

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "CAROL DAVILA" BUCUREȘTI

FACULTATEA DE MEDICINĂ GENERALĂ



TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT

**APECTAREA HEPATICĂ ÎN INTOXICAȚIILE ACUTE LA
COPIL ȘI ADOLESCENT**

PROTOCOL DE DIAGNOSTIC ȘI TRATAMENT

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT

Prof. Univ. Dr. ULMEANU CORIOLAN EMIL

DOCTORAND

Dr. BOGHIȚOIU DORA ANDREEA

BUCUREȘTI 2016

CUPRINS

I. INTRODUCERE	4
II. PREZENTAREA GENERALĂ A TEZEI	6
III. OBIECTIVELE STUDIULUI	7
IV. ANALIZA RETROSPECTIVĂ A INTOXICAȚIILOR ACUTE CARE AU ASOCIAT AFECTARE HEPATICĂ ACUTĂ ÎN PERIOADA 2010-2014	7
IV.1. INTRODUCERE. SCOP. OBIECTIVE	7
IV.2. MATERIAL ȘI METODĂ	8
IV.2.1. Tipul studiului și caracteristicile lotului	8
IV.2.2. Protocol de investigații	8
IV.2.3. Prelucrarea statistică a datelor	12
IV.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII	12
IV.3.1. Analiza caracteristicilor demografice	12
IV.3.2. Analiza circumstanțelor expunerii	13
IV.3.3. Analiza etiologiei afectării hepatice toxice	13
IV.3.4. Analiza manifestărilor clinice și a modificărilor paraclinice asociate afectării hepatice toxice	14
IV.3.5. Analiza abordării terapeutice și a duratei spitalizării	18
IV.3.6. Analiza deceselor	19
V. CERCETARE FUNDAMENTALĂ: EVALUAREA BIOMARKERILOR HEPATICI UZUALI, A ASPECTELOR HISTOPATOLOGICE ȘI A UNOR NOI BIOMARKERI LA ANIMALELE DE LABORATOR, DUPĂ ADMINISTRAREA UNOR SUBSTANȚE CU POTENȚIAL TOXIC HEPATIC	21
V.1. INTRODUCERE . OBIECTIVE	21
V.2. STUDIUL 1 - EVALUAREA PARAMETRILOR HEPATICI UZUALI LA ANIMALELE DE LABORATOR, DUPĂ ADMINISTRAREA UNOR SUBSTANȚE CU POTENȚIAL TOXIC HEPATIC	22
V.2.1. Ipoteză de lucru. Obiective	22
V.2.2. Material și metodă	22
V.2.3. Rezultate și discuții	22
V.3. STUDIUL 2 - EVALUAREA MODIFICĂRILOR HISTOLOGICE HEPATICE DUPĂ ADMINISTRAREA UNOR SUBSTANȚE CU POTENȚIAL HEPATOTOXIC	25
V.3.1. Ipoteză de lucru. Obiective	25
V.3.2. Material și metodă	25
V.3.3. Rezultate și discuții	26

V.4. STUDIUL 3 - EVALUAREA UNOR NOI BIOMARKERI HEPATICI LA ANIMALELE DE LABORATOR, DUPĂ ADMINISTRAREA UNOR SUBSTANȚE CU POTENȚIAL TOXIC HEPATIC	27
V.4.1. Ipoteză de lucru. Obiective.....	27
V.4.2. Material și metodă	27
V.4.3. Rezultate și discuții.....	28
VI. STUDII DE CAZ.....	30
VII. PROTOCOL DE DIAGNOSTIC ȘI TRATAMENT AL AFECTĂRII HEPATICE ÎN INTOXICAȚIILE ACUTE LA COPIL	30
VII.1. Evaluarea clinică și paraclinică a pacientului cu intoxicație acută care asociază și afectare hepatică.....	30
VII.1.1. Diagnosticul clinic	30
VII.1.2. Diagnosticul paraclinic	31
VII.2. Principii de tratament al intoxicațiilor acute care asociază afectare hepatică	32
VIII. CONCLUZII FINALE. ORIGINALITATEA STUDIULUI	33
VIII.1. Concluzii finale	33
VIII.2. Originalitatea studiului.....	38
BIBLIOGRAFIE.....	39

I. INTRODUCERE

Intoxicațiile acute la grupa de vârstă pediatrică reprezintă una dintre principalele cauze de mortalitate și de morbiditate, cu impact major în ceea ce privește mortalitatea prematură și alterarea calității vieții. De aceea, există o preocupare permanentă pentru analizarea atât a incidenței reale, cât și a particularităților evolutive ale acestora.

Cele mai detaliate raportări provin de la centrele antitoxice din Statele Unite ale Americii. Astfel, pentru anul 2014, aceste centre au raportat un număr de 2.165.142 de expuneri umane, continuând trendul descendent observat după anul 2008, când s-a înregistrat un maximum de 2.491.049 de cazuri. Dintre acestea, 1.326.789 de cazuri (61,28%) au fost expuneri la pacienți de vârstă pediatrică. Analiza caracteristicilor demografice și circumstanțiale ale expunerilor toxice pediatrice a identificat cea mai mare incidență la grupa de vârstă sub 6 ani, reprezentând 47,7% din totalul expunerilor raportate, grupă de vârstă la care domină intoxicațiile accidentale, în timp ce pentru intervalul de vârstă 13-19 ani expunerile sunt predominant voluntare, reprezentând 26,36% din totalul expunerilor voluntare raportate. Etiologia intoxicațiilor acute a fost diferită, în funcție de grupele de vârstă, fiind dominată de produsele cosmetice și de cele de uz casnic la grupa de vârstă 0-5 ani, în timp ce la grupa de vârstă 13-19 ani etiologia intoxicațiilor este dominată de expunerile la substanțe de abuz și medicamente [1].

Pentru Europa, raportările nu sunt uniforme, incidența, etiologia și rata de mortalitate în cazul intoxicațiilor acute la copil variind de la o țară la alta și chiar în cadrul aceleiași țări, mai ales secundar diferențelor socio-economice. În ceea ce privește vârsta, raportările sunt, totuși, similare celor din Statele Unite ale Americii, cu două vârfuri de incidență, la cei cu vârsta mai mică de 5 ani și la cei aparținând grupei de vârstă 15-19 ani [2]. În ceea ce privește mortalitatea, o analiză a informațiilor primite de la centrele antitoxice din Europa a permis o ierarhizare a țărilor în funcție de rata de deces prin intoxicații acute la copil, România ocupând locul 6 din cele 38 de state analizate [2].

Datele pentru România provin mai ales din cadrul unor studii desfășurate în centrele antitoxice întrucât, în prezent, nu există o structură care să cunatifice expunerile toxice la nivel național. Primul studiu cu privire la intoxicațiile acute la copil a fost unul epidemiologic, realizat în perioada 1997-2006 la nivelul centrului antitoxic din cadrul Spitalului de Urgență pentru Copii "Grigore Alexandrescu" din București. În această perioadă au fost înregistrate în București, și în 6 județe din sudul României, 11.890 de cazuri de intoxicații acute la copil. Cele mai multe expuneri au fost accidentale (78%), la grupa de vârstă 1-4 ani (65%) și la sexul masculin [3]. Colaborarea centrelor antitoxice din București, Timișoara, Cluj Napoca și Iași în perioada 2006-2010, a permis realizarea unui studiu la nivel național al epidemiologiei intoxicațiilor acute la copil. Analiza celor 6.099 de cazuri de intoxicație acută internate și tratate în cele 4 centre antitoxice a permis următoarele concluzii:

intoxicațiile acute cele mai des întâlnite au fost cele medicamentoase, expunerea în cele mai multe dintre cazuri a fost accidentală (58%), grupa de vârstă cea mai expusă în cazul intoxicațiilor acute accidentale a fost 1-5 ani; sexul feminin a fost cel mai frecvent implicat în expunerile voluntare (82%). În cazul intoxicațiilor medicamentoase, cele mai multe cazuri au fost secundare asocierii mai multor agenți farmacologici (44%), neuroleptice (25,65%) și antiinflamatorii nesteroidiene (8%). Etiologia nemedicamentoasă a fost dominată de intoxicațiile acute cu ciuperci (12,7%), urmate de etanol (11%), monoxid de carbon (7,5%), produse de uz casnic (6,52%), și insecticide inhibitorii de colinesterază (4,48%) [4].

Deoarece marea majoritate a xenobioticelor, medicamentoase sau nemedicamentoase, sunt metabolizate la nivel hepatic, ficatul este expus în permanență la diverse substanțe capabile să determine modificări structurale sau funcționale la nivelul acestui organ, cu posibilitatea evoluției către insuficiență hepatică. Datele din literatură demonstrează că principala cauză de insuficiență hepatică acută este cea toxică medicamentoasă, reprezentând aproximativ 20% din cazurile de insuficiență hepatică acută la copil și un procent mult mai însemnat la adult. Dintre medicamente, acetaminofenul este de departe cel mai frecvent agent etiologic incriminat, fiind responsabil de peste 15% din totalul cazurilor de insuficiență hepatică acută, în timp ce alte medicamente cu potențial hepatotoxic, de tipul tuberculostaticelor sau antiepilepticelor, reprezintă doar 5% [5]. În România, studiile cu privire la afectarea hepatică toxică sunt puține. Un studiu mai amplu al afectării hepatice în intoxicațiile acute medicamentoase la copil a fost realizat în cadrul Secției de Toxicologie și Terapie Intensivă a Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii "Grigore Alexandrescu" din București, în perioada 1997-2006. Au fost raportate 6.453 de cazuri de intoxicație acută, dintre care 3.464 (53%) au fost secundare expunerii la medicamente. Afectarea hepatică a fost prezentă la 6 dintre pacienții cu intoxicație acută medicamentoasă (0,17%), în toate cazurile fiind secundară expunerii la paracetamol, singur sau în combinație cu aspirina [3]. Un alt studiu bicentric, care a evaluat afectarea renală în cazul intoxicațiilor acute internate în perioada 2003-2012 în cadrul Secției de Toxicologie și Terapie Intensivă a Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii "Grigore Alexandrescu" din București și a Secției de Nefrologie-Toxicologie din Cluj, a constatat asocierea injuriei hepatice în 45 de cazuri (54,8%), 26 de cazuri evoluând către insuficiență hepatică acută [6].

Întrucât până în prezent nu există un studiu care să evalueze afectarea hepatică în intoxicațiile acute medicamentoase, dar și cu substanțe nemedicamentoase la pacienții pediatrici, în lucrarea de față mi-am propus să realizez o analiză complexă a etiologiei, caracteristicilor demografice, profilului clinic și paraclinic, precum și a evoluției specifice în cazurile de intoxicație acută care asociază afectare hepatică.

II. PREZENTAREA GENERALĂ A TEZEI

Partea generală a tezei a fost structurată în patru capitole. În capitolul I au fost sintetizate date legate de particularitățile de farmacocinetică întâlnite la vârsta pediatrică, subliniind aspectele specifice întâlnite la copil, pentru fiecare etapă pe care un toxic o parcurge la nivelul organismului.

Capitolul II prezintă noțiunile de bază legate de anatomia și fiziologia hepatică, noțiuni fără de care înțelegerea modalităților de acțiune a diverselor toxice la acest nivel, precum și consecințele asupra funcționării întregului organism, nu ar fi posibile.

În capitolul III sunt prezentate criteriile de definiție ale injuriei hepatice toxice, precum și diversele aspecte biochimice, histologice și fiziopatologice ale acestora. Tot în acest capitol sunt prezentați și factorii de risc pentru afectarea hepatică toxică, recunoașterea acestora permițând o identificare precoce a pacienților care necesită o atenție deosebită în ceea ce privește funcția hepatică.

Capitolul IV este o sinteză a datelor clinice și paraclinice utile pentru stabilirea diagnosticului pozitiv și diferențial al afectării hepatice din intoxicațiile acute ale copilului. Sunt detaliate testele biochimice uzuale - teste funcționale hepatice, insistând asupra particularităților vârstei pediatrică, dar și markeri biologici noi, aparținând tehnologiilor „omice”: transcriptomice, metabonomice, proteomice.

Partea specială – studiul personal, este structurată în 6 capitole, primul, capitolul V, prezentând obiectivele acestei teze de doctorat. În capitolul VI este prezentat un studiu clinic al afectării hepatice toxice în intoxicațiile acute la copil. Este un studiu bicentric, retrospectiv, observațional și descriptiv, pe o durată de 5 ani, în care au fost incluși 77 de pacienți internați cu diagnosticul de intoxicație acută și care au asociat de la internare sau pe durata spitalizării afectare hepatică. Lotul de studiu a fost selectat dintre pacienții internați și tratați în cadrul a două centre antitoxice pediatrică: secția de Toxicologie-Terapie intensivă a Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii „Grigore Alexandrescu” din București și secția de Toxicologie și Nefrologie pediatrică din cadrul Spitalului de Urgență pentru Copii Cluj Napoca. Capitolul VII este reprezentat de o cercetare fundamentală, efectuată în colaborare cu Departamentul de Farmacologie și Toxicologie clinică din cadrul Universității de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București, în care am evaluat impactul pe care anumite substanțe, identificate a avea potențial hepatotoxic, îl au asupra aspectului structural și al parametrilor biochimici hepatici uzuali și am încercat identificarea unor markeri biologici noi, care să fie asociați injuriei hepatice cu sensibilitate și specificitate superioare, comparativ cu testele uzuale. În capitolul VIII sunt prezentate, in extenso, câteva dintre cazurile analizate în studiul retrospectiv, datorită particularităților clinico-evolutive asociate. În capitolul IX am propus un protocol de diagnostic și de tratament al pacienților de vârstă pediatrică cu intoxicație acută care asociază afectare hepatică. Ultimul capitol, capitolul X, este rezervat prezentării concluziilor finale ale tezei de doctorat, precum și a elementelor de originalitate ale acestei lucrări.

Bibliografia conține 268 de titluri ale unor lucrări de specialitate din numeroase domenii: anatomie, fiziopatologie, pediatrie, gastroenterologie și toxicologie clinică și experimentală.

III. OBIECTIVELE STUDIULUI

Principalele **obiective ale studiului clinic** sunt:

1. Identificarea agenților etiologici cu potențial hepatotoxic
2. Analiza caracteristicilor demografice și circumstanțiale ale pacienților cu intoxicație acută care asociază afectare hepatică, pentru a identifica posibile grupe de risc pentru expunerea toxică
3. Descrierea profilului clinic și paraclinic al afectării hepatice toxice în intoxicațiile acute la copil
4. Aprecierea severității afectării hepatice toxice, a relației dintre etiologie și severitatea leziunilor, precum și descrierea celor mai frecvente manifestări clinice asociate
5. Evaluarea abordării terapeutice și a impactului metodelor aplicate asupra evoluției
6. Analiza factorilor de risc asociați afectării hepatice toxice care evoluează către deces
7. Propunerea unui protocol de diagnostic și tratament al intoxicațiilor acute care asociază afectare hepatică

Obiectivele studiului experimental sunt:

1. Aprecierea modului în care expunerea la paracetamol, izoniazidă și acid valproic influențează parametrii biochimici uzuali: alanilaminotransferaza, aspartataminotransferaza, fosfataza alcalină, bilirubina serică totală.
2. Caracterizarea modificărilor histologice hepatice induse de expunerea la doze toxice de paracetamol, acid valproic și izoniazidă.
3. Evaluarea unor noi markeri biologici la animale de laborator, la care injuria hepatică a fost indusă prin administrarea unor doze toxice de paracetamol.

