



**UNIVERSITATEA DE MEDICINA SI FARMACIE**  
**“CAROL DAVILA”**  
**BUCURESTI**

**TEZĂ DE DOCTORAT**  
**REZUMAT**

**Studiul proprietatilor fotofizice ale**  
**corzilor vocale si aplicatii in**  
**laser-chirurgia clinica**

Coordonator stiintific:  
**Prof.Univ.Dr. Viorel ZAINEA**

Doctorand:  
**Romeo COSTIN**

**BUCURESTI**  
**2016**

# STADIUL ACTUAL AL CUNOASTERII TEMEI

## 1. Notiuni de anatomie si embriologie ale laringelui

### 1.1. Generalitati

Laringele este un organ impar, situat in regiunea anterioara cervicala, in pozitie mediana. Este parte a tractului aero-digestiv superior, facind legatura intre faringe (situat superior) si trahee (inferior). Limita sa superioara este reprezentata de marginea libera a epiglotei si de cele doua plici ari-epigloteice, iar cea inferioara de marginea inferioara a cartilajului cricoid. Limita anterioara este constituita de sus in jos de fata linguala a epiglotei, membrana tiro-hioidiana, cartilajul tiroid si arcul anterior al cricoidului, iar cea posterioara de aritenoizi si pecetea cricoidului.

Embriologic, laringele ia nastere prin dezvoltarea simultana a doua structuri: una de origine ectodermica (lama epiteliala) si alta mezenchimala (ultimile arcuri branhiale). Astfel, pe fata anterioara a intestinului cefalic anterior se formeaza un sant care se va inchide ulterior pentru a forma caile respiratorii inferioare. Prima aparitie a tractului respirator este in jurul zilei embrionare 21, iar epiglota este prima structura laringiana ce se diferentiaza, in ziua 30, cind embrionul are aproximativ 6 mm [1].

### 1.2.Coarda vocala

Exista in prezent o parere unanima asupra structurii corzii vocale. Aceasta sustine alcatuirea corzii vocale din mai multe straturi succesive, fiecare strat cu proprietati fizice (mecanice) diferite, contribuind fiecare la miscarile de tip oscilatoriu ale mucoasei laringiene. Astfel, pe o sectiune transversala a marginii libere a corzii vocale sint descrise urmatoarele straturi:

1. epitelial
  2. superficial
  3. intermediar
  4. profund
  5. muscular – muschiul vocal [13]
- 2,3 si 4 – din lamina propria

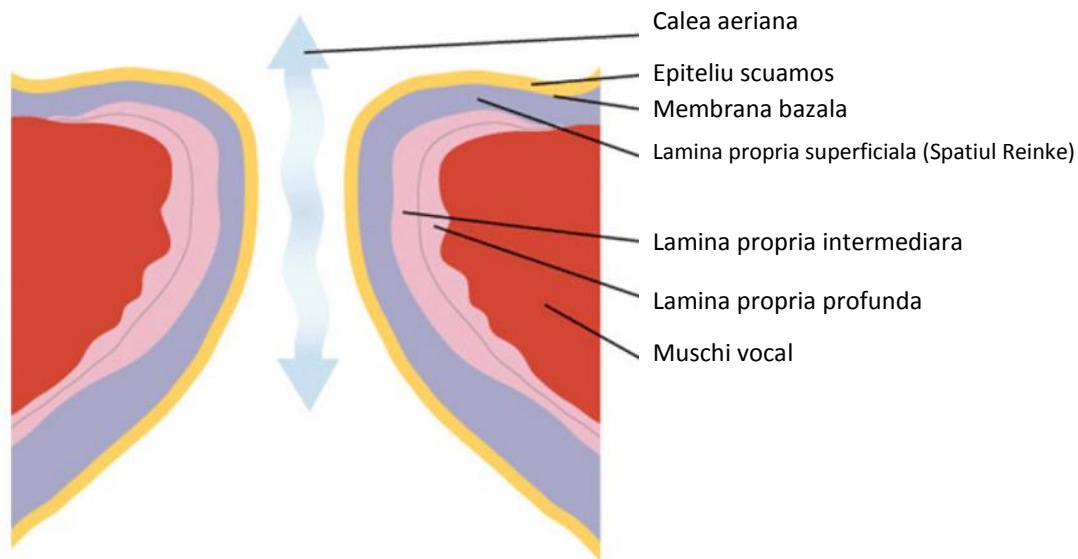


Figura 2. Secțiune transversala prin coarda vocala la adult (dupa Alexander Sevy, M.D.)

Epiteliul marginii libere a corzilor vocale este un epiteliu malpighian pluristratificat cu celule pavimentoase prismatice, spre deosebire de restul epiteliului laringian (care este de tip respirator – epiteliu cilindric pseudo-stratificat). Acest epiteliu are trei straturi:

a. stratul superficial – format din celule epiteliale scuamoase stratificate, aplatizate, mari, cu un grad variabil de alterare, cu nucleii încă vizibili; nu prezintă cheratinizare; pe suprafața externă a acestor celule există proeminente (microcreste) care contribuie la mărirea suprafeței, iar la jonctiunea intercelulară au prelungiri (puncte intercelulare) care se încrucisează cu cele ale celulelor adiacente, realizând astfel o legătură mai strânsă între celule; aceste puncte intercelulare (desmozomi) sunt mai puțin numeroase pe măsură ce respectivele celule devin mai superficiale și pot chiar dispărea cu timpul (când celulele scuamoase ajung în ultimii straturi); celulele epiteliale au organite celulare (nucleu, nucleol, aparat Golgi, lisosomi, rețicul endoplasmatic, mitocondrii și tonofilamente, acestea din urmă conferind celulelor elasticitate, forță de contractie și rigiditate); inflamația cronică, iritarea sau acțiunea substanțelor toxice pot transforma acest epiteliu, dându-i un aspect cornos și făcând ca prelungirile epiteliale să se infunde în submucoasă, papilele epiteliale crescând în înălțime;

b. stratul spinos – reprezentat de celule cu nucleul rotund și filamente de unire, dispuse în 8 – 10 straturi; numărul straturilor variază în funcție de papilele epiteliale (care la rândul lor depind de număr și profunzime de condițiile locale);

c. stratul bazal (germinativ) – este format dintr-un singur strat de celule cilindrice, cu nucleul oval, așezat pe membrana bazală.

Membrana bazală – reprezintă o zonă de tranziție între epiteliu și stratul superficial din lamina proprie (spațiul Reinke); are un rol foarte important, deși este o structură anatomică cu dimensiuni reduse, prin intermediul ei spațiul Reinke primind protecție din partea epiteliului. Este alcătuită din 4 tipuri principale de substanțe: Colagen: tip IV, IX; Laminina; Glicoproteine: entactina și fibronectina; Proteoglicani.

Lamina propria – poate fi impartita in trei straturi:

- a. stratul superficial (spatiul Reinke) – este un strat dinamic, lax si pliabil, cu rol determinant in vibratie in timpul fonatiei (aparitia valului mucos); contine o retea de colagen, fibre elastice si vase sanguine impletite; orice proces patologic (cicatrici, inflamatii, neoplasm) duce la rigidizarea acestui spatiu, cu afectarea miscarilor de vibratie si aparitia tulburarilor vocale;
- b. stratul mijlociu – format in special din fibre elastice; impreuna cu stratul profund formeaza conus elasticus, care se insera pe marginea superioara a cartilajului cricoid;
- c. stratul profund – format in special din fibre de colagen, unele dintre ele patrundind in stratul muscular .

Histologic, stratul superficial este mult mai precis delimitat de stratul mijlociu decit este acesta din urma de cel profund. Structura anatomica ce cuprinde straturile mijlociu si profund ale laminei propria se numeste ligament vocal. Acest ligament este specific speciei umane si apare in jurul varstei de 15 ani. In structura lui, fibrele elastice sint inlocuite de fibre de colagen pe masura ce ne apropiem de muschiul vocal, scazind astfel elasticitatea regionala.

Fibrele elastice din lamina propria au traiect paralel cu marginea libera a corzii vocale si spre deosebire de fibrele de colagen, ele se ramifica si se anastomozeaza, putindu-si dubla lungimea initiala, revenind la dimensiunea normala dupa incetarea intinderii.

Fibrele de colagen au si ele o directie aproximativ paralela cu marginea libera si provin din colagenul de tip III (in membrana bazala gasim colagen de tip IV). Formarea acestora este favorizata de tensiunea mecanica din tesuturi si inhibata de cortizon. Substanta amorfa este bogata in alanina, glicina, valina, prolina, in timp ce microfibrilele contin din abundenta hidroxiprolina.

Muschiul vocal (tiro-aritenoidian) – constituie structura anatomica principala a corzii vocale, avind fibrele paralele cu marginea sa libera, la fel ca si fibrele elastice si de colagen din lamina propria, arhitectura ce favorizeaza astfel miscarile vibratorii.

## **2. Aspecte histo-patologice in cancerul laringian**

Desi in arhitectura laringelui exista mai multe structuri histologice (mucoasa, cartilaje, ligamente si muschi), marea majoritate (aproximativ 95%) a tumorilor maligne ale acestui organ sint carcinoame ale epiteliului scuamos. Desi extrem de rare, sint descrise procese tumorale maligne ce-si au originea in celelalte componente, altele decit epiteliul, sau, exceptional, metastaze laringiene ale unor cancere situate la distanta. Vom incerca in continuare sa enumeram toate aceste malignitati si sa le caracterizam din punct de vedere histo-patologic.

### **1. Carcinomul epidermoid spinocelular**

Carcinomul epidermoid spinocelular este de departe cea mai frecventa tumora maligna a laringelui (95-96%), reprezentind 1,6-2% din cancerele la barbati, respectiv 0,2-0,4% din malignitatile sexului feminin [15,16], cu o incidenta mondiala in crestere si cu o usoara dominanta in mediul urban, precum si in populatia de culoare [17,18]. Virsta de electie este reprezentata de decadele 5-7, iar sex ratio este barbati:femei = 5:1 [19].

Acest lucru isi are o posibila explicatie prin aceea ca mucoasa endolaringiana sufera in timp, progresiv, un fenomen de “uzura” – un proces de metaplazie malpighiana, epiteliul respirator prismatic ciliat transformandu-se in epiteliu de tip pavimentos stratificat (zonele de electie unde se observa acest proces fiind marginea libera a corzilor vocale si a benzilor ventriculare, repliul ari-epiglotic si epiglota subhioidiana).

Desi nu este clar elucidata carcinogeneza in acest caz, exista studii care demonstreza o legatura directa intre cancerul de laringe si fumat, consumul de alcool [20,21,22,23,24], obiceiuri alimentare si refluxul gastro-esofagian [25,26,27,28], expunerea profesionala la noxe (azbest [29,30], nichel, hidrocarburi aromatice policiclice [31], radiatii ionizante [32]), infectii virale (human papilloma virus) [33,34,35].

Macroscopic, carcinomul epidermoid spinocelular poate imbraca mai multe aspecte, de la leziuni netede, plane, cu margini inalte, bine precizate, la leziuni vegetante, exofitice, polipoide sau papiliforme si chiar leziuni infiltrative endofitice. Suprafata acestora este frecvent ulcerata [36]. Se pot intilni si combinatii ale acestora (forme infiltro-vegetante, ulcero-vegetante etc.).

Microscopic, acest tip de cancer are doua caracteristici:

a. crestere invaziva – manifestata prin ruperea, penetrarea membranei bazale si dezvoltarea celulelor tumorale in stroma subepiteliala (in insule, cordoane sau izolate); tumorile mari pot invada structurile profunde, cum ar fi muschi, cartilaj si os; poate fi intalnita uneori invazia perineurala sau invazia limfatica si a vaselor sanguine (dovada certa a invaziei tumorale);

b. diferentiere scuamoasa – demonstrata prin prezenta de puncti intercelulare si depunere de cheratina intra sau extracelular; punctile intercelulare apar in microscopia optica sub forma de filamente subtiri ce unesc marginile citoplasmice ale celulelor vecine (aspect de spita de roata); in functie de gradul de diferentiere, exista trei tipuri de carcinom epidermoid spinocelular [37]: bine diferentiat, moderat diferentiat si slab diferentiat; in tipul bine diferentiat putem observa microscopic prezenta de “perle” (cuiburi celulare centrale, cu o citoplasma mai eozinofila fata de celulele periferice, adesea cu cheratinizare centrala); carcinomul slab diferentiat are un grad mare de anaplazie, facind dificil diagnosticul microscopic optic si impunind fie microscopie electronica (prezenta de desmozomi si tonofilamente [38]), fie identificarea de markeri imuno-histo-chimici (cito-cheratine cu greutate moleculara medie si mare [39] – subtipurile 8, 18, 19, sau antigenul epitelial de membrana, vimentina [40]).

Alaturi de gradul de diferentiere scuamoasa, apar si alte deosebiri, la nivelul nucleului si a activitatii mitotice, dupa cum urmeaza:

- carcinomul bine-diferentiat seamana foarte bine cu epiteliul scuamos normal, in care exista proportii variate de cheratocite mari, diferentiate si celule bazale mici, care sint dispuse la periferia insulelor tumorale; prezinta puncti celulare si cheratinizare completa, iar mitozele sint rare;

- carcinomul moderat-diferentiat se caracterizeaza prin polimorfismul nucleilor si frecventa mare a mitozelor, care pot fi anormale;

- carcinomul slab-diferentiat prezinta mitoze foarte frecvente, inclusiv anormale; predomina celulele bazale, mici, iar punctile intercelulare sint foarte rare; cheratinizarea este minima sau absenta [41].

Si reactia stromala este diferita. Astfel, ea este pronuntata in carcinomul bine si moderat diferentiat, exprimata prin proliferarea miofibroblastilor, depozite excesive de matrix celular si neovascularizatie [42,43], in timp ce in carcinomul slab diferentiat poate chiar lipsi, fiind inlocuita de infiltratie limfocitara.

Diagnosticul de certitudine al carcinomului epidermoid spinocelular este desigur histopatologic, iar biopsia trebuie luata din zona cea mai relevanta clinic, evitind ariile centrale necrotice. De obicei criteriile de diagnostic pozitiv (cresterea invaziva si diferentierea scuamoasa) nu pun probleme, fiind usor de identificat, iar in cazul carcinomului slab-diferentiat se practica evidentierea markerilor imuno-histo-chimici.

2. Carcinomul cu celule fusiforme (carcino-sarcomul, pseudo-sarcomul)
3. Carcinomul verucos (tumora Ackerman)
4. Carcinomul scuamos bazaloid
5. Adenocarcinomul (carcinomul adenoid chistic, cilindromul)
6. Sarcoamele laringelui
7. Limfomul malign primar laringian
8. Plasmocitomul malign laringian
9. Carcinoamele neuro-endocrine laringiene
10. Melanomul malign primar laringian
11. Metastazele laringiene ale unor tumori aflate la distanta

### **3. Metode de explorare ale corzilor vocale**

#### **3.1. Anamneza si examenul clinic**

#### **3.2. Laringoscopia indirecta**

#### **3.3. Laringoscopia directa**

#### **3.4. Laringoscopia directa in suspensie**

#### **3.5. Explorarea radiologica a laringelui**

#### **3.6. Metode de evaluare obiectiva a vocii:**

#### **3.7. Metode optice de investigatie a corzilor vocale**

Alaturi de metodele functionale (foniatrie, neurolaringologie), venind in sprijinul chirurgiei laringiene, exista o serie de metode morfologice, fizice si chimice.

In ultimile doua decenii se observa o explozie a utilizarii metodelor optice in medicina, atat in domeniul diagnosticului, cit si in cele ale terapiei si laser-chirurgiei. Dintre cele mai cunoscute si folosite in diagnosticul optic putem aminti: tehnici de spectroscopie optica pentru masurarea neinvaziva a caracteristicilor tesutului si a oxigenarii singelui (masurarea modificarii absorbtiei), masurarea cu laser a vitezei de curgere a singelui (efect Doppler), oximetria in impuls (determinarea fizica a gradului de saturatie cu oxigen a hemoglobinei), detectia tesutului neoplazic prin metode de fluorescenta si, mai recent, diferite tehnici pentru imagistica optica (de exemplu video-endoscopia de contact, narrow band imaging sau tomografia in coerenta optica).

Aceste metode de explorare folosesc o serie de masuratori fizice bazate pe proprietatile optice ale luminii si interactia acesteia cu tesuturile si permit medicului sa incerce punerea unui diagnostic “de certitudine” chiar in momentul examinarii (in timp real), in vivo, in situ si neinvaziv (sau minim invaziv) [97].

Trebuie reamintit ca este unanim acceptat in rindul specialistilor ORL faptul ca “standardul de aur” in diagnosticul procesului malign il reprezinta examenul histologic facut de un anatomopatolog dupa recoltarea fragmentului tisular tumoral. Biopsia propriu-zisa poate fi simpla, la indemina oricarui specialist ORL pentru zonele usor accesibile (orofaringe, fose nazale) sau anevoioasa, necesitind uneori tehnici endoscopice sub anestezie generala (cavum, hipofaringe, laringe).

Pentru a depasi aceste neajunsuri si riscuri anestezico-chirurgicale, pentru a grabi punerea diagnosticului de certitudine si pentru a scadea costurile, s-au dezvoltat noi metode de explorare care incearca sa-i ofere clinicianului noi criterii de diferentiere intre tesutul sanatos/tumora benigna/tumora maligna. Noile descoperiri tehnologice in domeniul fibrelor optice, a surselor de lumina, a senzorilor, au dus la dezvoltarea fara precedent a numeroase metode optice rafinate care imbunatatesc semnificativ posibilitatea vizualizarii si evaluarii diagnostice a epiteliului in vivo [98,99,100]. Acestea incearca sa adauge tehnicilor endoscopice standard o imbunatatire a rezolutiei imaginii, a contrastului, a penetrarii tisulare in profunzime, oferind informatii la nivel molecular si biochimic despre leziunile mucoaselor.

### **3.7.1. Videoendoscopia de contact**

### **3.7.2. Spectroscopia**

#### **3.7.2.1. Autofluorescenta endoscopica**

#### **3.7.2.2. Spectroscopia Raman**

### **3.7.3. Tomografia in coerenta optica (OCT)**

### **3.7.4. Narrow band imaging (NBI)**

### **3.7.5. Endomicroscopia confocala**

Ca o concluzie a acestui capitol, putem afirma faptul ca aceste metode morfologice nu ating membrana bazala, lucru esential in lupta chirurgului cu cancerul laringian, atit pentru stabilirea diagnosticului cit si pentru alegerea tehnicii chirurgicale adecvate.

# **ELEMENTE ORIGINALE SI CONTRIBUTIA PERSONALA LA STUDIUL PROPRIETATILOR FOTOFIZICE ALE CORZILOR VOCALE SI APLICATII IN LASER-CHIRURGIA CLINICA**

## **1. Ipoteza de lucru/Obiective generale**

Dupa cum am aratat in prima parte a acestei lucrari, conceptul actual unanim acceptat sustine alcatuirea corzii vocale din mai multe straturi succesive, fiecare dintre acestea cu proprietati fizice (mecanice) si biochimice diferite, contribuind astfel la miscarile de tip oscilatoriu ale mucoasei laringiene.

Atunci cind intervine un proces patologic (inclusiv de transformare maligna), la nivelul corzii vocale apar modificari semnificative calitative si cantitative atat biochimice, cit si biofizice.

Studiul nostru incearca sa puna in evidenta o parte din aceste modificari, folosind metode foto-fizice. Vom face masuratori optice asupra corzii vocale normale, comparativ cu coarda vocala carcinomatoasa, pe probe obtinute de la pacienti laringectomizati. Vom incerca sa stabilim daca exista corelatii intre rezultatele obtinute in urma masuratorilor si modificarile biofizice si biochimice identificate.

## **2. Selectia si analiza lotului de examinat**

Masuratorile optice s-au efectuat pe piese ex vivo, recoltate de la nivelul corzii vocale sanatoase, respectiv carcinomatoase (pereche), de la pacienti care au suferit o laringectomie totala.

Pentru a obtine aceste piese, am luat in studiu pacientii operati (laringectomizati) pentru Carcinom laringian si faringo-laringian in Clinica ORL a Spitalului Universitar de Urgenta Militar Central Bucuresti in perioada 2011-2016, fiind implicat in mod direct in diagnosticul si procedura chirurgicala efectuate. Vorbim aici despre un numar de 107 cazuri. Dintre acestia,

am format un lot din pacientii care indeplineau urmatoarele criterii de includere:

1. barbati;
2. nefumatori (am prezentat in prima parte a tezei modificarile induse de carcinogenii din tutun – vezi pagina 29);
3. fara alt cancer in antecedentele personale patologice;
4. nu au efectuat preoperator polichimioterapie sau radioterapie;
5. nu au suferit o alta interventie asupra laringelui (nici nu erau traheostomizati);
6. cu diagnostic de carcinom epidermoid spinocelular bine diferentiat;
7. stadiul T: T3 glotic cu fixarea unei singure corzi vocale, cea contralaterala fiind indemna;
8. stadiul N: N0;
9. stadiul M: M0;

Au fost exclusi pacientii care suferisera o laringectomie totala extinsa si cei la care postoperator s-au constatat modificari macroscopice ale corzii vocale sanatoase.

Aplicind cu strictete aceste criterii de includere/excludere, lotul asupra caruia s-au efectuat masuratorile optice a cuprins in final un numar de 4 cazuri. Pentru a vedea semnificatia statistica a acestor cazuri fata de totalul laringectomiilor efectuate in perioada 2011-2016, am facut o prelucrare statistica a datelor, dupa cum urmeaza.

Am alcatuit doua loturi: unul format din pacientii asupra carora nu s-au facut masuratori (103 pacienti) si altul format din cei 4 pacienti asupra carora am efectuat masuratori foto-fizice. Am analizat diferentele semnificative statistic intre cele doua loturi.

Ca si concluzie a acestei analize statistice, putem afirma ca singura diferenta dintre cele doua loturi studiate este obiceiul de a fuma, iar intre restul parametrilor (demografici, factori de risc, caracteristici patologice) nu sint diferente semnificative statistic.

### **3. Metodologie generala**

Dupa cum am aratat anterior, lotul de examinat a fost alcatuit dintr-un numar de 4 pacienti diagnosticati cu Carcinom epidermoid spinocelular cheratinizant bine diferentiat al corzii vocale, stadiul tumoral T3 (Figura 3b).

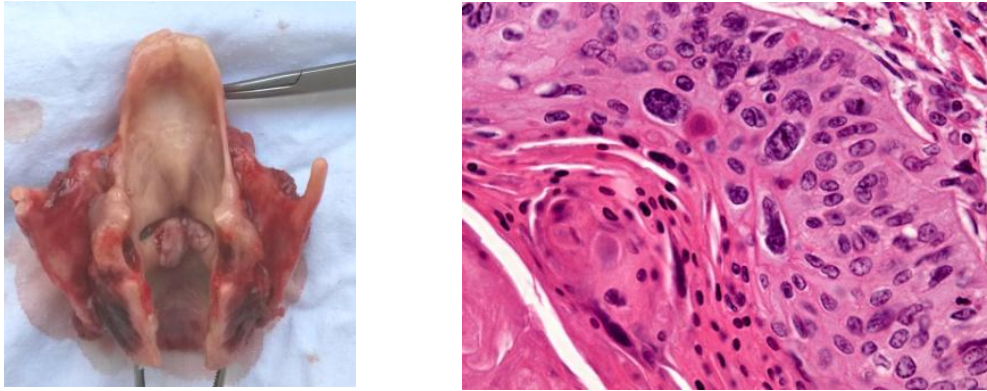


Figura 3b. Aspectul macroscopic si microscopic al piesei de exereza in cazul unuia din cazurile pe care am afectuat masuratori foto-fizice

Toti pacientii sint barbati, cu virste intre 57 si 68 de ani, nefumatori, fara alte antecedente personale semnificative. Pentru fiecare din cele 4 cazuri am stabilit si respectat in aplicare un protocol de obtinere a probelor tisulare dupa cum urmeaza.

Imediat dupa laringectomie, laringele extirpat a fost “spalat” cu solutie Custodiol (HTK – histidina-triptofan-ketoglutarat). Aceasta este o solutie folosita initial in chirurgia deschisa a inimii, ulterior ca mediu de perfuzie/spalare si prezervare pe durata transportului a organelor pentru transplant (rinichi, ficat, inima). Contine histidina (200 mM), manitol (30 mM), triptofan, acid alfa-ketoglutaric, sodiu, potasiu si magneziu.

Am folosit aceasta solutie si in timpul transportului piesei excizate spre Laboratorul de Anatomie Patologica, laringele fiind acoperit in totalitate de aceasta, dupa imediat in lada frigorifica cu gheata. Este demonstrat faptul ca hipotermia este una din cele mai simple si eficiente tehnici de prezervare a organului de transplant, in lipsa ei acesta rezistind ischemiei normotermice maxim 1 ora [140,141].

Am incercat astfel sa respectam cit mai fidel regulile de prezervare-transport ale organelor de transplantat, reducind la minimum procesele de degradare consecutive ischemiei, obtinind mostre cit mai aproape de statusul “in vivo”.

Timpul scurs intre recoltare si prepararea lamelor a fost de fiecare data maxim 3 ore, respectind inca odata regulile de transplant (5 ore pentru inima, 40 ore pentru rinichi, 5 ore pentru pancreas, 6 ore pentru ficat).

In Laboratorul de Anatomie Patologica, laringele a fost “clatit” cu ser fiziologic, s-a sectionat apoi la nivelul comisurii posterioare, s-a evidentiat coarda vocala carcinomatoasa de la nivelul careia s-a recoltat un fragment tumoral (suspectat macroscopic neoplazic) cu grosimea

3-4 mm. Acelasi lucru s-a petrecut “in oglinda” la nivelul corzii vocale normale, recoltandu-se tesut cordal sanatos.

Cele doua fragmente astfel recoltate au fost inghetate, apoi cu ajutorul microcriotomului s-au obtinut sectiuni de 5  $\mu\text{m}$ , respectiv 25-30  $\mu\text{m}$ , in duplicat (cite doua pentru fiecare fragment si dimensiune).

