

Vloga histopatologa pri odkrivanju predstopenj in raka ustne votline, žrela in grla

Nina Gale

Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija

Izhodišča. Za spoznavo in opredelitev epiteljskih sprememb sluznice ustne votline, žrela in grla (UVŽG) je patohistološki pregled tkivnih vzorcev najpomembnejša in za sedaj najbolj zanesljiva diagnostična metoda. Patolog mora pri svojem delu odgovoriti predvsem na enostavno, a bistveno vprašanje, ali so spremembe benigne, rizične ali maligne. Za oceno intraepiteljskih sprememb na sluznici UVŽG nimamo enotne klasifikacije. Po Ljubljanski razdelitvi razvrščamo spremembe epitelija v štiri skupine. Enostavna hiperplazija ter hiperplazija celic bazalne in parabazalne plasti sta benigni spremembi z majhno verjetnostjo prehoda v karcinom. Atipična hiperplazija ali rizični epitelij je ključna, potencialno maligna sprememba z nepredvidljivim biološkim potekom. V četrto skupino uvrščamo intraepiteljski karcinom. Posamezne rizične skupine so z natančno izdelanimi morfološkimi merili povezane z napovedjo razvoja bolezni in izbiro zdravljenja.

Zaključki. Rak v področju UVŽG spoznamo s histopatološkim pregledom majhnih tkivnih odščipov. Histološka diagnoza je v 90% običajen ploščatocelični rak. Po kirurškem zdravljenju mora patolog po pregledu operacijskega preparata v histopatološkem izvidu podati mesto nastanka tumorja, fenotip z diferenciacijo in gradusom raka, opisati mora resekcijske robove in dodati ali gre za primarni tumor, ponovitev bolezni ali za morebitni sekundarni tumor. Opredeliti mora število vseh pregledanih bezgavk, število bezgavk z zasevki v posameznih področjih in dodati morebitno ekstrakapsularno invazijo. Na podlagi vseh izvidov dopolni klinični TNM s histopatološkim »p«TNM. Vsi naštetni parametri odločilno vplivajo na napoved razvoja bolezni.

Ključne besede: usta, novotvorbe – patologija; karcinom ploščatocelični; žrelo, novotvorbe – patologija; grlo, novotvorbe – patologija; predrakava stanja

Uvod

Današnje vedenje o nastanku ploščatoceličnega karcinoma v zgornjem delu dihalne in prebavne poti kaže, da nastajajo

predstopnje in invazivna oblika raka kot dolgoleten večstopenjski proces. Pri tem procesu se v večvrstnem ploščatem epiteliju kopičijo genetske napake s posledičnimi fenotipičnimi spremembami, od enostavne hiperplazije do intraepiteljskega in invazivnega karcinoma. Patohistološki pregled tkivnih vzorcev ostaja še vedno najbolj zanesljiva preiskovalna metoda za spoznavo narave sprememb. Patolog mora pri svojem

Avtorjev naslov: prof. dr. Nina Gale, dr. med., Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova 2, 1000 Ljubljana; telefon: + 386 1 543 7102; fax: + 386 1 543 7104; e-pošta: nina.gale@mf.uni-lj.si

delu odgovoriti predvsem na enostavno, a bistveno vprašanje, ali so spremembe benigne, rizične ali maligne. Odgovor na to ni vselej enostaven. Za zanesljivo patohistološko diagnozo patolog potrebuje ob ustreznem tkivnem vzorcu tudi anamnestične in laboratorijske podatke, včasih izvide slikovnih preiskav ter natančen klinični opis spremembe. V nejasnih primerih je za pravilno oceno nujno potrebno tesno sodelovanje med kirurgom in/ali onkologom ter patologom.

