

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

„CAROL DAVILA” , BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

DOMENIUL MEDICINĂ

*EFECTELE INTOXICAȚIEI ACUTE CU
ORGANOFOSFORICE ASUPRA STATUSULUI
ENDOCRINOLOGIC*

Coordonator științific:

PROF. UNIV. DR. IOANA MARINA GRINȚESCU

Student-doctorand:

CRISTIAN COBILINSCHI

2019

CUPRINS TEZĂ

Lista cu lucrări științifice.....	3
Lista abrevieri	6
Introducere în tematică	9
PARTEA 1 STADIUL CUNOAȘTERII	15
CAPITOL 1. ASPECTE FIZIOLOGICE ALE SISTEMULUI COLINERGIC	15
1.1. Acetilcolina și receptorii colinergici.....	15
1.2. Butirilcolinesteraza.....	19
1.3. Acetilcolinesteraza.....	21
1.4. Inhibitorii de acetilcolinesterază.....	22
1.5. Carboxilesterazele	25
1.6. Efectele sistemului colinergic asupra sistemului endocrin.....	25
CAPITOLUL 2. SUBSTANȚELE ORGANOFOSFORICE	32
2.1. Scurt istoric – de la descoperirea gazelor de luptă, la insecticide și bioterorism	32
2.2. Proprietăți chimice ale compușilor organofosforici	36
2.3. Utilizarea compușilor organofosforici.....	38
CAPITOLUL 3. INTOXICAȚIA CU INSECTICIDE ORGANOFOSFORICE	41
3.1. Epidemiologie.....	41
3.2. Toxicocinetica pesticidelor organofosforice	43
3.3. Toxicodinamica pesticidelor organofosforice	49
3.4. Manifestări ale intoxicației cu compuși organofosforici.....	54
3.5. Măsurile terapeutice în intoxicația acută cu organofosforice.....	68
PARTEA 2. CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	71
CAPITOLUL 4: Afectarea tiroidiană secundară intoxicației acute cu clorpirifos - studiul 1	73
4.1. Introducere.....	73
4.2. Materiale și metode	75
4.3. Rezultate	77
4.4. Discuții.....	82
4.5. Concluzii.....	84
CAPITOLUL 5. Efectele expunerii acute la organofosforice asupra statusului glicemic – studiu experimental – studiul 2	86
5.1. Introducere.....	86

5.2. Materiale și metode	90
5.3. Rezultate	91
5.4. Discuții.....	96
5.5. Concluzii.....	99
CAPITOLUL 6. Consecințele endocrine secundare stresului acut din cadrul intoxicației cu insecticide organofosforice – studiul 3.....	101
6.1. Introducere.....	101
6.2. Materiale și metode	105
6.3. Rezultate	107
6.4. Discuții.....	114
6.5. Concluzii.....	119
CAPITOLUL 7: Alterări histologice și citologice secundare intoxicației acute cu organofosforice – studiul 4.....	120
7.1. Introducere.....	120
7.2. Materiale și metode	122
7.5. Concluzii.....	141
CAPITOLUL 8: Contribuții cu privire la modificările statusului hormonal secundare intoxicației acute cu organofosforice voluntare la pacienți suicidari – studiul 5	143
8.1. Introducere.....	143
8.2. Materiale și metode	146
8.3 Rezultate	147
8.4. Discuții.....	156
8.5. Concluzii.....	160
CONCLUZII GENERALE.....	162
Importanța și originalitatea rezultatelor tezei.....	164
Bibliografie	165

Introducere

Problema fundamentală

Utilizarea insecticidelor la nivel mondial prezintă o direcție ascendentă în ciuda tuturor reglementărilor instituite atât de Organizația Mondială a Sănătății (OMS), cât și de autoritățile naționale. Deși autoritățile europene și naționale susțin o scădere a cantității totale de pesticide utilizate, acestea nu oferă decât o imagine sintetică asupra situației de fapt, având în vedere că noii compuși sintetizați necesită o cantitate mai mică pentru o eficiență similară.

Cu toate că insecticidele organofosforicele au înlocuit insecticidele organoclorurate, fiind asociate la momentul respectiv cu un grad de toxicitate mai redus, în timp s-a dovedit că aceste substanțe prezintă de asemenea o varietate de efecte nocive atât pentru om, cât și pentru mediu.