Sectiunile de 5  $\mu\text{m}$  au fost folosite pentru examen histopatologic extemporaneu, pentru reconfirmarea din punct de vedere histologic a fragmentelor recoltate (tesut sanatos, respectiv tesut malign).

Sectiunile cu grosime 25-30  $\mu\text{m}$  au fost recoltate pe lamele de quartz (oferite de Laboratorul de Spectroscopie Laser – LSL din cadrul Institutului National de Fizica Laserilor, Plasmei si Radiatiei – INFLPR). Ulterior ele au fost transportate (la gheata) si depozitate in conditii optime la LSL unde s-au efectuat urmatoarele studii spectroscopice si optice:

1. Studiul autofluorescentei induse laser;
2. Studiul timpului de viata al autofluorescentei induse laser;
3. Studiul FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy);
4. Studiul LIAF si FTIR pe substante pure;
5. Studiul spectroscopic al substantelor anestezice folosite.

#### **4. Studiul autofluorescentei induse laser (LIAF)**

##### **4.1. Ipoteza/Obiective**

Dupa cum am mentionat in prima parte a acestei lucrari, aparitia si gradul autofluorescentei depind in special de continutul in fluorofori la nivelul tesutului analizat. Fluoroforii sint predominant proteine, cum ar fi de exemplu colagenul, elastina, cheratina sau NADH-ul. Alti factori ce influenteaza aceasta proprietate optica sint modificarile metabolice locale, reactia stromala adiacenta procesului patologic, grosimea epiteliului, atipiile nucleare.

Folosind probele recoltate si preparate dupa cum am prezentat anterior, vom face o serie de masuratori pentru a caracteriza autofluorescenta indusa laser a tesuturilor carcinomatoase in comparatie cu cele normale.

##### **4.2. Material si metoda**

Sistemul experimental (Figura 4) consta in expunerea probelor tisulare la un fascicul laser pulsant emis de o dioda laser in domeniul picosecundelor (Alphals, type PicoPower LD-375-50) la

o lungime de unda de 375 nm, cu o rata de repetitie a pulsurilor de 31MHz, largimea temporala a pulsului la semi-inaltime de 87 ps si o energie medie de 0,5 mW.

Fascicul laser cu dimensiuni ale spotului de 1.6x1.8 mm (eliptic) este trimis catre proba intr-o geometrie de iradiere verticala cu trecere dubla utilizand o oglinda dicroica (355 nm) la unghi de incidenta de 45° si o oglinda cu reflectanta totala.

Doua tipuri de masuratori au fost efectuate in cazul probelor ce contin tesut sanatos si tumoral: autofluorescenta indusa laser (LIAF) si timpul de viata al autofluorescentei. Semnalul de autofluorescenta a fost colectat utilizand doua fibre optice pozitionate la 45° in acelasi plan fata de fasciculul laser pompat. Diametrul interior al fibrei utilizate pentru monitorizarea semnalului LIAF este de 400 µm, iar al celei pentru monitorizarea timpului de viata al autofluorescentei este de 1500 µm.

Spectrul semnalului LIAF este inregistrat utilizand un spectrograf (Princeton Instruments, type Acton SpectraPro 2750) cu o rezolutie optica de 0,8 nm, iar in cazul inregistrarii timpului de viata al semnalului LIAF este utilizat un fotodetector cu amplificare (Hamamatsu, type H6780-20) caracterizat de un timp de raspuns de 0,78 ns al carui semnal de iesire este trimis catre un osciloscop digital (Tektronix, type DPO7254). Semnalul achizitionat de catre spectrograf si fotodetector este sincronizat cu pulsurile laser prin intermediul semnalului de sincronizare tip TTL emis de sursa de alimentare si control a diodei laser. In cazul spectrografului, pentru operarea la frecventa de 31 MHz s-a utilizat optiunea pentru pulsuri rapide (frecvente mai mari de 1 MHz) integrata in programul de control al acestuia.

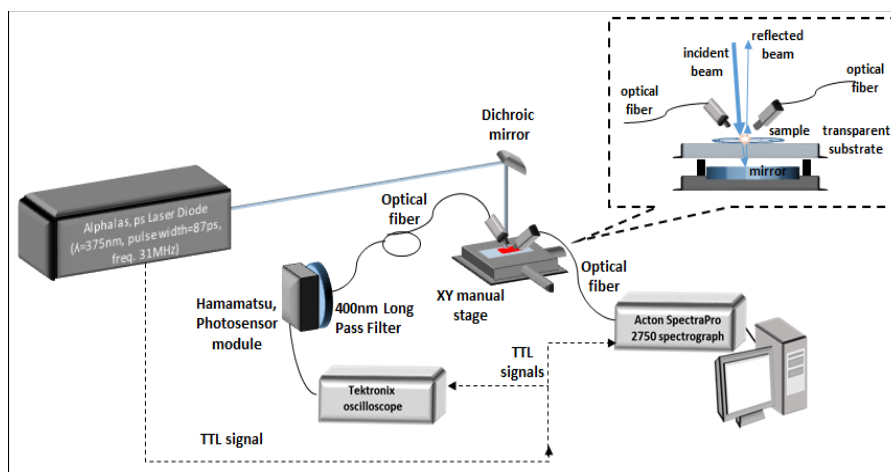


Figura 4. Sistemul experimental utilizat pentru determinarea autofluorescentei induse laser si a timpului de viata al autofluorescentei pentru probele cu tesut sanatos si tumoral

In timpul masuratorilor LIAF, probele (tesutul aplicat pe lamela de sticla) au fost plasate pe o masa de translatie XY avand o rezolutie de deplasare de 5  $\mu\text{m}$ . Probele continand tesutul sanatos si tumoral au fost preparate in duplicat, iar pentru fiecare s-au efectuat in jur de 6-8 masuratori in diferite puncte ale tesuturilor. Masuratorile s-au efectuat mentinandu-se o directie de deplasare liniara de la un punct la altul (specificata in imaginile foto ale probelor). Distantele dintre puncte au fost de 1 sau 2 mm (in functie de latimea probelor) astfel incat la o traversare a probei s-au efectuat 4-5 masuratori. Restul de masuratori de pana la 6-8 s-au efectuat pe o directie paralela cu prima (in puncte echivalente celor de pe prima directie de deplasare) si la o distanta (deplasare) in lateral de 2 mm.

Semnalul LIAF reprezinta un spectru mediat la 50 de pulsuri laser generate si a fost prelucrat astfel: s-a scazut semnalul inregistrat pentru sticla (substrat) din cel al probei si s-a mediat spectrul utilizand metoda de netezire adjacent-averaging pe un numar de 120 de puncte, urmata de integrarea spectrului si determinarea urmatoarelor parametri:

- 1. Lungimea de unda a maximului ( $\lambda_{\text{max}}$ );**
- 2. Intensitatea (I) acestuia;**
- 3. Lărgimea benzii la semi-inaltime (FWHM);**
- 4. Aria (A);**
- 5. Raportul I/FWHM.**

Comparatia intre spectrul initial si cel prelucrat este redata in Figura 5, in cazul tesutului sanatos al primului pacient.

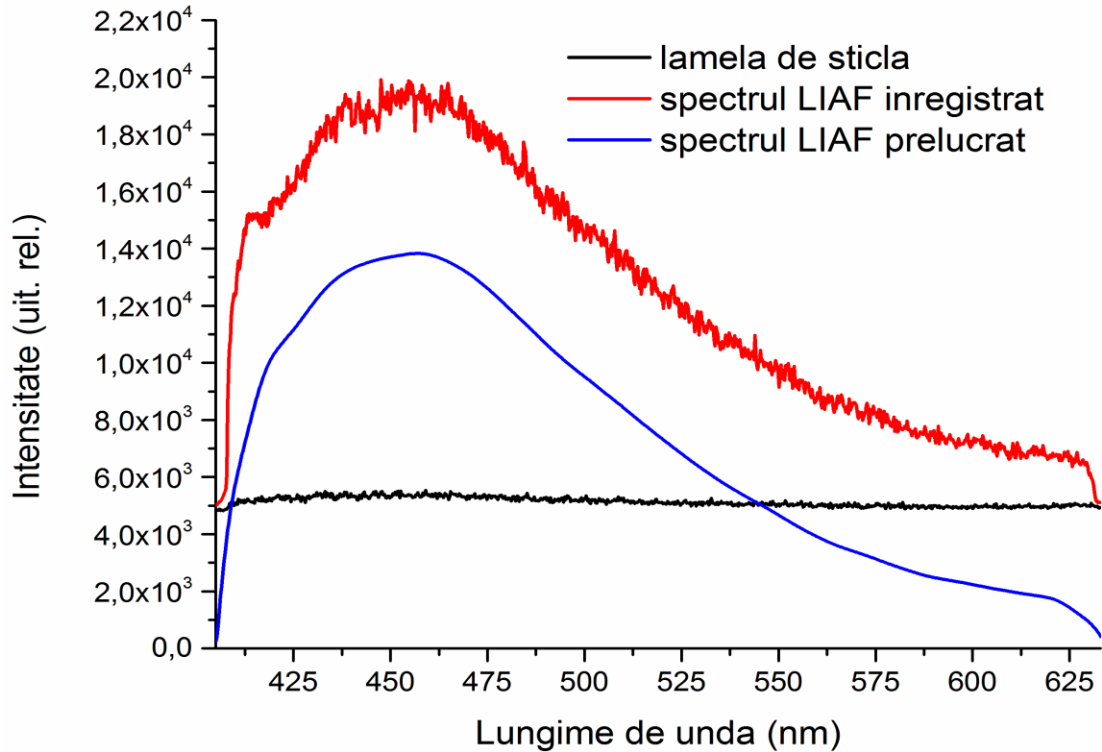


Figura 5. Comparatie intre spectrul LIAF neprelucrat si cel prelucrat al unei probe de tesut

Diferenta de intensitate dintre spectrul LIAF brut/neprelucrat inregistrat si cel prelucrat rezulta din scaderea contributiei lamelei de sticla la intensitatea semnalului LIAF.

### 4.3 Rezultate

#### Pacientul nr. I – probele de tesut sanatos

Asupra celor doua probe (in duplicat – Figura 6) s-au efectuat masuratori in 14 puncte iar rezultatele sunt centralizate in Tabelul 1 si sunt reprezentate grafic in Figura 7:

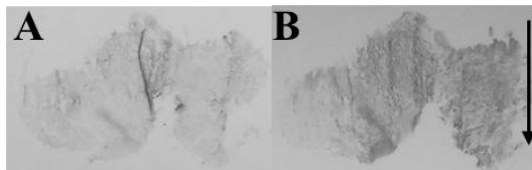


Figura 6. Aspectul probelor de tesut sanatos in duplicat: A) SI si B) SII; sageata indica sensul in care s-au realizat masuratorile

Tabelul 1. Parametrii extrasi din spectrele LIAF ale probelor de tesut sanatos si variatia acestora fata de parametrii spectrului LIAF mediat.

Proba	$\lambda_{max}$ (nm)	I (x 10 <sup>4</sup> unit. rel.)	$\Delta I/I_M$	FWHM (nm)	$\Delta FWHM / FWHM_M$	Arie (x10 <sup>6</sup> nm x unit. rel.)	$\Delta Arie / Arie_M$	I/FWHM (unit. rel./ nm)	$\Delta (I/FWHM) / (I/FWHM)_M$
SI-1	457	1,38	-69,2%	112	+5,66%	1,65	-67,1%	123,49	-70,8%
SI-2	457	3,53	-21,3%	106	0%	3,99	-20,4%	333,46	-21,3%
SI-3	454	1,97	-56,1%	109	+2,83%	2,30	-54,1%	180,77	-57,3%
SI-4	454	1,26	-71,9%	109	+2,83%	1,51	-69,9%	115,53	-72,7%
SI-5	458	1,64	-63,4%	112	+5,66%	1,96	+60,9%	146,64	-65,4%
SI-6	455	1,70	-62,2%	105	-0,94%	1,94	-61,3%	161,66	-61,8%
SI-7	458	0,35	-92,2%	105	-0,94%	0,41	-91,7%	33,38	-92,1%
SII-1	454	2,43	-45,9%	107	-0,94%	2,77	-44,7%	227,04	-46,4%
SII-2	457	8,01	+78,2%	102	-3,77%	8,67	+73,1%	785,41	+85,2%
SII-3	458	11	+143,8%	102	-3,77%	11,8	+135,3%	1074,24	+153,4%
SII-4	457	5,35	+19,0%	106	0%	5,98	+19,3%	504,86	+19,1%
SII-5	459	13	+189,7%	109	+2,83%	14,7	+194,2%	1194,70	+181,8%
SII-6	456	4,25	-5,3%	105	-0,94%	4,74	-5,5%	405,05	-4,4%
SII-7	457	7,10	+57,9%	103	-2,83%	7,71	+53,8%	688,87	+62,5%
<b>Spectrul mediat</b>	<b>457</b>	<b>4,49</b>		<b>106</b>		<b>5,01</b>		<b>423,92</b>	

$$\frac{\Delta X}{X_M} = \frac{X_M - X}{X_M} \text{ unde } X = I, FWHM, \text{ Arie sau } I/FWHM$$

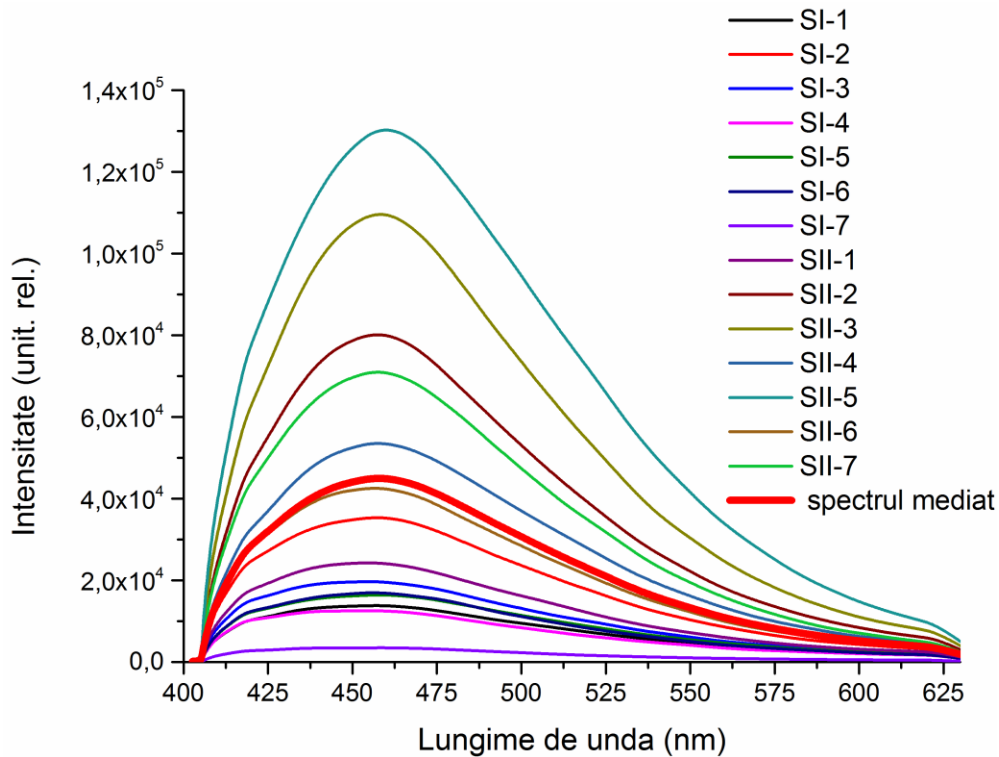


Figura 7. Spectrele LIAF inregistrate pentru probele de tesut sanatos (in duplicat, SI si SII) pe 14 puncte de colectare si spectrul LIAF mediat.

**Pacientul nr. I – probele de tesut tumoral**

Asupra celor doua probe (in duplicat – Figura 8) s-au efectuat masuratori in 14 puncte iar rezultatele sunt centralizate in Tabelul 2 si sunt reprezentate grafic in Figura 9:

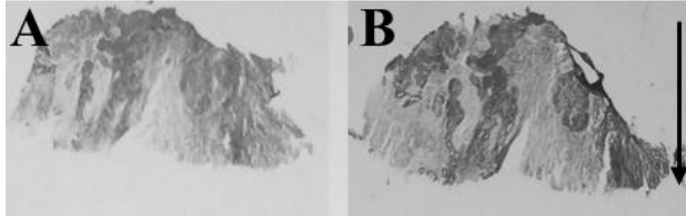


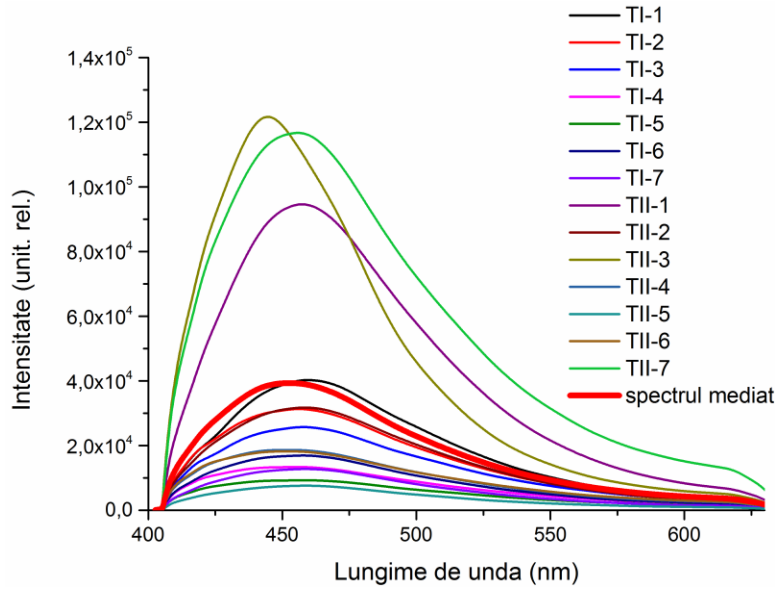
Figura 8. Aspectul probelor de tesut tumoral in duplicat: A) TI si B) TII; sageata indica sensul in care s-au realizat masuratorile

Tabelul 2. Parametrii extrasi din spectrele LIAF ale probelor de tesut tumoral si variatia acestora fata de parametrii spectrului LIAF mediat

Proba	$\lambda_{max}$ (nm)	I ( $\times 10^4$ unit. rel.)	$\Delta I/I_M$	FWHM M (nm)	$\Delta FWHM /$ $FWHM_M$	Arie ( $\times 10^6$ nm x unit. rel.)	$\Delta Arie /$ $Arie_M$	I/FWHM (unit. rel./ nm)	$\Delta (I/FWHM) /$ $(I/FWHM)_M$
TI-1	459	4,03	+2,4%	93,58	+0,3%	4,16	+2,3%	430,33	+2,1%
TI-2	456	3,13	-20,3%	98,37	+5,4%	3,36	-17,2%	318,40	-24,4%
TI-3	458	2,57	-34,5%	101,59	+8,9%	2,84	-30,1%	253,32	-39,8%
TI-4	455	1,34	-65,9%	107,95	+15,7%	1,58	-61,1%	124,10	-70,5%
TI-5	457	0,93	-76,3%	112,22	+20,2%	1,12	-72,3%	82,93	-80,3%
TI-6	457	1,69	-56,8%	100,83	+8,1%	1,88	-53,7%	168,07	-60,1%
TI-7	458	1,28	-67,5%	98,56	+5,6%	1,38	-65,9%	129,64	-69,2%
TII-1	457	9,46	+140,7%	91,24	-2,2%	9,46	+133,0%	1036,94	+146,1%
TII-2	458	3,18	-19,2%	97,71	+4,73%	3,36	-17,1%	325,00	-22,8%
TII-3	444	1,22	+209,5%	73,48	-21,24%	10,1	+147,6%	1655,33	+292,9%
TII-4	450	1,87	-52,5%	103,76	+11,21%	2,12	-47,8%	179,74	-57,3%
TII-5	458	0,76	-80,6%	99,73	+6,8%	0,83	-79,5%	76,36	-81,8%
TII-6	450	1,82	-53,6%	107,34	+15,1%	2,13	-47,6%	169,69	-59,7%
TII-7	445	11,7	+196,9%	98,12	+5,1%	12,6	+209,5%	1189,29	+182,3%
<b>Spectrul mediat</b>	<b>454</b>	<b>3,93</b>		<b>93,3</b>		<b>4,06</b>		<b>421,22</b>	

$$\frac{\Delta X}{X_M} = \frac{X_M - X}{X_M} \text{ unde } X = I, FWHM, \text{ Arie sau } I/FWHM$$

Figura 9. Spectrele LIAF inregistrate pentru probele de tesut tumoral (in duplicat, TI si TII) pe 14 puncte de colectare si spectrul LIAF mediat



Analizind datele obtinute din masuratorile spectrale ale celor doua tipuri de tesut (sanatos/tumoral) ale pacientului nr.I, obtinem valorile din Tabelul 3 si graficul din Figura 10:

Tabelul 3. Parametrii extrasi din spectrul LIAF al probei de tesut sanatos si tumoral

Proba	$\lambda_{max}$ (nm)	I (x10 <sup>4</sup> unit. rel.)	$\Delta I/I_s$	FWHM (nm)	$\Delta FWHM$ / FWHM <sub>s</sub>	Arie (x10 <sup>6</sup> nm x unit. rel.)	$\Delta Arie$ / Arie <sub>s</sub>	I/FWHM (unit. rel./ nm)	$\Delta (I/FWHM)$ / (I/FWHM) <sub>s</sub>
Tesut sanatos	457	4,49		106		5,01		423,92	
Tesut tumoral	454	3,93	-12,5%	93,3	10,1%	4,06	-19%	421,22	-0,6%

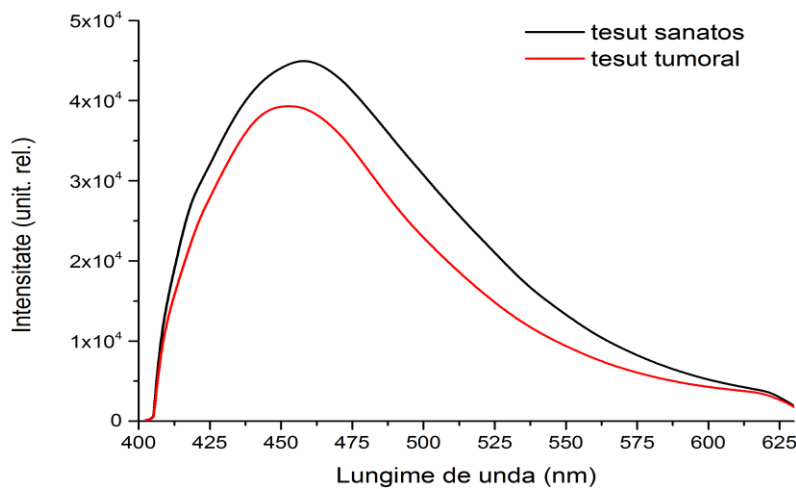


Figura 10. Spectrele LIAF inregistrate pentru probele de tesut sanatos si tumoral rezultate din spectrele mediate in cazul pacientului nr. I

Comparand valorile obtinute, se observa pentru pacientul nr. I:

1. **Scaderea** intensitatii maxime (I) a LIAF pentru tesutul tumoral cu 12,5% fata de tesutul sanatos;
2. **Scaderea** ariei (A) LIAF pentru tesutul tumoral cu 19% fata de tesutul sanatos ;
3. **Scaderea** largimii benzii la semi-inaltime (FWHM) pentru tesutul tumoral cu 10,1% fata de tesutul sanatos;
4. **Scaderea** lungimii de unda a maximului intensitatii ( $\lambda_{max}$ ) pentru tesutul tumoral cu 3 nm fata de tesutul sanatos;
5. **Scaderea** raportului I/FWHM pentru tesutul tumoral cu 0,6% fata de tesutul sanatos.

Aceleasi masuratori au fost efectuate in aceleasi conditii si celorlalti 3 pacienti inclusi in lot.

#### 4.4. Discutii

Coroborind valorile masuratorilor de LIAF efectuate pe perechile de probe ale celor 4 pacienti, putem caracteriza urmatoorii parametri:

**A. Intensitatea maximului spectrului LIAF** care variaza de la pacient la pacient atat pentru tesutul sanatos, cit si pentru cel tumoral, si care, in marea majoritate a cazurilor este **mai mica** pentru tesutul tumoral fata de tesutul sanatos (Figura 26).

