sokolovs, L.Sperla, Z.Liepa. Management of advanced SCC of the head and neck. *5th Baltic Otorhinolaryngplogy Congress. 16-18.09.2011. Rīga, Latvija.*

13. Ivanova A, I.Traucina, J.Tars, V.Ustinins, J.Libietis, V.Groma, Z.Nora-Krukle, M.Murovska. Epstein-Barr virus, Human herpes virus 6 and human herpes virus 7 association with oral squamous cell carcinoma and nasopharyngeal carcinoma. *5th Baltic Otorhinolaryngology Congress*. 16-18.09.2011. Rīga, Latvija.
14. Korņevs E, Kazanceva A, Tārs J, Lauskis G. Pieauss siekalu dziedzeru ļaundabīgo audzēju ārstēšanas rezultāti RAKUS. *RSU Zinātniskā konference* 29-30.03.2012. Rīga, Latvija.
15. Korņevs E, Kazanceva A, Tārs J, Lausks G. Bazalioma galvas un kakla rajonā: faktori, kas norāda uz audzēja agresivitāti. *RSU Zinātniskās konference*. 21-22.05.2013, Rīga, Latvija.
16. Ivanova A, Zarins J, Pastars K, Keirans A, Tars J. Outcome study of 87 patients with late stage oral cavity cancers: reconstruction, recurrence, survival rate and quality of life. *8th Condress of Baltic Association for Maxillofacial and Plastic Surgery*, 10-11.05.2013. Kaunas, Lietuva.
17. Ivanova A, Pastars K, Tars J, Zarins J, Keirans A, Sivins A, Januskevics V. Esophageal reconstruction with vascularized intestine. *8th Condress of Baltic Association for Maxillofacial and Plastic Surgery*, 10-11.05.2013. Kaunas, Lietuva.

8.5. Stenda referāti starptautiskos un vietējos kongresos un konferencēs

1. Kazanceva A, Groma V, Korņevs E, Bagante I, Smane L. Actin expression and vasculogenesis in salivary gland pleomorphic adenoma and some malignant tumors. *4th European Congress of Head and Neck Oncology*, 4-6.03.2010. Atēnas, Grieķija.
2. Ivanova A, Groma V, Tarasov M. Lielo siekalu dziedzeru limfoepiteliālas karcinomas klīniskā un patomorfoloģiskā izpēte. *RSU Zinātniskā konference* 29-30.03.2012. Rīga, Latvija.
3. Ivanova A, Groma V, Legusa I, Nora-Krukle Z, Murovska. Association of lichen planus with human herpesvirus type 6 – new implications for therapy. *40th Annual Meeting of the Society for Cutaneous Ultrastructure Research and Society for Skin Structure Research* May 12-14.2013. Salburga, Austrija.

PATEICĪBAS

Sirsnīgi pateicos asoc. profesorei Valērijai Gromai un asoc. profesoram Egīlam Korņevam, kuri piedalījās šī darba tapšanā, par atbalstu un ieguldīto darbu.

Liels paldies RSU MVI *Dr.biol.* Zaigai Nora-Krūklei un profesorei Modrai Murovskai par sniegto palīdzību darba sagatavošanas procesā.

Pateicos konsultantam profesoram Uldim Teibem par palīdzību statistisko datu apstrādē.

Paldies Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Latvijas Onkoloģijas centra Galvas un kakla ķirurģijas nodaļas ārstiem par atbalstu pētījuma veikšanā.

Pateicos Rīgas Stradiņa Universitātei par iespēju studēt doktorantūras studiju programmā un par finansiālo atbalstu, kas tika sniegts no ESF līdzekļiem: promocijas darbs veikts ar Eiropas sociālā fonda projekta “Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē” finansiālu atbalstu. Nr. 2009/0147/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/009.

Visbeidzot liels paldies manai ģimenei par sapratni, atbalstu un palīdzību promocijas darba izstrādes laikā.

