

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTAMENTUL IX: CHIRURGIE I
OTO-RINO-LARINGOLOGIE**

SITARU ADRIAN MIHAIL



TEZĂ DE DOCTORAT

**ASPECTE LEGATE DE NEOPLASMELE
TRACTULUI RESPIRATOR SUPERIOR ȘI
ASOCIEREA ACESTORA CU NICOTINĂ**

– R E Z U M A T –

Conducător Științific
PROF. UNIV. DR. MARIOARA POENARU

**Timișoara
2022**

CUPRINS

Lista lucrărilor științifice publicate	VI
Lista cu abrevieri și simboluri	VII
Indexul figurilor	VIII
Indexul tabelelor	XII
Mulțumiri	XIII
INTRODUCERE	XIV
PARTEA GENERALĂ	1
CAPITOLUL I. PATOLOGII ALE TRACTULUI RESPIRATOR SUPERIOR	1
I.1 Introducere	1
I.2 Factori de risc	5
I.2.1 Receptorii nicotinici de acetilcolină și sănătatea tractului respirator superior	6
CAPITOLUL II. MANAGEMENTUL BOLILOR MALIGNNE ALE TRACTULUI RESPIRATOR SUPERIOR	10
II.1 Introducere	10
II.2 Diagnostic	11
II.3 Tratament	15
II.3.1 Intervenția chirurgicală	16
II.3.2 Terapia cu radiații	17
II.3.3 Terapii medicamentoase	19
CAPITOLUL III. IMPORTANȚA CERCETĂRII PRECLINICE PENTRU SUCCESUL MANAGEMENTULUI CLINIC	22
III.1 Introducere	22
III.2 Testele <i>in vitro</i> în studiul patologiilor tumorale	29
PARTEA SPECIALĂ	33
CAPITOLUL IV. CONTRIBUȚII LEGATE DE EFECTELE CITOTOXICE ALE NICOTINEI ASUPRA UNOR CELULE SĂNĂTOASE ȘI OBSERVAȚII SPECIFICE LEGATE DE POTENȚIALUL IRITANT	34
IV.1 Introducere	34
IV.2 Materiale și metode	36
IV.2.1 Reactivi	36
IV.2.2 Culturi celulare	36
IV.2.3 Evaluarea viabilității celulare	37

IV.2.4 Morfologia celulară	37
IV.2.5 Marcarea nucleară	38
IV.2.6 Testul membranei corioalantoide (CAM)	38
IV.2.7 Testul Hen's egg pe membrana corioalantoidă (HET-CAM)	39
IV.2.8 Analiza statistică	40
IV.3 Rezultate	40
IV.3.1 Viabilitatea celulară	40
IV.3.2 Morfologia celulară	43
IV.3.3 Marcarea nucleilor	48
IV.3.4 Testul HET-CAM	52
IV.4 Discuții	56
IV.5 Concluzii	61
CAPITOLUL V. CONTRIBUȚII LA STUDIILE PRECLINICE CARE VIZEAZĂ NICOTINA ȘI ROLUL ACESTEIA ÎN PATOLOGIIILE MALIGNNE DIN SFERA ORL	62
V.1 Introducere	62
V.2 Materiale și metode	64
V.2.1 Reactivi și celule	64
V.2.2 Evaluarea citotoxicității	64
V.2.3 Analiza statistică	65
V.3 Rezultate și discuții	65
V.4 Concluzii	71
CAPITOLUL VI. INCIDENȚA CANCERELOR DE LARINGE DIAGNOSTICATE ÎN ZONA DE VEST A ROMÂNIEI	72
VI.1 Introducere	72
VI.2 Materiale și metode	74
VI.2.1 Sursa datelor	74
VI.2.2 Evaluarea histopatologică	75
VI.2.3 Considerații etice	75
VI.2.4 Analiza statistică	75
VI.3 Rezultate	76
VI.3.1 Date epidemiologice, caracteristici speciale și intervenții	76
VI.3.2 Evaluarea histopatologică	81
VI.4 Discuții	88
VI.5 Concluzii	91
CONCLUZII GENERALE ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE	92
BIBLIOGRAFIA	96
ANEXE	I

REZUMAT

Neoplasmele laringiene sunt una dintre cele mai frecvente afecțiuni maligne ale capului și gâtului, reprezentând o treime din totalul cancerelor de cap și gât, fiind o sursă semnificativă de morbiditate și mortalitate. În anul 2020, în țara noastră, neoplasmele laringiene au fost diagnosticate în număr de peste 1,900 și au produs peste 1,100 decese. În patologia malignă a laringelui sunt implicați mai mulți factori de risc, dintre care cel mai important este fumatul.