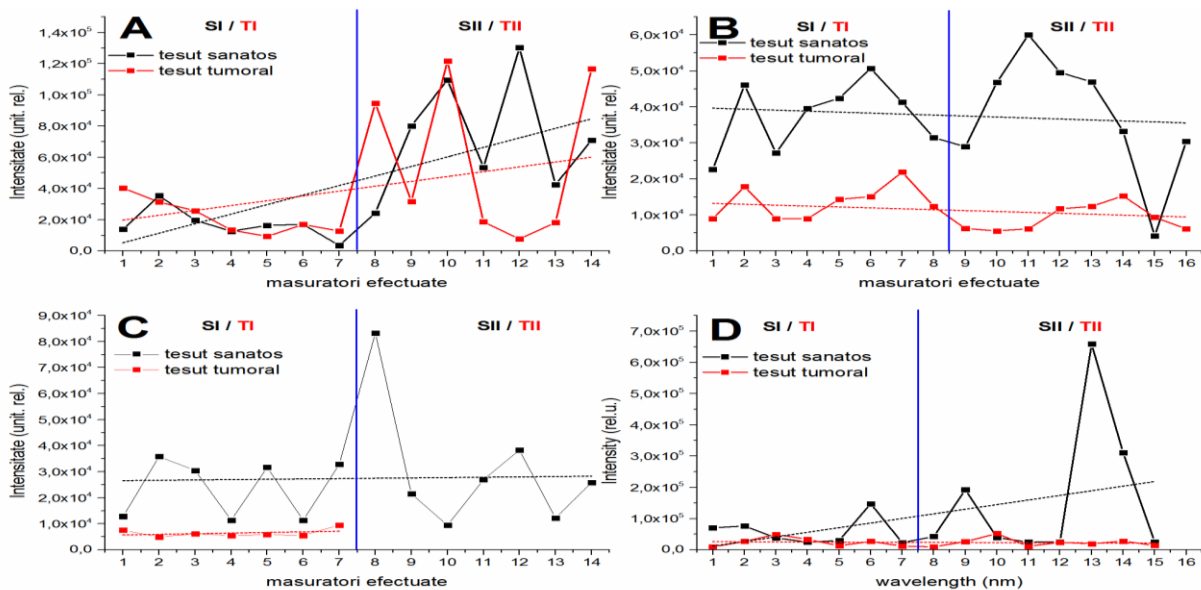


Figura 26. Variatia intensitatii maximului de LIAF ca functie de numarul de masuratori efectuate pe tesuturile sanatoase si tumorale pentru: A) pacientul I, B) pacientul II, C) pacientul III, D) pacientul IV

**B. Aria intensitatii LIAF este mai mica** pentru tesutul tumoral fata de cel sanatos in toate cele 4 cazuri, asa cum reiese si din graficele de mai jos:

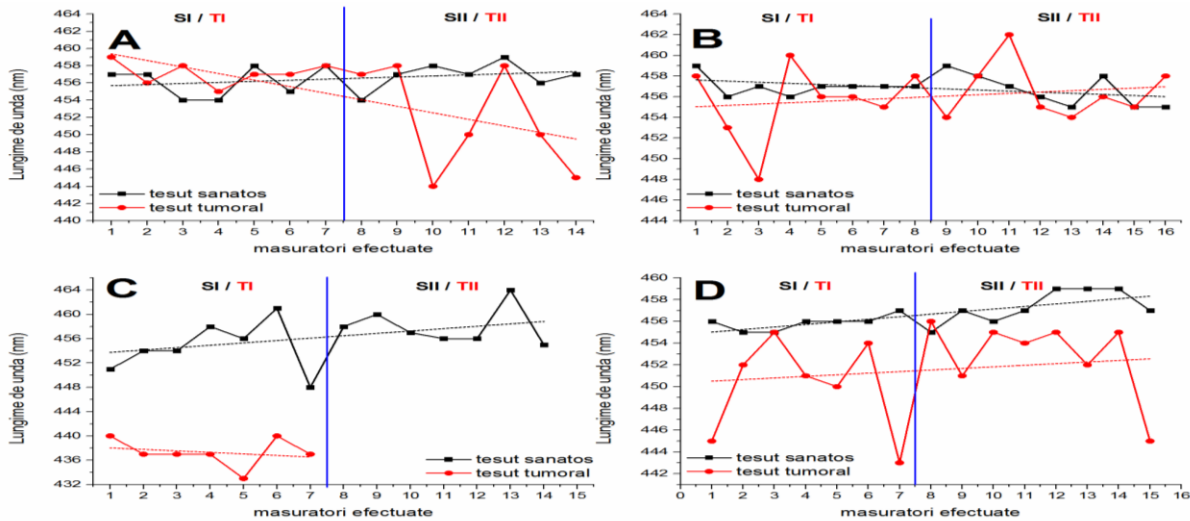


Figura 27. Variatia ariei ca functie de numarul de masuratori efectuate pe tesuturile sanatoase si tumorale pentru: A) pacientul I, B) pacientul II, C) pacientul III, D) pacientul IV

**C. Lungimea de unda a maximului intensitatii este mai mica** pentru tesutul tumoral decat pentru cel sanatos in toate cele 4 cazuri cercetate, asa cum reiese si din figura de mai jos:

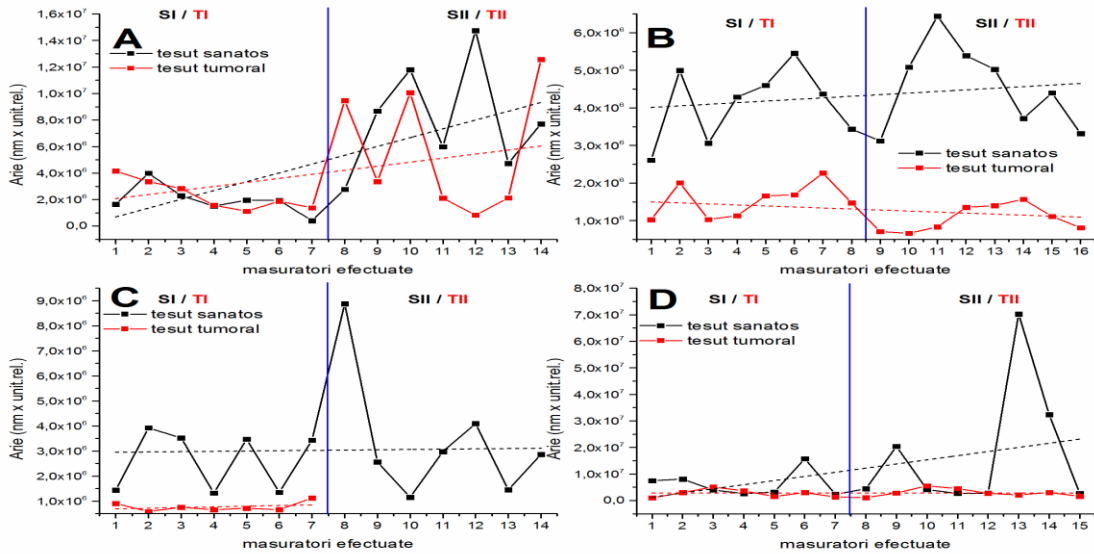


Figura 28. Variatia lungimii de unda a maximului de LIAF ca functie de numarul de masuratori efectuate pe tesuturile sanatoase si tumorale pentru: A) pacientul I, B) pacientul II, C) pacientul III, D) pacientul IV

**D. Largimea benzii la semiinaltime (FWHM)** este un parametru care este mai mare la tesutul tumoral fata de cel sanatos in 3 din cele 4 cazuri analizate, iar intr-un caz (pacientul nr. I) tendinta nu se respecta, asa cum observam si in graficele de mai jos:

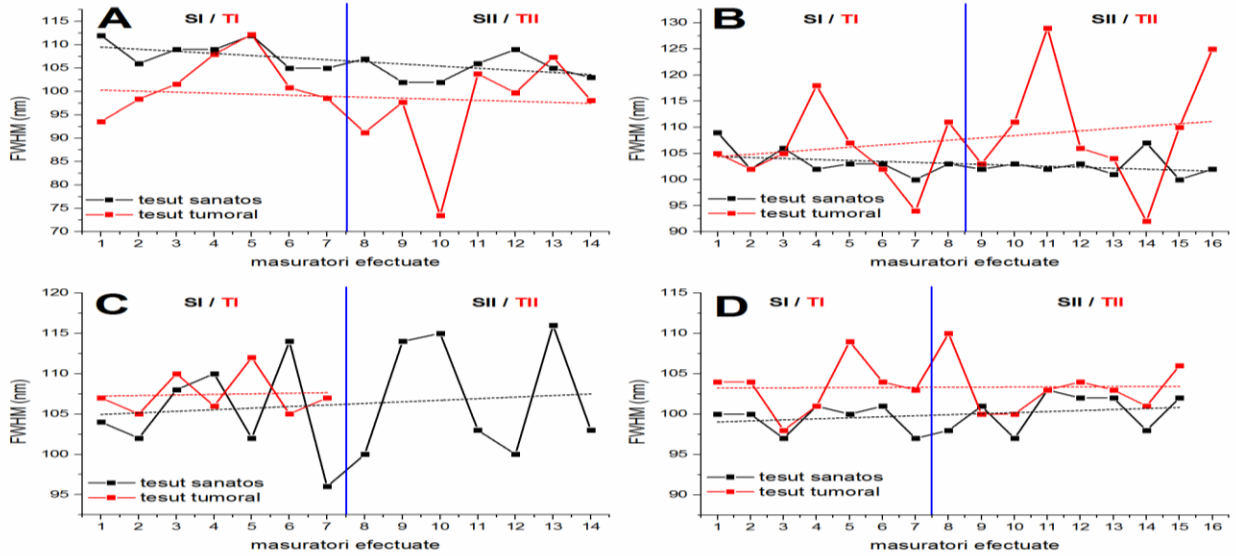


Figura 29. Variatia FWHM ca functie de numarul de masuratori efectuate pe tesuturile sanatoase si tumorale pentru: A) pacientul I, B) pacientul II, C) pacientul III, D) pacientul IV

**E. Raportul I/FWHM** este mai mic pentru tesutul tumoral decat pentru cel sanatos in 3 din cele 4 cazuri si neconcludent in cazul pacientului nr. I.

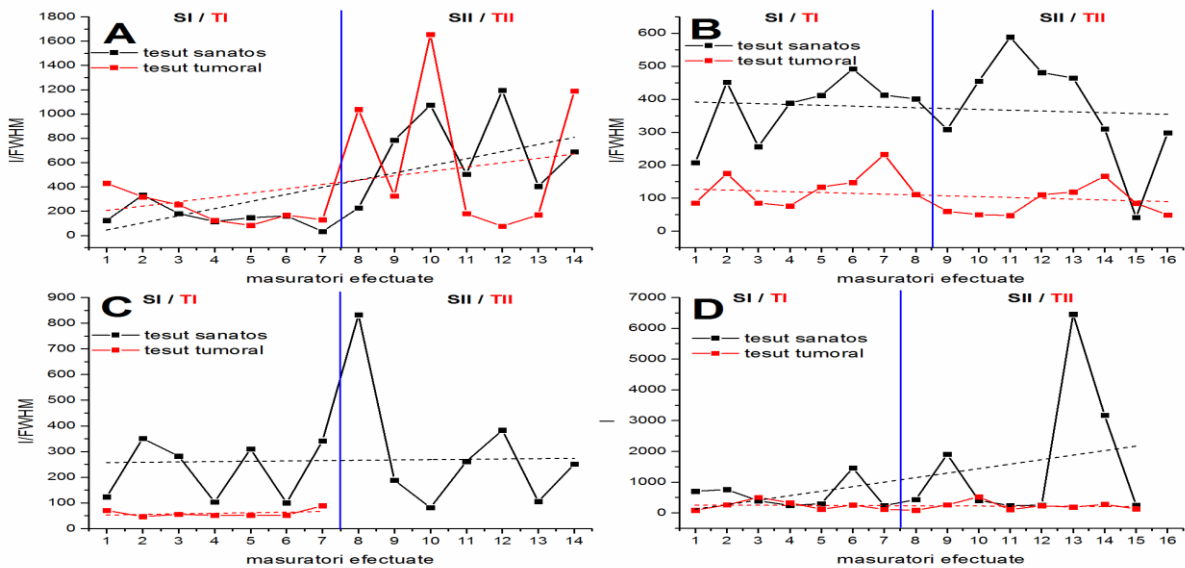


Figura 30. Variatia raportului I/FWHM ca functie de numarul de masuratori efectuate pe tesuturile sanatoase si tumorale pentru: A) pacientul I, B) pacientul II, C) pacientul III, D) pacientul IV

### F. Impactul radiatiei laser emise la 375 nm asupra tesutului sanatos

In timpul masuratorilor LIAF, am observat ca pentru acelasi cimp masurat la distanta de citeva secunde obtinem valori ale parametrilor LIAF care scad pe masura ce iradierea se repeta. Am sistematizat aceste masuratori pentru proba de tesut sanatos al pacientului nr. II in tabelul de mai jos, dupa ce am efectuat cite trei examinari succesive pe acelasi punct:

Tabelul 12. Impactul radiatiei laser asupra tesutului sanatos la pacientul nr. II

Proba	$\lambda_{\max}$ (nm)	I ( $\times 10^4$ unit. rel.)	$\Delta I/I_M$	FWHM (nm)	$\Delta \text{FWHM} /$ $\text{FWHM}_M$	Arie ( $\times 10^6$ nm x unit. rel.)	$\Delta \text{Arie} /$ $\text{Arie}_M$	I/FWHM (unit. rel./ nm)	$\Delta (I/\text{FWHM}) /$ $(I/\text{FWHM})_M$
<b>1.1</b>	<b>459</b>	<b>2,27</b>		<b>109</b>		<b>2,61</b>		<b>207,8</b>	
1.2	459	2,20	-2,8%	109	0%	2,55	-2,4%	202,0	-2,8%
1.3	458	2,05	-9,7%	110	+0,9%	2,37	-9,0%	186,0	-10,5%
<b>2.1</b>	<b>456</b>	<b>4,61</b>		<b>102</b>		<b>4,99</b>		<b>451,9</b>	
2.2	457	4,52	-2,0%	102	0%	4,87	-2,4%	442,7	-2,0%
2.3	458	3,87	-16,1%	104	+2%	4,24	-15,1%	371,7	-17,7%
<b>3.1</b>	<b>457</b>	<b>2,72</b>		<b>106</b>		<b>3,06</b>		<b>256,4</b>	
3.2	457	2,62	-3,4%	107	+0,9%	2,96	-3,1%	245,3	-4,3%
3.3	456	2,52	-7,4%	106	0%	2,84	-7,1%	237,3	-7,4%
<b>4.1</b>	<b>456</b>	<b>3,96</b>		<b>102</b>		<b>4,29</b>		<b>388,2</b>	
4.2	457	3,86	-2,5%	103	+1%	4,22	-1,6%	375,0	-3,4%
4.3	457	3,77	-4,8%	103	+1%	4,10	-4,4%	365,9	-5,8%
<b>5.1</b>	<b>457</b>	<b>4,24</b>		<b>103</b>		<b>4,60</b>		<b>411,6</b>	
5.2	457	4,17	-1,6%	103	0%	4,55	-1%	405,1	-1,6%
5.3	457	4,14	-2,3%	104	+1%	4,54	-1,2%	398,2	-3,3%
<b>6.1</b>	<b>457</b>	<b>5,07</b>		<b>103</b>		<b>5,45</b>		<b>492,1</b>	
6.2	457	4,90	-3,3%	103	0%	5,31	-2,7%	475,9	-3,3%
6.3	458	4,83	-4,8%	103	0%	5,25	-3,7%	468,5	-4,8%
<b>7.1</b>	<b>457</b>	<b>4,13</b>		<b>100</b>		<b>4,37</b>		<b>412,8</b>	
7.2	457	3,95	-4,2%	102	+2%	4,23	-3,2%	387,7	-6,1%
7.3	458	3,87	-6,3%	102	+2%	4,13	-5,4%	379,1	-8,2%
<b>8.1</b>	<b>457</b>	<b>3,15</b>		<b>103</b>		<b>3,44</b>		<b>305,5</b>	
8.2	457	3,06	-2,8%	104	+1%	3,34	-2,8%	294,1	-3,8%
8.3	457	2,92	-7,2%	105	+1,9%	3,22	-6,3%	278,1	-9,0%

Dintre acesti parametri ne-am indreptat atentia asupra intensitatii LIAF, a carei scadere progresiva o putem observa pentru fiecare punct masurat pentru cele trei masuratori consecutive in Figura 31:

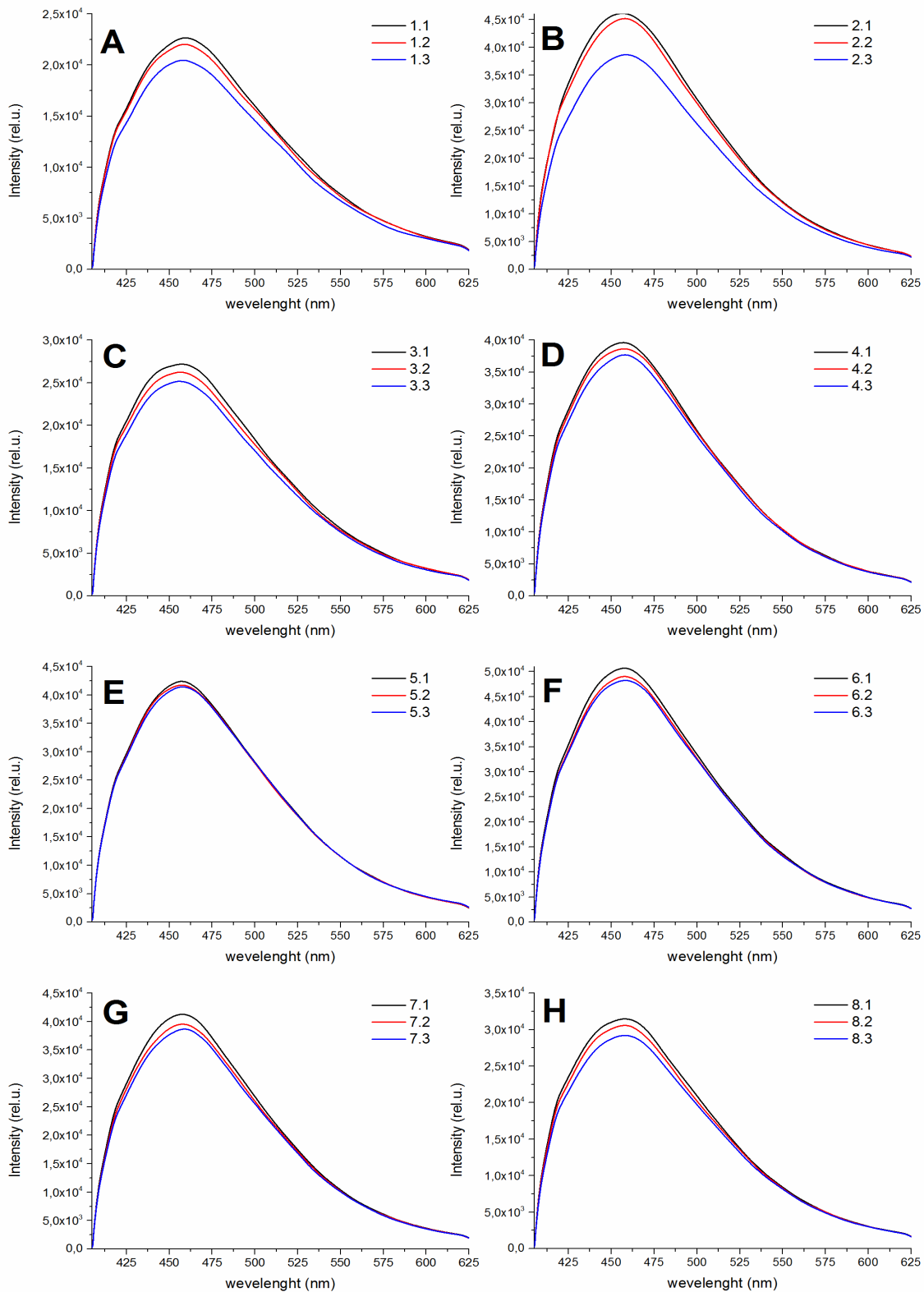


Figura 31. Impactul radiatiei laser emise la 375 nm asupra intensitatii LIAF pentru tesutul sanatos al pacientului nr.II pentru cele 8 puncte de colectare.

#### **4.5. Concluzii**

Metoda de masurare a caracteristicilor tesuturilor normale si maligne pe baza autofluorescentei induse cu fascicule laser este aplicata intr-un numar de discipline medicale, chiar prin utilizarea de echipamente disponibile comercial. Sunt cunoscute in acest sens realizarile din pneumologie si gastro-enterologie, dar si cercetarile privind tumorile maligne ale creierului [143,144].

Aplicarea acestei metode in chirurgia ORL poate aduce un progres in stabilirea in timp real a limitelor dintre tesuturile normale si tumorale in timpul unei operatii. Stabilirea de parametri reproductibili ai sistemelor de masura si a marimilor care trebuie masurate pentru spectrele LIAF ale tesuturilor normale si ale celor tumorale, in vederea evidentierii diferentelor dintre cele doua tipuri de tesuturi constituie un prim pas in aceasta directie. Datele prezentate in teza contribuie tocmai la identificare unor marimi fizice care sa permita o astfel de decelare, printre marimi aflandu-se:

**intensitatea maximelor de fluorescanta,**

**largimea spectrala a radiatiei de fluorescanta si a maximelor** (daca aceasta este masurabila pentru maxime in mod precis),

**raportul intensitate a maximului/largime spectrala,**

**timpii de viata ai fluorescentei** si altele care decurg din acestea.

Desi in cazul studiului nostru masuratorile au fost efectuate pe piese ex vivo, marimile mentionate pot fi masurate si/sau calculate in situ, in timp real, neinvaziv, astfel incat sa dea informatii in timp real chirurgului privind caracteristicile tesuturilor cu care opereaza, eventual sa delimiteze "safety edge". Aceste rezultate vor trebui comparate si contrapuse cu examenul histopatologic extemporaneu, considerat pina in acest moment mai "medical" si "adecvat" de catre chirurgii oncologi, admis in plus si ca proba medico-legala in caz de recidiva sau metastaza.

### **5. Studiul timpului de viata al emisiei LIAF**

#### **5.1. Ipoteza/Obiective**

Timpul de viata al emisiei autofluorescentei induse laser este un parametru spectrometric distinct si foarte sensibil. Vom face determinari ale acestuia pe diferite probe tisulare si vom incerca sa stabilim o legatura intre valorile acestuia si posibilitatea de discriminare tesut sanatos/tesut canceros.

## 5.2. Material si metoda

Pentru analiza timpului de viata al autofluorescentei induse laser s-a folosit sistemul experimental descris in capitolul anterior si prezentat in Figura 4. S-au folosit aceleasi probe tisulare in tandem, sanatos/tumoral in dublu exemplar, obtinute de la cei patru pacienti laringectomizati.

Valorile timpilor de viata ai LIAF au fost determinate analizand graficele semnalelor LIAF (Figurile 32-35) cu functia de fitare a scaderii exponentiale a semnalului a carei constanta de timp  $t$  reprezinta timpul de viata al procesului analizat. In Tabelele 13–16 sunt prezentate valorile timpilor de viata determinate punct cu punct pentru probele de tesut sanatos (SI si SII) si tumoral (TI si TII) la fiecare din cei 4 pacienti. In cazul fiecărei probe, investigatia s-a realizat pe doua directii paralele corespunzatoare latimii acesteia.

Pentru a evidenta evolutia timpului de viata al semnalului LIAF dealungul directiilor analizate, in Tabelele 13–16 valorile au fost ordonate pe doua coloane corespunzatoare celor doua directii liniare si paralele de investigatie. De asemenea, in cazul fiecărei probe s-a calculat valoarea medie corespunzatoare timpilor de viata obtinuti. Distanta intre cele doua zone liniare de investigatie a fost 2 mm. Valorile au fost plasate pe perechi acolo unde punctele analizate s-au aflat pe aceeasi linie longitudinala (raportat la dimensiunile probelor).

Numarul investigatiei a fost indexat cu valoarea „2” pentru a marca masuratorile realizate pe a doua directie. Pentru campurile unde nu s-au specificat valori nu au fost efectuate masuratori, iar acolo unde este specificat semnalul „-“ valoarea nu a putut fi determinata din graficul aferent masuratorii (intensitatea semnalului detectat a fost mica).

Pe durata masuratorilor sistemul de detectie a fost operat la treapta cea mai ridicata de amplificare a semnalului din cauza fluorescetei naturale scazute a tesuturilor analizate. Din aceasta cauza, raportul semnal – zgomot a fost mic, acest lucru reflectandu-se in zgomotul electric inregistrat sub forma unui semnal periodic cu perioada de aproximativ 2 ns care moduleaza semnalul util detectat.

## 5.3. Rezultate

In cazul fiecarui grafic analizat pentru Pacientii I-IV, liniile curbe de culoare rosie reprezinta curba de fitare cu functia exponentiala de descrestere a semnalului care furnizeaza prin intermediul constantei de timp  $t$  timpul de viata al semnalului LIAF.

**Pacientul nr. I**

In Figura 32 sunt prezentate graficele aferente semnalelor LIAF inregistrate pentru Pacientul nr. I pe probele SI – II si TI - II. Acestea au avut intensitati relativ egale pentru probele sanatoase si au fluctuat in cazul probelor tumorale. Rezultatele analizei graficelor cu functia de fitare a descresterii exponentiale a semnalului pentru determinarea timpului de viata sunt prezentate in Tabelul 13.

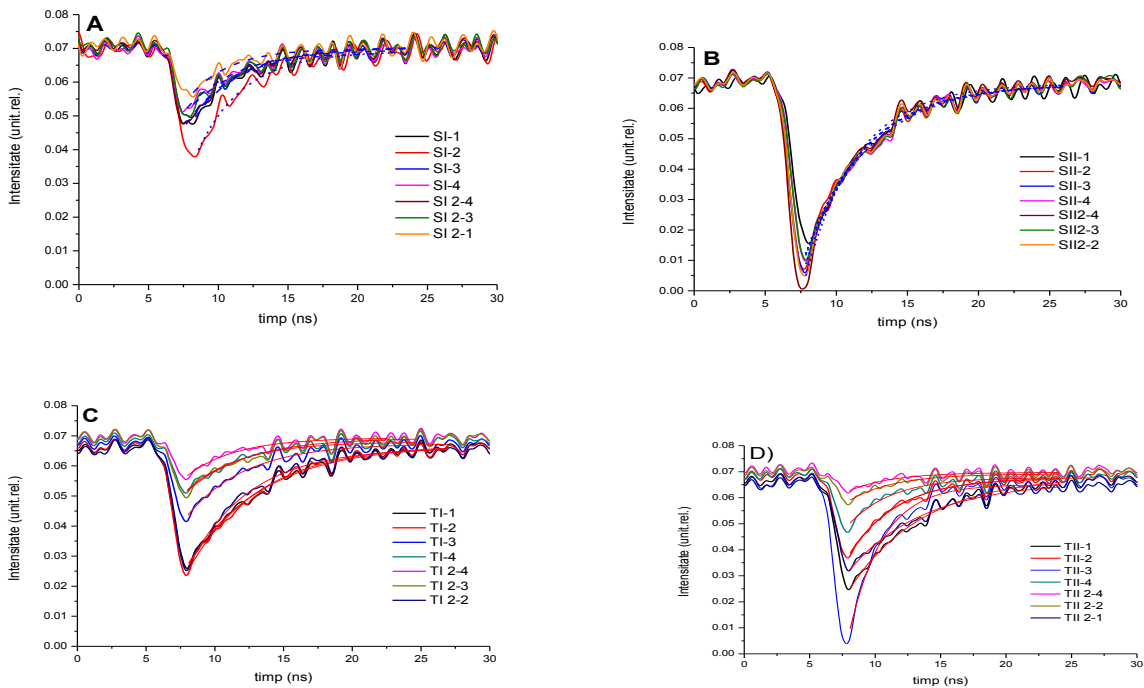


Figura 32. Graficele semnalelor LIAF obtinute pentru Pacientul nr. I pe probele A) SI, B) SII, C) TI si D) TII. Linia rosie reprezinta functia de fitare exponentiala.