Predstopnje raka ustne votline, žrela in grla

Najpogostnejša sprememba na sluznici ustne votline in ustnega dela žrelu je bela lisa ali levkoplakija. Izraz levkoplakija po definiciji uporabljamo le v tistih primerih, ko predhodno izključimo vse druge oblike belih lis z znano etiologijo, kot so: nikotinski stomatitis, lihen planus, beli gobasti nevus, infekcija s kandido itd. Naravo levkoplakije, oziroma njeno rizično stopnjo, zanesljivo spoznamo le s histološkim pregledom tkiva, saj se pod zadebeljeno keratinsko plastjo lahko skrivajo vse spremembe epitelijske od navadne hiperplazije do invazivnega karcinoma. V levkoplakiji ustne in žrelne sluznice so visokorizične epitelijske spremembe redke, prav kot tudi maligna transformacija. Pri uporabi izraza levkoplakija je potrebno še posebej poudariti, da ima svoje mesto izključno v klinični oceni bele lise, s histološkim pregledom pa opredelimo stopnjo rizičnosti morfoloških sprememb. Če po odstranitvi znanih etioloških dejavnikov levkoplakija v 2-4 tednih ne izgine, je nujen odvzem tkivnih vzorcev z ustreznih mest za patohistološki pregled¹.

Rdeča lisa ali eritroplakija je na sluznici ustne votline in ustnega dela žrela mnogo redkejša od levkoplakije. Barvo spremembe pripisujemo predvsem atrofičnemu epiteli-

ju brez poroženevanja in povečani vaskularizaciji subepitelijske strome. V spremembi pogosteje odkrijemo rizični epitelij, v 50% pa imajo bolniki z eritroplakijo na ustnem dnu že invazivno obliko raka^{1,2}. Zato je po odkritju spremembe nujna takojšnja biopsija.

Predstopnje raka v grlu klinično opredelimo kot levkoplakija, kronični hiperplastični laringitis in redkeje kot eritroplakija. Spremembe se pojavljajo predvsem na glasilkah, redkeje na drugih mestih v grlu. V spodnjem delu žrela jih odkrijemo le izjemoma. V grlu se lahko pojavljajo difuzno na obeh glasilkah ali pa so zamejene le na del ene glasilke. Histološki pregled spremenjene sluznice je odločilen za spoznavo narave bolezni³.

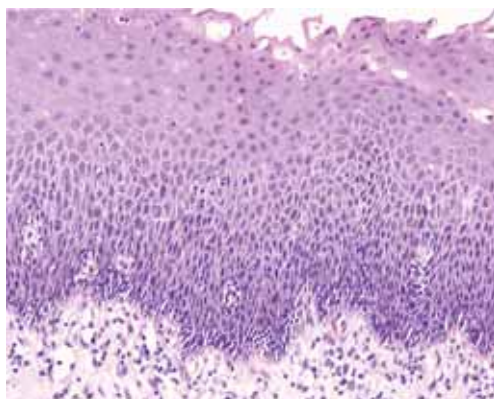
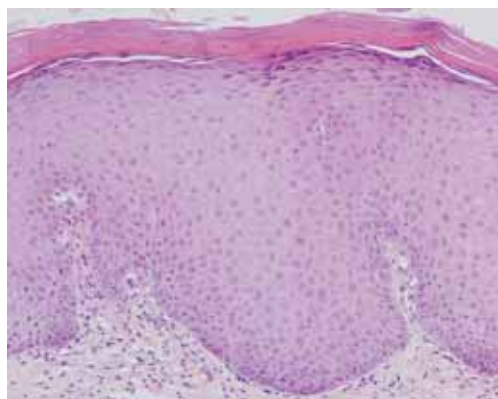
Epidemiologija

Študije o incidenci oralne levkoplakije so redke. Novejša nemška študija navaja podatek o prevalenci oralne levkoplakije pri moških v 2,3% in pri ženskah v 0,9%⁴. Pri starosti preko 70 let se pri moški populaciji dvigne prevalenca levkoplakije že na 8%.

Novejših epidemioloških podatkov o pojavljanju levkoplakije v grlu ali kroničnega laringitisa nimamo. V starejši retrogradni študiji so Bouquot in sodelavci v omejeni populaciji ugotovili pri keratozi, intraepitelijskem in invazivnem karcinomu v grlu letno incidenco 5,8, 0,4 in 3,3 na 100 000 prebivalcev⁵.

Etiologija

Med etiološkimi dejavniki imata pri razvoju predstopenj in raka v ustni votlini, ustnem in spodnjem žrelu in grlu (UVŽG) najpomembnejšo vlogo tobak (kajenje, žvečenje, njuhanje) in prekomerno uživanje žganih pijač ter še posebej kombinacija obeh škodljivih dejavnikov. Med preostalimi rizičnimi faktorji so pomembni tudi



Sliki 1a in 1b. Enostavna hiperplazija in hiperplazija celic bazalne in parabazalne plasti - benigni spremembi.