Ultimele rapoarte plasează România pe primul loc între țările UE-27 în ceea ce privește mortalitatea datorată neoplasmelor laringiene, cu o rată relativă de modificare a ASR de peste 133%. În aceste statistici, România a fost urmată de Polonia, Bulgaria, Lituania și Ungaria. Potrivit aceluiași raport, țările care în trecut aveau o incidență crescută a mortalității (cum ar fi Franța, Spania și Italia), au prezentat acum valori semnificativ reduse.

Principalul factor de risc al apariției și dezvoltării neoplasmelor laringiene este consumul de tutun (asociat cu peste 90% din cazuri, identificate în special zona glotică).

Liniile de celule canceroase sunt sisteme model *in vitro* valoroase care sunt utilizate pe scară largă în cercetarea cancerului și descoperirea/elaborarea de noi protocoale terapeutice. Utilizarea lor este legată în primul rând de capacitatea particulară de a furniza o sursă nedefinită de material biologic în scopuri experimentale.

Lucrarea de față a fost redactată conform normelor specifice și este structurată pe două părți, partea generală și partea specială. Partea generală cuprinde trei capitole în care sunt abordate după ultimele ghiduri și cercetări următoarele: tipurile de patologii maligne ale tractului respirator, managementul acestor patologii și relevanța studiilor preclinice pentru succesul managementului clinic. Partea specială, la rândul ei, cuprinde tot trei

capitole, și anume: contribuții legate de efectele citotoxice ale nicotinei asupra unor celule sănătoase și observații specifice legate de potențialul iritant; contribuții la studiile preclinice care vizează nicotina și rolul acesteia în patologiiile maligne din sfera ORL și incidența cancerelor de laringe diagnosticate în zona de vest a României.

Diagnosticul precoce joacă un rol important deoarece contribuie la o rată de supraviețuire ridicată în comparație cu omologii diagnosticați târziu. În ultimii ani, deși s-a observat o ușoară scădere a incidenței neoplasmelor laringiene, rata mortalității a crescut surprinzător. Până la începutul anilor 1990, tratamentul standard pentru neoplasmele laringiene a fost laringectomia totală în combinație cu radioterapia. Tumorile în stadiu incipient sunt tratate prin microchirurgia transorală cu laser cu dioxid de carbon, în timp ce în stadiile mai avansate ar putea fi implicate laringectomii parțiale și terapii combinate. Protocolul de tratament pentru neoplasmele laringiene diagnosticate stadiile I și II dă dovadă de o lipsă de date prospective, deoarece nu există o abordare comună în practica clinică.

În ciuda diferitelor rapoarte disponibile în prezent, care oferă mai multe date epidemiologice asociate cu neoplasmele laringiene, epidemiologia locală este precară, iar perspectiva globală este incompletă. Costurile asociate cu tratamentul neoplasmelor laringiene sunt mari, iar calitatea vieții pacientului este extrem de afectată. Sunt necesare informații epidemiologice exacte pentru a dezvolta strategii eficiente de prevenire și pentru a contribui la diagnosticarea precoce a acestora.

În ceea ce privește obiectivele științifice, acestea au fost în număr de trei, și anume: (a) determinarea prin studii preclinice, *in vitro*, a efectelor exercitate de nicotină (în ceea ce privește viabilitatea, morfologia și structura nucleului) asupra celulelor sănătoase (keratinocite, hepatocite și cardiomiocite) și a efectului legat de potențialul iritant prin intermediul testului pe membrana corioalantoidă de ou embrionat, (b) selectarea a două linii celulare (keratinocite gingivale umane și carcinomul faringian) pentru

evaluarea comportamentului acestora (cu ajutorul testelor de citotoxicitate și proliferare celulară) în prezența nicotinei și (c) analiza datelor epidemiologice și particularitățile histopatologice la pacienții cu neoplasm laringian diagnosticați în vestul României.