IV. ANALIZA RETROSPECTIVĂ A INTOXICAȚIILOR ACUTE CARE AU ASOCIAT AFECTARE HEPATICĂ ACUTĂ ÎN PERIOADA 2010-2014

IV.1. INTRODUCERE. SCOP. OBIECTIVE

Cercetarea de față are ca scop conturarea caracteristicilor demografice, clinice, paraclinice și evolutive ale afectării hepatice la pacienții pediatrici cu intoxicație acută, pentru a permite o diagnosticare rapidă, precum și instituirea unui tratament precoce și ținut, elemente cu impact semnificativ asupra prognosticului pacientului.

Obiectivele principale ale acestui studiu sunt:

1. Identificarea agenților etiologici cu potențial hepatotoxic
2. Analiza caracteristicilor demografice și circumstanțiale ale intoxicațiilor acute care asociază afectare hepatică pentru a identifica posibile grupe de risc pentru expunerea toxică
3. Descrierea profilului clinic și paraclinic al afectării hepatice toxice în intoxicațiile acute la copil
4. Aprecierea severității afectării hepatice toxice, a relației dintre etiologie și severitatea leziunilor, precum și descrierea celor mai frecvente manifestări clinice asociate
5. Evaluarea abordării terapeutice și a impactului metodelor aplicate asupra evoluției
6. Analiza factorilor de risc asociați afectării hepatice toxice care evoluează către deces
7. Propunerea unui protocol de diagnostic și tratament al intoxicațiilor acute care asociază afectare hepatică

IV.2. MATERIAL ȘI METODĂ

IV.2.1. Tipul studiului și caracteristicile lotului

Studiul de față este unul observațional, descriptiv și retrospectiv, cu o durată de 5 ani, în perioada 2010-2014. Este un studiu bicentric, realizat în două centre antitoxice pediatrie: secția de Toxicologie – Terapie intensivă a Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii "Grigore Alexandrescu" din București și secția de Nefrologie și Toxicologie Pediatrică din cadrul Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii din Cluj Napoca.

Lotul de studiu a fost alcătuit din pacienți cu vârsta cuprinsă între 0 și 18 ani, internați cu diagnosticul de intoxicație acută, care au prezentat la internare sau în evoluție afectare hepatică. În total au fost selectați pentru studiu 77 de pacienți, 38 dintre pacienți fiind diagnosticați și tratați în departamentul de Toxicologie din Cluj Napoca și 39 dintre pacienți în departamentul de Toxicologie din București. Pentru selectarea cazurilor care au fost incluse în lotul de studiu am folosit definiția afectării hepatice acute elaborată în urma unui consens internațional: o creștere a nivelurilor serice ale aminotransferazelor sau ale bilirubinei, conjugate de cel puțin două ori limita superioară a normalului, sau o creștere a aminotransferazelor, bilirubinei totale și fosfatazei alcaline, cu condiția ca cel puțin una dintre acestea să aibă valori de peste două ori limita superioară a normalului [7]. Au fost excluși din studiu pacienții cunoscuți cu afectare hepatică anterioară expunerii toxice, precum și cei care, deși au fost expuși la substanțe cu potențial hepatotoxic, nu au dezvoltat afectare hepatică.

IV.2.2. Protocol de investigații

Datele pacienților incluși în lotul de studiu au fost obținute din foile de observație clinică și introduse într-o bază de date în care am consemnat, pentru fiecare pacient, următoarele:

- Datele de identificare: inițiala numelui și a prenumelui
- Caracteristicile demografice: vârstă, sex, mediul de proveniență
- Agentul etiologic incriminat
- Circumstanțele expunerii: accidentală sau voluntară
- Semnele clinice de afectare hepatică la internare și în evoluție: manifestări gastrointestinale nespecifice, de tipul vărsăturilor, durerilor abdominale, modificărilor de tranzit intestinal, hepatomegalie, icter, semne specifice instalării insuficienței hepatice - encefalopatia, manifestările hemoragice secundare coagulopatiei
- Semne de afectare multisistemică: convulsii, semne de șoc, oligurie, sindrom hepato-renal
- Analize cu valoare diagnostică pentru afectarea hepatică acută: alanin-aminotransferaza (ALT), aspartat-aminotransferaza (AST), fosfataza alcalină, bilirubina totală, bilirubina directă, bilirubina indirectă, timpul de protrombină (timp Quick), INR
- Severitatea afectării hepatice toxice
- Analize cu valoare diagnostică pentru diferitele etiologii
- Durata spitalizării
- Intervalul de timp dintre expunere și primele gesturi terapeutice
- Tratamentul efectuat

Analiza foilor de observație clinică a presupus evaluarea datelor de anamneză, a celor furnizate de examenele clinice de la internarea pacientului și de la evaluările zilnice efectuate pe durata spitalizării, precum și a probelor paraclinice care să ateste prezența injuriei hepatice, dar și a altor complicații și, totodată, a testelor efectuate pentru identificarea agentului etiologic.

Din datele anamnestice am urmărit identificarea circumstanțelor expunerii la substanța cu potențial hepatotoxic, tipul de toxic și cantitatea la care a fost expus pacientul, manifestările clinice asociate, intervalul de timp de la expunere și până la prezentarea într-o unitate medicală.

Din datele furnizate în urma examenului clinic am urmărit prezența hepatomegaliei, a icterului, a modificărilor sugestive pentru instalarea insuficienței hepatice acute - manifestări neurologice specifice encefalopatiei hepatice sau sindromul hemoragic secundar coagulopatiei, dar și a manifestărilor gastrointestinale care, deși nu sunt specifice, sunt prezente la debut în marea majoritate a intoxicațiilor care asociază afectare hepatică.

Pentru a identifica din lotul de studiu pe acei pacienți care au evoluat către insuficiență hepatică acută, am folosit criteriile PALFSG - Pediatric Acute Liver Failure Study Group [8]:

- Nu există istoric de boală hepatică cronică
- Modificări biochimice sugestive pentru afectarea hepatică acută
- Prezența coagulopatiei, definită ca timp de protrombină ≥ 15 secunde sau INR $\geq 1,5$ care nu se corectează la administrarea de vitamină K, la

pacienți care asociază manifestări clinice de encefalopatie hepatică sau timp de protrombină ≥ 20 secunde sau INR ≥ 2 , indiferent de prezența sau absența encefalopatiei.

Am urmărit, de asemenea, descrierea unor semne de suferință neurologică, sugestive instalării encefalopatiei hepatice. Pentru cunatificarea severității am folosit criteriile elaborate de același grup de studiu, criterii care diferă de cele ale adultului, pentru copiii cu vârsta < 4 ani și sunt similare cu cele folosite la adult după această vârstă [8].

Tabel IV.2- 1. Stadiile encefalopatiei hepatice la pacientul pediatric [8]

STADII ALE ENCEFALOPATIEI HEPATICE			
Stadiul	Manifestări clinice	Reflexe osteotendinoase/ Asterixis	Semne neurologice
I COPIL	Plâns inconsolabil Incapacitate de concentrare Inversarea ritmului somn veghe	Normal/hiperreflexie	Dificil sau imposibil de evaluat
ADULT	Confuzie Schimbări de dispoziție Alterarea ritmului somn veghe	Normal	Tremor Apraxie Modificări ale scrisului
II COPIL	Plâns inconsolabil Incapacitate de concentrare Inversarea ritmului somn veghe	Normal/hiperreflexie	Dificil sau imposibil de evaluat
ADULT	Somnolent Modificări de comportament Scăderea inhibițiilor	Hiperreflexie	Disartrie Ataxie
III COPIL	Somnolență Stupoare	Hiperreflexie	Dificil sau imposibil de evaluat
ADULT	Stupoare Răspunde la stimuli verbali	Hiperreflexie Babinski +	Rigiditate
IV COPIL	Comă Răspunde la stimuli dureroși (IVa) Nu răspunde la stimuli dureroși (IVb)	Absente	Decerebrarea sau decorticare
ADULT	Comă Răspunde la stimuli dureroși (IVa) Nu răspunde la stimuli dureroși (IVb)	Absente	Decerebrarea sau decorticare

Hipoglicemia a fost definită ca valori ale glucozei serice sub 60 mg/dl [9].

Oliguria a fost definită ca scădere a volumului urinar sub 0,5-1 ml/kgc/h. Pentru definirea sindromului hepato-renal am folosit criteriile elaborate de International Ascites Club (IAC): afectare hepatică acută sau cronică severă, creatinină serică peste 1,5 mg/dl, lipsa de răspuns, exprimată prin persistența nivelurilor serice crescute ale creatininei la expansiunea volemică și la stoparea medicației diuretice, absența șocului, absența terapiei cu medicamente nefrotoxice,

absența afectării renale parenchimotoase, definită de proteinurie peste 500 mg/zi, hematurie peste 50/câmp sau aspecte ultrasonografice patologice [10].

Am selectat pacienții care au asociat șoc pe baza prezenței semnelor de perfuzie tisulară inadecvată: oligurie, alterarea statusului mental, puls periferic filiform sau absent, timp de recolorare capilară peste 2 secunde, extremități reci, cianotice, precum și alterarea semnelor vitale: tahicardie, hipotensiune arterială, instabilitate termică și tahipnee. Modificările semnelor vitale (frecvență cardiacă, frecvență respiratorie și tensiune arterială) au fost raportate la valorile normale pe grupe de vârstă [11].

Analiza modificărilor paraclinice a presupus evaluarea parametrilor hepatici specifici: alanin-aminotransferaza, aspartat-aminotransferaza, bilirubina totală, bilirubina directă, bilirubina indirectă, fosfataza alcalină, timpul de protrombină și INR-ul, dar și a glicemiei, echilibrului acido-bazic, parametrilor funcționali renali (uree, creatinină).

Pentru cuantificarea severității afectării hepatice am utilizat scala publicată de Institutul Național pentru Diabet, Boli Digestive și Renale din Statele Unite ale Americii (NIDDK). Aceasta permite încadrarea injuriei hepatice în cinci grade de severitate pe baza prezenței icterului, a semnelor de insuficiență hepatică, duratei spitalizării, precum și a prognosticului [12].

Astfel, afectarea hepatică poate fi:

Ușoară (1+) – creșteri ale aminotransferazelor și/sau fosfatazei alcaline, dar cu un nivel al bilirubinei totale $< 2,5$ mg/dl și INR $< 1,5$

Moderată (2+) - creșteri ale aminotransferazelor și/sau fosfatazei alcaline, asociate cu un nivel al bilirubinei totale $> 2,5$ mg/dl și INR $> 1,5$

Moderat severă (3+) - creșteri ale aminotransferazelor și/sau fosfatazei alcaline, asociate cu un nivel al bilirubinei totale $> 2,5$ mg/dl și spitalizare (sau prelungirea spitalizării) secundare injuriei hepatice toxice

Severă (4+) - creșteri ale aminotransferazelor și/sau fosfatazei alcaline, bilirubină totală $> 2,5$ mg/dl și cel puțin una dintre următoarele:

- Icter sau simptome prelungite, mai mult de 3 luni, sau
- Semne de decompensare hepatică (INR $> 1,5$, encefalopatie, ascită), sau
- Alte insuficiențe de organ cauzate de afectarea hepatică toxică

Fatală (5+) – deces sau transplant hepatic secundar afectării hepatice toxice

Totodată, am urmărit dacă pentru identificarea agentului etiologic s-au efectuat determinări toxicologice. Atunci când acestea au fost efectuate, au fost folosite atât metode calitative, cât și cantitative, produsele biologice utilizate fiind sângele și urina. Din urină s-au efectuat atât teste screening – teste cromatografice cu flux lateral rapide de identificare a unor medicamente, substanțe de abuz sau a metaboliților acestora (TOX/see), precum și examene toxicologice mai complexe, folosind metoda gaz cromatografiei cuplată cu spectometrie de masă. Determinările din sânge au fost unele cantitative, care au permis stabilirea nivelelor serice pentru diverse medicamente: acid valproic, paracetamol, salicilați. Expunerea la anumite toxice, de tipul insecticidelor inhibitorii de colinesterază sau al nitriților, a fost

evaluată prin intermediul unor parametri care cuantifică efectul acestor substanțe asupra organismului: nivelurile serice de pseudocolinesterază, respectiv de methemoglobină.

IV.2.3. Prelucrarea statistică a datelor

Datele obținute în urma analizei minuțioase a pacienților din lotul de studiu au fost analizate folosind programul IBM SPSS v20 și au fost exprimate în formă de procente, medii, mediane, valoarea modală sau abateri standard. Pentru a verifica dacă asocierile constatate între diverse variabile categoriale (vârstă, sex, mediu de proveniență, etiologie) sunt semnificative din punct de vedere statistic, am folosit testul Pearson Chi-pătrat pentru eșantioanele mai mari de 5 și testul Fischer's exact test atunci când numărul de observații a fost mai mic de 5, considerând semnificative rezultatele probabilității statistice (p) mai mici de 0,05. Pentru a evalua dacă mediile provenind de la 2 eșantioane independente diferă semnificativ statistic, am folosit testul t independent. Pentru compararea de eșantioane în care distribuția variabilelor nu a fost simetrică și nu am putut calcula media sau pentru compararea variabilelor ordinale, am folosit testele nonparametrice Kruskal Wallis. Am folosit analiza multivariabilă prin regresie logistică pentru a cuantifica contribuția diversilor factori de risc (variabile independente) la decesul pacienților analizați în lot și pentru un model de predicție a decesului la pacienții cu intoxicații care asociază afectare hepatică.

IV.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Pe durata studiului, respectiv ianuarie 2010 - decembrie 2014, în cele 2 centre antitoxice au fost internate și tratate 4.844 de intoxicații la pacienți cu vârstă cuprinsă între 0 și 18 ani. În cadrul Secției de Toxicologie a SCUC „Grigore Alexandrescu” au fost internate 4.280 de intoxicații acute, cu o medie anuală de 850 de cazuri. În cadrul Secției de Nefrologie – Toxicologie din Cluj Napoca, pe parcursul perioadei studiate, au fost internate 564 de cazuri de intoxicație acută, cu o medie anuală de 112 cazuri. Am inclus în studiul personal un număr de 77 de cazuri care au prezentat la internare sau în evoluție, pe parcursul spitalizării, semne de afectare hepatică acută. Prevalența injuriei hepatice acute în lotul studiat a fost de aproximativ 1,6%.