În afara de expunerea involuntară, o cauză foarte frecventă de intoxicație cu insecticide organofosforice o reprezintă ingestia voluntară cu scop de suicid. La nivel mondial, OMS a raportat în 2018 că pesticidele reprezintă în continuare cea mai utilizată metodă de suicid.

Studierea efectelor toxice ale compușilor organofosforici a apărut inițial, ca urmare a alterării stării de sănătate a personalului implicat în domeniul agricol. Dincolo de manifestările apărute în context de expunere acută, cercetările au relevat o incidență crescută a disfuncțiilor neurologice, renale și chiar imunologice în rândul fermierilor.

Mecanismele toxice ale insecticidelor organofosforice sunt mult mai complexe decât s-a crezut inițial. Astfel dacă în mod tradițional acești compuși sunt clasificați ca inhibitori de acetilcolinesterază, studiile recente au relevat o varietate de afectări non-colinergice caracterizând astfel un mod de acțiune extrem de complex.

Dincolo de toxidromul acut colinergic și nicotinic, tabloul clinic asociat intoxicației acute cu organofosforice cuprinde de asemenea o paletă diversă de tulburări neurologice care survin la intervale variate de la expunere. Deși mai puțin studiate celelalte afectări de organ, secundare intoxicației contribuie semnificativ la morbiditatea și mortalitatea asociată acesteia. Toxicitatea cardio-respiratorie, spre exemplu, s-a dovedit extrem de severă, atât din cauza tulburărilor de ritm maligne care pot surveni, cât și prin apariția sindromului de detresă pulmonară de cauză toxică.

Intoxicația acută cu organofosforice poate evolua de asemenea subclinc, astfel încât absența manifestărilor acute specifice toxidromului colinergic poate duce la o evoluție insidioasă. Repercursiunile acesteia sunt cu atât mai severe cu cât starea clinică relativ favorabilă nu determină pacientul să solicite ajutor medical.

Interesul cu privire la afectarea endocrină asociată intoxicației acute cu organofosforice a crescut recent în rândul cercetătorilor, odată cu identificarea unei frecvențe crescute a tulburărilor de fertilitate în rândul celor implicați în utilizarea și manipularea insecticidelor. Datele existente deja indică o afectare endocrină mult mai complexă care rezidă în toate axele hormonale. Având în vedere rolul central al funcției endocrine în interfața dintre sistemul nervos central și metabolism, se consideră că tulburările hormonale asociate intoxicației cu insecticide organofosforice sunt responsabile de o afectare sistemică extrem de severă.

Ipoteza de cercetare și obiectivele lucrării

Lucrarea de față are ca premisă principală punerea în evidență a eventualelor modificări hormonale acute la nivelul principalelor axe endocrine care apar în contextul de expunerii acute la insecticide organofosforice. Astfel ceea ce își propune această cercetare este să ofere rezultate mai clare în ceea ce privește tulburările endocrine care survin la pacientul diagnosticat cu intoxicație acută cu compuși organofosforici.

Obiectivele stabilite cuprind în principal determinarea modificărilor cauzate de aceste substanțe la nivelul fiecărei axe endocrine, astfel:

- Identificarea modificărilor la nivelul axei hipotalamo-hipofizo-tiroidiene;
- Evidențierea alterărilor asupra axului hipotalamo-hipofizo-corticosuprarenalian;
- Determinarea efectelor apărute în funcționarea axului somatotrop – factor de creștere insulenic -1 (IGF-1);
- Detectarea modificărilor survenite în secreția prolactinei;

Date fiind interferențele dintre sistemul endocrin și metabolismul glucidic, cercetarea actuală a evaluat de asemenea modificările survenite post expunere la insecticide organofosforice asupra statusului glicemic și insulinei.

Nu în ultimul rând, dincolo evaluarea modificărilor biochimice asociate intoxicației, lucrarea a avut ca obiectiv identificarea modificărilor morfopatologice survenit la nivelul principalelor glande endocrine.

Conținutul lucrării și metodologia cercetării

Teza de față este structurată în opt capitole și se încheie atât cu sintetizarea concluziilor

obținute în fiecare studiu elaborat, precum și cu rezumarea contribuțiilor personale.