Tabelul 13. Valori ale timpului de viata a LIAF pentru Pacientul nr.I.

Pacient nr. I											
Tesut		SI		SII		TI		TII			
Nr. investigatie		Timp de viata t(ns)									
		↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓
2-1	1	2,9	3,06		4,21		4,46		5,65	5,65	
2-2	2		3,34	4	4,24	5,49	5,1	3,42	3,76		
2-3	3	4,37	3,69	4,5	4	4,32	4,27			2,53	
2-4	4	3,69	3,75	3,67	4,24	3,56	3,8	3,29	3,3		
<b>medie t(ns)</b>		3,5		4,1		4,4		3,9			
<b>deplasare</b>		2mm "<---"		2mm "<---"		2mm "<---"		2mm "<---"			

In cazul Pacientului nr. I se observa ca valorile timpului de viata sunt relativ uniforme pe zonele analizate pentru tesuturile sanatoase.

In cazul tesuturilor tumorale, valorile sunt neuniforme, variind intre 3,56 ns si 5,49 ns pentru TI si intre 2,53 ns si 5,65 ns pentru TII. Valorile medii ale timpului de viata pentru probele de tesut sanatos si tumoral au fost 3,5 ns si 4,1 ns, respectiv 4,4 ns si 3,9 ns. In acest caz distanta intre punctele analizate a fost de 2 mm. Din datele masurate rezulta ca timpul de viata al autofluorescentei masurat pe probele de tesut este mai mare pentru radiatia de autofluorescenta emisa de tesutul tumoral in puncte alese aleatoriu fata de cel al autofluorescentei masurate pe tesut sanatos in puncte alese tot aleator si fara legatura evidenta cu zonele utilizate din tesutul tumoral.

Aceleasi masuratori au fost efectuate in aceleasi conditii si celorlalti 3 pacienti inclusi in lot.

#### **5.4. Discutii**

Analizand diferentele maxime inregistrate intre valorile medii calculate pentru cei patru pacientii (diferenta dintre maximul valorilor TI si TII si minimul valorilor SI si SII) se observa pentru pacientului nr. I valoarea de 0,9 ns, pacientul nr. II valoarea de 1,2 ns, pacientul nr. III valoarea de 1,1 ns si pacientul nr. IV valoarea de 0,5 ns. Daca, calculam diferenta minima inregistrata intre aceste valori (diferenta dintre minimul valorilor TI si TII si maximul SI si SII) vom obtine pentru pacientul nr. I valoarea -0,2 ns, pentru pacientul nr. II valoarea 0,5 ns, pentru pacientul nr. III valoarea 1 ns, si pentru pacientul nr. IV valoarea 0 ns.

Diferenta negativa in cazul pacientului nr. I inseamna ca timpii de viata inregistrati pentru cele doua tipuri de tesut au domenii de valori care se suprapun. Valoarea negativa de 0,2 ns masurata in acest caz este datorata in primul rand erorilor de fitare ale curbelor experimentale cu cele teroretice care permit estimarea timpului de viata al autofluorescentei. In cazul de fata erorile au fost de  $\pm 0,13$  ns. O alta cauza a acestei valori poate fi si calitatea, componenta biochimica si structura fizica a probelor de tesut utilizate in studiu.

In Figura 36 sunt prezentate graficele obtinute in urma medierii semnalelor corespunzatoare emisiei LIAF pentru probele SI, SII, TI si TII la fiecare din cei 4 pacienti. Se observa ca intensitatea medie a semnalelor variaza, in cazul fiecarui pacient, de la o proba la alta.

In cazul Pacientului nr. I (Figura 36A) intensitatile semnalelor pentru probele tumorale sunt similare, in timp ce cele pentru tesut sanatos prezinta variatii de 57% in raport cu

intensitatea semnalului maxim. Pentru Pacientul nr. I valorile medii ale timpilor de viata pentru probele SI, SII, TI si TII au fost 3,75 ns si 4,24 ns, respectiv 4,76 ns si 3,85 ns.

Pentru Pacientul nr. II (Figura 36B), intensitatile semnalelor LIAF au fost similare in cazul tipurilor de tesut, sanatos si tumoral, cel sanatos fiind in medie cu 80% mai intens. Timpii de viata aferenti au avut valorile medii 3.87 ns si 3,76 ns, respectiv 5,19 ns si 5,03 ns.

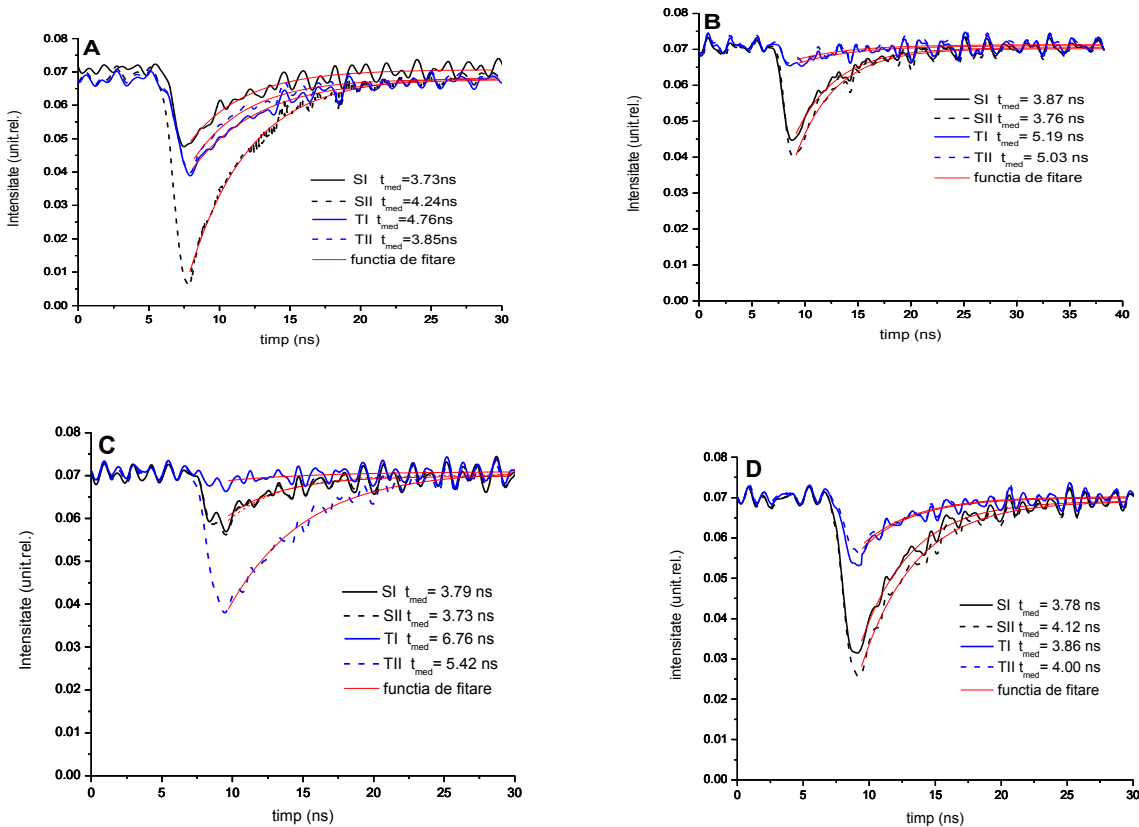


Figura 36. Timpul de viata al semnalului LIAF mediat pentru probele SI –II si TI- II la A) Pacientul nr. I, B) Pacientul nr. II, C) Pacientul nr. III si D) Pacientul nr. IV. Fiecare grafic a fost obtinut prin medierea tuturor semnalelor LIAF obtinute pentru o proba; linia rosie reprezinta functia de fitare exponentiala.

In cazul Pacientului nr. III (Figura 33 C), intensitatile semnalelor LIAF au fost similare pentru tesutul sanatos si mult diferite pentru tesutul tumoral (80% fata de valoarea maxima). Timpii de viata au avut valorile medii 3,79 ns si 3,73 ns, respectiv 6,76 ns si 5,42 ns.

La Pacientul nr. IV (Figura 33 D), la fel ca in cazul pacientului nr. II, intensitatile semnalelor LIAF au fost similare pentru tipurile de tesut, sanatos si tumoral, cel sanatos fiind in medie cu 65% mai intens decat cel tumoral. Timpii de viata aferenti au avut valorile medii 3,78 ns si 4,12 ns, respectiv 3,86 ns si 4,00 ns.

## 5.5. Concluzii

Valorile medii ale timpilor de viata obtinuti prin analiza semnalelor LIAF mediate pentru fiecare proba (SI, SII, TI si TII) au aratat un trend al valorilor asemanator cu cel indicat de mediile timpilor de viata obtinuti pentru fiecare punct de investigatie (Tabelele 13 – 16) si anume, valorile medii sunt **mai mari in cazul tesuturilor tumorale**.

O exceptie se regaseste in cazul Pacientului nr. IV unde valorile obtinute pentru tesutul tumoral se incadreaza intre cele obtinute pentru tesutul sanatos. Insa, daca coroboram acest rezultat cu datele obtinute prin medierea valorilor timpilor de viata obtinuti pentru fiecare punct investigat, 3,8 ns, 4,0 ns, 4,0 ns si 4,3 ns (Tabelul 16), putem spune ca si in acest caz exista o tendinta de crestere a timpului de viata al semnalului LIAF pentru tesutul tumoral. Aceasta evolutie poate reprezenta un indicator in stabilirea tipului de tesut analizat prin medierea semnalelor inregistrate dealungul unei directii de investigatie a probei si determinarea din acest semnal a timpului de viata mediu al semnalului LIAF.

La analiza privind diferentele maxime inregistrate intre valorile medii calculate pentru cei patru pacienti se observa pentru Pacientul nr. I valoarea de 1,03 ns, pentru Pacientul nr. II valoarea de 1,43 ns, pentru Pacientul nr. III valoarea de 3 ns si pentru Pacientul nr. IV valoarea de 0,22 ns. Daca, calculam diferenta minima inregistrata intre aceste valori vom obtine pentru Pacientul nr. I valoarea -0,39 ns, pentru Pacientul nr. II valoarea 1,16 ns, pentru Pacientul nr. III valoarea 1,63 ns, si pentru Pacientul nr. IV valoarea -0,26 ns.

Diferenta negativa in cazul Pacientilor I si IV indica faptul ca timpii de viata inregistrati pentru cele doua tipuri de tesut au domenii de valori care se suprapun. In acest caz, fata de cazul valorilor obtinute prin medierea aritmetica a timpilor de viata (Tabele 13 – 16), diferentele sunt mult mai accentuate, indicand mult mai precis separarea sau apropierea domeniilor de valori ale timpilor de viata.

Valorile negative de 0,39 ns si 0,26 ns masurate in acest caz sunt de asemenea determinate de erorile de fitare ale curbelor experimentale cu cele teoretice care permit estimarea timpului de viata al autofluorescentei. In cazul de fata erorile au fost de  $\pm 0,2$  ns (rezultate din estimarea facuta de programul de fitare). O alta cauza o reprezinta si calitatea, componenta si structura probelor de tesut utilizate in studiu.

Comparand diferentele inregistrate intre valorile medii calculate prin metoda medierii aritmetice a timpilor de viata obtinuti pentru fiecare esantionare in parte cu valorile timpilor de viata determinati prin analiza semnalelor mediate pentru aceleasi esantionari (la fiecare tip de proba in parte), rezulta ca analiza prin **medierea semnalelor corespunzatoare emisiei LIAF este mai utila pentru diferentierea calitativa a celor doua tipuri de tesut.**

Din punct de vedere experimental aceasta este o recomandare de principiu dar trebuie tinut cont si de faptul ca disponerea de **doua** metode de masura a caracteristicilor tesuturilor tumorale si normale poate constitui un avantaj in estimarea corecta a calitatii tesuturilor, cu atat mai mult cu cat masurarile de semnale sunt afectate de erori de ordinul celor mentionate in acest capitol. Ca si in cazul parametrilor LIAF din capitolul anterior, trebuie facuta comparatia cu examenul extemporaneu atat din punct economic, al resursei umane folosite, cit si medico-chirurgical si oncologic.

## **6. Studiul FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)**

### **6.1. Ipoteza/Obiective**

Metodele spectroscopice folosite pentru detectarea vibrațiilor atomilor din molecule au la baza fenomenele de absorbție a radiațiilor din domeniul infraroșu și de împrăștiere inelastică Raman. Aceste metode sunt folosite în practică pentru a colecta date despre structura moleculară, în scopul de a identifica substanțele pe baza unor „amprente” spectrale caracteristice și pentru a determina cantitatea de substanță de analizat dintr-o probă. Probele pot fi studiate in orice stare de agregare, la orice temperatura, ca particule microscopice sau în straturi de suprafață. Spectrul FTIR conține informații privind prezența unor grupări funcționale/tipuri de legături în moleculele probei studiate [Colthup et al 1978]. Spectroscopia FTIR și spectroscopia Raman sunt tehnici complementare. Vibrațiile puternice din spectrul IR sunt de obicei slabe în spectrul Raman și invers. Din punct de vedere calitativ, modurile de vibrație antisimetrice datorate legăturilor polare O-H, N-H, C=O au în general benzi proeminente în IR, în timp ce în spectrul Raman apar vibrații implicate în legături simetrice C=C, C-C, S-S.

Spectroscopia in infrarosu cu transformata Fourier este tehnica cea mai potrivita de identificare si caracterizare a vibratiilor caracteristice dintr-o molecula asimetrica ale gruparilor

functionale. Dupa absorbtia de radiatie IR de catre o molecula, energia rezultata este transformata in moduri de rotatie si vibratie. Cele din urma sunt clasificate astfel: vibratii de deformare (balans, rotire, forfecare si torsiune) si de alungire (asimetrice si simetrice)[145].

Utilizarea spectroscopiei FTIR ca instrument de investigare si analiza a tesuturilor sanatoase sau tumorale este limitata de dificultatea de a interpreta schimbarile subtile intre spectrele IR. Modificarile morfologice nucleare si citoplasmatiche au loc dupa cele biochimice, si, prin urmare, tehnica FTIR ar putea detecta modificarile chimice in timpul dezvoltarii cancerului, inainte ca modificarile citologice-morfologice sa fie detectabile sub microscop.

Multe studii au aratat ca FTIR poate diferentia semnificativ biochimia celulelor normale fata de a celor neoplazice [146]. Multe tipuri de cancer au fost studiate prin spectroscopie FTIR, cum ar fi carcinomul de col uterin [147], [148], de colon [149], de san [150], [151], de esofag [152], de stomac [153], [154] si pancreas [155].

## 6.2. Material si metoda

Spectrele IR au fost inregistrate cu spectrometrul FT-IR Nicolet™ iS™50 – modul ATR (reflexie totala atenuata), in domeniul  $3700 - 850 \text{ cm}^{-1}$  la o rezolutie de  $4 \text{ cm}^{-1}$  si o mediere pe 16 de spectre. S-a utilizat cristalul ZeSe ce are urmatoarele caracteristici: 2 mm diametru, 2,4 indice de refractie si 2  $\mu\text{m}$  adancime de penetrare la  $45^\circ$ .

Probele de tesut sanatos SI, SII, TI si TII de pe lamelele de sticla au fost investigate prin metoda FTIR-ATR in 2-3 puncte de masurare, in functie de dimensiunea probelor, in aceeasi directie ca si in cazul masuratorilor de LIAF.

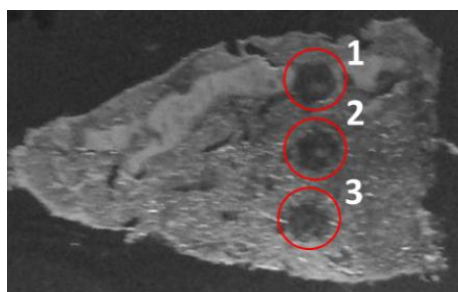


Figura 37. Proba de tesut sanatos SI a pacientului nr. II, analizata in 3 puncte utilizand metoda FTIR-ATR.

Spectrul FTIR a fost inregistrat in 3 puncte distincte ale tesutului sanatos cat si tumoral pentru pacientii nr. I si II si in 2 puncte pentru pacientii nr. III si IV.

In literatura de specialitate exista identificate vibratiile legaturilor gruparilor functionale caracteristice tesuturilor sanatoase si tumorale [156] ce se regasesc in Tabelul 17.

Tabelul 17. Frecventele vibratiilor legaturilor gruparilor functionale din molecule in regiunea IR de mijloc a spectrului electromagnetic.

Numar de unda (cm <sup>-1</sup> )	Grupare functionala	Mod de vibratie	Componente biochimice
<b>3500-2500</b>	<b>Vibratie de alungire a legaturii X-H (X=C,O,N)</b>		
~3300	N-H	v(N-H)	Amida A: peptida, proteina
~3100	N-H	v(N-H)	Amida B: peptida, proteina
2957	C-CH <sub>3</sub>	v <sub>as</sub> (CH <sub>3</sub> )	Lipide
2920	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	-v <sub>as</sub> (CH <sub>2</sub> )	
2872	C-CH <sub>3</sub>	v <sub>s</sub> (CH <sub>3</sub> )	
2851	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	-v <sub>s</sub> (CH <sub>2</sub> )	
<b>2000-1500</b>	<b>Vibratii de alungire fundamentale ale legaturilor duble (C=O, C=C, C=N)</b>		
~1740	-CH <sub>2</sub> -COOR	v(C=O)	Esteri fosfolipidici
~1655	O=C-N-H	80% v(CO), 20% v(CN)	Amida I, peptida, proteina
~1645	H-O-H	γ(HOH)	Apa
~1545	O=C-N-H	60% γ(N-H), 30% v(C-N), 10%v(C-C)	Amida II, peptida, proteina
<b>~1500-600</b>	<b>Regiune de amprenta: multe suprapuneri de vibratii</b>		
~1450	-(CH <sub>3</sub> ) <sub>n</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	δ <sub>as</sub> (CH <sub>3</sub> ) δ <sub>as</sub> (CH <sub>3</sub> )	Lipide, proteine
~1395	-(CH <sub>3</sub> ) <sub>n</sub> <sup>-</sup> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -O-C=O	δ <sub>s</sub> (CH <sub>3</sub> ) δ <sub>s</sub> (CH <sub>3</sub> ) v(C=O)	Lipide, proteine
~1380	C-CH <sub>3</sub>	γ <sub>s</sub> (CH <sub>3</sub> )	Fosfolipide, acizi grasi, trigliceride
1400 - 1200	O=C-N-H, CH <sub>3</sub>	γ(N-H), v(C-N), γ(C=O), v(C-C) and v(CH <sub>3</sub> )	Amida III, peptide, proteine, collagen
~1245 - 1230	RO-PO <sub>2</sub> -OR	v <sub>as</sub> (PO <sup>2-</sup> )	

~1170	R-COO-R'	$\nu_{as}(C-O)$	Esteri
~1160, ~1120		$\nu(C-O)$	ARN ribozomal
~1150	C-O, C-O-H	$\nu(CO), \gamma(COH)$	Carbohidrati
~1095, ~1084, ~1070	RO-PO <sub>2</sub> -OR	$\nu_s(PO_2^-)$	ADN, ARN, fosfolipide, proteine fosforilate
~1078	C-C	$\nu(CC)$	Glicogen
~1060, 1050, 1015	C-O	$\nu(CO)$	ADN si ARN ribozomal
~1050	C-O-P	$\nu(COP)$	Esteri fosforici
~1028	C-O-H	def(CHO)	Glicogen
~965	PO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	$\nu(PO_3^{2-})$	ADN si ARN ribozomal
~950	P-O	$\nu(PO_3^{2-})$	Proteine fosforilate
~920	C-O-P	$\nu(COP)$	Proteine fosforilate

$\nu$ -alungire;  $\delta$  – deformare in plan - forfecare;  $\gamma$  – deformare in plan – rotire, deformare in afara planului-balans - torsiune; def – deformare; as – asimetric; s – simetric;

Celulele biologice contin glicogen, proteine si acizi nucleici. Raportul dintre aceste structuri variaza in functie de starea/tipul celulelor. Atunci cand radiatia in infrarosu interactioneaza cu aceste structuri, energia cuantica specifica este absorbita.

Spectrele FTIR ale lipidelor (de exemplu, fosfolipide) se gasesc in regiunea 2800-3000  $cm^{-1}$ . Ele se datoreaza vibratiilor de alungire asimetrica si simetrica ale legaturilor din lanturile alchil/acil CH<sub>3</sub> (2956 si 2874  $cm^{-1}$ ) si CH<sub>2</sub> (2922 si 2852  $cm^{-1}$ ). Deoarece exista un numar mai mare de grupari metilen in fosfolipide, intensitatea vibratiilor legaturilor CH<sub>2</sub> este de 10-20 de ori mai mare decat cea corespunzatoare gruparii CH<sub>3</sub>.

Benzile IR din regiunea 1600-1800  $cm^{-1}$  sunt legate de vibratii de alungire ale legaturii C=O [157], [158]. Amida I, care este una dintre cele mai importante componente ale proteinelor, are benzi de absorbtie in regiunea cuprinsa intre 1600-1800  $cm^{-1}$  rezultate din vibratia de alungire a legaturii amidice C=O.

Absorbtiia amidei II se datoreaza vibratiilor de deformare-forfecare a legaturii N-H cuplate cu vibratia de alungire a legaturii C-N, ce se poate observa in domeniul 1500-1560  $cm^{-1}$ .

Benzile IR ale amidei III se datoreaza vibratiei de alungire a legaturii C-N si vibratiei de deformare in plan a N-H si se regasesc in domeniul 1250-1350  $cm^{-1}$ .

Regiunea  $1000-1250\text{ cm}^{-1}$  prezinta benzi de absorbtie datorate modurilor de vibratie ale gruparilor fosfat. Acizii nucleici sunt compusi din legaturi fosfodiester care prezinta doua benzi in infrarosul: vibratie de alungire simetrica ( $1087\text{ cm}^{-1}$ ) si asimetrica ( $1224\text{ cm}^{-1}$ ) a gruparii functionale  $\text{PO}_2$ . Benzile de absorbtie ale carbohidratilor (inclusiv glicogen) se gasesc in regiunea cuprinsa intre  $1000-1200\text{ cm}^{-1}$  si sunt atribuite vibratiilor de alungire ale legaturii C-O.

In regiunea  $1800-2800\text{ cm}^{-1}$  celulele biologice nu absorb radiatie [146].

### **6.3. Rezultate**

#### **Pacientul nr. I**

In cazul Pacientului nr. I, sunt prezentate in Figura 38 spectrele FTIR atat pentru tesuturile sanatoase cat si pentru cele tumorale. In continuare se urmaresc modificarile biochimice ce au loc atat intre diferite straturi de tesut sanatos si tumoral, cat si cele intre tesutul sanatos si tumoral, cu evidentierea diferentelor dintre acestea.

Benzile de absorbanta proeminente observate pentru ambele tipuri de tesuturi sunt caracteristice modurilor de vibratie ce reprezinta grupari functionale din molecule celulare, inclusiv proteine, carbohidrati si acizi nucleici [159, 160, 161]. In toate spectrele, s-au observat maxime majore caracterizate de absorbtiiile amidei I si II la  $1650\text{ cm}^{-1}$  si, respectiv,  $1540\text{ cm}^{-1}$ . Un al doilea set proeminent de maxime a fost observat in zona caracterizata de vibratiile legaturilor din carbohidrati si din acizi nucleici, mai exact intre  $1000\text{ cm}^{-1}$  si  $1150\text{ cm}^{-1}$ . Diferentele dintre spectrele IR ale tesutului tumoral si sanatos pot fi observate in special in regiunea  $1000\text{ cm}^{-1}$  si  $1150\text{ cm}^{-1}$  [162].

Benzile de la  $1650\text{ cm}^{-1}$  si  $1550\text{ cm}^{-1}$  reflecta in mod caracteristic vibratia de alungire a legaturii C=O si vibratia de deformare (torsiune) a legaturii N-H (in plus fata de vibratia de deformare a legaturilor C-N) in legaturile amidice ale proteinelor. Banda de la  $1042\text{ cm}^{-1}$  reflecta vibratiile de alungire si de deformare ale legaturii C-O care sunt atribuite carbohidratilor [162].

Pentru probele de tesut sanatos (SI si SII) si tumoral (TI si TII) analizate prin metoda FTIR-ATR, in 3 puncte de masurare distincte, se poate observa in Figura 38A si Figura 38B faptul ca tesuturile sunt uniforme si nu exista diferente intre acelasi tip de tesut, spectrele FTIR fiind caracterizate de aceleasi benzi de vibratie.