IV.3.1. Analiza caracteristicilor demografice

Lotul studiat a cuprins 42 de fete, reprezentând 54,5% din totalul cazurilor analizate, și 35 de băieți, respectiv 45,5%, constatându-se un raport fete/băieți de 1,2:1. Vârsta medie a pacienților din lotul de studiu a fost de $10,3 \pm 5,5$ ani, vârsta mediană 11 ani, iar vârsta modală 14 ani. Vârsta medie a fetelor din lotul de studiu a fost de $11,62 \pm 5,07$ ani, iar cea a băieților de $8,77 \pm 5,66$ ani, vârsta medie a fetelor fiind semnificativ statistic mai mare ($p = 0,023$, testul t). Analiza distribuției pacienților din lotul studiat pe grupe de vârstă pune în evidență două vârfuri de incidență: primul, la grupa de vârstă 10-14 ani (28,6%) și cel de al doilea, la pacienții cu vârstă cuprinsă între 15 și 18 ani (28,6%). Numărul de cazuri provenite din mediul rural ($n =$

40, 51,9%) este nesemnificativ mai mare comparativ cu cele provenind din mediul urban (n = 37, 48,1%).

IV.3.2. Analiza circumstanțelor expunerii

În lotul studiat expunerea accidentală a fost întâlnită cu o frecvență mai mare decât cea voluntară, înregistrându-se 52 de cazuri de intoxicație acută accidentală (67,53%) și 25 de cazuri de intoxicație voluntară (32,47%).

Analizând intenția expunerii în funcție de vârstă și de sexul pacienților, am constatat că expunerea voluntară este semnificativ statistic asociată cu grupa de vârstă 15-18 ani și cu sexul feminin, în timp ce expunerea accidentală este asociată cu grupa de vârstă până în 10 ani și cu sexul masculin.

IV.3.3. Analiza etiologiei afectării hepatice toxice

În majoritatea cazurilor expunerile au fost la substanțe toxice nemedicamentoase (n = 51, 66,2%), în timp ce expunerile medicamentoase, la un singur medicament sau în diverse asocieri, reprezintă 33,8% (n = 26).

Analizând etiologia nemedicamentoasă în lotul studiat am constatat că cele mai multe cazuri (n = 40, 78,4%) care au asociat afectare hepatică toxică au fost secundare expunerii la ciuperci necomestibile. O altă categorie importantă de toxice nemedicamentoase identificată în cadrul lotului studiat este reprezentată de pesticide (n = 8, 15,66%). 7 cazuri din lot au fost intoxicații acute cu insecticide inhibitoare de colinesterază: diazinon – 5 cazuri, dimetoat - 1 caz și un caz de intoxicație acută cu tomoxan. Expunerea la metaaldehidă, un moluscocid, a fost întâlnită într-un singur caz de ingestie accidentală. Lotul de studiu a cuprins și un caz (1,96%) de intoxicație acută voluntară, prin inhalare, cu substanțe psihoactive noi și 2 cazuri de methemoglobinemie toxică în cadrul intoxicației acute cu nitriți.

Etiologia medicamentoasă a intoxicațiilor cu un singur medicament este dominată de paracetamol (n = 13, 50%), cu o frecvență mult mai redusă urmând intoxicațiile cu izoniazidă (n = 3, 11,5%), acid valproic (n = 2, 7,7%), neuroleptice de tipul clozapinei (n = 1, 3,8%) și colchicină (n = 1, 3,8%). Din totalul cazurilor analizate în studiu 6 (7,8%) au fost intoxicații plurimedimentoase, paracetamolul fiind, și în acest context, medicamentul cel mai frecvent identificat (4 cazuri): coingestie de paracetamol, ibuprofen și acid acetilsalicilic - 2 cazuri, paracetamol, clorfeniramină, pseudoefedrină și metamizol - 1 caz, paracetamol, ketoprofen și ampicilină - 1 caz.

Analiza etiologiei intoxicațiilor în funcție de caracteristicile demografice și circumstanțiale a evidențiat că etiologia nemedicamentoasă a fost asociată semnificativ statistic cu sexul masculin (p = 0,01, test chi pătrat), grupa de vârstă sub 1 an și expunerea accidentală la toxic, iar etiologia medicamentoasă a fost semnificativ statistic asociată cu expunerea voluntară, sexul feminin (p = 0,01, test chi pătrat) și grupa de vârstă 15-18 ani. Mediul de proveniență al pacienților nu a influențat etiologia intoxicațiilor analizate.

IV.3.4. Analiza manifestărilor clinice și a modificărilor paraclinice asociate afectării hepatice toxice

Afectarea hepatică toxică poate mima din punct de vedere clinic și paraclinic orice formă de injurie hepatică. Severitatea injuriei hepatice depinde de agentul etiologic și de cantitatea de toxic cu care organismul a intrat în contact și cuprinde un spectru larg de modificări clinice și paraclinice, de la creșteri asimptomatice ale aminotransferazelor, până la insuficiență hepatică acută și deces.

IV.3.4.1. Analiza severității afectării hepatice toxice

Cele mai multe dintre cazurile analizate în studiu au asociat o formă ușoară de afectare hepatică (50,6%). Forma severă a fost întâlnită la 27,3% dintre pacienții din lot, iar forma fatală, reprezentând decesele secundare afectării hepatice toxice a fost prezentă la 9,1% dintre cazuri. Deși domină afectarea hepatică ușoară, formele grave (severă și fatală) ocupă un loc important, sumând 36,4% din cazuri.

Am analizat lotul de pacienți în funcție de etiologie și de severitatea afectării hepatice cu scopul de a identifica existența unor asocieri semnificative statistic între un anumit toxic și severitatea leziunilor pe care acesta le determină la nivelul structurii hepatice.

Forma cea mai gravă de afectare hepatică toxică, care a determinat și decesul pacienților, am întâlnit-o predominantă în cazul etiologiei nemedicamentoase (7 cazuri versus 1 caz pentru etiologia medicamentoasă). Acest lucru este explicat de faptul că majoritatea covârșitoare a acestor forme grave (87,5%) a fost secundară intoxicațiilor cu ciuperci necomestibile. Analiza statistică ne arată că între evoluția către forma fatală de injurie hepatică și etiologia nemedicamentoasă există o asociere semnificativă ($p < 0,05$, test chi pătrat). În ceea ce privește etiologia medicamentoasă, singurul caz în care afectarea hepatică a condus la decesul pacientului a fost intoxicația cu colchicină, subliniind gravitatea evolutivă a acestui tip de intoxicație.

Etiologia formei severe de afectare hepatică toxică este dominată, de asemenea, de toxicele nemedicamentoase, reprezentate, în toate cazurile, de consumul de ciuperci necomestibile. Analiza statistică a acestor date ne arată că pentru lotul de studiu există o asociere semnificativă între forma severă de afectare hepatică și intoxicația cu ciuperci ($p < 0,05$, test chi pătrat). În cazul expunerii medicamentoase constatăm că paracetamolul este asociat cel mai frecvent cu formele severe de afectare hepatică toxică, fie singur (4 cazuri), fie în combinație cu alte medicamente (2 cazuri), reprezentând 30% din totalul intoxicațiilor care au asociat afectare hepatică severă și 85,7% în cadrul etiologiei medicamentoase a acestei forme.

Analizând severitatea afectării hepatice în funcție de intenția expunerii am constatat că formele cele mai grave de afectare hepatică toxică, respectiv severă și fatală, sunt asociate semnificativ cu expunerile accidentale ($p < 0,05$, test chi pătrat). Cele mai multe dintre cazurile de expunere toxică voluntară ($n=14$, 56%) au

determinat forme ușoare de afectare hepatică, dar nu există o asociere semnificativă din acest punct de vedere.

IV.3.4.2. Analiza manifestărilor clinice în funcție de severitatea afectării hepatice

Manifestările gastrointestinale: greață, vărsături, dureri abdominale, modificări ale tranzitului intestinal, deși au specificitate redusă pentru afectarea hepatică toxică, au fost prezente în toate cazurile, indiferent de gradul de severitate.

Icterul a fost prezent mai ales în formele severe (42,9%) și fatale (100%) de injurie hepatică, existând o asociere semnificativ statistic între prezența icterului și severitatea afectării hepatice ($p = 0,08$, test chi pătrat). De asemenea, hepatomegalia a fost asociată cu o frecvență mult mai mare în cazul formelor severe și fatale comparativ cu cele ușoare sau moderate.

Manifestările hemoragice de tipul hematemezei, melenei sau epistaxisului au fost asociate predominant formelor fatale de afectare hepatică. Deși toate cazurile severe de afectare hepatică au asociat modificări ale parametrilor coagulării, acestea au fost evidente clinic doar la 2 dintre pacienți (9,5%). Această constatare este concordantă cu datele din literatură, conform cărora parametrii coagulării nu se corelează cu riscul de sângerare la pacienții cu afectare hepatică [13].

Semnele de șoc și convulsiile au fost asociate mai ales cu etiologia intoxicațiilor și mai puțin cu severitatea leziunilor hepatice. Astfel, din totalul cazurilor care au asociat în evoluție semne de șoc, 41,2 % au apărut la pacienții cu forme ușoare de afectare hepatică, în cadrul tabloului de intoxicație acută gravă cu insecticide inhibitoare de colinesterază sau cu nitriți.

Aceeași constatare se desprinde și în cazul afectării renale, aceasta fiind asociată cazurilor cu potențial nefrotoxic cunoscut (paracetamol, ciuperci) sau celor care au avut o evoluție severă către insuficiența multiplă de organe și sisteme, independent de afectarea hepatică.

IV.3.4.3. Insuficiența hepatică acută

Insuficiența hepatică acută este etapa finală în evoluția unei injurii hepatice, indiferent de etiologie, dar cele mai frecvente cauze sunt reprezentate de intoxicațiile medicamentoase și de hepatitele virale [14].

În lotul studiat, 30 dintre pacienții cu afectare hepatică toxică, reprezentând 38,9% din totalul cazurilor analizate, au evoluat către insuficiență hepatică acută.

Analiza etiologiei a permis identificarea paracetamolului ca principală cauză în cazul intoxicațiilor medicamentoase, reprezentând 77,78% din totalul intoxicațiilor medicamentoase care au evoluat către insuficiență hepatică acută. Toxicele nemedicamentoase au fost implicate cu o frecvență mult mai mare (70%), toate cele 21 de cazuri înregistrate, fiind secundare expunerii accidentale la ciuperci necomestibile. Analiza statistică ne arată că există o asociere semnificativă între evoluția către insuficiență hepatică acută și intoxicația cu ciuperci ($p = 0,01$, Fisher's exact test).

Pierderea funcției de detoxifiere determină instalarea manifestărilor neurologice specifice encefalopatiei hepatice, secundare acumulării produșilor de metabolism endogen, în special a amoniacului, cu efect toxic asupra structurilor neuronale. Stadializarea encefalopatiei hepatice se realizează cu dificultate la copil, gradele I și II având manifestări clinice greu de diferențiat. În lotul de studiu, la 17 dintre pacienți (22,07%) am identificat, pe baza semnelor neurologice, asocierea encefalopatiei hepatice. Analizând etiologia intoxicațiilor care au asociat encefalopatie, am constatat că substanțele nemedicamentoase sunt mult mai frecvent asociate cu apariția manifestărilor neurologice și cu o severitate mai mare a encefalopatiei (8 cazuri de encefalopatie grad IV, comparativ cu 0 cazuri la etiologia medicamentoasă). Toate cazurile înregistrate au apărut la pacienți cu intoxicație acută cu ciuperci, existând o asociere semnificativă între expunerea la ciuperci și evoluția către encefalopatie hepatică ($p < 0,05$, test chi pătrat). În ceea ce privește etiologia medicamentoasă, cele 3 cazuri au fost reprezentate de 2 intoxicații cu paracetamol și de o intoxicație severă cu acid valproic.

IV.3.4.4. Afectarea renală asociată afectării hepatice toxice

În lotul studiat, 12 (15,58%) dintre pacienții cu intoxicație acută au asociat la internare sau în evoluție afectare renală, etiologia acestora fiind reprezentată de: paracetamol - 3 cazuri, ciuperci - 3 cazuri, insecticide inhibitoare de colinesterază - 3 cazuri și câte 1 caz pentru intoxicațiile cu nitriți, izoniazidă și colchicină.

Mecanismele de producere a injuriei renale acute la pacienții cu intoxicație acută care asociază afectare hepatică toxică sunt variate și depind, în mare măsură, de agentul etiologic implicat. În cazul intoxicațiilor cu paracetamol și cu ciuperci toți cei 6 pacienți au evoluat către forma cea mai severă de afectare hepatică – insuficiența hepatică acută și nu a asociat modificări paraclinice de afectare renală organică (hematurie, proteiurie) permițând încadrarea acestor cazuri ca sindrom hepato-renal. Mioglobinuria a reprezentat mecanismul de producere a injuriei renale în cazul intoxicației cu izoniazidă, pacienta asociind valori foarte crescute ale creatinfosfokinazei, sugerând o rabdomioliză importantă. În cazul intoxicațiilor cu insecticide inhibitoare de colinesterază și cu nitriți, care au asociat forme ușoare de afectare hepatică, disfuncția renală asociată a apărut secundar tulburărilor cardiovasculare asociate, toți cei 4 pacienți prezentând semne de șoc. Intoxicația cu colchicină are efecte asupra multor organe și sisteme, astfel încât mecanismul afectării renale este multifactorial: hipovolemia, secundară pierderilor masive de lichide la nivel gastrointestinal, hipotensiunea, secundară disfuncției cardiovasculare sau mioglobinuria, secundară rabdomiolizei. În cazul analizat, hipovolemia și compromiterea cardiovasculară au reprezentat factorii determinați pentru instalarea injuriei renale.

IV.3.4.4. Analiza modificărilor paraclinice

Evaluarea parametrilor specifici hepatici la pacienții cu intoxicație acută permite stabilirea asocierii afectării hepatice toxice, aprecierea severității acesteia,

precum și urmărirea evoluției către recuperare sau către instalarea insuficienței de organ.

În lotul studiat am urmărit evoluția aminotransferazelor (ALT și AST) ca indicatori de injurie hepatocelulară, bilirubina totală și parametrii coagulării (timp Quick și INR) pentru a evalua funcția hepatică. La 55 (71,4%) dintre pacienții analizați alterarea valorilor aminotransferazelor a fost prezentă încă de la internare și la 22 dintre pacienți (28,6%) valorile aminotransferazelor au fost în limite normale la internare, dar s-au modificat în evoluția intoxicației acute. Analizând etiologia intoxicațiilor la care afectarea hepatică a apărut în evoluție am constatat următoarele: paracetamol - 6 cazuri, asocieri medicamentoase - 4 cazuri, izoniazidă - 3 cazuri, insecticide inhibitoare de colinesterază - 5 cazuri, ciuperci necomestibile - 4 cazuri.

Am evaluat ulterior toți acești indicatori de afectare hepatică la internare, în momentul din evoluție când au atins valorile maxime și în momentul externării sau al decesului. Folosind testul t pentru eșantioane independente, am stabilit că valorile medii ale parametrilor analizați diferă semnificativ în cele 3 momente analizate ($p < 0,003$).