Partea generală a lucrării este formată din trei capitole astfel:

CAPITOLUL 1 prezintă fiziologia sistemului colinergic, considerat principala țintă a mecanismelor de acțiune a compușilor organofosforici, precum și implicațiile colinergice de la nivelul sistemului endocrin.

CAPITOLUL 2 descrie evoluția utilizării pesticidelor organofosforice de la descoperire și până în prezent, precum și principalele proprietăți fizico-chimice ale acestora.

CAPITOLUL 3 expune datele epidemiologice, caracteristicile toxicocinetice și toxicodinamice ale insecticidelor organofosforice, precum și principalele manifestări clinice secundare intoxicației cu acest tip de compuși, evidențiindu-se afectările asupra sistemului endocrin.

Metodologia întregii cercetării a fost analizată și aprobată de către Comisia de Etică a Spitalului Clinic de Urgență București.

Partea originală a tezei include o cercetare experimentală materializată în patru studii, la care se adaugă un studiu prospectiv observațional care a inclus pacienți internați în cadrul Spitalului Clinic de Urgență București cu diagnosticul de intoxicație acută cu compuși organofosforici.

CAPITOLUL 4 - *Afectarea tiroidiană secundară intoxicației acute cu clorpirifos - studiul 1*

În prezent insecticidele de tip organofosforic au devenit cele mai utilizate tipuri de pesticide la nivel mondial(1,2). Unul dintre cei mai utilizați compuși organofosforici la ora actuală în domeniul agricol, clorpirifosul, a fost în ultimii ani introdus de către autorități și organizațiile de protecție a mediului pe lista pesticidelor ce ar trebui interzise, având în vedere datele cu privire la efectele sale toxice(3,4).

Clorpirifosul sau acidul fosforotioic O,O-dietil O-(3,5,6 dicloro-piridinil) ester este un tio-organofosforic (*Figura 13*) introdus pe piața pesticidelor de către compania americană Dow încă de la începutul anilor '60(5). În România acest insecticid este comercializat sub denumirea de Reldan 22 EC și este utilizat în principal în combaterea dăunătorilor pentru culturile de rapiță, viță de vie, în livezile de meri sau pentru protejarea cerealelor din depozite(6).

În cazul intoxicației acute cu organofosforice, la fel ca și în cazul traumei sau sepsisului, alterarea axei hipotalamo-hipofizo-tiroidiene este caracterizată de apariția unei hipofuncții tiroidiene fără modificări biochimice clare(7).

Acest studiu experimental prezintă modificările asupra axei tiroidiene induse de administrarea orală de clorpirifos la șobolani de vârstă adultă. Studiul experimental a inclus 20 de șobolani de rasă Wistar de vârstă adultă. Toți șobolanii au fost testați inițial în vederea determinării nivelului bazal al butirilcolinesterazei, fT3, fT4 și TSH. Ulterior întregului lot de studiu i s-a administrat prin intermediul unei sonde oro-gastrice clorpirifos. Determinările hormonale stabilite în protocolul studiului au fost efectuate prin tehnică ELISA sandwich pentru determinări cantitative, utilizând kituri specifice pentru șobolani.

La două ore de la administrarea orală de clorpirifos, stabilirea diagnosticului biochimic al intoxicației s-a efectuat pe baza stabilirii nivelului de inhibare a butirilcolinesterazei. În ceea ce privește evoluția hormonilor tiroidieni la două ore de la intoxicație, s-a obținut o creștere a nivelului de fT3, fT4 și TSH, față de nivelul bazal. Determinarea la 48 de ore de la intoxicație, a relevat totuși o scădere semnificativă a nivelului T3, fapt care încadrează evoluția statusului T3 în trendul datelor deja existente. Măsurătorile efectuate la 48 de ore au indicat o menținere a unui nivel plasmatic crescut de fT4. O explicație a nivelului crescut de T4 în context de intoxicație acută poate fi reprezentată de afectarea conversiei T4 în T3, prin alterarea activității deiodinazelor. La 48 de ore nivelul TSH a scăzut până la o valoare apropiată de cea bazală.