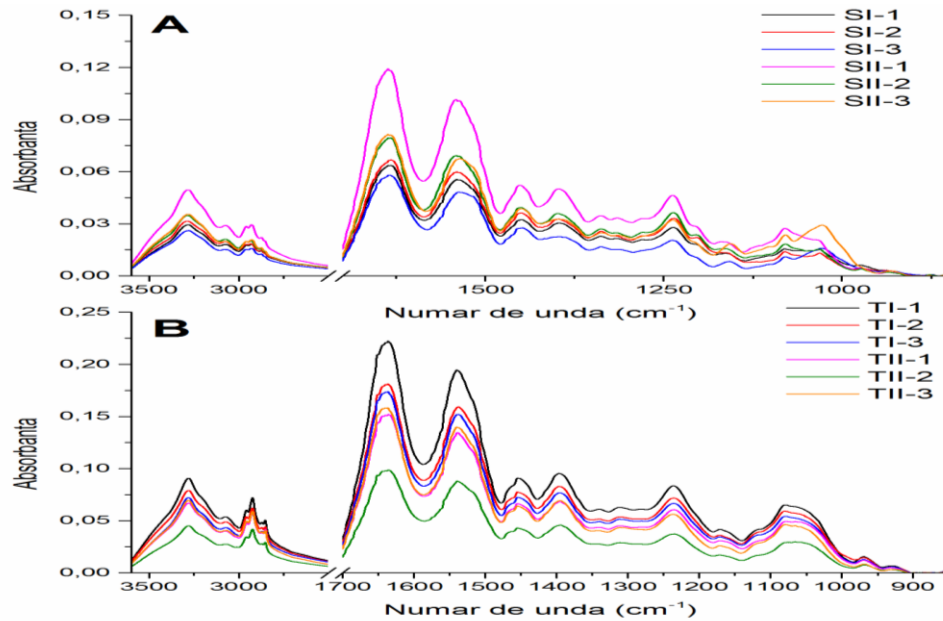


Figura 38. Spectrele FTIR ale probelor Pacientului nr. I in domeniul 3600-850  $\text{cm}^{-1}$  pentru A) tesut sanatos (SI si SII) si B) tumoral (TI si TII) .

Comparatia dintre tesutul sanatos si cel tumoral, in cazul Pacientului nr. I, este prezentata in Figura 39, unde pentru ambele probe se pot identifica benzile specifice amidei A, B, I, II si III si vibratia caracteristica acizilor nucleici caracterizata de vibratia de alungire simetrica a gruparii functionale  $\text{PO}_2$ .

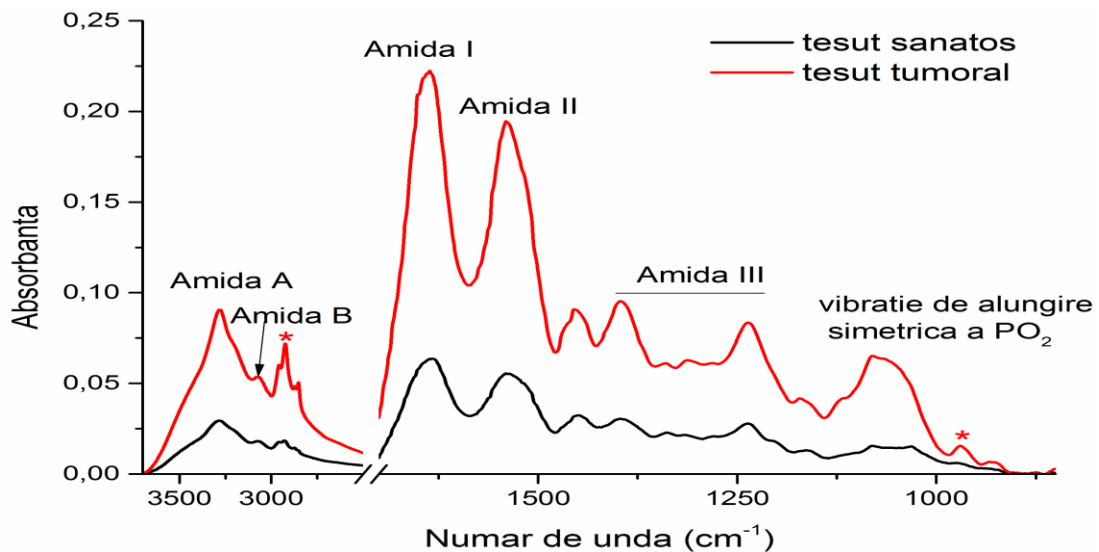


Figura 39. Spectrele FTIR ale probelor Pacientului nr. I in domeniul 3600-850  $\text{cm}^{-1}$  pentru tesutul sanatos si cel tumoral.

Pentru acest pacient, nu exista modificari majore intre spectrele IR ale probelor de tesut sanatos si tumoral, cu exceptia aparitiei benzii de la  $2929\text{ cm}^{-1}$  responsabila de vibratia de alungire simetrica a  $\text{CH}_2$  din cadrul lipidelor si cea de la  $965\text{ cm}^{-1}$  responsabila de vibratia de alungire a gruparii  $\text{PO}_3^{2-}$  (AND si ARN - riboza).

Aceleasi masuratori au fost efectuate in aceleasi conditii si celorlalti 3 pacienti inclusi in lot.

#### **6.4. Discutii.Concluzii**

Modificarile produse in spectrele FTIR ale tesuturilor tumorale indica **lipsa benzilor de absorbtie IR la  $2929\text{ cm}^{-1}$ , la  $1745\text{ cm}^{-1}$  si la  $1160\text{ cm}^{-1}$  si  $1120\text{ cm}^{-1}$** , comparativ cu rezultatele obtinute pentru tesutul sanatos.

De asemenea, in cazul tesutului tumoral, pentru toate spectrele IR s-au observat modificari ale intensitatii absorbantei benzilor amidelor I si II, ceea ce reflecta modificari structurale ale proteinelor, cat si interactii intramoleculare si intermoleculare ale acestora cu alte molecule [162].

Un caz atipic il constituie Pacientul nr. I pentru care nu s-au observat diferente intre tesutul tumoral si cel sanatos comparativ cu pacientii II – IV. Totusi, si in cazul acestui pacient sunt observabile diferente intre spectrele FTIR masurate pe tesutul tumoral si cel sanatos. Comportarea diferita a spectrelor FTIR la Pacientul I fata de ceilalti pacienti poate fi datorata faptului ca pentru acesta grosimea probelor masurate a fost de  $25\text{ }\mu\text{m}$  fata de  $30\text{ }\mu\text{m}$  in cazul pacientilor II – IV (artefact).

## 7. Studiul LIAF si FTIR pe substante pure

### 7.1. Ipoteza/obiective

Originea LIAF la nivel tisular nu este pe deplin inteleasa. Diferentele parametrilor LIAF intre tesutul normal si cel tumoral sunt puse pe seama urmatoarelor factori:

- Modificarea arhitecturii tisulare (ingrosarea anumitor straturi celulare sau, din contra, scaderea grosimii acestora);
- Modificari ale retelei sanguine locale (neovascularizatie tumorală, aport sanguin modificat);
- Modificari in distributia colagenului (celulele neoplazice ce infiltreaza submucoasa secreta metaloproteaze – identificabile prin teste de imunohistochimie – care participa la ruperea punctilor de colagen[164]);
- Modificari in continutul tisular de fluorofori: NADH (Nicotinamida Adenin Dinucleotidă), FAD (Flavina Adenin Dinucleotida), riboflavina, NADHP (Nicotinamida Adenin Dinucleotidă Fosfat)[165].

Pentru a intelege caracteristicile de absorbtie in UV-Vis, de autofluorescenta indusa laser, de timp de viata al fluorescentei induse laser si absorbtie in IR ale tesuturilor sanatoase si tumorale laringiene, au fost investigate aceleasi proprietati pentru fluoroforii cu relevanta biologica ce se regasesc in acestea, precum NADH ( $C_{21}H_{27}N_7Na_2O_{14}P_2$ ), FAD ( $C_{27}H_{31}N_9Na_2O_{15}P_2$ ), cheratina si colagen ( $C_2H_5NOC_5H_9NOC_5H_{10}NO_2$ ).

### 7.2. Material si metoda

Solutiile preparate, solventul si concentratiile corespunzatoare sunt prezentate in tabelul urmator.

Tabelul 18: Solutiile si solventii utilizati si concentratiile corespunzatoare

	Solvent	Concentratie
NADH	0.01 M NaOH	$10^{-3}M$
FAD	apa ultrapura	$10^{-3}M$
Cheratina	apa ultrapura	12,5 mg/mL
Colagen	17,5 M acid acetic	1 mg/mL

Pentru a putea compara cu probele de tesuturi, s-a preparat o solutie de amestec ce cuprinde NADH, FAD, cheratina si colagen in raport 1:1:1:1 (V:V:V:V – raport de volum). Solutiile au fost analizate prin metode spectroscopice: absorbtie UV-Vis, absorbtie IR (FTIR-ATR) și LIAF.

### 7.3. Rezultate

#### 7.3.1. Analiza UV-Vis-NIR

Spectrele de absorbție au fost înregistrate între 200 și 1500 nm utilizând spectrofotometrul Perkin Elmer, model Lambda 950 (eroare standard de  $\pm 0.004\%$ ) pentru un drum optic de 1 mm. Spectrele de absorbție sunt prezentate în Figura 46.

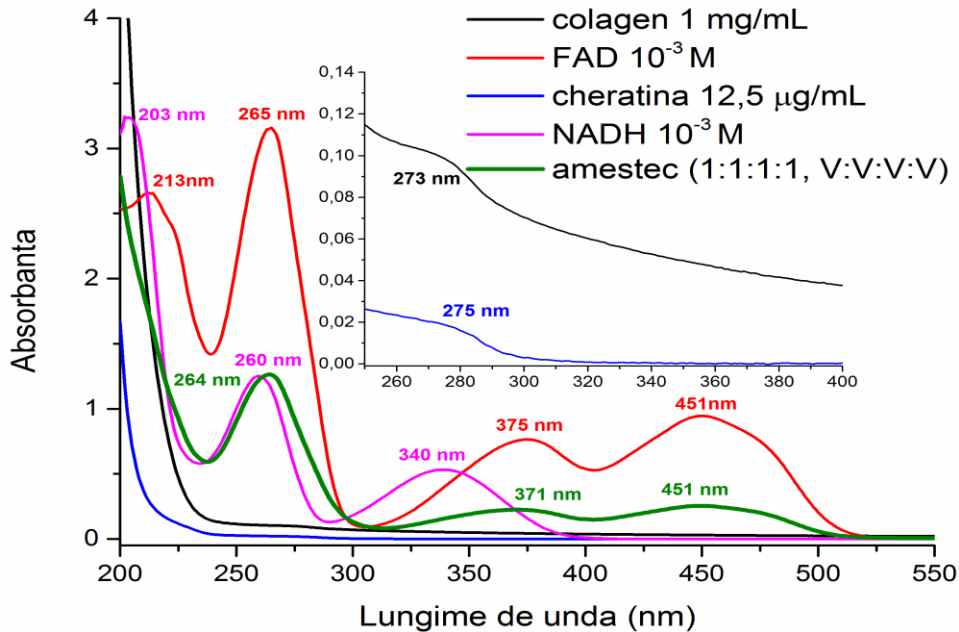


Figura 46. Spectrele de absorbție ale soluțiilor de NADH, FAD, cheratina și colagen în domeniul 200-550 nm. Figura în-set evidențiază spectrele soluțiilor de cheratina și colagen în domeniul 250-400 nm

Spectrul de absorbție al soluției de NADH este caracterizat de 3 benzi de absorbție la 230 nm, 260 nm și 340 nm și cel al soluției de FAD este caracterizat de 4 benzi de absorbție la 213 nm, 265 nm, 375 nm și 451 nm. Cheratina și colagenul prezintă în domeniul 200-1500 nm câte o singură bandă de absorbție la 275 nm și respectiv, 273 nm. În domeniul 550-1500 nm soluțiile nu prezintă benzi de absorbție.

În cazul iradierii probelor de tesuturilor sănatoase și tumorale la 375 nm, contribuția semnificativă a semnalelor este oferită de FAD ce prezintă o absorbanta de 0,76 comparativ cu NADH (0,16) ambele soluții având aceeași concentrație. Colagenul prezintă la 375 nm o absorbanta mai mică decât cele două soluții menționate, respectiv 0,42.

### 7.3.2. Analiza LIAF si a timpului de viata a semnalului LIAF

Analiza LIAF a fost efectuata in aceleasi conditii ca si in cazul probelor de tesuturi sanatoase si tumorale. Cantitatea de 20  $\mu\text{L}$  de solutie a fost aplicata pe o lamela de sticla unde s-a permis evaporarea solventului. Probele in stare solida au fost expuse la 50 pulsuri laser emise la 375 nm, inregistrandu-se semnalul LIAF si timpul de viata corespunzator. Spectrele solutiilor sunt prezentate in Figura 47.

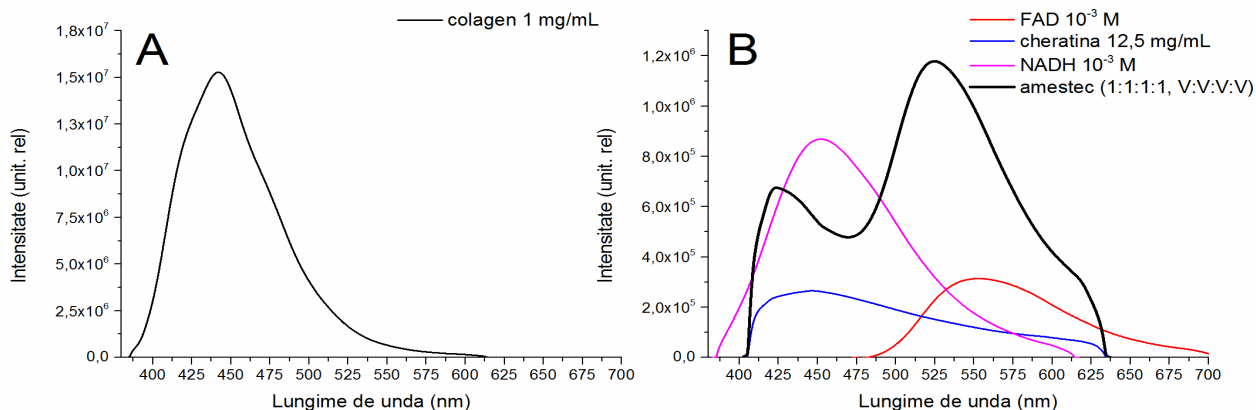


Figura 47. Spectrele LIAF ale solutiilor de A) collagen si B) NADH, FAD si cheratina in domeniul 400-700 nm.

Spectrul de fluorescanta al solutiei de NADH este caracterizat de o banda de fluorescanta cu maxim la 452 nm, al solutiei de FAD la 553 nm, al solutiei de collagen la 442 nm si cel al cheratinei este caracterizat de o banda cu maxim la 446 nm. Solutia de amestec 1:1:1:1 prezinta doua benzi de fluorescanta la 423 nm si 542 nm.

Tabelul 19. Parametrii extrasi din spectrele LIAF ale solutiilor de NADH, FAD, cheratina si collagen.

Proba	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	I ( $\times 10^5$ unit. rel.)	FWHM (nm)	Arie ( $\times 10^7$ nm x unit. rel.)
NADH	452	8,6	95	9
FAD	553	3,1	100	3,3
Colagen	442	153	70	114,4
Cheratina	446	2,6	130	3,6
<b>Amestec</b>	<b>423 / 542</b>	<b>6,2 / 11,8</b>	<b>40/108</b>	<b>15,2</b>

Valoarea timpului de viata al autofluorescentei pentru NADH este de 2,7 ns, pentru FAD de 1,3 ns, pentru cheratina de 2,7 ns, colagen 1,99 ns si pentru amestec 2,54 ns. Spectrele timpului de viata al autofluorescentei induse laser sunt prezentate in Figura 48.

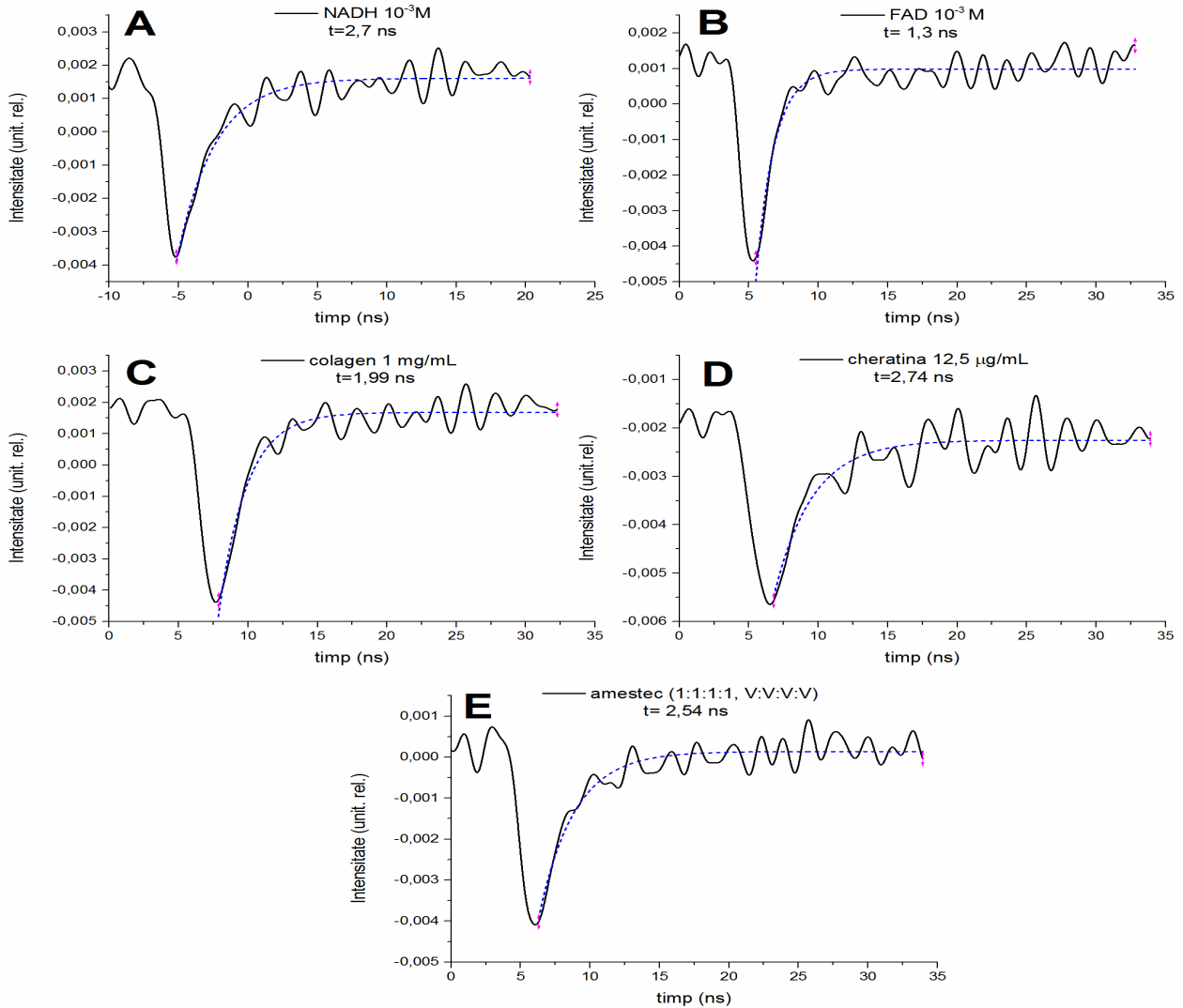


Figura 48. Spectrele timpului de viata al autofluorescentei si valorile corespunzatoare pentru solutiile de NADH, FAD, cheratina, colagen si amestec.

### 7.3.3. Studiul FTIR (Spectroscopia in infrarosu cu tranformata Fourier)

Spectrele IR au fost înregistrate cu spectrometrul FT-IR Nicolet™ iS™50 – modul ATR (reflexie totala atenuata), în domeniul  $3700 - 850 \text{ cm}^{-1}$  la o rezoluție de  $4 \text{ cm}^{-1}$  și o mediere pe 16 de spectre. S-a utilizat cristalul ZeSe ce are urmatoarele caracteristici: 2 mm diametru, 2,4 indice de refractie si 2  $\mu$ m adancime de penetrare la  $45^\circ$ . Spectrele FTIR ale probelor sunt prezentate in Figura 49.

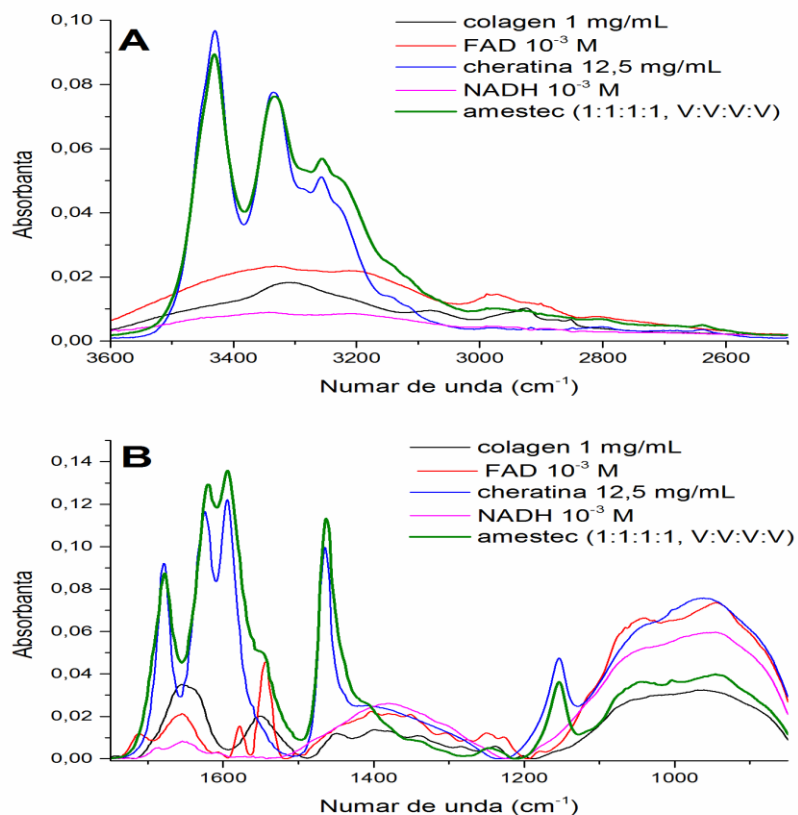


Figura 49: Spectrele FTIR-ATR ale probelor de NADH, FAD, collagen, cheratina si de amestec in domeniul A) 3600-2500 cm<sup>-1</sup> si B) 1750-850 cm<sup>-1</sup>

In Figurile 50-54 sunt prezentate spectrele IR ale probelor si vibratiile caracteristice legaturilor moleculare ale acestora. Spectrele FTIR ale probelor prezinta benzi de absorbtie caracteristice datorate in mare parte legaturilor peptidice (-CONH-). Vibratiile legaturilor peptidelor sunt cunoscute ca amida A, amida B, amida I, amida II si amida III.

In spectrul FTIR al probei de collagen (Figura 50) avand o concentratie de 1mg/mL sunt identificate benzile corespunzătoare amidei A (3308 cm<sup>-1</sup>) și amidei B (2923 cm<sup>-1</sup>) si cele trei benzi principale ale amprentei collagenului la 1650 cm<sup>-1</sup> (vibratie de alungire C-H, din cadrul amidei I), 1552 cm<sup>-1</sup> (vibratii de intindere a legaturilor N-H și N-C din cadrul amidei II) și la 1230 cm<sup>-1</sup> (corespunzând vibrațiilor de intindere ale legaturii C-N și de deformare a legaturii N-H din cadrul amidei III).

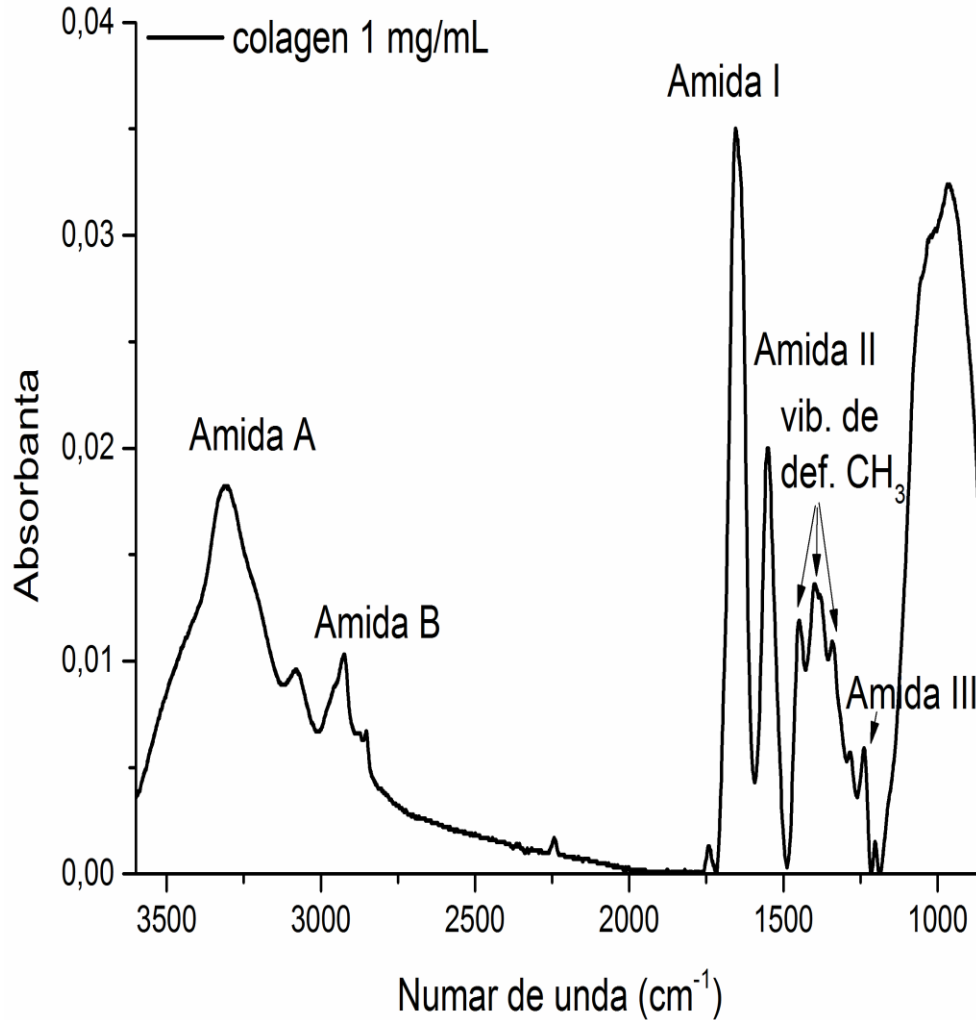


Figura 50. Spectrul FTIR-ATR al solutiei de 1mg/mL colagen.