Analizând valorile medii ale aminotransferazelor, în funcție de etiologia intoxicațiilor din lotul studiat, am obținut o serie de date interesante. Cele mai mari valori la internare, atât pentru alanin-aminotransferază, cât și pentru aspartat-aminotransferază au fost asociate intoxicației cu acid valproic, urmată de intoxicația cu ciuperci și de cea cu paracetamol. Datele din literatură identifică vârsta mai mică de 7,5 ani [15], suferințele neurologice preexistente, tratamentul anticonvulsivant cronic, nivelurile serice crescute de acid valproic și administrarea concomitentă a unor medicamente cu efect inductor asupra citocrom P450 [16] ca factori de risc pentru afectarea hepatică toxică indusă de acidul valproic. Deși aceste modificări sunt asociate mai ales cu expunerea cronică la acid valproic, apartenența pacienților din lotul de studiu la intervalul de vârstă 5-6 ani, diagnosticul de epilepsie și tratamentul cronic cu acid valproic, anterior expunerii toxice, pot să explice alterarea marcată a valorilor aminotransferazelor. Cele mai mici valori ale aminotransferazelor la internare au fost asociate expunerii acute la izoniazidă. În ceea ce privește funcția hepatică, cuantificată prin valorile bilirubinei totale și ale parametrilor coagulării, am constatat că cele mai importante modificări au apărut în intoxicațiile cu acid valproic, paracetamol și ciuperci.

Încadrarea afectării hepatice în grade de severitate a fost făcută, pentru lotul de studiu, pe baza nivelurilor bilirubinei totale, INR-ului și a manifestărilor clinice. Deoarece alterarea funcției hepatice, exprimată paraclinic prin modificarea nivelurilor bilirubinei și a parametrilor coagulării, apare după ce o proporție importantă de hepatocite a suferit procese de necroză, mi-am propus să analizez dacă și valorile aminotransferazelor, ca indicator de injurie hepatocelulară, variază în funcție de gradul de severitate. Valorile alaninaminotransferazei la internare sunt cele mai mici în forma ușoară de afectare hepatică - 448,82 U/L pentru ca în forma fatală aceste valori să fie de aproximativ 6 ori mai mari - 2956,42U/L. Aceeași evoluție am constatat-o și în cazul valorilor aspartataminotransferazei, existând, de asemenea,

diferențe semnificative între gradele de severitate. Analizând valorile medii ale acestor parametri în dinamica intoxicației acute, am constatat că pentru formele ușoare și moderate de afectare hepatică valorile aminotransferazelor înregistrează inițial o creștere pe parcursul evoluției intoxicației pentru ca ulterior să scadă, în timp ce pentru formele severe sau fatale valorile asociază creșteri constante, la externare sau în momentul decesului pacientului fiind superioare celor de la internare.

IV.3.5. Analiza abordării terapeutice și a duratei spitalizării

Intervalul mediu între expunere și prezentarea într-o unitate medicală a fost de $14,53 \pm 13,13$ ore. Intervalul maxim a fost de 72 de ore, în cazul unui pacient cu expunere acută accidentală la ciuperci necomestibile, iar cel mai mic de 30 de minute, în cazul unei intoxicații acute accidentale cu insecticide inhibitoare de colinesterază.

Pentru lotul studiat intervalul de timp dintre expunerea toxică și instituirea primelor gesturi terapeutice a influențat severitatea afectării hepatice asociate intoxicației acute, cu cât media acestui interval este mai mare, cu atât injuria hepatică este mai severă ($p = 0,007$).

Abordarea terapeutică a pacientului cu intoxicație acută care asociază afectare hepatică trebuie să urmeze, inițial, etapele comune pentru orice intoxicație. Am analizat, astfel, lotul de pacienți din punct de vedere al aplicării metodelor de decontaminare gastrointestinală prin lavaj gastric sau administrare de cărbune activat, al administrării tratamentului antidotiv sau folosirii mijloacelor de epurare extracorporeală.

În lotul studiat, decontaminarea gastrointestinală prin lavaj gastric s-a efectuat în 17 cazuri, reprezentând 22% din totalul cazurilor analizate. Această constatare poate să fie explicată și de intervalul lung de timp între expunere și prezentarea într-o unitate medicală, întrucât utilizarea lavajului gastric, ca metodă de decontaminare gastrointestinală, este recomandată doar primele 60 de minute de la expunere [17]. Cărbunele activat a fost administrat la 6 (7,8%) dintre pacienții din lot, la 5 dintre acești pacienți fiind aplicate, concomitent, ambele metode de decontaminare gastrointestinală.

Tratamentul antidotiv a fost folosit în 58 dintre cazurile analizate (75,3%).

Tehnicile de epurare extracorporeală utilizate la pacienții din lotul de studiu au fost reprezentate de hemoperfuzia pe coloană de cărbune activat, hemodializa și suportul hepatic extracorporeal (dializa hepatică). De aceste tehnici au beneficiat 23 dintre pacienții din lotul de studiu (29,9%). Hemoperfuzia pe coloană de cărbune activat a fost metoda folosită la 19 dintre pacienți, la 6 dintre aceștia într-o singură ședință, iar la ceilalți 13 pacienți, în 2 ședințe. Cele 2 cazuri din lotul analizat la care s-a instituit hemodializa ca metodă de epurare extracorporeală, au fost reprezentate de o intoxicație acută gravă cu colchicină și de o intoxicație plurimedicamentoasă cu paracetamol, antiinflamatoare nesteroidiene și salicilați, ambele cazuri asociind, pe lângă afectarea hepatică și afectare renală severă, insuficiență renală acută. Sistemele de suport hepatic extracorporeal au fost utilizate la 6 dintre pacienții din

lotul de studiu: în cazul a 4 dintre pacienți în asociere cu hemoperfuzia pe coloană de cărbune activat, iar la 2 dintre ei ca unică metodă. Etiologia acestor intoxicații a fost reprezentată de ciuperci, în 5 dintre cazurile analizate, și de acid valproic, într-un caz.

Analizând distribuția lotului de studiu în funcție de abordarea terapeutică și severitatea afectării hepatice am obținut date interesante. Astfel, metodele de decontaminare gastrointestinală au fost asociate, semnificativ statistic, cu evoluția către o formă ușoară de afectare hepatică, în timp ce pentru pacienții la care nu s-au folosit, s-a constatat o evoluție mai frecventă către forma severă de afectare hepatică toxică ($p < 0,05$, Fisher's exact test). În ceea ce privește tratamentul cu antidot, deși cele mai multe cazuri la care s-a folosit au evoluat către o formă ușoară de afectare hepatică, analiza statistică nu a identificat o asociere semnificativă între instituirea acestui tratament și forma ușoară de afectare hepatică.

Tehnicile de epurare extracorporeală sunt metode costisitoare și cu o disponibilitate redusă. În consecință, constatarea că folosirea acestor metode a fost asociată semnificativ statistic ($p < 0,05$, Fisher's exact test) cazurilor cu forme grave de afectare hepatică ($n = 15$, 75%), este plauzibilă și nu indică o eficiență redusă a acestora, ci, mai degrabă, o utilizare limitată la cazurile cu severitate crescută.

Durata medie de spitalizare, pentru pacienții din lotul studiat, a fost de $6,53 \pm 6,1$ zile, cu o durată mediană de 5 zile și una modală de 4 zile. Datele obținute diferă de cele din literatură, majoritatea autorilor raportând o durată medie de spitalizare pentru cazurile cu intoxicație acută de 2-4 zile [18][19][20]. Această constatare subliniază faptul că intoxicațiile acute care asociază afectare hepatică au o severitate mai mare, necesitând o spitalizare prelungită.

Pentru marea majoritate a etiologiilor identificate în lotul de studiu durata medie de spitalizare a fost de peste 5 zile. Expunerile toxice nemedicamentoase au necesitat perioade de spitalizare mai mari, comparativ cu expunerile medicamentoase ($7,10 \pm 6,73$ zile, versus $5,42 \pm 4,57$, pentru cele medicamentoase), dar această diferență nu este semnificativă statistic ($p = 0,2$, t-test).

Cea mai mică durată de spitalizare s-a înregistrat în cazul pacienților care au asociat forme fatale de afectare hepatică, decesul, secundar injuriei hepatice, survenind după o perioadă medie de $3,14 \pm 0,9$ zile. Această constatare subliniază, încă o dată, severitatea intoxicațiilor care asociază afectare hepatică toxică. Așa cum ne așteptam, intoxicațiile care asociază forme ușoare de afectare hepatică au avut o durată de spitalizare mai mică decât cele care au asociat forme moderate sau severe.

IV.3.6. Analiza deceselor

În lotul pacienților cu intoxicație acută care au asociat afectare hepatică s-au înregistrat 13 decese, reprezentând 16,9% din totalul cazurilor din lotul de studiu. Etiologia deceselor a fost următoarea: insecticide inhibitoare de colinesterază – 4 cazuri, nitriți - 1 caz, ciuperci necomestibile - 7 cazuri, colchicină – 1 caz. Deși

ciupercile sunt cel mai frecvent agent etiologic identificat în lotul deceselor, analiza statistică nu a identificat o asociere semnificativă între intoxicația cu ciuperci și evoluția către deces ($p = 0,56$, Fisher's exact test). Riscul de deces nu diferă substanțial comparativ cu cel din intoxicațiile cu alte etiologii din lotul studiat. Analiza statistică evidențiază, însă, o asociere semnificativă între intoxicația cu insecticide inhibitoare de colinesterază și evoluția către deces ($p < 0,05$, Fisher's exact test), doar 3 dintre cei 7 pacienți cu intoxicație acută cu insecticide supraviețuind.

Am analizat lotul de pacienți decedați în funcție de manifestările clinice, modificările paraclinice asociate și abordarea terapeutică pentru a identifica eventuali factori de risc pentru deces.

Dintre manifestările clinice specifice afectării hepatice, au reprezentat factori de risc pentru deces hepatomegalia, icterul, encefalopatia și manifestările hemoragice. Folosind metoda regresiei logistice, am identificat că doar asocierea manifestărilor hemoragice constituie factor predictiv pentru deces, independent de alte variabile, în cazul pacienților cu intoxicație acută care asociază și afectare hepatică. Afectarea multisistemică a fost observată la un număr mare dintre pacienții din lotul de studiu. Dintre manifestările extrahepatice, convulsiile, șocul și afectarea renală au fost, de asemenea, asociate cu creșterea riscului de deces.

Analiza parametrilor paraclinici în raport cu riscul de deces, a evidențiat faptul că hipoglicemia este modificarea cu cel mai mare impact asupra riscului de deces, pacienții care au asociat modificări ale glicemiei având un risc de deces de 26 de ori mai mare comparativ cu cei la care valorile glicemiei au fost în limite normale. Prin regresie logistică, am identificat că, dintre parametrii biochimici uzuali, valorile bilirubinei totale și ale INR-ului constituie factori predictivi pentru deces, independent de alte variabile.

Analizând decesele în funcție de abordarea terapeutică, am constatat că decontaminarea gastrointestinală prin lavaj gastric sau administrarea de cărbune activat nu a avut nici un impact asupra stării finale a pacienților din lotul de studiu. Analiza riscului de deces la pacienții care au primit antidot ne arată că administrarea tratamentului antidotic poate fi considerată factor de protecție în intoxicațiile acute. Tehnicile de epurare extracorporeală și de suport hepatic extracorporeal au fost folosite la 23 dintre pacienții analizați, reprezentând 29,9% din totalul cazurilor. Analiza riscului de deces, în raport cu aplicarea acestor tehnici, identifică o mortalitate mai mare în rândul pacienților la care s-au instituit aceste metode.

V. CERCETARE FUNDAMENTALĂ: EVALUAREA BIOMARKERILOR HEPATICI UZUALI, A ASPECTELOR HISTOPATOLOGICE ȘI A UNOR NOI BIOMARKERI LA ANIMALELE DE LABORATOR, DUPĂ ADMINISTRAREA UNOR SUBSTANȚE CU POTENȚIAL TOXIC HEPATIC

V.1. INTRODUCERE . OBIECTIVE

Ipoteza de lucru a fost: afectarea hepatică poate să apară după expunerea la diferite substanțe medicamentoase sau nemedicamentoase. Afectarea toxică a ficatului poate acoperi un spectru larg de modificări, de la creșteri asimptomatice ale parametrilor biochimici, până insuficiență hepatică acută sau deces, evoluția depinzând, în mare măsură, de tipul de toxic și de doza la care organismul a fost expus. Pentru diagnosticarea injuriei hepatice sunt folosiți în practica curentă o serie de parametri biochimici, cunoscuți sub denumirea de teste funcționale hepatice. Întrucât acești parametri se modifică abia după ce leziunile hepatocelulare sunt constituite și modificările nu sunt proporționale cu extensia leziunilor hepatice, este nevoie de noi markeri biologici care să faciliteze o diagnosticare precoce a afectării hepatice toxice, permițând o intervenție terapeutică rapidă și ținută.

Pentru a demonstra această ipoteză de lucru, am studiat modul în care diverse substanțe cu potențial hepatotoxic cunoscut alterează, din punct de vedere structural și funcțional, ficatul. În acest scop, animalele de laborator au fost expuse la paracetamol, izoniazidă și acid valproic. Am urmărit în ce măsură aceste expuneri toxice determină modificări histopatologice și ale profilului biochimic și, totodată, modul în care aceste modificări sunt influențate de doza administrată și de momentul evaluării paraclinice. Într-o etapă ulterioară am analizat o serie de markeri biologici: lactat dehidrogenaza, interleukina 1 α , malonilaldehida și unele fracțiuni de ARN, cu scopul de a verifica dacă modificările acestor parametri sunt asociate injuriei hepatice cu o specificitate și o sensibilitate superioare parametrilor hepatici uzuali.

Planul de lucru experimental a cuprins următoarele obiective:

1. Aprecierea modului în care expunerea la paracetamol, izoniazidă și acid valproic influențează parametrii biochimici uzuali: alanin-aminotransferaza, aspartat-aminotransferaza, fosfataza alcalină, bilirubina serică totală.
2. Caracterizarea modificărilor histologice hepatice induse de expunerea la doze toxice de paracetamol, acid valproic și izoniazidă
3. Evaluarea unor noi markeri biologici la animale de laborator la care injuria hepatică a fost indusă prin administrarea unor doze toxice de paracetamol

V.2. STUDIUL 1 - EVALUAREA PARAMETRILOR HEPATICI UZUALI LA ANIMALELE DE LABORATOR, DUPĂ ADMINISTRAREA UNOR SUBSTANȚE CU POTENȚIAL TOXIC HEPATIC

V.2.1. Ipoteză de lucru. Obiective.

Administrarea unor substanțe cu potențial hepatotoxic determină modificări ale parametrilor biochimici hepatici care variază în funcție de tipul de toxic, de doza administrată și de intervalul de timp dintre expunerea toxică și momentul testării. Pornind de la aceste date, în cadrul studiului personal experimental, am încercat să evidențiez efectele pe care paracetamolul, acidul valproic sau izoniazida le au asupra structurii hepatice, prin evaluarea parametrilor biochimici specifici.

Studiul de față și-a propus să stabilească modul în care expunerea la paracetamol, acid valproic și izoniazidă modifică o serie de parametri biochimici hepatici la animalele de laborator care au fost tratate cu acești compuși cu potențial hepatotoxic cunoscut. Pentru îndeplinirea acestui obiectiv s-au realizat mai multe experimente.

V.2.2. Material și metodă

- **Animale utilizate**

În cadrul acestei etape s-au folosit șobolani rasa Wistar masculi, cu greutatea cuprinsă între 250-300 de grame. Animalele au fost furnizate de biobaza Universității de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București. Fiecare lot de experiment a fost alcătuit din 12 animale de laborator.