Metodele abordate pentru a realiza activitățile necesare pentru atingerea obiectivelor sunt metode de actualitate care conduc la rezultate reproductibile. Pentru studiile preclinice *in vitro* s-au utilizat teste specifice de analiză a morfologiei celulare, de cuantificare a viabilității celulare, de analiză a modificărilor la nivel de nucleu, în timp ce pentru studiile *in ovo* s-a utilizat testul membranei corioalantoide de ou embrionat care a permis vizualizarea efectelor la nivelul vaselor sanguine. În ceea ce privește analiza incidenței neoplasmelor laringiene diagnosticate în zona de vest a României a fost prezentată sursa datelor și s-au analizat analizele histopatologice într-un studiu de tip retrospectiv.

Partea generală cuprinde trei capitole care abordează: (a) patologiiile tractului respirator superior, (b) managementul bolilor maligne ale tractului respirator superior și (c) importanța cercetării preclinice pentru succesul managementului clinic.

Partea experimentală este structurată pe trei capitole care descriu direcțiile principale de cercetare și care sunt interconectate. Primul capitol/studiu este centrat pe efectele citotoxice ale nicotinei asupra unor celule sănătoase și observații specifice legate de potențialul iritant. Nicotina este o substanță psihoactivă cunoscută pentru dependența semnificativă pe care este capabilă să o inducă. În plus, are un profil toxicologic ridicat, aparținând categoriei celor mai nocive substanțe. Totuși, în ceea ce privește efectul nicotinei asupra fumătorilor, este mai dificil să se stabilească o relație de cauzalitate directă între aceasta și efectele toxice sistemice, datorită faptului că atât țigările obișnuite, cât și țigările electronice conțin o multitudine de alte substanțe cu potențial toxic. Mai multe boli asociate cu consumul de tutun au devenit mai răspândite în ultimii ani, ca urmare a creșterii acestui tip de

consum. Există multe consecințe cunoscute ale fumatului la adulți, inclusiv apariția proceselor canceroase în organele expuse tutunului, precum și câteva afecțiuni cronice, cum ar fi tulburări oculare și boli cardiovasculare, pulmonare și parodontale. Fumatul are un efect toxic asupra organismului, afectând o varietate de celule din organism. Plasturii transdermici cu nicotină și efectele toxice ale fumatului pot afecta negativ keratinocitele. Nicotina este metabolizată în primul rând de către hepatocite, motiv pentru care consumul de tutun duce la diferite modificări toxice la acest nivel. Prin urmare, studiul actual a fost conceput pentru a evalua efectele nicotinei asupra acestor celule la nivel celular. În plus, pentru a obține o înțelegere mai cuprinzătoare a potențialului toxic al nicotinei, a fost aplicată metoda HET-CAM pentru a determina potențialul de iritare a membranei corioalantoide a ouălor de găină. Prin calcularea echivalentului miligramului pe baza densității nicotinei, s-au obținut următoarele concentrații: 0.10, 10.1, 25.2, 50.4 și 101 mg. Concentrațiile testate în acest studiu au fost alese în primul rând pe baza conținutului de nicotină al țigărilor electronice. S-a demonstrat că există o problemă semnificativă cu raportarea conținutului de nicotină. În plus, s-a stabilit că, conținutul mediu de nicotină din țigările electronice variază între 6 și 36 mg/mL și poate ajunge până la 60 mg/mL. Mai mult, a fost luat în considerare și conținutul de nicotină al unei țigări, care variază în funcție de tipul și mărimea produsului, la o concentrație de 6 până la 28 mg/g de tutun. Cu toate acestea, cantitatea de nicotină absorbită după fumatul unei țigări este de aproximativ 1.1 până la 1.5 mg de nicotină per țigară. Având în vedere faptul că o persoană poate fuma în medie 20 de țigări pe zi, cantitatea de nicotină la care poate fi expusă în orice zi variază între 22 și 30 mg. În timpul studiului, s-a observat că nicotina poate induce o reducere marcată a viabilității celulare, în special la cele mai mari concentrații testate (50 și 100 μ L/mL), rezultând o viabilitate medie de doar 2% pentru toate liniile celulare testate. În plus, un pas semnificativ în acest studiu a fost evaluarea efectului nicotinei asupra vaselor de sânge ale membranei corioalantoide a ouălor de găină.