Benzile din regiunea cuprinsă între  $3100\text{ cm}^{-1}$  și  $3400\text{ cm}^{-1}$  se datorează vibrațiilor de întindere ale legăturilor O-H și N-H din compoziția amidei A. Benzile identificate la  $1451\text{ cm}^{-1}$  și în regiunea cuprinsă între  $1394\text{ cm}^{-1}$  și  $1337\text{ cm}^{-1}$  corespund stereochemiei inelelor pirolidinici ai prolinei și hidroxiprolinei [163].

Spectrul IR al FAD este asemanator cu cel al colagenului, unde banda amidei A este situata la  $3346\text{ cm}^{-1}$  si banda amidei B la  $2985\text{ cm}^{-1}$ . Benzile amidei I, II si III sunt situate la  $1656\text{ cm}^{-1}$ ,  $1541\text{ cm}^{-1}$  si respectiv, la  $1247\text{ cm}^{-1}$ . Spectrul FTIR a  $10^{-3}\text{M}$  FAD este prezentat in Figura 51.

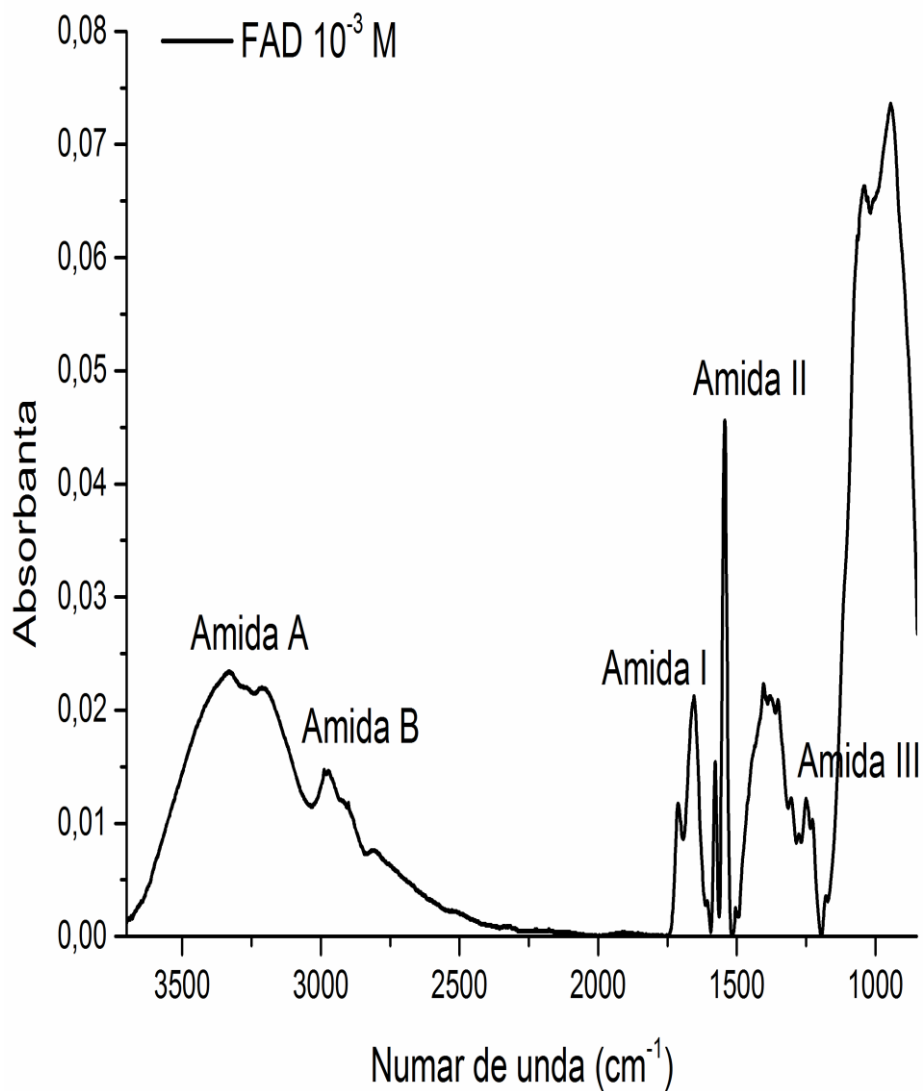


Figura 51. Spectrul FTIR al solutiei de  $10^{-3}\text{M}$  FAD

Spectrul IR al NADH este si el asemanator cu cel al colagenului si al FAD, unde banda amidei A este situata la  $3342\text{ cm}^{-1}$  si banda amidei I este situata la  $1656\text{ cm}^{-1}$ . Spectrul FTIR a  $10^{-3}\text{M}$  NADH este prezentat in Figura 52.

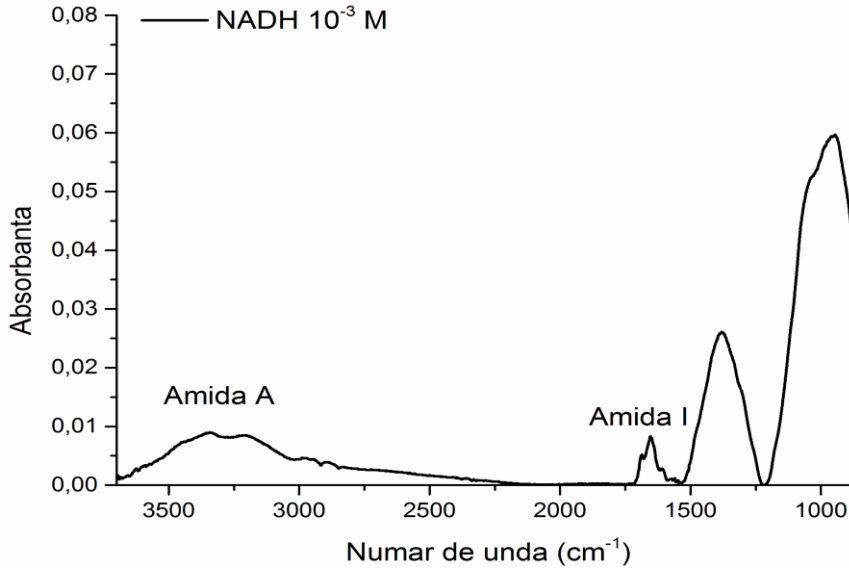


Figura 52. Spectrul FTIR al solutiei de  $10^{-3}\text{M}$  NADH

De asemenea, spectrul IR al cheratinei este asemanator cu cel al probelor mentionate mai sus. Banda corespunzatoare amidei A situata la  $3430\text{ cm}^{-1}$  se datoreaza vibratiei de intindere a legaturii N-H. Banda amidei I se datoreaza vibratiei de intindere a legaturii C=O si se regaseste in domeniul spectral  $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ , iar banda amidei II este situata la  $1465\text{ cm}^{-1}$ .

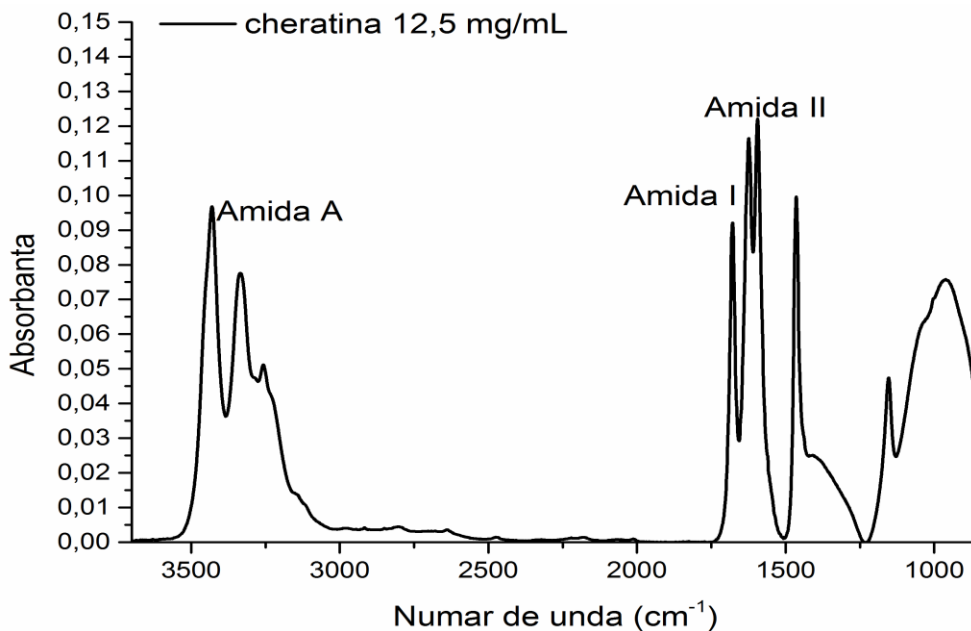


Figura 53. Spectrul FTIR al solutiei de  $12,5\text{ mg/mL}$  cheratina

## 7.4. Discutii

Pentru a determina influenta fluoroforilor cu relevanta biologica ce se regasesc in tesuturi in cazul probelor de tesut sanatos si tumoral s-au comparat spectrele LIAF si cele FTIR ale fluoroforilor cu cele ale tesuturilor sanatoase si tumorale. In Figurile 54 si 55 sunt prezentate spectrele LIAF atat pentru solutiile pure cat si pentru tesuturi.

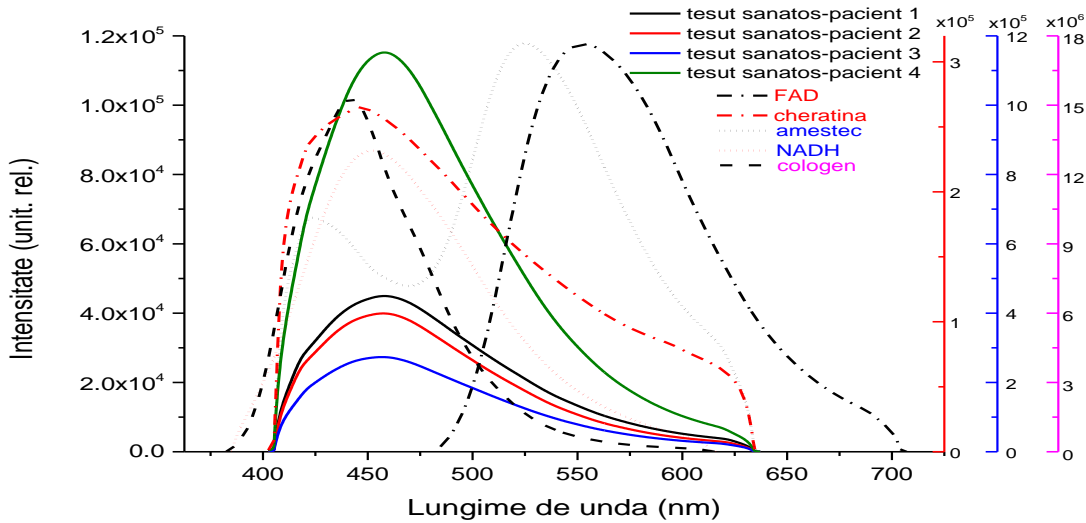


Figura 54. Spectrele LIAF ale solutiilor pure (FAD, cheratina, NADH, colagen si amestec) si ale probelor de tesut sanatos pentru toti pacientii investigati

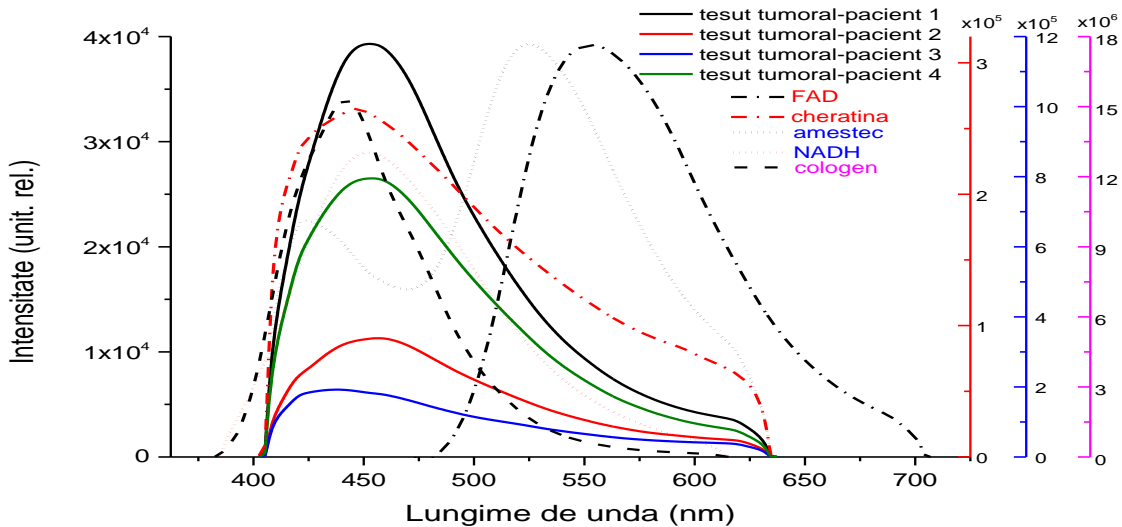


Figura 55. Spectrele LIAF ale solutiilor pure (FAD, cheratina, NADH, colagen si amestec) si ale probelor de tesut tumoral pentru toti pacientii investigati

In Figurile 56-58 sunt comparate spectrele FTIR ale probelor de tesut sanatos si tumoral cu cele ale solutiilor de FAD, NADH, cheratina, collagen si amestecul lor cu scopul de a identifica contributia fiecarului fluorofor in tesut.

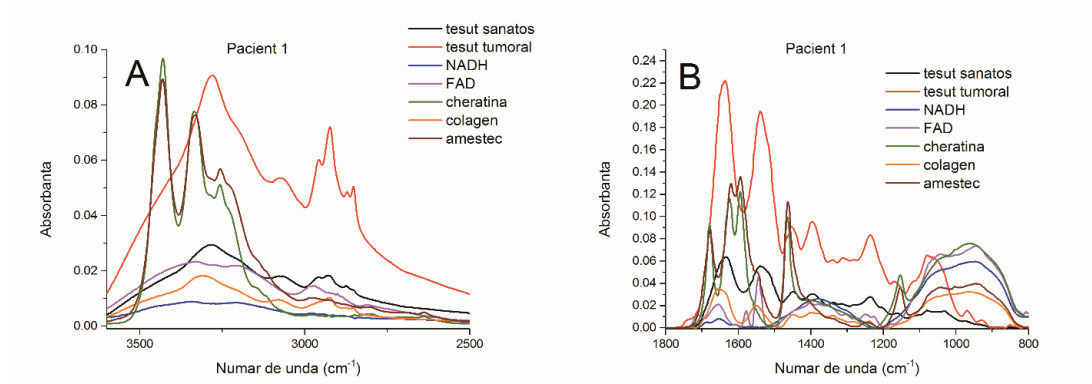


Figura 56. Spectrele FTIR-ATR pentru ale solutiilor pure (FAD, cheratina, NADH, collagen si amestec) si ale probelor de tesut sanatos pentru Pacientul nr. I

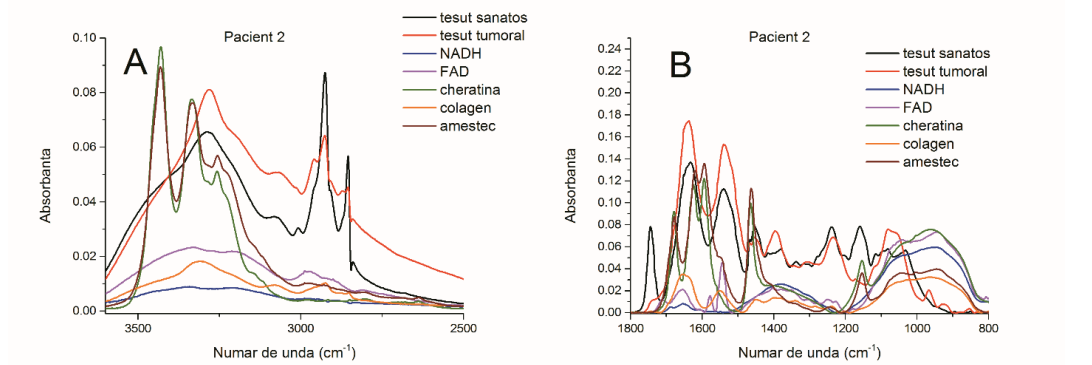


Figura 57. Spectrele FTIR-ATR pentru ale solutiilor pure (FAD, cheratina, NADH, collagen si amestec) si ale probelor de tesut sanatos pentru Pacientul nr. II

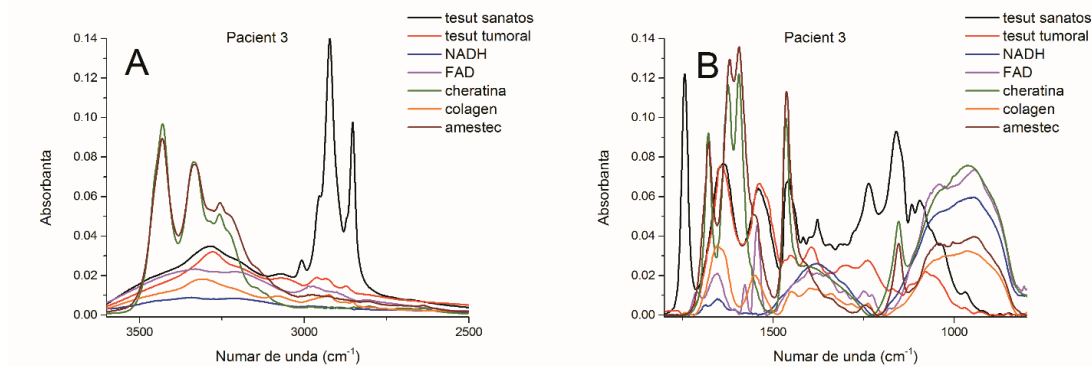


Figura 58. Spectrele FTIR-ATR pentru ale solutiilor pure (FAD, cheratina, NADH, collagen si amestec) si ale probelor de tesut sanatos pentru Pacientul nr. III

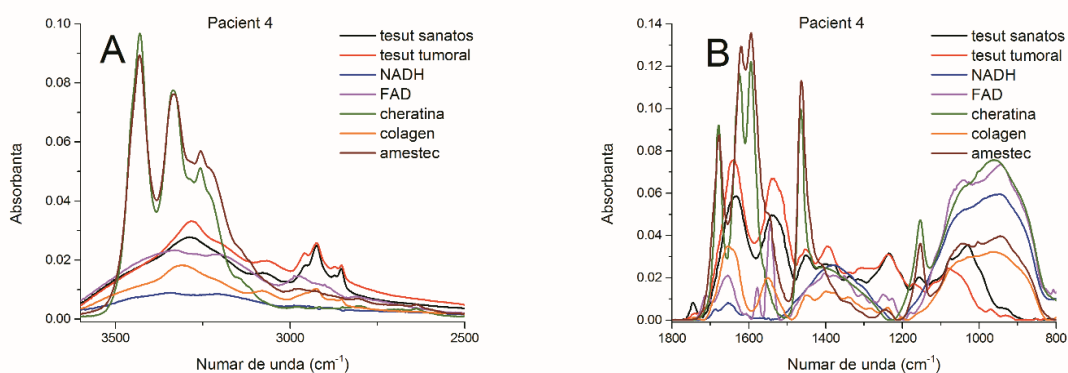


Figura 59. Spectrele FTIR-ATR pentru ale solutiilor pure (FAD, cheratina, NADH, collagen si amestec) si ale probelor de tesut sanatos pentru Pacientul IV

## 7.5. Concluzii

In cazul tesuturilor sanatoase, spectrele LIAF sunt influentate de prezenta fluoroflorilor FAD, cheratina si NADH.

In cazul tesuturilor tumorale, se poate observa ca spectrele lor LIAF sunt influentate in cea mai mare masura de prezenta **NADH**, maximele de fluorescanta a probelor de tesut tumoral sunt aceleasi ca si in cazul fluoroforului NADH insa la diferite concentratii in fiecare tesut.

In cazul spectrelor FTIR se poate observa o influenta minora a collagenului atat in probele de tesut sanatos cat si tumoral; cu alte cuvinte intre  $3700\text{ cm}^{-1}$  si  $2500\text{ cm}^{-1}$  spectrele FTIR pentru toate tesuturile urmeaza, in mare, comportarea collagenului si nu sunt influentate diferit de restul fluoroflorilor.

## 8 Studiul spectroscopic al substantelor anestezice folosite

### 8.1. Ipoteza/Obiective

Intrucat probele de tesuturi pe care s-au facut masuratori au fost recoltate de la pacienti cu anestezie generala, in acest capitol sunt prezentate caracteristicile spectrale ale anestezicilor utilizate, pentru a observa daca exista o interferenta a acestora in spectrele LIAF si FTIR masurate pe probele de tesuturi prelevate de la acestia. S-au avut in vedere in primul rand spectrele de absorbtie si FTIR ale Fentanyl (concentratie  $0.05\text{ mg/mL}$ ) si Tracrium (concentratie  $10\text{ mg/mL}$ ). Formulele chimice ale acestora sunt prezentate in Figura 60 si Figura 61, respectiv:

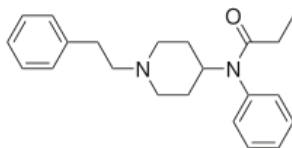


Figura 60. Structura chimica a Fentanyl (N-(1-(2-phenylethyl)-4-piperidinyl)-N-phenylpropanamide).

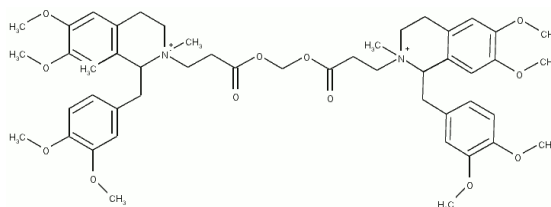


Figura 61. Structura chimica a Tracrium (5-[3-[1-[(3,4-dimetoxifenil)metil]-6,7-dimetoxi-2-metil-3,4-dihidro-1H-isochinolin-2-il] propanoiloxi] pentil 3-[1-[(3,4-dimetoxifenil)metil]-6,7-dimetoxi-2-metil-3,4-dihidro-1H-isochinolin-2-il] propanoate).

## 8.2. Material si metoda

Spectrele de absorbtie au fost inregistrate intre 200 și 1000 nm utilizand spectrofotometrul Perkin Elmer, model Lambda 950 (eroare standard de  $\pm 0.004\%$ .) pentru un drum optic de 1 mm. Spectrele de absorbtie in cazul solutiilor apoase (apa ultrapura) de Fentanyl (concentratie 0.025 mg/mL) si Tracrium (concentratie 1.25 mg/mL), sunt prezentate in Figura 62. S-au diluat solutiile in apa utrapura deoarece spectrul de absorbtie al probei de Fentanyl era saturat in domeniul 250-280 nm.

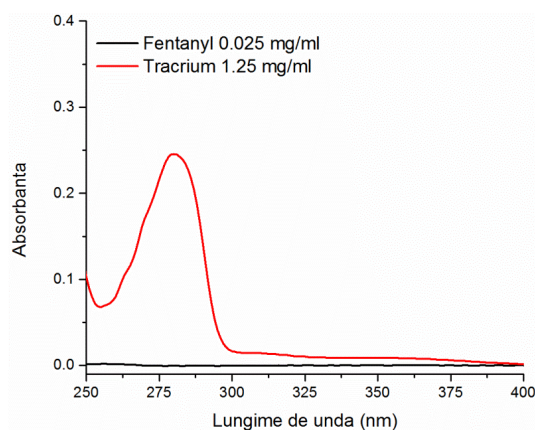


Figura 62. Spectrele de absorbtie pentru Fentalyn si Tracrium in domeniul 250-300 nm.

### 8.3. Rezultate. Discutii

Spectrul de absorbtie al solutiei de Tracrium este caracterizat de o singura banda de absorbtie la 280 nm, pe cand solutia de Fentanyl nu absoarbe in domeniul 250-1000 nm. In concluzie, ambele anestezice nu absorb la 375 nm si nu influenteaza masuratorile efectuate pe tesuturile sanatoase sau tumorale.

Spectrele IR au fost inregistrate, ca si in cazul probelor de tesut sanatos si tumoral, cu spectrometrul FT-IR Nicolet™ iS™50 – modul ATR (reflexie totala atenuata), in domeniul 3700 – 850  $\text{cm}^{-1}$  la o rezolutie de 4  $\text{cm}^{-1}$  si o mediere pe 16 de spectre. In Figura 63 sunt comparate spectrele FTIR ale solutiilor de Fentanyl (concentratie 0.05 mg/mL) si de Tracrium (concentratie 10mg/mL) cu cele ale tesuturilor sanatoase si tumorale in cazul Pacientului nr. II.