- **Substanțe utilizate:** paracetamol, acid valproic, izoniazidă, soluție ser fiziologic

Soluțiile de paracetamol, acid valproic și izoniazidă au fost realizate după dizolvarea acestora cu clorură de sodiu 9‰. Concentrațiile soluțiilor au fost calculate astfel încât să se administreze un volum de 0,1 ml/10 grame de animal, iar lotul martor a primit soluție de ser fiziologic, câte 0,1 ml/10 grame de animal.

- **Protocol de lucru**

Parametrii biochimici analizați au fost alanin-aminotransferaza (ALT), aspartat-aminotransferaza (AST), fosfataza alcalină (FAL) și bilirubina totală. La șobolani, recoltările s-au făcut după ce acestora li s-au administrat paracetamol, acid valproic și izoniazidă oral, prin gavaj. Determinările biochimice au fost făcute la 2 ore, la 24 și 48 de ore de la expunerea toxică, pentru recoltarea probelor folosindu-se protocolul prezentat.

V.2.3. Rezultate și discuții

A.1. Evoluția ALT după administrarea de paracetamol, acid valproic și izoniazidă

Analizând în dinamică valorile alanin-aminotransferazei pentru cele 3 toxice folosite, am constatat că pentru lotul expus la paracetamol valorile acestui parametru se modifică din primele 2 ore de la administrare, asociind creșteri importante în toate cele 3 momente ale experimentului. Astfel, la 2 ore, valorile ALT înregistrează o creștere cu 127% față de lotul martor, la 24 de ore, cu 3622%, iar la 48 de ore aceste

valori continuă să se modifice, înregistrând o creștere cu 4300% față de martor. Pentru loturile expuse la izoniazidă și acid valproic, la 2 ore de la expunere, creșterea valorilor medii ale ALT a fost modestă în raport cu lotul martor, pentru lotul expus la izoniazidă, înregistrându-se o creștere a valorii medii cu 12%, respectiv 17%, pentru lotul expus la acid valproic. Atunci când testarea acestui parametru s-a efectuat la 24 de ore de la expunere, în aceste 2 loturi s-au înregistrat valori semnificativ mai mari comparativ cu lotul martor, dar cu aproximativ 50% mai mici comparativ cu cele obținute postexpunere la paracetamol. Totuși, după primele 24 de ore de la expunere, am constatat o stabilizare a valorilor ALT, rezultatele obținute la 48 de ore de la expunerea toxică fiind similare cu cele ale loturilor pentru care evaluarea acestui parametru de injurie hepatocelulară s-a realizat la 24 de ore postexpunere.

În urma acestui experiment putem concluziona că, dintre cele 3 substanțe cu potențial hepatotoxic, paracetamolul este asociat cu creșterile cele mai precoce și mai severe ale alanin-aminotransferazei, valorile menținând un trend crescător în toate etapele de analiză. În cazul expunerii la celelalte 2 substanțe hepatotoxice, modificările valorilor medii ale ALT sunt comparabile pentru toate cele 3 momente ale experimentului, sugerând un efect citotoxic similar.

A.2. Evoluția AST după administrarea de paracetamol, acid valproic și izoniazidă

În finalul acestui experiment am constatat că și pentru aspartat-aminotransferază cele mai mari valori s-au obținut în cazul expunerii la paracetamol, pentru toate cele 3 momente de determinare. Astfel, la 2 ore, s-a înregistrat o creștere cu 74% față de valorile lotului martor, la 24 de ore, cu 190%, iar la 48 de ore, valorile au fost de 10 ori mai mari comparativ cu martorul (creștere cu 1016%). Pentru loturile expuse la izoniazidă și acid valproic creșterile înregistrate la 2 ore postexpunere au fost modeste, cu 42%, respectiv 40% comparativ cu lotul martor. La 24 de ore de la expunerea la dozele toxice de izoniazidă, valoarea medie a AST a fost cu 135% mai mare, iar la 48 de ore s-a înregistrat o creștere cu 487%. Pentru lotul expus la acid valproic creșterile au fost comparabile, cu 93% la 24 de ore, respectiv 372% la 48 de ore.

A.3. Evoluția fosfatazei alcaline după administrarea de paracetamol, acid valproic și izoniazidă

Întrucât fosfataza alcalină este un marker de disfuncție hepatobiliară, putem concluziona că toate aceste toxice asociază un grad de injurie canaliculă, exprimată biochimic prin creșterea acestui parametru. Totuși, creșterile înregistrate au fost modeste, pentru nici una dintre substanțe raportul ALT/FAL nu a fost ≤ 2 , aspect sugestiv tipului colestatic de injurie hepatică.

A.4. Evoluția bilirubinei totale după administrarea de paracetamol, acid valproic și izoniazidă

Întrucât, din experimentele precedente, am constatat că injuria hepatocelulară, cuantificată din punct de vedere biologic prin intermediul nivelurilor serice ale aminotransferazelor, este cea mai severă la 48 de ore de la expunerea toxică,

comparativ cu evaluările făcute la 2 și la 24 de ore postexpunere, am ales acest moment pentru dozarea bilirubinei totale. Analiza valorii medii a bilirubinei totale, la 48 de ore postexpunere, identifică creșteri semnificative statistic pentru toate cele trei toxice comparativ cu lotul martor ($p < 0,05$, testul t). Pentru lotul expus la paracetamol, creșterea a fost de 60%, pentru izoniazidă, de 52%, și pentru acid valproic, de 45% față de lotul martor. Putem concluziona că, în prezența modificărilor enzimelor de citoliză hepatică (alanin-aminotransferaza și aspartat-aminotransferaza), creșterile bilirubinei totale sunt un indicator de alterare a funcției hepatice care apare precoce, încă de la 48 de ore de la expunere, pentru toate cele 3 toxice folosite în cadrul experimentului.

În urma acestui studiu am putut concluziona că parametrii biochimici hepatici folosiți în practica curentă pentru definirea injuriei hepatice: alanin-aminotransferaza, aspartat-aminotransferaza și fosfataza alcalină se modifică diferit în funcție de etiologia toxică. Astfel, parametrii de injurie hepatocelulară (ALT, AST) au asociat cele mai importante creșteri la loturile expuse la paracetamol, subliniind faptul că, în cazul acestui tip de expunere toxică, necroza hepatocitară este mai importantă comparativ cu expunerea la izoniazidă sau acid valproic. De asemenea, am constatat că, deși toate cele trei toxice determină modificări ale valorilor aminotransferazelor încă de la 2 ore de la expunerea toxică, în cazul loturilor expuse la paracetamol nivelurile serice ale acestor enzime înregistrează o creștere importantă pe toată durata studiului, în timp ce, pentru izoniazidă și pentru acidul valproic, nivelurile serice se stabilizează după primele 24 de ore de la expunere.

Deși ambele aminotransferaze sunt markeri de injurie hepatocelulară, la debutul injuriei hepatice toxice creșterile aspartat-aminotransferazei sunt mai importante comparativ cu cele ale alanin-aminotransferazei, pentru toate substanțele analizate înregistrându-se un raport AST/ALT supranumerar (2,36 pentru paracetamol, 3,73 pentru acidul valproic și 3,94 pentru izoniazidă). La 24 de ore de la expunere, valorile medii ale ALT le depășesc pe cele ale AST, pentru toate toxicele analizate raportul AST/ALT fiind subunitar, pentru ca la 48 de ore, acest aspect să se mențină doar pentru paracetamol și acid valproic, lotul expus la izoniazidă înregistrând, în acest moment al experimentelor, creșteri mai importante ale aspartat-aminotransferazei.

În ceea ce privește fosfataza alcalină ca marker de disfuncție hepatobiliară, am constatat că cele mai importante creșteri au fost înregistrate la loturile expuse la paracetamol și la izoniazidă, în timp ce expunerea la acid valproic determină creșteri mai modeste ale acestui parametru. Folosind raportul ALT/FAL (raportate ca multipli ai limitei superioare a normalului) [21] pentru clasificarea injuriei hepatice toxice, am constatat că pentru toate cele trei toxice analizate acest raport este mai mare de 5, indicând tipul hepatocelular de afectare hepatică.

V.3. STUDIUL 2 - EVALUAREA MODIFICĂRILOR HISTOLOGICE HEPATICE DUPĂ ADMINISTRAREA UNOR SUBSTANȚE CU POTENȚIAL HEPATOTOXIC

V.3.1. Ipoteză de lucru. Obiective.

Deși evaluarea parametrilor biochimici hepatici specifici este utilă pentru stabilirea diagnosticului de injurie hepatică, biopsia hepatică rămâne „metoda de aur”, furnizând date complexe despre tipul de injurie hepatică pentru un fiecare tip de toxic, despre extensia și severitatea leziunilor, precum și despre evoluția în timp a acestora. Fiind o metodă invazivă, utilizarea acesteia este destul de limitată în practica curentă, evaluarea modificărilor structurale hepatice, secundare expunerilor toxice, făcându-se, mai ales, prin intermediul studiilor experimentale

Pornind de la această observație, în cadrul acestui studiu am evaluat modul în care expunerea la doze toxice de paracetamol modifică structura hepatică, precum și evoluția temporală a leziunilor. Totodată, am analizat care sunt leziunile hepatice cel mai frecvent asociate anumitor tipuri de expuneri toxice, folosind ca substanțe paracetamolul, izoniazida și acidul valproic, agenți farmaceutici cu notabile efecte hepatotoxice. În cadrul acestui studiu mi-am propus să identific un model temporal de evoluție a leziunilor structurale hepatice induse de paracetamol, precum și o analiză comparativă a modificărilor histopatologice, asociate, cel mai frecvent, diverselor etiologii toxice.

V.3.2. Material și metodă

- **Animale utilizate**

În cadrul acestui studiu s-au folosit șoareci albinoși masculi, cu greutate cuprinsă între 25 și 35 de grame și șobolani masculi rasa Wistar, cu greutate cuprinsă între 200 și 250 de grame. Animalele au fost furnizate de biobaza Universității de Medicină și Farmacie “Carol Davila”, București. Pentru experimentul în care s-au urmărit, în dinamică, modificările histologice hepatice după administrarea de paracetamol s-au folosit loturi formate din 12 șoareci, iar pentru experimentul care a vizat evaluarea modificărilor histologice după expunerea la 3 hepatotoxice: paracetamol, acid valproic și izoniazidă, loturile au fost formate din câte 12 șobolani.

- **Substanțe utilizate:** paracetamol, acid valproic, izoniazidă, soluție ser fiziologic

- **Protocol de lucru**

În cazul administrării intraperitoneale, doza de paracetamol folosită a fost de 400 mg/kg. Substanța a fost inițial dizolvată cu clorură de sodiu 9‰, pentru a obține o concentrație care să permită administrarea unui volum de 0,1 ml/grame de șoarece. Lotul martor a primit soluție de ser fiziologic câte 0,1 ml/10 g de șoarece. Evaluarea modificărilor histologice s-a realizat la 30 de minute, la 2 ore, la 24 de ore și, respectiv, la 48 de ore de la expunerea toxică.

În cadrul celui de al doilea experiment al acestui studiu administrarea celor 3 substanțe hepatotoxice s-a realizat prin gavaj, doza de paracetamol fiind de 2000 mg/kg și de 700 mg/kg pentru acid valproic și izoniazidă. Prelevarea probelor hepatice s-a realizat la 48 de ore postexpunere. După obținerea fragmentelor tisulare, s-a realizat o stabilizare în parafină a fragmentelor, urmată, la 4 zile, de

secționarea cu un microtom și obținerea de preparate pentru colorațiile tisulare. După obținerea lamelor, s-a efectuat o stadializare a activității necroinflamatorii, pentru fiecare animal de laborator, și, ulterior, o comparație între mediile scorurilor de necroză obținute.

Pentru a putea evalua modificările structurale hepatice induse prin expunerea la substanțele hepatotoxice, m-am axat pe identificarea ariilor de necroză hepatocelulară și am cuantificat severitatea acestor leziuni hepatice astfel:

- 0 – fără leziuni evidente
- 1 (+) - leziuni congestive și necrotice, limitate la un număr restrâns de hepatocite, localizate, preponderent, în zona centrolobulară (necroză focală)
- 2 (++) – leziuni congestive și necrotice ale hepatocitelor din zona centrolobulară, cu aspect confluent (necroză confluentă zonală)
- 3 (+++) – leziuni congestive și necrotice, confluențe la nivelul zonei centrolobulare, cu extensie către celelalte zone ale lobului hepatic
- 4 (+++++) – zone importante de congestie și necroză hepatocitară, cu aspect confluent, localizate la nivelul întregului lob hepatic, cu extensie către zonele centrolobulare ale lobulilor învecinați (necroză confluentă „în punte”)

Totodată, am urmărit și prezența altor tipuri de modificări histologice: aspecte sugestive modificărilor steatotice (▲) sau reacțiilor inflamatorii marcate (Δ).

Fotografiile realizate după obținerea lamelor s-au efectuat cu ajutorul unui microscop cu cameră digitală Celestron LCD Pentaview.

• **Prelucrarea statistică a datelor**

Datele obținute au fost introduse într-o foaie de calcul Microsoft Office - Excel și interpretate din punct de vedere statistic. Rezultatele obținute sunt prezentate ca medii și deviații standard, iar testarea semnificației statistice s-a realizat folosind testul t-Student, rezultatele semnificative statistic având un $p < 0,05$.

V.3.3. Rezultate și discuții

B.1. Studiu experimental privind modificările histologice înregistrate la animalele de laborator, după administrarea de paracetamol

În urma acestui studiu experimental am observat că, secundar expunerii la doze toxice de paracetamol, la nivelul structurii hepatice apar modificări, începând cu primele 30 de minute de la expunere (valoarea medie a scorului de necroză fiind de 0,41) și că injuria hepatică continuă să progreseze pe toată durata celor 48 de ore postexpunere, ajungând la o valoare medie a scorului de necroză de 3,71.

B.2. Studiu experimental privind modificările histologice înregistrate la animalele de laborator, la 48 de ore după administrarea de paracetamol, acid valproic și izoniazidă

În urma acestui studiu am obținut o serie de observații interesante. Modificările structurii hepatice diferă în funcție de etiologia expunerii toxice, necroza hepatocelulară fiind aspectul dominant în cazul expunerii la paracetamol. Pentru

acidul valproic, leziunile necrotice sunt asociate modificărilor de tip steatotic, iar expunerea la izoniazidă asociază modificări importante de tip inflamator. Alterarea arhitectonicii normale a ficatului apare precoce în cazul expunerii la paracetamol, acestea progresând în mod constant în primele 48 de ore postexpunere.

V.4. STUDIUL 3 - EVALUAREA UNOR NOI BIOMARKERI HEPATICI LA ANIMALELE DE LABORATOR, DUPĂ ADMINISTRAREA UNOR SUBSTANȚE CU POTENȚIAL TOXIC HEPATIC

V.4.1. Ipoteză de lucru. Obiective.