številni škodljivi kemični in fizikalni dejavniki v industriji in na drugih delovnih mestih. Vloga mikroorganizmov, predvsem okužba s kandido in humanimi virusi papiloma (HPV) v karcinogenezi ni zanesljivo dokazana^{3,4,6}. Izjema je le rak v področju nebnic, ki se vse bolj zanesljivo povezuje z okužbo s HPV, predvsem z genotipoma 16 in 18⁷. Pred pojavljanjem predstopenj in raka v ustni votlini naj bi imela pomembno zaščitno vlogo prehrana, ki vsebuje tiamin, niacin, antioksidante, kot so vitamini A,C, E in večje količine sadja in zelenjave⁴.

Klinične značilnosti

Levkooplakije se pojavljajo predvsem pri bolnikih po 30. letu starosti in dosežejo vrh pri 50. letih. Razmerja med moškimi in ženskami so v različnih predelih sveta različna, od pogostejše obolevnosti pri moških do razmerja 1:1 v razvitem svetu⁸. Bele lise se pojavljajo na ustni sluznici kot posamezne lokalizirane spremembe, lahko so multiple in difuzne. Najpogosteje so vidne na lični in dlesnični sluznici, pojavljajo se tudi na jeziku, ustnem dnu in na ustnici. Po klinični sliki se levkooplakije delijo glede na strukturo površine in obliko spremembe v homogene (80%) in nehomogene (20%). Prehod v karcinom je pri homogeni obliki

opisan le v 5%⁹. Nehomogena levkooplakija, pri kateri je prehod v maligno obliko pogostejši, ima več oblik: nodularno in verukozno ter eritrolevkooplakijo.

Eritroplakija je redka, pojavlja se predvsem na ustnem dnu, zgornji in spodnji površini jezika ter retromolarno kot ostro zamejena lisa z žametno površino.

Levkooplakija na sluznici grla in kronični laringitis se pojavljata predvsem pri moških po 50. letu, razmerje med moškim in ženskami je približno 10:1. Na sluznici glasik lahko opazimo ostro zamejene, neravne belkaste obloge, pogosto eksofitične. Pri kroničnem laringitisu je sluznica obeh glasilk navadno difuzno zadebeljena, neravna rdečkastorjava, lahko pa je delno ali v celoti obložena z belkastimi oblogami^{3,6,10-12}.

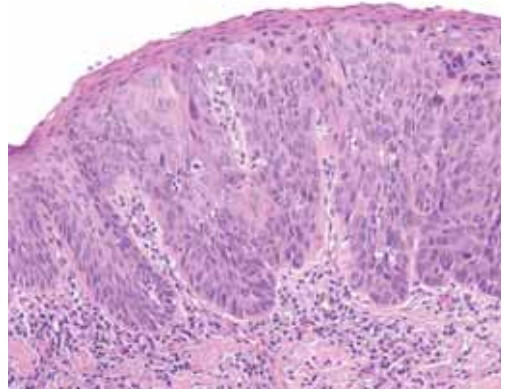
Patohistološka diagnostika

Za spoznavo in opredelitev epiteljskih sprememb sluznice UVŽG je patohistološki pregled tkivnih vzorcev najpomembnejša in za sedaj najbolj zanesljiva diagnostična metoda. Za oceno intraepiteljskih sprememb na sluznici UVŽG so v zadnji izdaji knjige Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) »Head and Neck Tumours« navedene tri različne klasifikacije, sistem displazije in sistem oralne intraepiteljske neoplazije ter