PIELIKUMI

1. pielikums

RSU Ētikas komitejas atļauja pētījuma veikšanai

Veidlapa Nr E-9 (2)

RSU ĒTIKAS KOMITEJAS LĒMUMS

Rīga, Dzirciema iela 16, LV-1007
Tel.67409137

Komitejas sastāvs	Kvalifikācija	Nodarbošanās
1. Asoc. prof. Olafs Brūvers	Dr.miss.	teologs
2. Docente Santa Purviņa	Dr.med.	farmakologs
3. Asoc. prof. Voldemārs Arnis	Dr.biol.	rehabilitologs
4. Profesore Regīna Kleina	Dr.med.	patanatoms

Pieteikuma iesniedzējs: Anna Kazanceva
RSU, Doktorantūras nodaļa

Pētījuma nosaukums: Siekalu dziedzeru onkoloģisko operāciju komplikāciju klīniskā un kompleksmorfoloģiskā analīze un to novēršanas iespējas

Iesniegšanas datums: 02.09.2010.

Pētījuma protokols:

(X) Pētījuma veids:

(X) Pētījuma populācija: pacienti ar siekalu dziedzeru audzēju-pleomorfo adenoma

(X) Informācija par pētījumu:

(X) Piekrišana dalībai pētījumā:

Citi dokumenti:

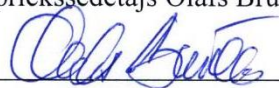
1. Atļauja pētījuma veikšanai no RAKUS Patoloģijas centra un RAKUS LOC

Lēmums: piekrist biomedicīniskajam pētījumam

Komitejas priekšsēdētājs Olafs Brūvers

Tituls: Dr.miss., asoc.prof.

Paraksts



Ētikas komitejas sēdes datums: 23.09.2010.

Pacienta piekrišana izmeklēšanai un operācijai (manipulācijai)

aslimnica
RĪGAS AUSTRUMU KLĪNISKĀ UNIVERSITĀTES SLIMNĪCA
Hipokrāta iela 2, Rīga, LV-1038, Latvija
Tālr.: 67 042 400, fakss: 67 042 786
E-pasts: aslimnica@aslimnica.lv, www.aslimnica.lv
Iestādes kods: 0100-00234

Piekrišana izmeklēšanai un operācijai (manipulācijai)

Es, _____
(pacienta vai pilnvarotās personas vārds, uzvārds, personas kods)

būdams/būdama (vajadzīgo pasvītrot) pie pilnas apziņas, dodu savu piekrišanu ārstam

_____ un viņa izraudzītajiem
(ārsta vārds, uzvārds)

palīgiem veikt ķirurģisko operāciju/manipulāciju man/manam (vajadzīgo pasvītrot)

(radniecības pakāpe, vārds, uzvārds, personas kods)

Man ir izskaidrota operācijas/manipulācijas (vajadzīgo pasvītrot) būtība un nepieciešamība, un es apzinos tās iespējamās rezultātus un komplikācijas. Esmu informēts/informēta, ka operācijas gaitā ir iespējama neparedzēta operācijas atrade vai neparedzēti apstākļi, kuri var izmainīt operācijas gaitu, tāpēc dodu savu piekrišanu ķirurgam mainīt iepriekš plānoto operācijas gaitu atbilstoši viņa profesionālajam slēdzienam.

Apspriešanas gaitā man bija dota iespēja uzdot jautājumus, uz kuriem esmu saņēmis/saņēmusi atbildes.

Par savu veselību esmu sniedzis/sniegusi patiesas un pilnīgas ziņas.

Augstāk esošo tekstu esmu izlasījis/izlasījusi un sapratis/sapratusi.

201 ____ . gada _____
(datums) (mēnesis)

Pacients/Pilnvarotā persona: _____
(vajadzīgo pasvītrot) (paraksts)

Ķirurgs: _____
(paraksts)