Afectarea hepatică toxică asociază un risc evolutiv către insuficiență acută de organ într-o manieră puțin previzibilă, cu consecințe dramatice asupra întregului organism. Deși determinarea nivelurilor serice ale aminotransferazelor este în prezent metoda cea mai des utilizată pentru cuantificarea injuriei hepatice, acestea se modifică după ce injuria hepatocelulară este deja constituită, iar nivelurile serice se corelează slab cu severitatea modificărilor histopatologice. Înțelegerea mecanismelor patologice implicate în declanșarea procesului de necroză hepatocitară, precum și cuantificarea modificărilor pe care acestea le produc la nivel genomic, al profilului metabolic sau proteic, devine o problemă de maximă importanță. Este nevoie, deci, de identificarea unor noi markeri, care să permită diagnosticarea afectării hepatice cu o sensibilitate și o specificitate superioară aminotransferazelor. În cadrul acestui experiment, mi-am propus evaluarea modului în care expunerea la paracetamol, substanță cu notabile efecte hepatotoxice, modifică nivelurile serice ale lactat dehidrogenazei, interleukinei 1, malonilaldehydei și ale unor fracțiuni ale miARN-ului plasmatic.

V.4.2. Material și metodă

- **Animale utilizate**

Pentru realizarea acestor obiective au fost folosite mai multe loturi de animale de laborator. În cazul determinării lactat dehidrogenazei, interleukinei 1 α și a malonilaldehydei au fost constituite loturi care au inclus 12 șobolani rasa Wistar masculi, cu greutatea cuprinsă între 250-300 de grame. Animalele au fost furnizate de biobaza Universității de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București. Pentru studiul fracțiunilor de miARN, loturile au fost constituite din câte 12 șoareci albinoși masculi, cu greutate cuprinsă între 25 și 35 de grame.

- **Substanțe utilizate:** paracetamol, soluție de ser fiziologic

- **Protocol de lucru**

Pentru determinarea lactat dehidrogenazei, interleukinei 1 α și a malonilaldehydei, paracetamolul a fost administrat prin gavaj, iar în cazul determinărilor miARN-ului substanța a fost administrată injectabil, intraperitoneal, după ce aceasta a fost dizolvată cu clorură de sodiu 9%. Concentrațiile soluțiilor au fost calculate astfel încât să se administreze un volum de 0,1 ml/10 grame de animal. Lotul martor a primit soluție de ser fiziologic, câte 0,1 ml/10 g șoarece.

Concentrațiile lactat dehidrogenazei au fost determinate în trei momente: 2 ore, 24 de ore și 48 de ore, iar pentru interleukina 1 α și malonilaldehidă determinările s-au făcut la 48 de ore de la expunere. Pentru dozarea lactat dehidrogenazei s-au folosit bioanalizoarele utilizate și în cazul parametrilor hepatici uzuali, iar dozarea interleukinei a fost făcută prin metoda ELISA. Pentru determinarea conținutului hepatic de malonil dehidrogenază s-a folosit metoda acidului tiobarbituric [22].

Pentru evaluarea fracțiunilor specifice de miARN s-au făcut determinări la 30 de minute, 2 ore și respectiv, 24 de ore de la administrarea paracetamolului în doză de 400mg/kg (doza toxică). Pentru fiecare moment de determinare, șoarecii au fost aneșteziți cu eter etilic și s-au prelevat câte 0,4 ml sânge. Întreaga cantitate de sânge obținută a fost centrifugată timp de 10 min. la 14000 G. Plasma rezultată după centrifugare a fost decantată și stocată la -80°C. MiARN-ul a fost purificat din plasmă utilizând MiRNeasy Mini kit (Qiagen Sciences). Screeningul întregului genom s-a făcut prin reacții de polimerizare în lanț: RT miARN PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) după un protocol furnizat de producător (SABiosciences, Qiagen), iar în etapa următoare s-a realizat o evaluare cantitativă a expresiilor genice, folosind o a doua reacție de polimerizare în lanț RT-qPCR (Real time Quantitative Polymerase Chain Reaction). Datele obținute astfel au fost analizate cu ajutorul unui soft pus la dispoziție de producător: <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>

- **Prelucrarea statistică a datelor**

Prelucrarea statistică a datelor s-a realizat prin calcularea mediilor și a deviațiilor standard, iar pentru testarea semnificației statistice s-a folosit testul t Student.

V.4.3.Rezultate și discuții

C.1. Evaluarea lactat dehidrogenazei după administrarea de paracetamol

Am constatat că valorile lactat dehidrogenazei la lotul expus la paracetamol cresc în toate cele 3 momente ale experimentului, diferențele față de cele înregistrate la lotul martor fiind semnificative din punct de vedere statistic ($p < 0,05$, testul t). Întrucât lactat dehidrogenaza este o enzimă intracitoplasmatică ale cărei niveluri serice sunt influențate de integritatea hepatocitului, am analizat, în continuare, dacă magnitudinea creșterii înregistrate de acest parametru este superioară celor înregistrate în cazul altor enzime intrahepatocitare. Astfel, pentru loturile expuse la paracetamol, am comparat creșterile lactat dehidrogenazei, exprimate procentual în raport cu lotul martor, cu cele ale alanin-aminotransferazei. Am constatat că valorile ALT înregistrează creșteri mult mai importante în toate momentele în care aceste 2 enzime au fost evaluate, astfel încât lactat dehidrogenaza nu poate fi considerată un marker de injurie hepatică cu sensibilitate mai mare decât a alanin-aminotransferazei.

C.2. Evaluarea interleukinei 1 α după 48 de ore de la administrarea de paracetamol

Analiza valorilor medii ale interleukinei 1 α a identificat, pentru lotul expus la doze toxice de paracetamol, o valoare semnificativ mai mare comparativ cu cea a lotului martor, înregistrând o creștere cu 318% (1,86 pg/ml versus 0,44 pg/ml pentru lotul martor, $p < 0,000001$, testul t). Putem concluziona că, în cazul expunerii la doze toxice de paracetamol, la nivelul structurii hepatice se declanșează o reacție inflamatorie importantă, exprimată biologic prin modificarea concentrațiilor serice ale unor citokine proinflamatorii. Determinarea nivelului seric pentru interleukina 1 α permite semnalizarea asocierii procesului inflamator, precum și cuantificarea magnitudinii acestuia, aspecte extrem de importante, mai ales pentru înțelegerea elementelor agravante în cursul unei injurii hepatice toxice.

C.3. Evaluarea malonilaldehidei după 48 ore de la administrarea de paracetamol

Analiza concentrației medii a malonilaldehidei la nivelul țesutului hepatic a identificat pentru lotul expus la hepatotoxic valori cu 94% mai mari comparativ cu cele înregistrate pentru lotul martor, respectiv 298,37 nmol/g țesut hepatic pentru lotul expus la paracetamol comparativ cu 154 nmol/g țesut hepatic pentru martor ($p < 0,000001$, testul t). Determinarea concentrațiilor hepatice de malonilaldehidă confirmă implicarea stresului oxidativ ca mecanism patogenetic cu rol important în constituirea și progresia injuriei hepatice acute. Această constatare poate să aibă aplicații importante, în special în terapeutică, o intervenție rapidă care să vizeze antagonizarea efectelor oxidative putând limita propagarea injuriei hepatice.

C.4. Evaluarea miARN-ului plasmatic după administrarea de paracetamol

Analizând literatura de specialitate am folosit, pentru a cuantifica diferențele existente între loturile cu expunere toxică și loturile martor în ceea ce privește concentrația miARN, parametrul numit „ fold change value” (FCV) [23][24]. Astfel, concentrația medie a celor 2 forme de miARN, 122, respectiv 192, a fost exprimată ca fold change comparativ cu lotul martor.

Analizând valorile medii ale FVC, am constatat că expresia miARN-122 este mai mare la lotul la care s-a administrat paracetamol comparativ cu cea a lotului martor, încă din primele 30 de minute de la expunerea toxică. În etapa ulterioară a experimentului, atunci când expresia miARN-122 a fost evaluată la 2 ore de la expunerea toxică, am constatat o creștere marcată a FVC (8,33 la 2 ore comparativ cu 2,1 la 30 de minute) pentru ca în următoarele 24 de ore nivelurile să se stabilizeze, valoarea medie a FCV fiind de 8,94. Putem concluziona că nivelurile miARN-122 se pozitivează precoce după expunerea toxică și cea mai importantă creștere a expresiei acestui marker se înregistrează în primele 24 de ore.

Comparând aceste date cu cele obținute în cadrul studiului modificărilor histologice hepatice secundare expunerii la paracetamol, am obținut o serie de observații interesante. Astfel, la 30 de minute postexpunere, scorul de necroză la lotul la care s-a administrat paracetamol este similar cu cel al lotului martor, în timp ce valorile miARN-122 înregistrează o dublare comparativ cu martorul (FCV = 2,1).

Am analizat momentul în care nivelul miARN înregistrează cea mai importantă creștere, respectiv la 2 ore postexpunere, comparativ cu modificările histologice și am constatat că, deși raportat la lotul martor, creșterile miARN-122 sunt extrem de importante (FCV = 8,33), modificările histopatologice înregistrate au fost minime, marea majoritate a animalelor evaluate prezentând zone de necroză limitate la un număr restrâns de hepatocite. Aceste observații permit concluzia că miARN-122 este un indicator precoce de injurie hepatică, nivelurile crescând înaintea constituirii unor leziuni histopatologice evidente.

În ceea ce privește expresia miARN-192, deși la 30 de minute postexpunere se înregistrează o creștere comparativ cu lotul martor, magnitudinea acesteia este inferioară celei înregistrate în cazul miARN-122 (0,62, versus 2,1), această diferență menținându-se și atunci când determinările au fost făcute la 2 ore și la 24 de ore de la expunerea toxică.

VI. STUDII DE CAZ

- VI.1. Intoxicație acută voluntară cu izoniazidă
- VI.2. Intoxicație acută accidentală cu ciuperci cu perioadă lungă de incubație
- VI.3. Intoxicație acută accidentală cu acid valproic
- VI.4. Intoxicație acută voluntară cu colchicină
- VI.5. Intoxicație acută voluntară cu paracetamol și acid acetilsalicilic

VII. PROTOCOL DE DIAGNOSTIC ȘI TRATAMENT AL AFECTĂRII HEPATICE ÎN INTOXICAȚIILE ACUTE LA COPIL

Intoxicațiile acute reprezintă urgențe medicale din cauza potențialului evolutiv extrem de sever. Abordarea pacientului intoxicat are ca punct de plecare o anamneză cât mai detaliată și un examen clinic riguros, pe baza cărora poate fi formulat un diagnostic și, ulterior, elaborat și aplicat un plan terapeutic specific etiologiei.

VII.1. Evaluarea clinică și paraclinică a pacientului cu intoxicație acută care asociază și afectare hepatică

VII.1.1. Diagnosticul clinic

În cazul pacienților de vârstă pediatrică, datele anamnestice sunt, în general, obținute de la aparținători și trebuie să conțină informații despre etiologia expunerii (substanța toxică, concentrația, denumirea comercială în eventualitatea în care există asocieri de substanțe în cadrul aceluiași produs), magnitudinea expunerii (cantitatea de toxic la care pacientul a fost expus) și încadrarea în doze toxice, prin raportarea la greutatea corporeală, precum și despre momentul ingestiei. Tot în cadrul anamnezei trebuie obținute informații legate de statusul pacientului anterior expunerii, în sensul prezenței comorbidităților (inclusiv tulburări de natură psihiatrică)

sau a eventualelor tratamente cronice, întrucât o situație frecvent întâlnită este cea a intoxicațiilor acute voluntare, cu medicamente din cadrul medicației curente a pacientului respectiv.

O atenție deosebită trebuie acordată manifestărilor clinice pe care pacientul le-a asociat postexpunere, pentru o estimare inițială a severității intoxicației și, implicit, a necesității inițierii unor intervenții terapeutice de urgență. Asocierea anumitor manifestări clinice poate, de asemenea, sugera etiologia toxică, chiar dacă expunerea nu este confirmată de către pacient sau aparținători.

Examenul clinic trebuie să cuprindă, în primul rând, evaluarea rapidă a parametrilor vitali (frecvență respiratorie, frecvență cardiacă, tensiune arterială, temperatură) și a stării de conștiență, precum și identificarea principalelor sindroame toxice caracteristice (toxidroame). În situația în care, pe baza anamnezei, s-a ridicat suspiciunea expunerii la substanțe cu potențial hepatotoxic, este necesară o evaluare atentă a structurii hepatice, precum și identificarea semnelor clinice asociate disfuncției hepatice severe: icter, faetor hepatic, diateză hemoragică, prezența manifestărilor neurologice specifice encefalopatiei hepatice.

VII.1.2. Diagnosticul paraclinic

Investigațiile paraclinice urmăresc identificarea prezenței injuriei hepatice, stabilirea etiologiei, fie prin confirmarea expunerii toxice, atunci când acest lucru este posibil, fie prin excluderea altor cauze de afectare hepatică acută, stabilirea severității și a riscului evolutiv către insuficiență hepatică acută, precum și instalarea unor complicații renale, septice, metabolice, neurologice sau cardiace, asociate frecvent stadiului final al evoluției unei injurii hepatice acute.

Teste pentru stabilirea prezenței și severității injuriei hepatice: aminotransferaze (ALT, AST), bilirubina totală, precum și fracțiunile directă și indirectă, fosfataza alcalină, glicemie, parametrii coagulării (timp Quick, INR), amoniemie, proteine serice și electroforeza proteinelor, hemoleucogramă completă, ultrasonografie abdominală, grup sanguin și Rh, dacă starea pacientului este sever alterată și se preconizează necesitatea terapiei substitutive.

Teste pentru stabilirea etiologiei injuriei hepatice: determinări toxicologice din sânge și/sau urină, teste serologice pentru etiologia hepatitică A, B, C, E, dar și pentru afectarea hepatică din cadrul infecției cu virusul Ebstein Barr, Citomegalovirus sau Herpesvirus, cupremie, cuprurie, ceruloplasmină, autoanticorpi atunci când anamneza nu este sugestivă pentru expunerea la substanțe cu potențial hepatotoxic și contextul clinic este sugestiv pentru boală Wilson sau hepatită autoimună.