Ljubljanska klasifikacija^{12,13}. Pri prvih dveh razvrstitvah posamezne skupine epitelijskih sprememb niso natančno opredeljene in povezane z napovedjo razvoja bolezni. Po Ljubljanski razdelitvi razvrščamo spremembe epitelijskega v štiri skupine. Enostavna hiperplazija in hiperplazija celic bazalne in parabazalne plasti sta benigni spremembi z majhno verjetnostjo prehoda v karcinom (slika 1a in 1b). Atipična hiperplazija ali rizični epitelij je ključna, potencialno maligna sprememba z nepredvidljivim biološkim potekom (slika 2). V posebno četrto skupino je uvrščen intraepitelijski karcinom (slika 3)^{3,6,10-12}. Posamezne rizične skupine so z natančno izdelanimi morfološkimi merili povezane z napovedjo razvoja bolezni in izbiro zdravljenja. V vsem spektru epitelijskih sprememb je atipična hiperplazija ali rizični epitelij ključna morfološka sprememba za prehod v karcinom^{9,11}. Najpomembnejša histološka merila, po katerih razvrščamo spremembe v posamezno rizično skupino, so: izguba stratifikacije epitelijskega in polarizacije celic, hiperplazija celic bazalnega in parabazalnega sloja, jedrne in celične atipije, povečano število in velikost jedrc, spremenjeno razmerje med citoplazmo in jedrom, pojav in položaj mitoz, še posebej patoloških mitoz ter pojav diskeratotičnih in apoptotičnih celic^{12,13}. Patolog mora skupaj s stopnjo rizičnosti epitelijskih sprememb opisati tudi, ali je sprememba odstranjena v celoti in kakšne so spremembe epitelijskega v reznih ploskvah biopsije. Z izvidom usmerja kirurga v izbiro načina zdravljenja in sledenja bolnikov.

Maligna transformacija

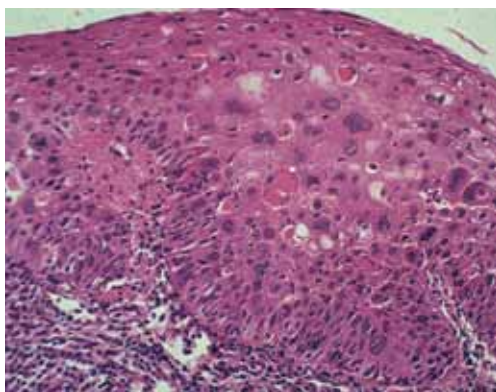
Maligna transformacija sprememb na sluznici UVŽG je tesno povezana z dolžino časovnega sledenja in stopnjo rizičnosti epitelijskih sprememb. Pojav atipične hiperplazije v levkoplakiji pomeni večjo verjetnost za razvoj karcinoma v ustni votlini,



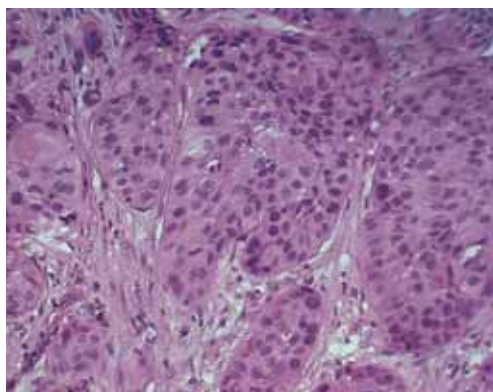
Slika 2. Atipična hiperplazija, rizični epitelij ali potencialno maligna sprememba z nepredvidljivim biološkim potekom.

kar je prikazal Cowen s sodelavci v prospektivni študiji s 165 bolniki z rizičnim epitelijem in maligno transformacijo v 16% ter s 1182 bolniki z benignimi epitelijskimi spremembami in maligno transformacijo v 1%. Bolnike so sledili od 45 do 65 mesecev¹⁴. Klinični dejavniki, ki ob histološki sliki rizičnega epitelijskega povečujejo verjetnost prehoda levkoplakije v karcinom so: dolgotrajnost spremembe pri nekadilcih, lokalizacija na ustnem dnu in/ali jeziku, nehomogena oblika levkoplakije, infekcija s kandido in ženski spol.

Podobne rezultate imamo tudi pri spremljanju bolnikov s kroničnim laringitisom ali levkoplakijo na glasilkah več kot dve desetletji. Ugotovili smo, da so bolniki z atipično hiperplazijo izrazito rizična skupina s prehodom v karcinom v 11,6%. Pri bolnikih s spremembami, ki jih Ljubljanska klasifikacija uvršča med benigne (enostavna hiperplazija in hiperplazija celic bazalne in parabazalne plasti), je v 16 letih le 0,9% teh sprememb prešlo v invazivno obliko raka. Ti rezultati potrjujejo vrednost izbranih histoloških kriterijev Ljubljanske klasifikacije ter upravičenost osrednje vloge rizičnega epitelijskega v celotnem sklopu intraepitelijskih sprememb^{3,6,10-12}.



Slika 3. Intraepitelijski rak.



Slika 4. Srednje diferenciran, invazivni ploščatocelični rak, gradus II.