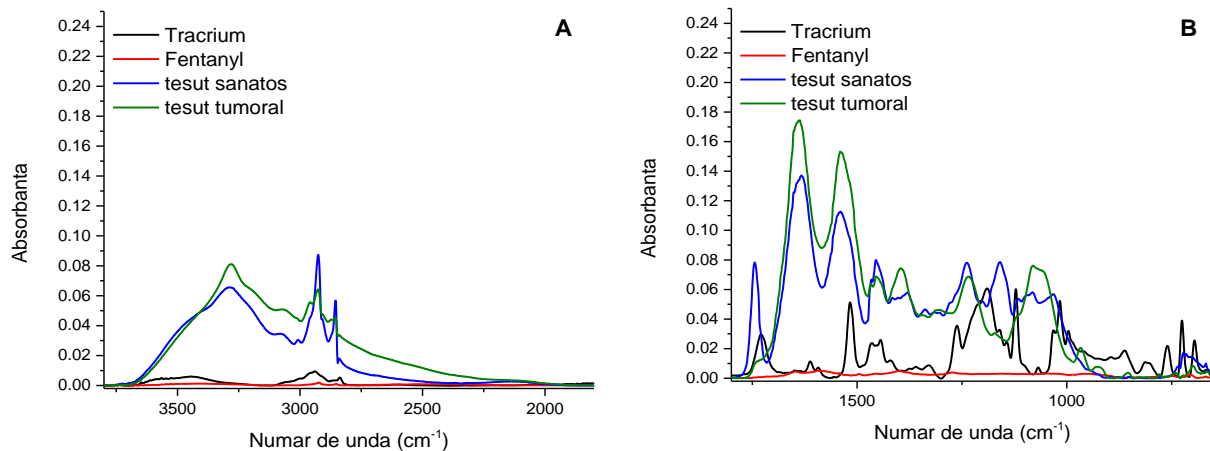


Figura 63. Comparatie intre spectrele FTIR ale solutiilor de Fentanyl (concentratie 0.05 mg/mL) si de Tracrium (concentratie 10mg/mL) si cele ale tesuturilor sanatoase si tumorale in cazul Pacientului nr. II.

### 8.4. Concluzii

Se poate observa ca benzile IR ale anestezicelor folosite nu corespund cu cele ale tesuturilor tumorale si sanatoase recoltate, astfel incat spectrele FTIR ale probelor investigate nu sunt influentate de anestezicele administrate in timpul operatiei.

Aceste rezultate sint oarecum in concordanta cu “bunul simt” medical, stiut fiind faptul ca anestezicele se adreseaza structurilor eminamente nervoase (sinapse, cai si centrii nervosi), unde realizeaza concentratii corespunzatoare.

## **9. Contributii personale si elemente de originalitate ale studiului**

**9.1.** Studiul se afla in **frontul actual al cercetarilor medicale**, oncogeneza reprezentind inca o carte cu multe pagini nescrise.

**9.2.** Studiul nostru reprezinta **o altfel de abordare a patologiei neoplazice a corzii vocale**, incercind ca prin folosirea metodelor (masuratorilor) **neinvazive fotofizice (cantitative)** sa obiectiveze modificarile histo-chimice (calitative) asociate cu tesutul canceros. Este cunoscut faptul ca modificarile histo-chimice din cancer le preced pe cele detectabile anatomo-patologic, iar prin identificarea acestora putem sa mutam depistarea intr-un stadiu precoce.

**9.3. Sistemul experimental** folosit pentru studiul parametrilor autofluorescentei induse laser este unul **original** si a constat in expunerea probelor tisulare la un fascicul laser pulsant emis de o dioda laser in domeniul picosecundelor (Alphalabs, type PicoPower LD-375-50) la o lungime de unda de 375 nm, cu o rata de repetitie a pulsurilor de 31MHz, largimea temporala a pulsului la semi-inaltime de 87 ps si o energie medie de 0,5 mW. Fascicul laser cu dimensiuni ale spotului de 1.6x1.8 mm (eliptic) este trimis catre proba intr-o geometrie de iradiere verticala cu trecere dubla utilizand o oglinda dielectrica (355 nm) la unghi de incidenta de 45° si o oglinda cu reflectanta totala. Spectrul semnalului LIAF este inregistrat utilizand un spectrograf (Princeton Instruments, type Acton SpectraPro 2750) cu o rezolutie optica de 0,8 nm, iar in cazul inregistrarii timpului de viata al semnalului LIAF este utilizat un fotodetector cu amplificare (Hamamatsu, type H6780-20) caracterizat de un timp de raspuns de 0,78 ns al carui semnal de iesire este trimis catre un osciloscop digital (Tektronix, type DPO7254). Semnalul achizitionat de catre spectrograf si fotodetector este sincronizat cu pulsurile laser prin intermediul semnalului de sincronizare tip TTL emis de sursa de alimentare si control a diodei laser. In cazul spectrografului, pentru operarea la frecventa de 31 MHz s-a utilizat optiunea pentru pulsuri rapide (frecvente mai mari de 1 MHz) integrata in programul de control al acestuia.

**9.4. Lucrul in echipa cu fizicienii** a permis ca toate masuratorile sa fie facute in conditii optime si riguros stiintifice. Am beneficiat de colaborarea cu o echipa cu experienta, formata din cercetatorii Laboratorului de Spectroscopie Laser din cadrul Institutului National de Fizica Laserilor, Plasmei si Radiatiei. Acestia au participat atat la efectuarea masuratorilor optice, cit si la interpretarea rezultatelor obtinute.

**9.5.** Studiul s-a efectuat pe **piese proprii**, obtinute de la pacienti laringectomizati, imediat postoperator. Pacientii sint barbati, cu virste intre 57 si 68 de ani, nefumatori, fara alte antecedente personale semnificative. Prin analiza statistica am aratat ca intre lotul pacientilor asupra carora s-au efectuat masuratorile optice si lotul celorlalti pacienti laringectomizati in perioada 2011-2016 in Clinica ORL a SUUMC nu exista diferente semnificative statistic. S-au recoltat probe pereche si in duplicat, atat de la coarda vocala carcinomatoasa cit si de la cea normala (dublu obiectivate anatomopatologic), care s-au conservat si manipulat in conditii optime (asemanator transplantului de organ). Am incercat astfel sa creem ca o prima etapa un model de cercetare pe laringele ex vivo imediat, urmind ca intr-o etapa ulterioara sa il extrapolam comparativ la corzile vocale in vivo pentru cancerle unicordale.

**9.6. Rezultatele obtinute** ofera un punct de plecare in stabilirea de parametri reproductibili ai sistemelor de masura si a marimilor care trebuie masurate pentru a putea diferentia tesutul sanatos de cel malign. Au fost astfel identificati:

- in studiul autofluorescentei induse laser: pentru tesutul canceros: scaderea fata de tesutul normal a valorilor: intensitatii maxime a LIAF, ariei LIAF, lungimii de unda a maximului intensitatii;
- in studiul spectroscopiei in infrarosu cu transformata Fourier: pentru tesutul canceros: lipsa benzilor de absorbtie IR la  $2929\text{ cm}^{-1}$ , la  $1745\text{ cm}^{-1}$  si la  $1160\text{ cm}^{-1}$  si  $1120\text{ cm}^{-1}$ , comparativ cu rezultatele obtinute pentru tesutul sanatos.

S-a mai observat ca masurate in acelasi punct, valorile parametrilor LIAF scad usor pe masura ce iradierea se repeta.

O alta serie de rezultate observate prin comparatie cu solutii pure de fluorofori (colagen, cheratina, FAD, NADH) arata ca:

- spectrele LIAF in cazul tesutului sanatos sint influentate de prezenta FAD, cheratina si NADH, in timp ce pentru tesutul canceros doar de prezenta NADH;
- spectrele FTIR urmeaza pentru toate tesuturile comportarea colagenului.

**9.7.** Desi studiul a fost realizat pe piese ex vivo, rezultatele sint incurajatoare. Ele pot si vor trebui sa fie realizate si **in vivo**, eventual corelate si completate cu evaluari imuno-histochimice (pe proba bioptica) si pe un numar mare de cazuri. Dincolo de aceste limite inerente la crearea unui model experimental, am identificat o serie rezultate concrete ale masuratorilor efectuate.

## 10. Concluzii

Lucrarea si-a propus sa studieze proprietatile fizice ale corzilor vocale, aplicind un protocol original, folosind masuratori optice bazate pe interactia dintre radiatia laser si tesuturi. Ideea se inscrie in frontul cercetarilor actuale legate de oncogeneza, incercind sa obiectiveze prin metode fotofizice (cantitative) modificarile histochemice (calitative) asociate transformarii maligne. Au fost luate in studiu si comparate doua stari particulare in care poate fi surprinsa coarda vocala: tesutul sanatos, respectiv tesutul care a suferit o transformare carcinomatoasa.

In acest scop s-au realizat probe pereche (sanatos/malign), in duplicat, de la patru pacienti laringectomizati, care dupa ce au fost reconfirmate histopatologic au fost pastrate si manipulate in conditii optime. Selectia acestor pacienti s-a facut dupa criteriile de includere/excludere riguros respectate, dintre care amintim: barbati nefumatori, fara alt cancer in antecedentele personale patologice, care nu au efectuat preoperator polichimioterapie sau radioterapie, care nu au suferit o alta interventie asupra laringelui (nici nu erau traheostomizati), cu diagnostic de carcinom epidermoid spinocelular bine diferentiat, stadiul T3 glotic cu fixarea unei singure corzi vocale, cea contralaterala fiind indemna, stadiul N: N0, stadiul M: M0. Au fost exclusi pacientii care suferisera o laringectomie totala extinsa si cei la care postoperator s-au constatat modificari macroscopice ale corzii vocale sanatoase.

Conditiiile de prezervare-transport au fost cele aplicate in transplantul de organ, facind ca probele analizate sa fie mai aproape de statusul "in vivo" decit de cel "ex vivo".

Asupra acestora s-au facut o serie de masuratori spectrofotometrice pentru a determina parametri cit mai specifici uneia sau alteia dintre conditiile histologice date. Aceste tehnici apartin domeniului optic al autofluorescentei induse laser (LIAF), respectiv spectroscopiei in infrarosu cu transformata Fourier (FTIR). Prezentam in continuare concluziile acestor masuratori:

**I.** Pentru studiul LIAF s-a folosit un dispozitiv original, bazat pe un fascicul laser pulsant emis de o dioda laser in domeniul picosecundelor (Alphals, type PicoPower LD-375-50) la o lungime de unda de 375 nm, cu o rata de repetitie a pulsurilor de 31MHz, largimea temporală a pulsului la semi-inaltime de 87 ps si o energie medie de 0,5 mW. Fascicul laser cu dimensiuni ale spotului de 1.6x1.8 mm (eliptic) este trimis catre proba intr-o geometrie de iradiere verticala cu trecere dubla utilizand o oglinda dicroica (355 nm) la unghi de incidenta de 45° si o oglinda cu reflectanta totala. Pentru fiecare proba de tesut au fost facute masuratori in 14-16 puncte,

obtinandu-se rezultate concordante, fiecare in parte, iar impreuna putind oferi intr-un grad destul de inalt valori ce ar putea duce la diferentierea sanatos/malign. Astfel:

a. Intensitatea maximului spectrului LIAF, in marea majoritate a cazurilor este **mai mica** pentru tesutul tumoral fata de tesutul sanatos;

b. Aria intensitatii LIAF este **mai mica** pentru tesutul tumoral fata de cel sanatos in toate cele 4 cazuri;

c. Lungimea de unda a maximului intensitatii este **mai mica** pentru tesutul tumoral decit pentru cel sanatos in toate cele 4 cazuri cercetate;

d. Largimea benzii la semiinaltime (FWHM) este un parametru care este **mai mare** la tesutul tumoral fata de cel sanatos in 3 din cele 4 cazuri analizate;

e. Raportul I/FWHM este **mai mic** pentru tesutul tumoral decit pentru cel sanatos in 3 din cele 4 cazuri;

f. Valorile medii ale timpului de viata al LIAF sunt **mai mari** in cazul tesuturilor tumorale in 3 din cele 4 cazuri.

Stabilirea de parametri reproductibili ai sistemelor de masura si a marimilor care trebuie masurate pentru spectrele LIAF permite aplicarea acestei metode neinvazive in chirurgia corzii vocale pentru stabilirea limitei de siguranta oncologica. In acelasi timp poate insemna un pas inainte in detectia timpurie a unei neoplazii sau in urmarirea postoperatorie.

**II.** In ceea ce priveste spectroscopia FTIR, rezultatele obtinute ne permit sa afirmam urmatoarele:

a. Modificarile produse in spectrele FTIR ale tesuturilor tumorale indica **lipsa** benzilor de absorbtie IR la  $2929\text{ cm}^{-1}$ , la  $1745\text{ cm}^{-1}$  si la  $1160\text{ cm}^{-1}$  si  $1120\text{ cm}^{-1}$ , comparativ cu rezultatele obtinute pentru tesutul sanatos.

b. In cazul tesutului tumoral, pentru toate spectrele IR s-au observat modificari ale intensitatii absorbantei benzilor amidelor I si II, ceea ce reflecta modificari structurale ale proteinelor, cat si interactii intramoleculare si intermoleculare ale acestora cu alte molecule.

Aceste rezultate ne permit sa afirmam ca si spectroscopia FTIR poate constitui o metoda alternativa celor deja folosite in diferentierea celor doua tipuri tisulare (sanatos/malign).

**III.** Inercind sa facem o legatura intre compozitia chimica si proprietatile optice ale respectivelor probe, am studiat parametrii solutiilor pure ale fluoroforilor intilniti mai frecvent la acest nivel, obtinind urmatoarele rezultate:

a. In cazul tesuturilor sanatoase, spectrele LIAF sunt influentate de prezenta fluoroflorilor FAD, cheratina si NADH. In cazul tesuturilor tumorale, se poate observa ca spectrele lor LIAF sunt influentate in cea mai mare masura de prezenta NADH, maximele de fluorescanta a probelor de tesut tumoral fiind aceleasi ca in cazul fluoroforului NADH insa la diferite concentratii in fiecare tesut.

b. In cazul spectrelor FTIR se poate observa o influenta minora a colagenului atat in probe de tesut sanatos cat si tumoral; cu alte cuvinte intre  $3700\text{ cm}^{-1}$  si  $2500\text{ cm}^{-1}$  spectrele FTIR pentru toate tesuturile urmeaza, in mare, comportarea colagenului si nu sunt influentate diferit de restul fluoroflorilor. Acest lucru este in concordanta cu proprietatile anatomo-chimice cunoscute, stiut fiind faptul ca neoplasmul laringian este in 95% epitelial.

**IV.** O alta directie a studiului se refera la influenta substantelor anestezice administrate asupra proprietatilor optice cercetate. Rezultatele acestor masuratori dovedesc ca benzile IR ale anestezicelor folosite nu corespund cu cele ale tesuturilor tumorale si sanatoase, neschimbând deci parametrii studiati.

**In final, putem afirma ca masuratorile fotofizice efectuate ne-au permis obtinerea de rezultate concrete, concordante, ce fac din aceste metode fizico-chimice instrumente utile in diferentierea tesutului carcinomatos de cel sanatos. Ele ar putea fi aplicate in scop diagnostic in timp real al cancerului laringian, cit si in urmarirea postoperatorie, incercind sa echilibreze balanta in “competitia” cu biopsia si examenul histopatologic (care reprezinta inca “golden standard”), alaturi de celelalte metode optice neinvazive deja aplicate in practica ORL (videoendoscopia de contact, narrow-band imaging, autofluorescenta endoscopica).**

**Studiul reprezinta un punct de plecare in incercarea de a realiza o schimbare a opticii clinicianului in raport cu folosirea unor metode fizice bazate pe radiatia laser, neinvazive, de evaluare a morfologiei tesutului canceros “in vivo”. Vom continua cercetarea bazindu-ne pe colaborarea foarte buna in acest colectiv (medici si fizicieni), iar odata validate, aceste metode pot constitui un instrument viabil diagnostic, intraoperator si postoperator in evaluarea cancerului laringian.**

## REFERINTE

- [1] Fechner RE, Mills SE (1997) Larynx and pharynx. In: Sternberg SS (ed) *Histology for pathologists*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp 391–403
- [2] Soulié A, Bardier F. Recherches sur le développement du larynx chez l'homme. *J Anat Physiol* 1907;43: 137–240
- [3] Hirano M, Sato K (1993) *Histological color atlas of the human larynx*. Singular, San Diego, pp 1–112
- [4] *Netter's clinical anatomy* / [edited by] John T. Hansen ; illustrations by Frank H. Netter ; contributing illustrators, Carlos A.G. Machado, John A. Craig, James A. Perkins.—2nd ed., by Saunders, an imprint of Elsevier Inc., 2010, pag. 427
- [5] Maue WM, Dickinson DR. Cartilages and ligaments of the adult larynx. *Arch Otolaryngol* 1971;94:432–9.
- [6] Hollinshead WH. *Anatomy for Surgeons. Vol 1: the head and neck*. 3rd ed. Philadelphia: JB Lippincott; 1982
- [7] Hast MH. *Anatomy of the larynx*. In: English GM, editor. *Otolaryngology. Vol 3*. Philadelphia: JB Lippincott; 1993.
- [8] Sasaki CT, Driscoll BP, Gracco C. *Anatomy and physiology of the larynx*. In: Ballenger JJ, Snow JB, editors. *Otorhinolaryngology head and neck surgery*. 15th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1996
- [9] Kirchner JA. What have whole organ sections contributed to the treatment of laryngeal cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1989;98:661–6
- [10] Han Y, Wang J, Fischman DA, et al. Slow tonic muscle fibers in the thyroarytenoid muscles of human vocal folds: a possible specialization for speech. *Anat Rec* 1999;256:146–57
- [11] Sanders I. *The microanatomy of the vocal folds*. In: Rubin JS, Sataloff RT, Korovin GS, Gould WJ, editors. *Diagnosis and treatment of voice disorders*. New York: Igaku-Shoin; 1995
- [12] Bogdan, Constantin I., *Foniatrică clinică, vol. I*, Editura Viata Medicală Românească, București, 2001, pag. 68
- [13] Hirano M. *Phonosurgical anatomy of the larynx*. In: Ford CN, Bless DM, editors. *Phonosurgery: assessment and surgical management of voice disorders*. New York: Raven Press; 1991
- [14] *Ballenger's Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Sixteenth Edition*, 2003, BC Decker Inc, pag. 1091
- [15] Boring CC, Squires TS, Tong T, Montgomery S (1994) *Cancer statistics, 1994*. *CA Cancer J Clin* 44:7–26
- [16] Pompe-Kirn V (2002) *Epidemiological features of laryngeal cancer in Slovenia*. *Zdrav Vestn* 71:59–63
- [17] Cattaruzza MS, Maisonneuve P, Boyle P (1996) *Epidemiology of laryngeal cancer*. *Oral Oncol Eur J Cancer* 32B:293–305
- [18] Rafferty MA, Fenton JE, Jones AS (2001) *The history, aetiology and epidemiology of laryngeal carcinoma*. *Clin Otolaryngol* 26:442–446
- [19] Muir C, Weiland L (1995) *Upper aerodigestive tract cancers*. *Cancer* 75:147–153
- [20] Maier H, Dietz A, Gewelke U, Heller WD, Weidauer H (1992) *Tobacco and alcohol and the risk of head and neck cancer*. *Clin Invest* 70:320–327
- [21] Maier H, Tisch M (1997) *Epidemiology of laryngeal cancer: results of the Heidelberg case-control study*. *Acta Otolaryngol Suppl* 527:160–164
- [22] Muscat JE, Wynder EL (1992) *Tobacco, alcohol, asbestos, and occupational risk factors for laryngeal cancer*. *Cancer* 69:2244–2251
- [23] Tuyns AJ, Estève J, Raymond L, Berrino F, Benhamou E, Blanchet F, Boffetta P, Crosignani P, del Moral A, Lehmann W, Merletti F, Péquignot G, Riboli E, Sancho-Garnier H, Terracini B, Zubiri A, Zubiri L (1988) *Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France)*. *Int J Cancer* 41:483–491
- [24] Zatonski W, Becher H, Lissowska J, Wahrendorf J (1991) *Tobacco, alcohol, and diet in the etiology of laryngeal cancer: a population-based case-control study*. *Cancer Causes Control* 2:3–10
- [25] Esteve J, Riboli E, Pequignot G, Terracini B, Merletti F, Crosignani P, Ascunce N, Zubiri L, Blanchet F, Raymond L, Repetto F, Tuyns AJ (1996) *Diet and cancers of the larynx and hypopharynx: the IARC multi-center study in southwestern Europe*. *Cancer Causes Control* 7:240–252
- [26] Franceschi S (2003) *Fibre intake and laryngeal cancer risk*. *Ann Oncol* 14:162–167
- [27] La Vecchia C, Negri E, D'Avanzo B, Franceschi S, Decarli A, Boyle P (1990) *Dietary indicators of laryngeal cancer risk*. *Cancer Res* 50:4497–4500
- [28] Oreggia F, De Stefani E, Boffetta P, Brennan P, Deneo-Pellegrini H, Ronco AL (2001) *Meat, fat and risk of laryngeal cancer: a case-control study in Uruguay*. *Oral Oncol* 37:141–145
- [29] Boyle P, Macfarlane GJ, Zheng T, Maisonneuve P, Evstifeeva T, Scully C (1992). *Recent advances in epidemiology of head and neck cancer*. *Curr Opin Oncol* 4: 471-477

- [30] Kambic V, Radsel Z, Gale N (1989). Alterations in the laryngeal mucosa after exposure to asbestos. *Br J Ind Med* 46: 717-723
- [31] Maier H, Tisch M (1997). Epidemiology of laryngeal cancer: results of the Heidelberg case-control study. *Acta Otolaryngol Suppl* 527: 160-164
- [32] World Cancer Research Fund (WCRF) (1997). Lung. In: Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective (Part II, Cancers, nutrition and food), Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective (Part II, Cancers, nutrition and food), American Institute for Cancer research: Washington, D.C. pp 130-147
- [33] Lindeberg H, Kroghdahl A (1999) Laryngeal cancer and human papillomavirus: HPV is absent in the majority of laryngeal carcinomas. *Cancer Lett* 146:9-13
- [34] Gallo O, Bianchi S, Giannini A, Boccuzzi S, Calzolari A, Fini-Storchi O (1994) Lack of detection of human papillomavirus in transformed larynx keratoses by in situ hybridization (ISH) technique. *Acta Otolaryngol* 114:213-217
- [35] Lie ES, Karlsen F, Holm R (1996) Presence of human papillomavirus in squamous cell laryngeal carcinomas. A study of thirty-nine cases using polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Acta Otolaryngol* 116:900-905
- [36] Michaels L, Hellquist H (2001). *Ear, Nose and Throat Histopathology*. 2nd ed. Springer Verlag: Berlin
- [37] *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*, Edited by Leon Barnes, John W. Eveson, Peter Reichart, David Sidransky, IARC Press, Lyon, 2005, pag. 119
- [38] Ghadially FN (1985). *Diagnostic Electron Microscopy of Tumours*. 2nd ed. Butterworths: London
- [39] Mallofre C, Cardesa A, Campo E, Condom E, Palacin A, Garin-Chesa P, Traserria J (1993). Expression of cytokeratins in squamous cell carcinomas of the larynx: immunohistochemical analysis and correlation with prognostic factors. *Pathol Res Pract* 189: 275-282
- [40] van der Velden LA, Schaafsma HE, Manni JJ, Ruiters DJ, Ramaekers CS, Kuijpers W (1997). Cytokeratin and vimentin expression in normal epithelium and squamous cell carcinomas of the larynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 254: 376-383
- [41] *Pathology of the Head and Neck*, Antonio Cardesa · Pieter J. Slootweg, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2006, pag. 15
- [42] Zidar N, Gale N, Kambic V, Fischinger J (2001). Expression of tenascin and fibronectin in benign epithelial hyperplastic lesions and squamous carcinoma of the larynx. *Anticancer Res* 21: 451-454
- [43] Cazorla M, Hernandez L, Nadal A, Balbin M, Lopez JM, Vizoso F, Fernandez PL, Iwata K, Cardesa A, Lopez-Otin C, Campo E (1998) Collagenase-3 expression is associated with advanced local invasion in human squamous cell carcinomas of the larynx. *J Pathol* 186:144-150
- [44] Batsakis JG, Suarez P (2000) Sarcomatoid carcinomas of the upper aerodigestive tract. *Adv Anat Pathol* 7:282-293
- [45] Meijer JW, Ramaekers FC, Manni JJ, Slooff JJ, Aldeweireldt J, Vooy's GP (1988) Intermediate filament proteins in spindle cell carcinoma of the larynx and tongue. *Acta Otolaryngol* 106:306-313
- [46] Zarbo RJ, Crissman JD, Venkat H, Weiss MA (1986) Spindle-cell carcinoma of the upper aerodigestive tract mucosa. An immunohistochemical and ultrastructural study of 18 biphasic tumors and comparison with seven monophasic spindle-cell tumors. *Am J Surg Pathol* 10:741-753
- [47] Ackerman LV (1948) Verrucous carcinoma of the oral cavity. *Surgery* 23:670-678
- [48] Brandsma JL, Steinberg BM, Abramson AL, Winkler B (1986) Presence of human papillomavirus type 16 related sequences in verrucous carcinoma of the larynx. *Cancer Res* 46:2185-2188
- [49] Bryan RL, Bevan IS, Crocker J, Young LS (1990) Detection of HPV 6 and 11 in tumors of the upper respiratory tract using the polymerase chain reaction. *Clin Otolaryngol* 15:177-180
- [50] Fliss DM, Noble-Topham SE, McLachlin CM, Freeman JL, Noyek AM, van Nostrand AWP, Hartwick WJ (1994) Laryngeal verrucous carcinoma: a clinicopathologic study and detection of human papillomavirus using polymerase chain reaction. *Laryngoscope* 104:146-152
- [51] Kasperbauer JL, O'Halloran GL, Espy MJ, Smith TF, Lewis JE (1993) Polymerase chain reaction (PCR) identification of human papillomavirus (HPV) DNA in verrucous carcinoma of the larynx. *Laryngoscope* 103:416-420
- [52] Ferlito A, Recher G (1980) Ackerman's tumor (verrucous carcinoma) of the larynx: a clinicopathologic study of 77 cases. *Cancer* 46:1617-1630
- [53] Koch BB, Trask DK, Hoffmann HT, Karnell LH, Robinson RA, Zhen W, Menck HR (2001) National survey of head and neck verrucous carcinoma: pattern of presentation, care, and outcome. *Cancer* 92:110-120
- [54] Wain SL, Kier R, Volmer RT, Bossen EH (1986) Basaloid squamous carcinoma of the tongue, hypopharynx, and larynx. Report of 10 cases. *Hum Pathol* 17:1158-1166