În urma cercetării de față se poate aprecia că rezultatele obținute susțin datele cu privire la efectele toxice ale clorpirifosului asupra funcției tiroidiene. Cu toate acestea, studiul prezintă o particularitate în ceea ce privește nivelul inițial crescut al T3, având în vedere că afectarea tiroidiană eutiroidiană se caracterizează de o scădere rapidă a nivelului de T3. O alta particularitate a acestui studiu este reprezentată de evidențierea modificărilor hormonale care survin foarte rapid post intoxicație, respectiv doar la două ore. Totodată, valoarea crescută a nivelului de TSH la două ore post intoxicație este sugestivă pentru un posibil status hipotiroidian tranzitor.

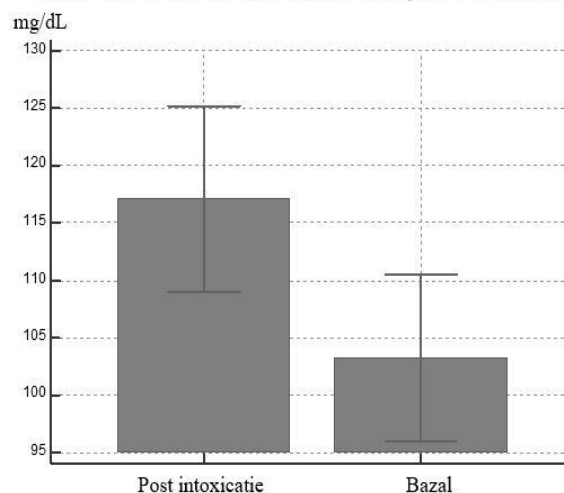
CAPITOLUL 5 - *Efectele expunerii acute la organofosforice asupra statusului glicemic – studiu experimental – studiul 2*

Identificarea efectelor pesticidelor organofosforice asupra metabolismului sunt relativ recente, provenite mai ales din studii experimentale. Ulterior studiile de cohortă efectuate pe

populația activă în domeniul agricol au demonstrat un risc crescut de diabet zaharat în rândul agricultorilor care utilizau astfel de compuși. Mai mult decât atât, s-a dovedit că soțiile fermierilor, care se ocupau de prepararea insecticidelor, au dezvoltat același risc de a dezvolta diabet zahat. Nu în ultimul rând, femeile gravide implicate în activități agricole unde fuseseră aplicate aceste tipuri de insecticide sau care au lucrat la manipularea produselor, au prezentat un risc mai mare de apariție a diabetului gestațional. Având în vedere susceptibilitatea dovedită a populației pediatrie la pesticide, cercetările dedicate disfuncției metabolice au relevat o creștere a tulburărilor endocrine și a riscului de obezitate.

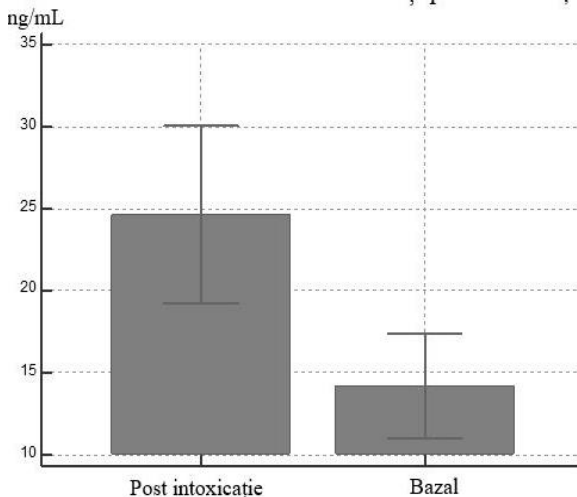
Studiul de față a avut ca scop principal evaluarea statusului metabolic post intoxicație acută cu organofosforice la animale de laborator de vârstă mică. Acesta a inclus opt șobolani de rasă Wistar cu vârsta de trei săptămâni. Inițial, toți cei opt șobolani au fost testați în vederea determinării nivelului bazal al butirilcolinesterazei, glicemiei, al insulinei și al IGF-1. Determinările s-au efectuat pe baza probelor sangvine prelevate în urma unei mici incizii la capătul cozii. Ulterior, s-a administrat prin intermediul unei sonde oro-gastrice clorpirifos în doză de 0.1 g/kg, echivalând cu jumătate din doza letală 50% (DL50). După două ore de la administrarea insecticidului, s-au repetat prelevările sangvine, de data aceasta prin puncție la nivelul cordului. Atât prelevările sangvine precum și montarea sondei oro-gastrice s-au efectuat sub anestezie generală conform protocolului Comitetului Instituțional de Îngrijire și Utilizare a Animalelor de Laborator (IACUC), utilizându-se izofluran 1% și ketamină/xylazină 40 /5 mg/kg. Nivele butirilcolinesterazei au fost detectate printr-o metodă spectrofotometrică și au fost exprimate în unități/ pe litru (U/L). Determinările hormonale stabilite în protocolul studiului au fost efectuate prin tehnică ELISA