Napovedni dejavniki

Samo s klinično oceno in tradicionalnim svetlobnomikroskopskim pregledom ni mogoče z gotovostjo napovedati razvoja potencialno malignih sprememb sluznice UVŽG. Zato danes, predvsem v raziskovalni dejavnosti, vse pogosteje uporabljamo metode molekularne patologije, s katerimi je mogoče opredeliti genetske spremembe v posameznih celicah še pred pojavom fenotipičnih sprememb in tako morda bolj zanesljivo napovedati klinični potek epitelijskih sprememb. Številne raziskave na tem področju lahko delimo v tri vsebinske sklope:

- 1) iskanje napovednih dejavnikov v spremembah genoma, vključno z DNK ploidijo, kromosomskimi nepravilnostmi in spremembami beljakovinskih pridelkov onkogenov in tumorje zavirajočih genov.
- 2) pomen izražanja proliferacijskih kazalcev.
- 3) spremembe v kazalcih diferenciacije epitelijskega tkiva, vključno s spremembami v keratinskih genih in ogljikovih hidratih na površini epitelijskih celic.

Do danes še ne poznamo kazalca, ki bi zanesljivo napovedal maligno transformacijo. Raziskave kažejo, da so spremembe v DNK (aneuploidija) pomemben napovedni

dejavnik pri razvoju raka, enako izguba heterozigotnosti na kromosomih 3p in 9p in spremembe v keratinskih genih povezanih z diferenciacijo epitelijskega tkiva^{6,9}.

Rak ustne votline, žrela in grla

Ploščatocelični karcinom glave in vratu je šesti najpogostnejši rak v svetu. Med vsemi karcinomi odpade na to obliko raka 5% tumorjev, letna incidenca v svetu je 500 000 novo odkritih tumorjev. V Sloveniji je bil pri moških rak glave in vratu leta 2002 po pogostnosti na petem mestu s 7,6% med vsemi rakavimi boleznimi. V istem letu so v Sloveniji odkrili 187 novih bolnikov in 44 novih bolnic z rakom ustne votline in ustnega dela žrela ter 148 novih bolnikov in 15 novih bolnic z rakom spodnjega žrela in grla¹⁵.

V ustni votlini je rak najpogostnejši na ustnici, lateralnem robu jezika in na ustnem dnu, v ustnem delu žrela na bazi jezika in na nebnicah. V predelu grla prevladuje rak v Sloveniji v zgornjem, supraglotisnem delu, v nekaterih severnih državah Evrope in ZDA pa na glasilkah.

Makroskopsko se rak kaže kot infiltrativna, neostro zamejena tvorba, z razjedo na površini, ki ima neravne in podminirane

robove. Tumor lahko raste tudi eksofitično, kot polipodna ali resičasta neostro zamejena tvorba. Rak v področju UVŽG spoznamo s histopatološkim pregledom majhnih tkivnih odščipov. Histološko je rak v področju UVŽG v 90% običajen ploščatocelični, z ali brez poroženjavanja (slika 4). Po stopnji diferenciacije ga patolog oceni kot dobro, srednje in slabo diferencirani rak, po stopnji anaplazije (gradus) tumorskih celic pa v tri stopnje. Čim manj je tumor diferenciran in čim bolj so izraženi znaki anaplazije, bolj je tumor malignen.

V manj kot 10% se lahko pojavljajo v predelu UVŽG redke podvrste ploščatoceličnega raka, ki imajo zelo različni biološki potek in preživetje v primerjavi z običajno obliko ploščatoceličnega raka. Verukočni karcinom raste počasi, le izjemoma zaseva in ima boljše napoved od običajnega ploščatoceličnega raka, enako tudi papilarni karcinom. Nasprotno pa imajo bazalodni, limfoepitelijski in adenoskvamozni karcinomi slabšo napoved od običajnega raka, pri teh oblikah so pogosti področni in oddaljeni zasevki. Pri adenoskvamoznem raku je 5-letno preživetje od 13-25%. Vretenastocelični in adenoidni- ploščatocelični rak imata podoben biološki potek in napoved kot običajna oblika ploščatoceličnega raka. Ostale oblike raka, predvsem žlezni in maligni mezenhimski tumorji so v predelu UVŽG redki⁶.