Conform constatărilor noastre, cea mai mică concentrație testată, 0.1 $\mu\text{L/mL}$, nu a contribuit semnificativ la modificările arhitecturii vasculare. În schimb, expunerea la concentrații de 50 și 100 $\mu\text{L/mL}$ a indus efecte iritante pe scară largă, inclusiv hemoragia, coagularea și liza vaselor de sânge. În acest caz, scorul de iritație calculat pentru cele două concentrații a fost analog cu cel al martorului pozitiv, sugerând că nicotina este o substanță foarte iritantă. Din câte știm, efectul iritant asupra membranei corioalantoide nu a fost încă explorat.

Cel de-al doilea capitol a vizat studiile preclinice prin prisma analizei efectului nicotinei asupra unor tipuri de cellule sănătoase și tumorale aflate în strânsă legătură cu afecțiunile maligne ale tractului respirator superior. Asimilarea nicotinei poate apărea în cavitatea bucală, cavitatea nazală, faringe (nazofaringe, orofaringe și hipofaringe), învelișul laringelui, plămâni, vezica urinară și tractul gastro-intestinal, iar gradul de absorbție este în funcție de pH. În stare ionizată în medii acide, nicotina traversează lent membranele biologice. Absorbția nicotinei în plămâni este rapidă (are loc la o rată similară cu cea după administrarea intravenoasă) datorită suprafeței mari a alveolelor pulmonare și a pH-ului de aproximativ 7.4, în timp ce la nivelul stomacului, absorbția nicotinei este redusă datorită pH-ului acid al sucului gastric, dar este bine absorbită în intestin datorită pH-ului alcalin și suprafeței mari de absorbție.

Cel de-al treilea capitol este un studiu retrospectiv care abordează incidența în particularitățile histopatologice ale neoplasmelor laringiene în zona de vest a României. În patologia malignă a laringelui sunt implicați mai mulți factori de risc, care sunt cel mai adesea diagnosticați la pacienții cu antecedente semnificative de fumat și pot implica diferite locații ale laringelui. Datele au arătat un risc ridicat de a dezvolta cancer laringian la fumători (de 10-15 ori mai mare în comparație cu nefumătorii) și un risc extrem de mare la fumătorii înrăiți (de 30 de ori mai mare în comparație cu nefumătorii). Diagnosticul precoce joacă un rol important deoarece contribuie la o rată de supraviețuire ridicată în comparație cu omologii diagnosticați târziu. În ceea ce

privește stadializarea, carcinomul *in situ* este clasificat în stadiul 0 (cel mai timpuriu stadiu) cu cele mai bune rate de răspuns. Celelalte stadii sunt de la I la IV, împărțite în substadii, stadiul IVc fiind cel mai avansat cu cele mai scăzute rate de răspuns. În ciuda diferitelor rapoarte disponibile în prezent, care oferă mai multe date epidemiologice asociate cu neoplasmelor laringiene, epidemiologia locală este precară, iar perspectiva globală este incompletă. Costurile asociate cu tratamentul neoplasmelor laringiene sunt mari, iar calitatea vieții a pacientului este extrem de afectată. Sunt necesare informații epidemiologice exacte pentru a dezvolta strategii eficiente de prevenire și pentru a contribui la diagnosticarea precoce a neoplasmelor laringiene.

Principalele concluzii care se pot desprinde sunt redată în cele ce urmează.

Studiul 1. Contribuții legate de efectele citotoxice ale nicotinei asupra unor celule sănătoase și observații specifice legate de potențialul iritant. A presupus evaluarea profilului toxicologic al nicotinei atât *in vitro*, la nivelul a trei linii celulare sănătoase, cât și *in ovo*, la nivelul membranei corioalantoide.

- rezultatele obținute în prezentul studiu contribuie la înțelegerea activității nicotinei asupra celulelor orale, dar și asupra celulelor tumorale ale faringelui.
- nicotina exercită la anumite concentrații efecte nocive asupra celulelor, distruge celulele sănătoase, ceea ce are drept consecință lezarea celulelor și apariția leziunilor precanceroase.
- în cazul unei boli maligne, nicotina poate intensifica manifestările celulare, iar rezultatele sunt negative pentru recuperarea pacientului.
- cinci concentrații diferite de nicotină au fost utilizate în keratinocite, cardiomiocite și hepatocite în scopul evaluării viabilității celulelor, morfologiei celulelor și impactului acestora asupra nucleelor.
- metoda testului pe membrana corioalantoidă de ouă de găină (HET-CAM) a fost utilizată pentru a analiza biocompatibilitatea și potențialul iritant.