Grafic 2.1. Nivelul bazal al glicemiei și post intoxicație



sandviș pentru determinări cantitative, utilizând kituri specifice pentru șobolani. Toți șobolanii

Grafic 2.2. Nivelul bazal al insulinei și post intoxicație



incluși inițial în studiu au rezistat prelevărilor sanvine și intoxicației acute cu clorpirifos, pentru ca după cea de-a doua prelevare să fie eutanasiați, conform ghidului IACUC prin supradozare de izofluran. În urma dozării nivelului de butirilcolinesterază înainte și după administrarea de organofosforic s-a confirmat statusul de intoxicație acută. După cum se observă și în *Graficele 2.1 și 2.2* post intoxicație s-a detectat un nivel crescut al glicemiei și al insulinei.

Valorile IGF-1 au fost de asemenea crescut post administrare de clorpirifos.

Pe baza curbelor ROC și a ariei de sub curbă a fost evaluată diferențierea parametrilor studiați după intoxicație. Pe baza calculării sensibilității și specificității fiecărei curbe s-a apreciat ulterior contribuția acestor parametri în aprecierea statusului de intoxicație. Astfel conform *Tabelului 2.1*, se poate aprecia că din punct de vedere al metabolismului glucidic subiectul expus la clorpirifos prezintă un status hiperglicemic, rezistență la insulină și creșterea nivelului de IGF-1.

Tabel 2.1 Profilul metabolic al subiectului din lotul de studiu post intoxicație	
Glicemie	111 mg/dL
Insulină	18 ng/mL
IGF-1	239 pg/mL

În urma intoxicației acute, niciun animal din lotul de studiu nu a prezentat manifestări colinergice, cu toate acestea dozarea nivelului de butirilcolinesterază care a scăzut semnificativ statistic după administrarea de clorpirifos a oferit confirmarea biochimică a intoxicației.

În ceea ce privește statusul metabolic al lotului de studiu după administrarea orală de clorpirifos s-a constatat o creștere semnificativă a glicemiei. Aceste rezultate coincid cu cele disponibile deja în literatură conform cărora hiperglicemia apare în condiții de intoxicație acută sau de expunere subcronică la organofosforice(8). Creșterea valorilor glicemiei din intoxicația cu organofosforice se poate explica prin efectele acesteia de stimulare neurologică, ca urmare a acumulării de acetilcolină, crescând astfel nevoile metabolice(9).

Dozarea insulinei în grupul de studiu a relevat o creștere semnificativă a nivelului plasmatic după administrarea de clorpirifos. Acest rezultat este explicat de prin faptul că inhibarea acetilcolinesterazei secundare intoxicației cu organofosforice provoacă o creștere a stimulării colinergice la nivelul celulelor β de la nivelul insulelor Langerhans, favorizând creșterea eliberării de insulină(9). Creșterea rezistenței la insulină în condiții de intoxicație acută cu pesticide organofosforice a fost confirmată și în alte studii în care s-au testat efectele diclorvosului sau ale malationului(10).

Valorile IGF-1 măsurate în lotul de studiu au fost de asemenea crescute post intoxicație orală cu organofosforice. Aceste rezultate pot fi explicate pe baza faptului că în condiții de stimulare colinergică exacerbată s-a constatat o inhibare a secreției de somatostatina și creșterea eliberării de STH(11). Acest mecanism fiziologic stă la baza testului de evaluare a rezervelor de STH, ce presupune eliberarea de piridostigmină(12). Cu toate acestea, se consideră că în condiții acute creșterea eliberării de citokine generează o creștere a rezistenței periferice la efectele STH, determinând astfel scăderea IGF-1(12). În ceea ce privește datele disponibile deja în literatură, rezultatele cu privire la nivelul de IGF-1 în condiții de intoxicație acută cu insecticide sunt contradictorii.