Ploščatocelični karcinom UVŽG se lahko širi v sosednje organe neposredno, lahko se širi z zasevanjem po limfi (zasevki v področnih in oddaljenih bezgavkah) in/ali krvi (oddaljeni zasevki), lahko se širi tudi ob živcih (perinevralna invazija). Ploščatocelični karcinom UVŽG pogosto zaseva v področne bezgavke na vratu. Položaj in pogostnost zasevkov sta odvisna od mesta in velikosti primarnega tumorja. S serijskim pregledom vseh bezgavk in z dodatno uporabo imunohistokemičnih preiskav lahko povečamo senzitivnost histološke preiskave pri odkrivanju zasevkov v bezgavkah. Prisotnost zasevkov na

vratu je slab napovedni dejavnik in zmanjša 5-letno preživetje bolnikov za približno 50%. Širjenje raka preko vezivne kapsule bezgavk (ekstrakapsularna invazija) je še dodaten negativen napovedni dejavnik in vpliva na področno ponovitev bolezni.

Oddaljeni zasevki pri raku UVŽG se pojavljajo najpogosteje pod ključnico in so lahko hematogeni ali limfogeni. Oddaljeni limfogeni zasevki se pojavljajo v bezgavkah v medpljučju, pazduhah in dimljah. Hematogeno pa se rak širi predvsem v pljuča, jetra, kosti, kožo in možgane. Oddaljeni zasevki so znak poznega stadija bolezni in se pojavljajo pri 3-8,5% bolnikov z rakom UVŽG. Najpogostejši oddaljeni zasevki so pri raku spodnjega žrela in jezika. Bolniki z oddaljenimi zasevki preživijo povprečno od 4 do 7 mesecev. Za vse zasevke ploščatoceličnega raka UVŽG pa je značilno, da postanejo klinično zaznavni v prvih dveh letih po odkritju bolezni⁶.

Bolniki s ploščatoceličnim karcinomom UVŽG lahko zbolijo še za drugim primarnim rakom v tem področju, vendar na drugem mestu, kot je bil primarni tumor. Drugi primarni tumor je sočasen (sinhron), če se pojavi v šestih mesecih po odkritju prvega, in metahron, če je časovni interval daljši od šest mesecev. Prevalenca drugega primarnega tumorja pri bolnikih z rakom UVŽG je 9%. Nastanek novega primarnega tumorja je tesno povezan z nadaljevanjem kajenja in uživanja žganih pijač. Dolgoletno delovanje škodljivih dejavnikov vodi k povečani genetski okvari epitelijskih celic v vsem področju sluznice glave in vratu, kar imenujemo »*field cancerisation*«. Napoved pri drugem raku UVŽG, sinhronem ali metahronem, je slabša, kot pri prvem tumorju⁶.

Vloga patologa pri oceni operacijskega preparata raka UVŽG in bezgavk na vratu

Če je bolnik zdravljen kirurško, dobi patolog v oceno operacijski preparat s tumorjem in pogosto tudi z odstranjenimi bezgavkami

na vratu, eno- ali obojestransko. Patologov izvid bo odločilno vplival na izbiro morebitnega dodatnega zdravljenja in napoved razvoja bolezni. Ocena operacijskega preparata mora vsebovati natančno mesto tumorja v organu, velikost in največjo debelino tumorske rasti. V opisu moramo navesti, ali smo ugotovili primarni tumor ali pomovitev bolezni in ali je bil bolnik že prehodno zdravljn. Ob histološkem tipu tumorja mora biti navedena tudi stopnja diferenciranosti in gradus tumorja ter oblika invazivnega roba (infiltrativna ali ekspanzivna). Patolog mora pregledati tumor v celoti in ugotoviti ali je prisotna razrast tumorja ob žvicah (perineuralna invazija), ali so vidne karcinomske celice v limfnih žilah (karcinomska limfangioza) in ali so tumorske celice tudi v krvnih žilah (blastomski trombi). Vsi ti parametri so za bolnika slabi napovedni dejavniki. Nadalje mora patolog opredeliti morebitno širjenje tumorja v druga tkiva, kot so hrustanec, kost, koža in opisati morebitno invazijo v drugi organ, n.pr. širjenje karcinoma spodnjega dela žrela v grlo. Zelo razširjeni karcinomi imajo v primerjavi z majhnimi in zamejenimi raki vsekakor slabo napoved. S histološkim pregledom mora patolog tudi opredeliti, ali raste rak iz enega žarišča ali pa je rast multicentrična. Izredno pomemben podatek za terapevta je, če je tumor izrezan v zdravo (R0) ali ne (R1). Radikalnost operacije patolog največkrat ocenjuje že z intraoperativno metodo »zaledenelega reza«.