- în toate liniile celulare studiate, nicotina s-a dovedit a dăuna semnificativ viabilității celulare, cea mai mare concentrație testată având ca rezultat mai puțin de 2% celule viabile. Mai mult, morfologia celulelor s-a schimbat dramatic, cu modificări ale formei și confluenței lor. Moartea celulară indusă de nicotină pare a fi apoptotică, pe baza impactului său asupra nucleului.
- s-a evidențiat că nicotina are un efect iritant foarte puternic asupra membranei corioalantoide.
- nicotina are un profil toxicologic extrem de puternic, așa cum demonstrează reducerea drastică a viabilității celulare și inducerea unor modificări morfologice și alterărilor nucleare asociate cu apoptoza celulară.

-

Studiul 2. Contribuții la studiile preclinice care vizează nicotina și rolul acesteia în patologii maligne din sfera ORL. A presupus investigarea efectului nicotinei asupra keratinocitelor gingivale primare dar și asupra celulelor tumorale faringiene, prin evaluarea viabilității și a proceselor apoptotice.

- o serie de studii evidențiază efectele nocive ale fumatului și consecințele extrem de grave ale majorității compușilor găsiți în țigări și fumul de țigară.
- rezultatele obținute contribuie la înțelegerea activității nicotinei asupra celulelor bucale dar și asupra celulelor tumorale faringelui.
- nicotina exercită la anumite concentrații efecte nocive asupra celulelor, distruge celulele sănătoase ceea ce are drept consecință lezarea celulelor și apariția leziunilor precanceroase.
- în cazul unei boli maligne nicotina contribuie la intensificarea modificărilor morfologice celulare, iar rezultatele sunt negative pentru recuperarea pacientului.

Studiul 3. Incidența cancerelor de laringe diagnosticate în zona de vest a României. A presupus analiza datelor epidemiologice privind cancerul laringian și particularitățile histopatologice la pacienții diagnosticați în vestul României.

- în decurs de trei ani și 10 luni (în perioada octombrie 2016–iulie 2020) în Clinica ORL a Spitalului Clinic Municipal de Urgență Timișoara, au fost diagnosticați 194 de pacienți cu neoplasme laringiene.
- majoritatea pacienților au fost bărbați (93,8%), din județul Timiș, în principal, și din județele învecinate Caraș-Severin, Hunedoara, Mehedinți și Arad.
- vârsta medie a pacientului (ambele sexe) a fost de 62,6 ani, cu un interval de la 38 la 84 de ani și cele mai mari procente în grupa de vârstă 60+ (48%).
- în ceea ce privește statutul de fumător, principala cauză a dezvoltării neoplasmelor laringiene, 93,9% dintre pacienți au fost cei activi.
- în ceea ce privește localizarea [International Classification of Diseases 11th Revision (ICD-11)], aproximativ 69% erau neoplasme maligne de glotă (C32.0), urmate de supraglotă (C32.1), laringe nespecificat (C32.9) și subglotă. (C32.2).
- din punct de vedere histopatologic, au fost identificate mai multe tipuri de tumori, majoritatea fiind carcinoame spinocelulare nekeratinizate și keratinizate (circa 90%).
- au fost identificate tipuri de carcinom verucos, carcinom acantolitic, papilom scuamos, sarcom pleomorf și granulom piogen.
- datele prezentate în acest studiu evidențiază incidența în creștere a neoplasmelor laringiene, care afectează în principal bărbații, la o vârstă din ce în ce mai fragedă.
- este imperativ implicarea specialiștilor din nutriție, medicină generală, ORL, stomatologie pentru a demara programe de conștientizare și pentru a dezvolta protocoale de prevenire.

Utilizarea produselor din tutun este o problemă majoră de sănătate publică la nivel mondial, deoarece este principala cauză de deces care poate fi prevenită la nivel mondial. Nicotina este o componentă cheie a Țigărilor electronice și convenționale, potențialul de dependență al nicotinei este bine cunoscut dar efectele sale asupra sănătății încă nu sunt pe deplin înțelese. Legătura cu apariția neoplasmelor laringiene este una puternică iar studii viitoare de aprofundare și înțelegere a mecanismelor implicate sunt necesare. Totodată diferite programe de conștientizare, care să implice specialiști din diferite specialități ar trebui concepute și implementate într-un timp cât mai scurt.