Dincolo de îngrijorarea actuală legată de efectele neurotoxice ale compușilor organofosforice, tulburările metabolice asociate expunerii la acest tip de pesticide, trebuie să intensifice reglementările pentru a limita contactul cu acestea. studiul de față susține datele existente în literatură cu privire la efectele intoxicației acute cu organofosforice asupra statusului metabolic.

CAPITOLUL 6 - *Consecințele endocrine secundare stresului acut din cadrul intoxicației cu insecticide organofosforice – studiul 3*

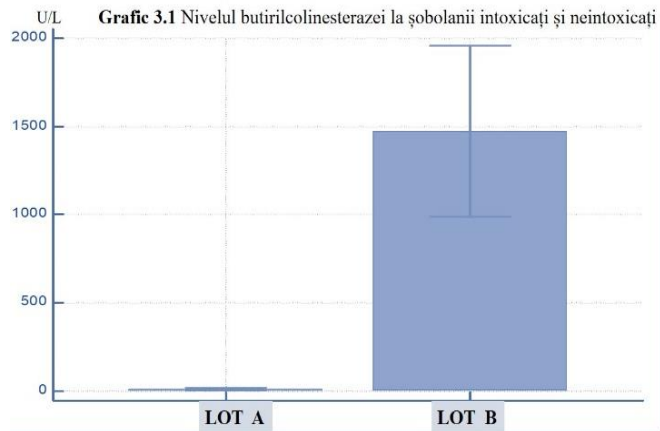
Deși este cel mai studiat mecanism endocrin implicat în răspunsul la stres, activarea axei hipotalamo-hipofizo-corticosuprarenaliene, nu este singurul mecanism endocrin, ce favorizează

adaptarea la stres(13). La ora actuală prolactina este considerată un hormon de stres, a cărei activitate este responsabilă de modularea răspunsului la stres, de imunostimulare și reglare metabolică(13,14). Cu toate acestea mecanismul prin care prolactina își exercită efectele nu sunt momentan, complet elucidate (14). Modificările axei hipotalamo-hipofizo-tiroidiene în condiții de stres acut sunt specifice afectării sistemice non-tiroidiene, în care se înregistrează în principal o scădere a nivelului de T3(15). Deși în mod clasic se consideră ca situațiile de stres determină scăderea hormonilor tiroidieni, există date contradictorii în literatură, conform cărora anumite evenimente stresante duc la creșterea acestora, cum ar fi zgomotul puternic(16). Se consideră de asemenea că axa hormonală tiroidiană se află în relație directă cu axa glucocorticoidă, astfel încât creșterea nivelului de cortizol determină scăderea activității tiroidiene prin alterarea transformării T4 în T3, dar și prin inhibarea eliberării de TRH la nivel hipotalamic(16).

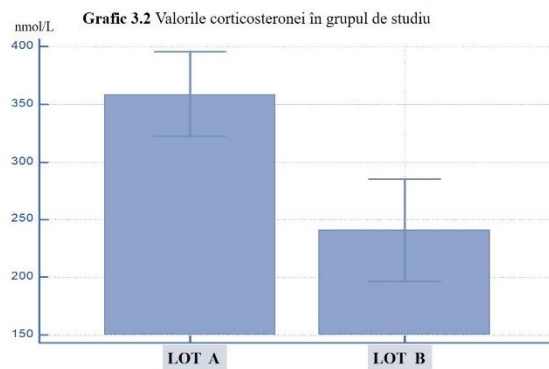
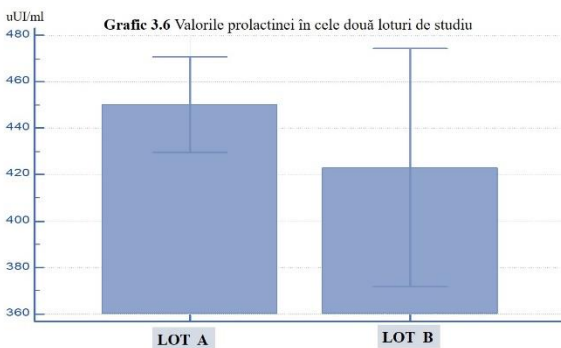
Efectele inhibării acetilcolinesterazei la nivel axului hipotalamo-hipofizo-corticosuprarenalian au fost dovedite atât în studii experimentale, cât și pe pacienți și sunt reprezentate de creșterea nivelului de ACTH, precum și de creșterea eliberării de glucocorticoizi(12). Cercetările au relevat de asemenea că nivelul de CRH în condiții de intoxicație acută este scăzut, cel mai probabil ca urmare a mecanismului de feed-back negativ exercitate de creșterea nivelului de cortizol(17). În ceea ce privește afectarea tiroidiană secundară intoxicației cu organofosforice s-a dovedit că aceste substanțe pot determina un dezechilibru hormonal în condițiile unei funcții glandulare anterior normale atât la nivel central prin inhibarea eliberării de TSH secundare creșterii nivelului de somatostatină, cât și la nivel periferic prin interferența în procesului de deiodinare a T4(17). La nivel hipofizar acumularea de acetilcolină secundară inhibării acetilcolinesterazei determină stimularea eliberării de dopamină de la nivelul neuronilor tuberoinfundibulari, având ca rezultat final inhibarea eliberării de prolactină(18).