Probele paraclinice trebuie completate și cu teste care permit evaluarea multiplelor complicații ale insuficienței hepatice acute, dacă această formă severă de afectare hepatică este identificată:

- Complicații renale: uree, creatinină, ionogramă urinară, proteinuria pe 24 de ore, examen de urină și sediment urinar

- Complicații metabolice: ionogramă serică, cu evaluarea principalilor electroliți – sodiu, potasiu, clor, echilibru acido-bazic, inclusiv nivelul seric de lactat cu rol prognostic
- Complicații pulmonare: radiografie pulmonară, pentru evidențierea edemului pulmonar acut
- Complicații cardiace: monitorizarea frecvenței cardiace și a tensiunii arteriale, electrocardiogramă cu 12 derivații
- Complicații neurologice: monitorizarea presiunii intracraniene la pacienții cu encefalopatie grad IV [25], EEG, examene imagistice de tipul computer-tomografiei sau rezonanței magnetice nucleare
- Complicații septice: markeri inflamatori, culturi din sânge și din urină

VII.2. Principii de tratament al intoxicațiilor acute care asociază afectare hepatică

Abordarea terapeutică a pacienților cu intoxicații acute care asociază afectare hepatică presupune, inițial, parcurgerea etapelor comune tuturor intoxicațiilor acute, cunoscând, pentru fiecare etapă, metodele cele mai eficiente pentru substanțele cu potențial hepatotoxic:

1. Evaluarea și stabilizarea funcțiilor vitale
2. Limitarea absorbției toxicului depinde de calea de pătrundere în organism și presupune decontaminarea gastrointestinală, pentru expunerea pe cale orală, spălarea cu apă, pentru expunerea tegumentară sau oculară, scoaterea pacientului din mediu și, eventual, oxigenoterapie pentru expunerea inhalatorie
3. Accelerarea eliminării toxicului poate fi realizată prin metode de epurare extracorporeală. Alegerea metodei de epurare extracorporeală depinde de proprietățile fizico-chimice ale toxicului și de capacitatea de legare de proteinele plasmatic. Astfel, hemodializa este indicată pentru hepatotoxicele cu greutate moleculară mică și cu hidrosolubilitate crescută: acid acetilsalicilic, acid valproic. Hemoperfuzia pe coloană de cărbune activat este deosebit de utilă pentru intoxicația cu ciuperci cu perioadă lungă de incubație, în special din specia *Amanita Phalloides*, dar și pentru acetaminofen, acid valproic și salicilați
4. Tratamentul antidotic este deosebit de util, dar este aplicabil doar în situațiile în care, pentru toxicul incriminat, există un astfel de tratament. În ceea ce privește intoxicațiile cu substanțe hepatotoxice, utilizarea tratamentului antidotic este limitată la intoxicația cu paracetamol (N acetilcisteina), ciuperci (penicilina G) și intoxicația cu fier (deferoxamina)

Tratamentul afectării hepatice asociate intoxicațiilor acute este unul ierarhizat, în funcție de severitatea injuriei hepatice. Când tabloul clinic și paraclinic nu indică evoluția către insuficiență hepatică acută, tratamentul afectării hepatice toxice este unul suportiv și presupune:

- Regim dietetic hipercaloric, bogat în carbohidrați, dar cu conținut lipidic și proteic limitat, dacă pacientul tolerează aportul oral
- Corectarea dezechilibrelor hidroelectrolitice asociate, folosind soluții cristaloide și electroliți, în funcție de pierderile calculate
- Menținerea valorilor glicemiei peste 60 mg/dl, prin administrarea de soluții de glucoză 5% sau 10%
- Agenți hepatoprotectori: silimarina în doză de 5 mg/kg/zi, care poate fi crescută până la 20-50 mg/kg/zi în intoxicația cu ciuperci necomestibile din specia *Amanita phalloides* [26]

Atunci când sunt identificate manifestările clinice sugestive insuficienței hepatice acute, pacientul trebuie transferat într-o secție de terapie intensivă pediatrică. Trebuie avut în vedere faptul că transplantul hepatic reprezintă singura metodă terapeutică eficientă și că evoluția pacienților către decompensare este imprevizibilă, dar favorizată de multitudinea de complicații asociate: hemoragice, renale, cardiovasculare, neurologice, metabolice sau infecțioase, care necesită tratament precoce și țintit.

VIII. CONCLUZII FINALE. ORIGINALITATEA STUDIULUI

VIII.1. Concluzii finale

1. Studiul personal a urmărit o analiză detaliată a afectării hepatice de natură toxică. Este primul studiu național în care, pentru evaluarea injuriei hepatice toxice, au fost folosite date de toxicologie clinică, dar și de toxicologie experimentală. Datele clinice au fost obținute în cadrul unui studiu retrospectiv bicentric, pe o perioadă de 5 ani (2010-2014) pe un lot de pacienți cu vârsta cuprinsă între 0 și 18 ani, care au fost diagnosticați cu intoxicație acută și care au asociat, de la prezentare sau în evoluție, afectare hepatică. Datele experimentale au vizat evaluarea modificărilor histopatologice și biochimice induse de expunerea la unele dintre substanțele cu potențial hepatotoxic, identificate în cadrul studiului clinic, precum și a unor noi markeri de diagnostic ai injuriei hepatice.

2. Analiza retrospectivă a cazurilor de intoxicație acută internate în cele două centre antitoxice din București și Cluj Napoca, în perioada ianuarie 2010 - decembrie 2014, a identificat asocierea unor modificări clinice și paraclinice de afectare hepatică la 77 din totalul celor 4.844 de pacienți. Prevalența afectării hepatice toxice a fost de 1,6% .

3. Vârsta medie a pacienților a fost de 10,3 ani, dar s-au înregistrat cazuri de afectare hepatică toxică în cazul tuturor grupelor de vârstă. Am identificat 3 vârful de incidență, două în perioada de adolescență, la pacienții cu vârsta între 17 și 18

ani (n = 12, 15,5%) și la cei cu vârsta cuprinsă între 14 și 15 ani (n = 8, 10,4%) și unul în cazul copiilor de vârstă mică, la intervalul de vârstă 3-4 ani (n = 7, 9,1%).

4. Analizând intenția expunerii în funcție de parametrii demografici: vârstă, sex și mediu de proveniență, am constatat că intoxicațiile voluntare sunt asociate cu grupa de vârstă 15-18 ani și cu sexul feminin, iar cele accidentale, cu vârsta până în 10 ani și cu sexul masculin, neexistând diferențe în ceea ce privește mediul de proveniență al pacienților.

5. Etiologia intoxicațiilor acute care au asociat afectare hepatică este dominată de toxicele nemedicamentoase (n = 51, 66,2%). Aceste intoxicații au fost și cele mai severe, din totalul celor 13 decese, 12 (92,3%) fiind secundare expunerii la toxice nemedicamentoase. Majoritatea cazurilor de expunere nemedicamentoasă a fost reprezentată de intoxicațiile acute cu ciuperci (78,43%), urmată de cele cu pesticide (15,66%) și de intoxicațiile acute cu substanțe methemoglobinizante - nitriți (3,92%). Elaborarea unor programe naționale de informare a populației asupra potențialului toxic crescut al acestor toxice, utilizate preponderent în mediul rural, sau al folosirii unor surse nesigure de hrană, cum sunt ciupercile sau apa de puț, ar putea contribui la scăderea incidenței acestor intoxicații.

6. Etiologia medicamentoasă a fost identificată la 26 dintre pacienți, reprezentând 33,8% din totalul cazurilor din lotul de studiu. Cele mai multe sunt expuneri la un singur medicament (n = 20, 76,9%), expunerile plurimedimentoase fiind întâlnite doar la 6 dintre pacienții analizați. În cazul expunerilor la un singur medicament, paracetamolul a fost cel mai frecvent agent etiologic identificat, 13 (65%) din cele 20 de astfel de intoxicații fiind secundare expunerii la paracetamol. Și în cazul expunerilor plurimedimentoase etiologia a fost dominată de paracetamol. Cinci (83,33%) dintre cele 6 cazuri identificate în lotul de studiu au fost combinații de paracetamol, în special cu antiinflamatoare nesteroidiene sau salicilați. O constatare interesantă în ceea ce privește intoxicațiile plurimedimentoase a fost aceea că pacienții au asociat atât paracetamolul ca atare, cât și medicamente a căror denumire comercială diferă, dar toate au în compoziție paracetamol: Antinevralgic - combinație de paracetamol cu acid acetilsalicilic, Parasinus – paracetamol, clorfeniramină, pseudoefedrină. Doar 3 dintre intoxicațiile în care a fost implicat paracetamolul au fost accidentale, secundare neglijenței părinților care au depozitat necorespunzător medicamentele, restul fiind intoxicații voluntare, ca tentative de suicid sau parasuicid. Analiza efectuată semnalizează necesitatea impunerii unor măsuri care să permită un control strict al accesibilității pacienților la acest medicament, precum și utilitatea unor campanii de informare asupra potențialul hepatotoxic important al paracetamolului.

7. Analiza etiologiei, în funcție de caracteristicile demografice și circumstanțiale, a identificat o asociere a intoxicațiilor nemedicamentoase cu sexul masculin, grupa de vârstă sub 1 an și expunerea accidentală, iar pentru intoxicațiile medicamentoase, o asociere cu grupa de vârstă 15-18 ani, sexul feminin și caracterul voluntar al expunerii.

8. Afectarea hepatică toxică a avut un spectru larg de manifestări în cadrul lotului de studiu, de la creșteri asimptomatice ale aminotransferazelor, până la tabloul extrem de sever cu afectare neurologică și coagulopatie, specific insuficienței hepatice acute. Manifestările clinice întâlnite la pacienții cu intoxicație acută care au asociat afectare hepatică au fost, în ordinea frecvenței: simptome gastrointestinale de tipul vărsăturilor, durerilor abdominale și modificărilor de tranzit, prezente la marea majoritate a pacienților (94,8%); hepatomegalia în 59,7% din cazuri; icterul la 37,7% dintre cazurile analizate; manifestări neurologice specifice encefalopatiei hepatice în 22,1% din cazuri; manifestări paroxistice convulsive în 22,1% din cazuri; semne specifice de șoc la 20,8% dintre pacienții analizați; semne de afectare renală în 15,6% din cazuri și manifestări hemoragice la 11,7% dintre pacienți. Deși modificarea parametrilor coagulării a fost prezentă la un număr mult mai mare de pacienți ($n = 49$), manifestări hemoragice au asociat doar 18,36 % dintre aceștia, riscul de sângerare nefiind corelat cu modificarea timpilor de coagulare.

9. Încadrarea afectării hepatice asociată fiecărui caz de intoxicație acută din lotul de studiu în grade de severitate, după modelul scalei publicate de Institutul Național pentru Diabet, Boli Digestive și Renale din Statele Unite, a permis constatarea că cele mai multe cazuri au asociat o formă ușoară de afectare hepatică ($n = 39$, 50,6%). Forma moderată a fost întâlnită la 10 dintre pacienții din lotul de studiu, reprezentând 13%, iar cea severă, la 20 dintre pacienți (25,9%). 8 dintre cazuri (10,4%) au asociat o formă fatală de afectare hepatică toxică, responsabilă de evoluția către deces.

10. Analizând manifestările clinice în raport cu gradele de severitate ale afectării hepatice toxice, am constatat că manifestările gastrointestinale au fost prezente la marea majoritate a pacienților, indiferent de gradul de severitate. Icterul, hepatomegalia, manifestările hemoragice, encefalopatia, au fost cu atât mai frecvente, cu cât gradul de severitate al injuriei hepatice a fost mai mare. În ceea ce privește prezența semnelor de șoc, a convulsiilor sau a afectării funcției renale, acestea au fost asociate, mai ales, cu etiologia intoxicațiilor și mai puțin cu severitatea afectării hepatice toxice.

11. Insuficiența hepatică acută, ca etapă finală în evoluția unei injurii hepatice, a fost diagnosticată la 30 dintre pacienți, reprezentând 38,9% din totalul cazurilor analizate. Expunerea nemedicamentoasă a fost cel mai frecvent implicată, toate cazurile fiind reprezentate de intoxicații acute cu ciuperci. Analiza statistică a evidențiat că riscul de evoluție către insuficiență de organ este de 2,1 ori mai mare în cazul intoxicațiilor cu ciuperci comparativ cu alte etiologii. Paracetamolul, singur sau în combinație cu alte medicamente, este principalul agent etiologic medicamentos, responsabil de 77,78% dintre cazurile de expunere medicamentoasă care au evoluat către insuficiență hepatică acută.

12. Modificările aminotransferazelor, ca markeri de injurie hepatocelulară, au fost prezente de la internare la 55 dintre pacienții analizați, în timp ce la 22 dintre pacienți, reprezentând 28,6%, acestea au apărut în evoluția intoxicației. Analiza etiologică a acestor cazuri a identificat insecticidele inhibitoare de colinesterază,

dintre toxicele nemedicamentoase, și paracetamolul și izoniazida, dintre cele medicamentoase, ca principali agenți etiologici pentru care injuria hepatică s-a constituit în evoluția intoxicației acute. Analiza statistică identifică o asociere semnificativă între expunerea la insecticide inhibitoare de colinesterază și asocierea, în evoluție, a afectării hepatice. Cunoașterea toxicelor care pot determina instalarea injuriei hepatice în evoluția intoxicației acute este deosebit de importantă pentru practician, întrucât semnalizează necesitatea urmăririi în dinamică a parametrilor specifici hepatici, chiar dacă valorile inițiale indică lipsa afectării hepatice toxice.

13. Folosirea unor markeri care să permită diagnosticarea injuriei hepatice toxice înaintea constituirii leziunilor de necroză hepatocelulară, exprimate biochimic de modificarea nivelului seric al aminotransferazelor, devine, astfel, extrem de importantă. În studiul experimental, efectuat în a doua parte a studiului personal, am constatat că valorile miARN-122 s-au modificat precoce, începând cu primele 30 de minute de la expunerea la hepatotoxic, înaintea constituirii unor leziuni histopatologice evidente: scorul de necroză la lotul la care s-a administrat paracetamol a fost similar cu cel al lotului martor la 30 de minute postexpunere, în timp ce valorile miARN-122 înregistrează o dublare comparativ cu martorul. Expresia miARN-192 se modifică, de asemenea, precoce după expunerea toxică, dar magnitudinea creșterii este inferioară celei înregistrate de miARN-122. Deși rezultatele sunt promițătoare, este nevoie de studii suplimentare, în special studii clinice, pentru stabilirea utilității acestor biomarkeri pentru diagnosticarea precoce a injuriei hepatice toxice.

14. În cadrul studiului clinic, durata medie de spitalizare a fost de $6,53 \pm 6,1$ zile. Întrucât în literatura de specialitate durata medie de spitalizare pentru intoxicații acute este între 2 și 4 zile, putem concluziona că asocierea afectării hepatice în tabloul unei intoxicații acute, determină o evoluție mai severă a acesteia, care necesită tratament de specialitate pe o perioadă mai îndelungată.

15. Analiza abordării terapeutice a intoxicațiilor care au asociat afectare hepatică a arătat că limitarea contactului cu toxicul, prin aplicarea metodelor de decontaminare gastrointestinală, a fost asociată cu formele ușoare de afectare hepatică și că tehnicile de epurare extracorporeală au fost asociate cu formele grave de injurie hepatică toxică. Această ultimă constatare nu indică o eficiență redusă a acestor metode, ci o utilizare limitată la cazurile severe, secundar costurilor ridicate și disponibilității reduse.

16. Analiza deceselor identifică, pentru intoxicațiile acute care asociază afectare hepatică, o rată de mortalitate de 16,9%. Etiologia deceselor a fost reprezentată de intoxicația acută cu ciuperci (n = 7, 53,8%), insecticide inhibitoare de colinesterază (n = 4, 30,8%), nitriți (n = 1, 7,7%) și colchicină (n = 1, 7,7%).