Iz operacijskega preparata bezgavk na vratu mora patolog izolirati vse bezgavke, opredeliti njihovo lokalizacijo po področjih na vratu (najpogosteje so iz področij I.-V.) in jih histološko pregledati. V patohistološkem izvidu mora opredeliti število vseh pregledanih bezgavk, število bezgavk z zasevki v posameznih področjih in dodati morebitno ekstrakapsularno invazijo. Opisati mora tudi prisotnost blastomskih trombov v žilju ob bezgavki.

V povzetku histopatološkega izvida mora patolog navesti mesto vznika in fenotip z diferenciacijo in gradusom tumorja, število in lokalizacijo zasevkov, morebitno ekstrakapsularno invazijo in opisati reseksijske robove tumorja, dodati mora, ali gre za primarni tumor, ponovitev bolezni ali za morebitni sekundarni tumor ter zaključiti izvid s histopatološkim »p«TNM. Vsi naštetni parametri odločilno vplivajo na napoved razvoja bolezni.

Literatura

1. Suarez P, Batsakis JG, El-Naggar AK. Leukoplakia: still a gallimaufry or is progress being made? – A review. *Adv Anat Pathol* 1998; **5**: 137-55.
2. Axell T, Pindborg JJ, Smith CJ, van der Waal I. Oral white lesions with special references to precancerous and tobacco-related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Swede, May 18-21, 1994. International Collaborative Group on Oral White Lesions. *J Oral Pathol Med* 1996; **25**: 49-54.
3. Kambič V, Gale N. *Epithelial hyperplastic lesions of the larynx*. Amsterdam: Elsevier; 1995. p. 1-265.
4. Reichart PA. Identification of risk groups for oral precancer and cancer and preventive measures. *Clin Oral Invest* 2001; **5**: 207-13.
5. Bouquot JE, Kurland LT, Weiland LH. Laryngeal keratosis and carcinoma in the Rochester, MN, population. *Cancer Detect Prevent* 1991; **15**: 83-91.
6. Gale N, Zidar N. Benign and potentially malignant lesions of the squamous epithelium and squamous cell carcinoma. In: Cardesa A, Slootweg PJ, editors. *Pathology of the Head and Neck*. Berlin: Springer; 2006. p. 2-38.
7. Kinsky AA, Poljak M, Seme K, Kocjan BJ, Gale N, Luzar B, et al. Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal oral mucosa. *Acta Virol* 2003; **47**: 11-6.
8. van der Waal I, Schepman KP, van der Meij EH, Smeele LE. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. *Oral Oncol* 1997; **33**: 291-301.
9. Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; **14**: 47-62.

10. Hellquist H, Cardesa A, Gale N, Kambič V, Michaels L. Criteria for grading in the Ljubljana classification of epithelial hyperplastic laryngeal lesions. A study by members of the Working group on Epithelial Hyperplastic Laryngeal Lesions of the European Society of Pathology. *Histopathology* 1999; **34**: 226-33.
11. Gale N, Kambič V, Michaels L, Cardesa A, Hellquist H, Zidar N, et al. The Ljubljana classification: a practical strategy for the diagnosis of laryngeal precancerous lesions. *Adv Anat Pathol* 2000; **7**: 240-51.
12. Gale N, Pilch BZ, Sidransky D, Westra WH, Califano J. Epithelial precursor lesions. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. *World health organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours*. Lyon: IARC; 2005. p. 140-3.
13. Gale N, Pilch BZ, Sidransky D, Westra WH, Califano J. Epithelial precursor lesions. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. *World health organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours*. Lyon: IARC; 2005. p. 177-9.
14. Cowan CG, Gregg TA, Napier SS, McKenna SM, Kee F. Potentially malignant oral lesions in northern Ireland: a 20-year population-based perspective of malignant transformation. *Oral Dis* 2001; **7**: 18-24.
15. *Incidenca raka v Sloveniji 2002*. Poročilo RR 44. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana – Register raka za Slovenijo; 2005.