- [55] Klijanienko J, El-Naggar A, Ponzio-Prion A, Marandas P, Micheau C, Caillaud JM (1993) Basaloid squamous carcinoma of the head and neck. Immunohistochemical comparison with adenoid cystic carcinoma and squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 119:887–890
- [56] Raslan WF, Barnes L, Krause JR, Contis L, Killeen R, Kapadia SB (1994) Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck: a clinicopathologic and flow cytometric study of 10 new cases with review of the English literature. *Am J Otolaryngol* 15:204–211
- [57] Barnes L, Ferlito A, Altavilla G, MacMillan C, Rinaldo A, Doglioni C (1996) Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck: clinicopathologic features and differential diagnosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 105:75–82
- [58] Banks ER, Frierson HF, Mills SE, George E, Zarbo RJ, Swanson PE (1992) Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck. *Am J Surg Pathol* 16:939–946
- [59] Gerughty RM, Hennigar GR, Brown FM (1968) Adenosquamous carcinoma of the nasal, oral and laryngeal cavities: a clinicopathologic survey of ten cases. *Cancer* 22:1140–1155
- [60] Alos L, Castillo M, Nadal A, Caballero M, Mallofre C, Palacin A, Cardesa A (2004) Adenosquamous carcinoma of the head and neck: criteria for diagnosis in a study of 12 cases. *Histopathology* 44:1–10
- [61] Keelawat S, Liu CZ, Roehm PC, Barnes L (2002) Adenosquamous carcinoma of the upper aerodigestive tract: a clinicopathologic study of 12 cases and review of the literature. *Am J Otolaryngol* 23:160–168
- [62] Napier SS, Gormley JS, Newlands C, Ramsay-Baggs P (1995) Adenosquamous carcinoma. A rare neoplasm with an aggressive course. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 79:607–611
- [63] Fujino K, Ito J, Kanaji M, Shiomi Y, Saiga T (1995) Adenosquamous carcinoma of the larynx. *Am J Otolaryngol* 16:115–118
- [64] Lewis JE, Olsen KD, Inwards CY (1997) Cartilaginous tumors of the larynx: clinicopathologic review of 47 cases. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 106:94–100
- [65] Thompson LDR, Gannon FH (2002) Chondrosarcoma of the larynx. A clinicopathologic study of 111 cases with review of the literature. *Am J Surg Pathol* 26:836–851
- [66] Evans HL, Ayala AG, Romsdahl MM (1977) Prognostic factors in chondrosarcoma of bone: a clinicopathologic analysis with emphasis on histologic grading. *Cancer* 40:818–831
- [67] Brandwein M, Moore S, Som P, Biller H (1992) Laryngeal chondrosarcomas: a clinicopathologic study of 11 cases including 2 chondrosarcomas with additional malignant mesenchymal component. *Laryngoscope* 8:858–867
- [68] Nakayama M, Brandenburg JH, Hafez GR (1993) Dedifferentiated chondrosarcoma of the larynx with regional and distant metastases. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 102:785–791
- [69] Gonzales-Lois C, Ibarrola C, Ballestin C, Martanez-Tello FJ (2002) Dedifferentiated liposarcoma of the pyriform sinus: report of a case and review of the literature. *Int J Surg Pathol* 10:75–79
- [70] Madrigal FM, Godoy LM, Daboin KP, Casiraghi O, Garcia AM, Lu MA (2002) Laryngeal osteosarcoma: a clinicopathologic analysis of four cases and comparison with a carcinosarcoma. *Ann Diagn Pathol* 6:1–9
- [71] Loos BM, Wieneke JA, Thompson LDR (2001) Laryngeal angiosarcoma: clinicopathologic study of five cases with a review of the literature. *Laryngoscope* 111:1197–1202
- [72] Guney E, Yigitbasi OG, Balkanli S, Canoz OM (2002) Postirradiation malignant fibrous histiocytoma of the larynx: a case report. *Am J Otolaryngol* 23:293–296
- [73] Lan MY, Guo YC, Chu PY, Ho DM, Chang SY (2001) Pathology quiz case 2: leiomyosarcoma of the larynx. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127:1503–1505
- [74] Mochloulis G, Irving RM, Grant HR, Miller RF (1996) Laryngeal Kaposi's sarcoma in patients with AIDS. *J Laryngol Otol* 110:1034–1037
- [75] Ansell S, Habermann TM, Hoyer JD, Strickler JG, Chen MG, McDonald TJ (1997) Primary laryngeal lymphoma. *Laryngoscope* 107:1502–1506
- [76] World Health Organization Classification of Tumours (2005) Pathology and genetics of tumours of the head and neck. IARC, Lyon
- [77] Kutta H, Steven P, Tillmann BN, Tsokos M, Paulsen FP (2003) Region-specific immunological response of the different laryngeal compartments: significance of larynx-associated lymphoid tissue. *Cell Tissue Res* 311:365–371
- [78] Kamijo T, Inagi K, Nakajima M, Motoori T, Tadokoro K, Nishiyama S (2002) A case of extramedullary plasmacytoma of the larynx. *Acta Otolaryngol Suppl* 547:104–107
- [79] Nowak-Sadzikowska J, Weiss M (1998) Extramedullary plasmacytoma of the larynx. Analysis of 5 cases. *Eur J Cancer* 34:1468

- [80] Amin HM, Petruzzelli GJ, Husain AN, Nickoloff BJ (2001) Primary malignant melanoma of the larynx. Arch Pathol Lab Med 125:271–273
- [81] Karagiannidis K, Noussios G, Sakellariou T (1998) Primary laryngeal melanoma. J Otolaryngol 27:104–106
- [82] Wenig BM (1995) Laryngeal mucosal malignant melanoma. A clinicopathologic, immunohistochemical, and ultrastructural study of four patients and review of the literature. Cancer 75:1568–1577
- [83] Batsakis JG, Luna MA, Byers RM (1985) Metastases to the larynx. Head Neck Surg 7:458–460
- [84] Dee SL, Eshghi M, Otto CS (2000) Laryngeal metastasis 7 years after radical nephrectomy. Arch Pathol Lab Med 124:1833–1834
- [85] Nicolai P, Puxeddu R, Cappiello J, Peretti G, Battochio S, Facchetti F, Antonelli AR (1996) Metastatic neoplasms to the larynx: report of three cases. Laryngoscope 106:851–855
- [86] Glanz H, Kleinsasser O (1978) Metastasen im Kehlkopf. HNO 26:163–167
- [87] Cooper R.L., Lindsey A.J. & Waller R.E. The presence of 3,4-benzopyrene in cigarette smoke (1954)
- [88] Molecular and cellular alteration in tobacco smoke-associated larynx cancer, K.Szyfter, Z.Szmeja, W.Szyfter, K.Hemminki, J.Banaszewski, R. Jaskula-Szut, J.Louhelainen, Mutation Research 445 (1999) 259-274
- [89] Pfeifer, G.P., Tobacco smoke carcinogen, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers (2002), 7435-7451
- [90] K.Anwar, K.Nakakuki, H.Imai, M.Inuzuka, Overexpression of p53 protein in human laryngeal carcinoma, Int.J.Cancer 53 (1993) 952-956
- [91] M.Degawa, S.J.Stern, M.V.Martin, F.P.Guengerich, P.F.Fu, K.F.Illlet, R.K.Kaderlik, F.F.Kadlubar, Metabolic activation and carcinogen DNA adduct detection in human larynx, Cancer Res. 54 (1994) 4915-4919
- [92] K.Szyfter, K.Hemminki, W.Szyfter, Z.Szmeja, J.Banaszewski, M.Pabiszezak, Tobacco smoke-associated N-alkylguanine in DNA of larynx tissue and leucocytes, Carcinogenesis 17 (1996) 501-506
- [93] Rumboldt Z, Gordon L, Ackermann R (2006) Imaging in head and neck cancer. Curr Treat Options Oncol 7:23–34
- [94] Hoorweg JJ, Kruijt RH, Heijboer RJ, Eijkemans MJ, Kerrebijn JD (2006) Reliability of interpretation of CT examination of the larynx in patients with glottic carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 135:129–134
- [95] Ruffing S, Struffert T, Reith AGW (2005) Imaging diagnostics of the pharynx and larynx. Radiologe 45:828–836
- [96] Hasso AN, Tang T (1994) Magnetic resonance imaging of the pharynx and larynx. Top Magn Reson Imaging 6:224–240
- [97] Irving J. Bigio, Judith R. Mourant, “Optical Biopsy” in Encyclopedia of Optical Engineering, 2003, M.Dekker.Inc., New York
- [98] Van Dam J. Novel methods of enhanced endoscopic imaging. Gut. 2003;52(suppl):S12–S16.
- [99] Ell C. Improving endoscopic resolution and sampling: fluorescence techniques. Gut. 2003; 52(suppl):S30–S33
- [100] Dacosta RS, Wilson BC, Marcon NE. New optical technologies for earlier endoscopic diagnosis of premalignant gastrointestinal lesions. J Gastroenterol Hepatol. 2002 ; 17 (suppl): S85–S104
- [101] Cheong W.F., Prah S.A., Welch A.J. (1990), A review of the optical properties of biological tissues, IEEE J. Quant. Electr. QE 26, 2166 2185
- [102] Andrea M, Dias O, Santos A. Contact endoscopy during microlaryngeal surgery: a new technique for endoscopic examination of the larynx. Ann Otol Rhinol Laryngol 1995;104:333–339
- [103] Carriero E, Galli J, Fadda G, Di Girolamo S, Ottaviani F, Paludetti G. Preliminary experiences with contact endoscopy of the larynx. Eur Arch Otorhinolaryngol 2000; 257:68–71
- [104] V. Zainea, R. Hainarosie, N. Popescu, V. Postelnicu, Anca Iliescu, Anca Ioan, Isabela Postolache, C. Ionita, M. Tusaliu, Cristina Stoica, Madalina Criveanu, Roberta Udrescu, M. Lupascu - Video-contact endoscopy: study of the vascular design in chronic laryngitis - therapeutical significance, European Archives of Oto-Rhino-Laryngology Volume 266, Number 4, April 2009, ISI – IF 1.608. 7th Congress of the ELS, Barcelona 2008
- [105] Jovanovic MB, Milutinovic Z, Perovic J, Grubor A, Milenkovic S, Malobabic S. Vocal fold mucosa “blue lines” observed on contact telescopic at Reinke’s edema. J Voice 2009;23:512–515
- [106] Jovanovic MB, Mulutinovic Z, Perovic J, Grubor A, Milenkovic S, Malobabic S. Contact telescopic reveals blood vessel alterations of vocal fold mucosa in Reinke’s edema. J Voice 2007;21:355–360
- [107] M. Andrea, O. Dias, and A. Santos, “Contact endoscopy of the vocal cord: normal and pathological patterns,” Acta OtoLaryngologica, vol. 115, no. 2, pp. 314–316, 1995
- [108] V. Zainea, R. Calarasu, R. Hainarosie, N. Popescu, Anca Iliescu - Videocontact endoscopy associated with microsurgical “cold” techniques and CO2 Laser techniques in surgery of glottic plan, European Archives of Oto-

- Rhino-Laryngology Volume 264, Supplement 1, June 2007, ISI – IF 1.608. 6th European Congress of Oto-Rhino-Laryngology Head and Neck Surgery, June 30th-July 4th, 2007, Vienna/Austria, Hofburg Congress Center
- [109] Policard A. Etude sur les aspects offerts par des tumeurs expérimentales examinées à la lumière de Wood. *Comptes Rendues Hebdomadaires des Séances Mémoires la Société Biologie ses Filiales*, 1924;91:1423-4
- [110] Alfano R, Tata D, Cordero J. Laser induced fluorescence spectroscopy for native cancerous and normal tissue. *IEEE J Quant Electron* 1984;20:1507-11
- [111] Harries ML, Lam S, MacAulay C, Qu J, Palcic B. Diagnostic imaging of the larynx: autofluorescence of laryngeal tumours using the helium-cadmium laser. *J Laringolog Otol* 1995;109:108-110
- [112] Malzahn K, Dreyer T, Glanz H, Arens C. Autofluorescence endoscopy in the diagnosis of early laryngeal cancer and its precursor lesions. *Laryngoscope* 2002;112:488–493
- [113] Arens C, Dreyer T, Glanz H, Malzahn K. Indirect autofluorescence laryngoscopy in the diagnosis of laryngeal cancer and its precursor lesions. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2004;261:71–76.
- [114] Mostafa BE, Shafik AG, Fawaz S. The role of flexible autofluorescence laryngoscopy in the diagnosis of malignant lesions of the larynx. *Acta Otolaryngol* 2007;127:175–179
- [115] Malzahn K, Dreyer T, Glanz H, Arens C. Autofluorescence endoscopy in the diagnosis of early laryngeal cancer and its precursor lesions. *Laryngoscope* 2002;112:488–493
- [116] Mostafa BE, Shafik AG, Fawaz S. The role of flexible autofluorescence laryngoscopy in the diagnosis of malignant lesions of the larynx. *Acta Otolaryngol* 2007;127:175–179
- [117] Zargi M, Fajdiga I, Smid L. Autofluorescence imaging in the diagnosis of laryngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2000;257:17–23
- [118] Arens C, Reussner D, Woenkhaus J, Leunig A, Betz CS, Glanz H. Indirect fluorescence laryngoscopy in the diagnosis of precancerous and cancerous laryngeal lesions. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007;264:621–626
- [119] Wong KSLM, Wilson BC (2005) Endoscopic detection of early upper GI cancers. *Best Pract Res Clin Gastroenterology* 19: 833-856
- [120] Crow P, Uff JS, Farmer JA, Wright MP, Stone N. Use of Raman spectroscopy to identify and characterize transitional cell carcinoma in vitro. *BJU Int* 2004;93:1232–1236
- [121] Lau D, Huang Z, Lui H, et al. Raman spectroscopy for optical diagnosis in the larynx: preliminary findings. *Lasers Surg Med* 2005;37:192–200
- [122] Drexler W, Fugimoto J, (2008) *Optical coherence tomography: technology and application*, 2008<sup>th</sup> edn. Springer, New York
- [123] Wong BJ, Jackson RP, Guo S, Ridgway JM, Mahmood U, Su J, Shibuya TY, Crumley RL, Gu M, Armstrong WB, Chen Z (2005) In vivo optical coherence tomography of the human larynx: normative and benign pathology in 82 patients. *Laryngoscope* 115 (11):1904-1911
- [124] Gono K, Obi T, Yamaguchi M, Ohyama N, Machida H, Sano Y, et al. Appearance of enhanced tissue features in narrow-band endoscopic imaging. *J Biomed Opt* 2004;9:568-77
- [125] Uedo N, Ishihara R, Iishi H, Yamamoto S, Yamamoto S, Yamada T, et al. A new method of diagnosing gastric intestinal metaplasia: narrow-band imaging with magnifying endoscopy. *Endoscopy* 2006;38:819-24
- [126] Watanabe A, Taniguchi M, Tsujie H, Hosokawa M, Fujita M, Sasaki S (2008) The value of narrow band imaging endoscope for early head and neck cancers. *Otolaryngol Head Neck Surg* 138:446-451
- [127] Muto M, Katada C, Sano Y, Yoshida S (2005) Narrow band imaging: a new diagnostic approach to visualize angiogenesis in superficial neoplasia. *Clin Gastroenterol Hepatol* 3:S16–S20
- [128] Nonaka S, Saito Y (2008) Endoscopic diagnosis of pharyngeal carcinoma by NBI. *Endoscopy* 40:347–351
- [129] Hamamoto Y, Endo T, Noshio K, Arimura Y, Sato M, Imai K. Usefulness of narrow-band imaging endoscopy for diagnosis of Barrett's esophagus. *J Gastroenterol* 2004;39:14-20
- [130] Shibuya K, Hoshino H, Chiyo M, Iyoda A, Yoshida S, Sekine Y, et al. High magnification bronchovideoscopy combined with narrow-band imaging could detect capillary loops of angiogenic squamous dysplasia in heavy smokers at high risk of lung cancer. *Thorax* 2003;58:989-95
- [131] Muto M, Nakane M, Katada C, Sano Y, Ohtsu A, Esumi H, et al. Squamous cell carcinoma in situ at oropharyngeal and hypopharyngeal mucosal sites. *Cancer* 2004;101:1375-81
- [132] Lin YC, Watanabe A, Chen WC, Lee KF, Lee IL, Wang WH (2010) Narrowband imaging for early detection of malignant tumors and radiation effect after treatment of head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 136:234–239

- [133] Watanabe A, Taniguchi M, Tsujie H, Hosokawa M, Fujita M, Sasaki S, The value of narrow band imaging for early detection of laryngeal cancer, *Eur Arch Otorhinolaryngol* (2009) 266:1017–1023
- [134] C. Piazza, D. Cocco, L. De Benedetto, F. Del Bon, P. Nicolai, G. Peretti, Narrow band imaging and high definition television in the assessment of laryngeal cancer: a prospective study on 279 patients, *Eur Arch Otorhinolaryngolog* (2010) 267:409-414
- [135] Muto M, Minashi K, Yano T, Saito Y, Oda I, Nonaka S, et al. Early detection of superficial squamous cell carcinoma in the head and neck region and esophagus by narrow band imaging: a multicenter randomized controlled trial. *J Clin Oncol* 2010;28:1566–72
- [136] Kiesslich R, Burg J, Vieth M, et al. Confocal laser endoscopy for diagnosing intraepithelial neoplasias and colorectal cancer in vivo. *Gastroenterology* 2004;127:706–713
- [137] Just T, Stave J, Boltze C, et al. Laser scanning microscopy of the human larynx mucosa: a preliminary, ex vivo study. *Laryngoscope* 2006;116:1136–1141
- [138] Hurlstone DP, Baraza W, Brown S, Thomson M, Tiffin N, Cross SS. In vivo real-time confocal laser scanning endomicroscopic colonoscopy for the detection and characterization of colorectal neoplasia. *Br J Surg* 2008;95: 636–645
- [139] Goetz M, Kiesslich R. Confocal endomicroscopy: in vivo diagnosis of neoplastic lesions of the gastrointestinal tract. *Anticancer Res* 2008;28:353–360
- [140] Belzer F.O., Southard J.H., Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation*. 1988 Apr. 45(4):673-6
- [141] Warnecke G., Moradiellos J., Tudorache I., Kuhn C., Avstar M., Wiegmann B., et al., Normothermic perfusion of donor lungs for preservation and assessment with the Organ Care System Lung before bilateral transplantation: a pilot study of 12 patients. *Lancet*. 2012 Nov 24. 380(9856):1851-8. Medscape
- [142] Diode Lasers, PicoQuant,  
[https://www.picoquant.com/images/uploads/downloads/laser\\_brochure\\_2.pdf](https://www.picoquant.com/images/uploads/downloads/laser_brochure_2.pdf)
- [143] Laser induced fluorescence, measurements on brain tissues A. Pascu, M. O. Romanitan, J.M. Delgado, L. Danaïla, M.L. Pascu, *Anatomical Record*, vol. 292, pg. 2013-2022, 2009
- [144] Laser-induced autofluorescence as a possible diagnostic tool for use in neurosurgery, Mihail - Lucian Pascu, Mihaela - Oana Romanitan, Alexandru Pascu, José Delgado-García, Leon Danaïla, Book chapter in "Brain Tumor / Book 4", ISBN 978-953-307-589-1. InTech - Open Access Publisher, Croatia, 2011.
- [145] A. Alvarez-Ordóñez and M. Prieto, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Food Microbiology*. Boston, MA: Springer US, 2012.
- [146] "FTIR Spectroscopy; A New Technique In Cancer Diagnoses." [Online]. Available: [https://www.academia.edu/1380747/FTIR\\_Spectroscopy\\_A\\_New\\_Technique\\_In\\_Cancer\\_Diagnoses](https://www.academia.edu/1380747/FTIR_Spectroscopy_A_New_Technique_In_Cancer_Diagnoses). [Accessed: 26-Jul-2016].
- [147] M. A. Cohenford, T. A. Godwin, F. Cahn, P. Bhandare, T. A. Caputo, and B. Rigas, "Infrared spectroscopy of normal and abnormal cervical smears: evaluation by principal component analysis," *Gynecol. Oncol.*, vol. 66, no. 1, pp. 59–65, Jul. 1997.
- [148] M. A. Cohenford and B. Rigas, "Cytologically normal cells from neoplastic cervical samples display extensive structural abnormalities on IR spectroscopy: Implications for tumor biology," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 26, pp. 15327–15332, Dec. 1998.
- [149] A. Salman, S. Argov, J. Ramesh, J. Goldstein, I. Sinelnikov, H. Guterman, and S. Mordechai, "FT-IR microscopic characterization of normal and malignant human colonic tissues," *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.*, vol. 47 Online Pub, p. OL159-166, 2001.
- [150] D. C. Malins, N. L. Polissar, K. Nishikida, E. H. Holmes, H. S. Gardner, and S. J. Gunselman, "The etiology and prediction of breast cancer. Fourier transform-infrared spectroscopy reveals progressive alterations in breast DNA leading to a cancer-like phenotype in a high proportion of normal women," *Cancer*, vol. 75, no. 2, pp. 503–517, Jan. 1995.

- [151] S. O. Miller, G. P. Ewing, C. Howard, H. Tachikawa, S. A. Bigler, W. H. Barber, M. Angel, and D. O. McDaniel, "Incorporating cytochrome P450 3A4 genotype expression and FT-IR/Raman spectroscopy data as means of identification of breast tumors," *Biomed. Sci. Instrum.*, vol. 39, pp. 24–29, 2003.
- [152] J.-S. Wang, J.-S. Shi, Y.-Z. Xu, X.-Y. Duan, L. Zhang, J. Wang, L.-M. Yang, S.-F. Weng, and J.-G. Wu, "FT-IR spectroscopic analysis of normal and cancerous tissues of esophagus," *World J. Gastroenterol.*, vol. 9, no. 9, pp. 1897–1899, Sep. 2003.
- [153] Q.-B. Li, X.-J. Sun, Y.-Z. Xu, L.-M. Yang, Y.-F. Zhang, S.-F. Weng, J.-S. Shi, and J.-G. Wu, "Use of Fourier-transform infrared spectroscopy to rapidly diagnose gastric endoscopic biopsies," *World J. Gastroenterol.*, vol. 11, no. 25, pp. 3842–3845, Jul. 2005.
- [154] Q.-B. Li, X.-J. Sun, Y.-Z. Xu, L.-M. Yang, Y.-F. Zhang, S.-F. Weng, J.-S. Shi, and J.-G. Wu, "Diagnosis of gastric inflammation and malignancy in endoscopic biopsies based on Fourier transform infrared spectroscopy," *Clin. Chem.*, vol. 51, no. 2, pp. 346–350, Feb. 2005.
- [155] Y.-J. Chen, Y.-D. Cheng, H.-Y. Liu, P.-Y. Lin, and C.-S. Wang, "Observation of biochemical imaging changes in human pancreatic cancer tissue using Fourier-transform infrared microspectroscopy," *Chang Gung Med. J.*, vol. 29, no. 5, pp. 518–527, Oct. 2006.
- [156] G. Bellisola and C. Sorio, "Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis," *Am. J. Cancer Res.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–21, Nov. 2011.
- [157] Y. Nishina, K. Sato, C. Setoyama, H. Tamaoki, R. Miura, and K. Shiga, "Intramolecular and intermolecular perturbation on electronic state of FAD free in solution and bound to flavoproteins: FTIR spectroscopic study by using the C = O stretching vibrations as probes," *J. Biochem. (Tokyo)*, vol. 142, no. 2, pp. 265–272, Aug. 2007.
- [158] J. Sasaki, J. K. Lanyi, R. Needleman, T. Yoshizawa, and A. Maeda, "Complete identification of C = O stretching vibrational bands of protonated aspartic acid residues in the difference infrared spectra of M and N intermediates versus bacteriorhodopsin," *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 33, no. 11, pp. 3178–3184, Mar. 1994.
- [159] H. P. Wang, H.-C. Wang, and Y.-J. Huang, "Microscopic FTIR studies of lung cancer cells in pleural fluid," *Sci. Total Environ.*, vol. 204, no. 3, pp. 283–287, Oct. 1997.
- [160] "Wiley: Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications - Barbara H. Stuart." [Online]. Available: <http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0470854286.html>. [Accessed: 26-Jul-2016].
- [161] D. E. Maziak, M. T. Do, F. M. Shamji, S. R. Sundaresan, D. G. Perkins, and P. T. T. Wong, "Fourier-transform infrared spectroscopic study of characteristic molecular structure in cancer cells of esophagus: An exploratory study," *Cancer Detect. Prev.*, vol. 31, no. 3, pp. 244–253, 2007.
- [162] G. E. Menzies, H. R. Fox, C. Marnane, L. Pope, V. Prabhu, S. Winter, A. V. Derrick, and P. D. Lewis, "Fourier transform infrared for noninvasive optical diagnosis of oral, oropharyngeal, and laryngeal cancer," *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.*, vol. 163, no. 1, pp. 19–26, Jan. 2014.
- [163] Z. S. S. Júnior, S. B. Botta, P. A. Ana, C. M. França, K. P. S. Fernandes, R. A. Mesquita-Ferrari, A. Deana, and S. K. Bussadori, "Effect of papain-based gel on type I collagen - spectroscopy applied for microstructural analysis," *Sci. Rep.*, vol. 5, p. 11448, Jun. 2015.
- [164] Nagase H, Woessner J. Matrix metalloproteinases. *J. Biol Chem* 1999; 74:21491/3
- [165] Farah CS, McIntosh L, Georgiou A, McCulloch MJ. Efficacy of tissue autofluorescence imaging (VELScope) in the visualization of oral mucosal lesions. *Head Neck* 2012; 34:856-62.