17. În cazul pacienților cu afectare hepatică toxică, evoluția către deces a fost asociată cu prezența unor manifestări clinice și a unor modificări paraclinice. Identificarea acestora este deosebit de utilă, acestea putând constitui factori de prognostic, care să permită identificarea precoce a cazurilor cu potențial evolutiv sever, care necesită o intervenție terapeutică precoce și complexă. Dintre

manifestările clinice specifice afectării hepatice, au reprezentat factori de risc pentru deces hepatomegalia, icterul, encefalopatia și manifestările hemoragice. Folosind metoda regresiei logistice, am identificat doar manifestărilor hemoragice ca factor predictiv pentru deces în cazul pacienților cu intoxicație acută care asociază și afectare hepatică. Dintre manifestările extrahepatice, convulsiile, șocul, coma și afectarea renală au fost, de asemenea, asociate cu creșterea riscului de deces. Analiza parametrilor paraclinici, în raport cu riscul de deces, a evidențiat faptul că hipoglicemia este modificarea cu cel mai mare impact asupra riscului de deces, pacienții care au asociat modificări ale glicemiei având un risc de deces de 26 de ori mai mare comparativ cu cei la care valorile glicemiei au fost în limite normale. Prin regresie logistică am identificat că, dintre parametrii biochimici uzuali, valorile bilirubinei totale și ale INR-ului constituie factori predictivi pentru deces, independent de alte variabile.

18. Analiza deceselor în funcție de abordarea terapeutică a permis o serie de observații interesante. Decontaminarea gastrointestinală, prin lavaj gastric sau administrarea de cărbune activat, nu a avut nici un impact asupra stării finale a pacienților din lotul de studiu. Această constatare poate fi explicată de faptul că, dintre cele 18 cazuri din lotul de studiu la care s-a efectuat decontaminarea prin lavaj gastric, doar 3 au ajuns într-o unitate medicală la mai puțin de o oră de la expunere, intervalul considerat optim în cadrul protocoalelor internaționale. Administrarea tratamentului antidot, atunci când etiologia a beneficiat de astfel de tratament, a fost asociată cu o rată de supraviețuire mai mare. Tehnicile de epurare extracorporeală și de suport hepatic extracorporeal au fost folosite la 23 dintre pacienții analizați, reprezentând 29,9% din totalul cazurilor. Analiza riscului de deces, în raport cu aplicarea acestor tehnici, identifică o mortalitate mai mare în rândul pacienților la care s-au instituit aceste metode. Această constatare este explicată de faptul că nu toate toxicele beneficiază de tehnicile de epurare extracorporeală, că metodele de suport hepatic extracorporeal au rolul de susținere temporară a funcției hepatice, dar, mai ales, de faptul că aceste tehnici sunt deosebit de costisitoare și cu o disponibilitate limitată. Pe baza acestor observații, putem concluziona că doar tratamentul antidot a fost asociat cu o creștere a ratei de supraviețuire, dar că în cazul celorlalte mijloace terapeutice eficiența a fost limitată, fie de abaterea de la protocoalele internaționale, fie de disponibilitatea redusă a metodei. Este nevoie, deci, de conceperea și implementarea unor protocoale naționale, care să ofere un plan ierarhizat de abordare a pacientului cu intoxicație acută care asociază afectare hepatică, motiv pentru care studiul personal se încheie cu propunerea unui astfel de protocol de diagnostic și tratament al intoxicațiilor acute care asociază afectare hepatică.

19. Pentru o abordare terapeutică eficientă, este necesară cunoașterea tuturor mecanismelor patogenice prin care se constituie injuria hepatică, dar și a celor care contribuie la extensia leziunilor. În acest sens, în partea experimentală a studiului personal, am urmărit dacă stresul oxidativ, cuantificat prin valorile malonilaldehidei, sau o reacție inflamatorie marcată, cuantificată prin determinarea

nivelului seric de interleukină 1 α , sunt implicate în injuria hepatică toxică, indusă prin expunerea la doze toxice de paracetamol. Am constatat că ambii parametri investigați au suferit modificări importante la lotul cu expunere toxică, subliniind implicarea acestor mecanisme în patogenia injuriei hepatice toxice. Utilizarea acestor biomarkeri în practica curentă poate fi deosebit de utilă, întrucât instituirea unor tratamente țintite ar putea limita progresia leziunilor declanșate de expunerea toxică.

VIII.2. Originalitatea studiului

Studiul de față a pornit de la ideea că expunerea toxică nu are aceleași efecte asupra tuturor organelor și sistemelor de la nivelul organismului uman. Întrucât ficatul este cel mai important organ în cadrul proceselor de detoxifiere ale xenobioticelor, structura hepatică este constant expusă și predispusă la injurie toxică. Perturbarea numeroaselor funcții îndeplinite de acest organ, secundar injuriei toxice, are consecințe serioase asupra întregului organism, dar, deoarece tabloul clinic al afectării hepatice toxice este nespecific, incidența reală a afectării hepatice toxice nu este cunoscută. Pentru clinician, este necesară o bună cunoaștere a entităților cu risc hepatotoxic, a factorilor de risc asociați, a metodelor de diagnosticare rapidă, precum și a celor mai eficiente mijloace terapeutice, obiective pe care mi le-am propus și le-am realizat în cadrul acestui studiu detaliat și complex.

Prima parte a studiului personal este reprezentată de o cercetare retrospectivă, pe o perioadă de 5 ani, a afectării hepatice asociate intoxicațiilor acute. Lotul de studiu a fost selectat dintre cazurile de intoxicații acute internate și tratate în două dintre cele mai importante centre antitoxice de pe teritoriul României: București și Cluj Napoca, fiind primul studiu care evaluează afectarea hepatică toxică la nivel multicentric. Deși prevalența injuriei hepatice toxice nu este foarte mare, în lotul studiat fiind de 1,6 %, acest studiu identifică potențialul evolutiv sever al intoxicațiilor care asociază afectare hepatică, rata mortalității în aceste cazuri fiind de 16,9%.

Pornind de la această constatare, am realizat o analiză amănunțită a cazurilor de intoxicație acută care au asociat afectare hepatică. Am evaluat pacienții din punctul de vedere al caracteristicilor demografice și al circumstanțelor în care a survenit intoxicația, pentru a identifica grupele cele mai expuse. Am stabilit principalii agenți etiologici cu potențial hepatotoxic, am evaluat spectrul de modificări clinice și am apreciat asocierea acestora cu diverse clase etiologice. Afectarea hepatică a fost urmărită în dinamică și, prin evaluarea parametrilor biochimici specifici, au fost identificate cazurile în care aceasta nu a fost evidentă de la internare. Am analizat lotul de studiu și din punctul de vedere al abordării terapeutice, precum și al impactului pe care terapiile aplicate l-au avut asupra evoluției pacienților. Analiza deceselor a identificat aspecte interesante în ceea ce privește etiologia, precum și principalii factori care cresc riscul de deces în rândul pacienților cu afectare hepatică acută toxică, elemente deosebit de utile pentru identificarea grupelor de pacienți cu risc crescut de evoluție către deces.

Un element de originalitate al tezei îl constituie structurarea afectării hepatice toxice pe grade de severitate și conturarea tabloului clinic sugestiv fiecărui grad. De asemenea pentru fiecare dintre gradele de severitate am făcut aprecieri în ceea ce privește etiologia, durata spitalizării, eficienței metodelor terapeutice aplicate.

În a doua parte a studiului personal sunt prezentate rezultatele unui studiu experimental, de asemenea element de originalitate al tezei de doctorat. În cadrul acestei cercetări fundamentale, realizată în colaborare cu Departamentul de Farmacologie Clinică și Toxicologie al UMF „Carol Davila” din București, am urmărit aspectele histopatologice și biochimice asociate injuriei hepatice induse de expunerea la diverse substanțe cu efect hepatotoxic cunoscut. Într-o etapă ulterioară, am evaluat o serie de markeri biologici care să se coreleze mai specific și mai precoce cu injuria hepatică toxică, permițând un diagnostic de suferință hepatică înaintea constituirii leziunilor de necroză hepatocelulară, evaluate în prezent prin modificarea aminotransferazelor. Rezultatele studiului confirmă eficiența acestor biomarkeri în diagnosticul afectării hepatice într-o etapă premergătoare creșterii parametrilor actuali de evaluare hepatică. Aceste constatări permit aprecierea că folosirea în practica curentă a acestor markeri biologici ar putea crește rata de diagnosticare a suferinței hepatice în stadii incipiente, cu impact major asupra evoluției pacienților și constituie o premisă pentru o cercetare clinică ulterioară.

În a treia parte a studiului personal, sunt analizate unele cazuri din lotul de pacienți studiați, prezentate datorită particularităților clinico-evolutive asociate.

În partea finală a studiului am elaborat un algoritm de diagnostic și de tratament al pacienților cu intoxicație acută care asociază afectare hepatică, util pentru o diagnosticare rapidă și pentru instituirea unui tratament ierarhizat și eficient.

BIBLIOGRAFIE

1. Mowry JB, Spyker DA, Brooks DE, Mcmillan N, Schauben JL. 2014 annual Report of the American Association of Poison Control Centers ' National Poison Data System (NPDS):32nd Annual Report. Clin Tox. 2015; 53(10): 962–1146
2. Dinesh S, Towner E, Vincenten J, Segui-Gomez M, Racioppi F. European Report on Child Injury Prevention.
http://www.who.int/violence_injury_prevention/child/injury/world_report/European_report.pdf
3. Nițescu V. Afectarea hepatică și renală în intoxicațiile acute medicamentoase la copil. Protocoale terapeutice. Teză de doctorat. București. UMF Carol Davila. 2007
4. Ulmeanu C, Nițescu V, Bizo A, Gafencu M, Iordache C, Jitareanu C. Epidemiologia intoxicațiilor acute la copil în România- studiu multicentric pe 5 ani.În Congresul Național de Pediatrie; 2011; București.

5. Murray KF, Hadzic N, Wirth S, Bassett M, Kelly D. Drug-related hepatotoxicity and acute liver failure. *J Pediatr. Gastroenterol Nutr.* 2008; 47(4): 395-405
6. Ulmeanu A. Nefropatiile toxice în intoxicațiile acute la copil și adolescent. *Protocole de diagnostic și tratament. Teză de doctorat. București. UMF Carol Davila.* 2013
7. Benichou C. Criteria of drug-induced liver disorders: report of an international consensus meeting. *J Hepatol.* 1990; 11: 272-276
8. Squires HR, Shneider BL, Bucuvalas J, Alonso E, Sokol RJ, Narkewicz MR, Dhawan A, Rosenthal P, Rodriguez-Baez N, Murray KF, Horslen S, Martin GM, Lopez JM, Soriano H, McGuire BM, Jonas MM, Yazigi N, Shepherd RW, Schwarz K, Lobritto S, Thomas DW, Lavine JE, Karpen S, Ng V, Kelly D, Simonds N, Hynan LS. Acute Liver Failure in Children: The First 348 Patients in The Pediatric Acute Liver Failure Study Group. *J Pediatr.* 2006; 148(5): 652-658
9. Pesce MA. Laboratory testing in Infants and Children. In Kliegman RM, Berhman RE, Jenson HB, Stanton BF, editors. *Nelson Textbook of Pediatrics.* 18th ed. Philadelphia, USA: Saunders. 2007; 715: 2943-2954
10. Salerno F, Gerbes A, Gines P, Wong F, Arroyo V. Diagnosis, prevention and treatment of hepatorenal syndrome in cirrhosis. *Gut.* 2007; 56(9): 1310-1318
11. Mathers LH, Frankel LR. Pediatric Emergencies and Resuscitation. In Kliegman RM, Berhman RE, Jenson HB, Stanton BF, editors. *Nelson Textbook of Pediatrics.* 18th ed. Philadelphia, USA: Saunders. 2007; 66: 387-405
12. Fontana RJ, Watkins PB, Bonkovsky HL, Chalasani N, Davern T, Serrano J, Rochon J. Drug-Induced Liver Injury Network (DILIN) Prospective Study: Rationale, Design and Conduct. *Drug Safety: An International Journal of Medical Toxicology and Drug Experience.* 2009; 32(1): 55–68.
13. Tripodi A, Caldwell SH, Hoffman M, Trotter JF, Sanyal AJ. Review article: the prothrombin time test as a measure of bleeding risk and prognosis in liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007; 26(2): 141-148
14. Streetz KL, Tacke F, Koch A, Trautwein C. Acute liver failure. Diagnosis and therapy. *Med Klin Intensivmed Notfmed.* 2013; 108(8): 639-45.
15. Gopaul S, Farrell K, Abbott F. Effects of age and polytherapy, risk factors of valproic acid (VPA) hepatotoxicity, on the excretion of thiol conjugates of (E)-2,4-diene VPA in people with epilepsy taking VPA. *Epilepsia.* 2003; 44(3): 322-328
16. Al-Rouby NM, Gawish SM. Histological Study on the Possible Protective Effect of Nigella Sativa Oil on Experimentally Induced Hepatotoxicity in Albino Rats Treated with Sodium Valproate. *Glo Adv Res J of Med Med Sci.* 2013; 2(4): 90-99
17. Vale JA. Position statement: gastric lavage. American Academy of Clinical Toxicology; European Association of Poisons Centres and Clinical Toxicologists. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1997; 35(7): 711-719

18. Ozdogan H, Davutoglu M, Bosnak M, Tutanc M, Haspolat K. Pediatric poisonings in southeast of Turkey: epidemiological and clinical aspects. *Hum Exp Toxicol*. 2008; 27(1): 45-48
19. Assar S, Hatami S, Lak E, Pipelzadeh M, Joorabian M. Acute poisoning in children. *Pak J Med Sci*. 2009; 25(1): 51-54.
20. Vasavada H, Desai P. Clinical Profile And Outcome Of Children Presenting With Poisoning (A Hospital Based Study). *National Journal of Integrated Research in Medicine*. 2013; 4(4): 1-7
21. Kleiner DE, Chalasani PN, Lee WM, Fontana RJ, Bonkovsky HL, Watkins PB, Hayashi PH, Davern TJ, Navarro V, Reddy R, Talwalkar JA, Stolz A, Gu J, Barnhart H, Hoofnagle JH. Hepatic Histological Findings in Suspected Drug-Induced Liver Injury: Systematic Evaluation and Clinical Associations. *Hepatology*. 2014; 59(2): 661–670
22. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med*. 1990; 9(6): 515-540
23. Zhang Y, Jia Y, Zheng R, Guo Y, Wang Y, Guo H, Fei M, Sun S. Plasma MicroRNA-122 as a Biomarker for Viral-, Alcohol-, and Chemical-Related Hepatic Diseases. *Clin Chem*. 2010; 56(12): 1830–1838
24. Qureshi R, Sacan A. A novel method for the normalization of microRNA RT-PCR data. *BMC Medical Genomics*. 2013; 6(1): S14
25. Riley T, Sadana A. Drug-induced Hepatic Failure. In Brent J, Wallace KL, Burkhart KK, Phillips SD, Donovan WJ, editors. *Critical Care Toxicology. Diagnosis and Management of the Critically Poisoned Patient*. Philadelphia, USA: Elsevier Mosby. 2005; 17: 189-212
26. Ulmeanu C, Ulmeanu A. Intoxicațiile acute cu ciuperci. În Ulmeanu C, Nițescu V, editori. *Intoxicațiile acute la copil și adolescent*. Oltenița, România. Tridonia. 2015; 40: 334-342