Modificările sistemice produse de expunerea acută la organofosforice a determinat catalogarea acestui tip de intoxicație ca o situație de stres acut similară cu cele identificate în condiții de traumă sau sepsis, ca urmare studiul de față a avut ca scop evaluarea statusului hormonilor de stres post intoxicație acută cu organofosforice(19).

Am elaborat un studiu experimental comparativ în care s-a evaluat statusul hormonal în condiții de stres acut provocat de intoxicația acută cu organofosforice la șobolani înțărcați. Studiul a inclus 13 șobolani de rasă Wistar, cu vârsta de 3 săptămâni. Cei 13 șobolani au fost împărțiți în două loturi – Lotul A a reprezentat lotul de studiu și a cuprins 8 șobolani, iar Lotul B – a reprezentat



lotul control și a fost format din 5 șobolani. În cadrul lotului de studiu s-a administrat clorpirifos (Reldan™ 22 EC, Dow Agrosciences), în doza de 100 mg/kg prin intermediul unei sonde oro-gastrice. În lotul control s-a administrat prin gavaj, soluție salină, iar probele sangvine s-au recoltat prin aceeași tehnică. În ambele cazuri s-au efectuat recoltări sangvine în vederea determinării nivelurilor plasmatice ale butirilcolinesterazei, corticosteronei, T3, T4, TSH și prolactină. Conform *Graficului 3.1* nivelul pseudocolinesterazei a fost inhibat semnificativ în lotul de studiu.



În ceea ce privește statusul hormonal în lotul intoxicat s-a obținut un nivel crescut atât al corticosteronei (*Grafic 3.2*), al hormonilor tiroidieni, dar și al prolactinei (*Grafic 3.6*).

Pe baza curbelor ROC obținute în urma analizei statistice, a corelațiilor semnificative statistice și a coeficientului de variație semnificativ față de grupul control am elaborat un profil hormonal al subiectului cu intoxicație acută cu organofosforice. Astfel conform datelor noastre,

subiectul intoxicat a prezentat parametri descriși în *Tabelul 3.1*.

Butirilcolinesteraza	<28 U/L
Corticosteron	>280 nmoli/L
T3	>4.4 ng/mL
TSH	>3.2 ng/mL

Încă de la începutul anilor '80, Clement și colaboratorii au luat în considerare clasificarea intoxicației acute cu organofosforice ca o reacție de stres generalizată(20) Riscul de toxicitate și repercursiunile stresului acut secundar acestora în cadrul populației pediatrice generează un grad de îngrijorare la nivel mondial(21). Având în vedere considerentele etice legate de cercetările asupra nou-născuților și copiilor, se încearcă evaluarea modificărilor induse de toxice asupra animalelor de laborator de vârstă mică(21). Din acest motiv în studiul de față s-a efectuat evaluarea efectelor endocrine din cadrul intoxicației cu organofosforice la animale de laborator cu vârstă mică.

În lotul de studiu, șobolanii intoxicați au prezentat o creștere semnificativă a nivelului de corticosteronă, comparativ cu cei din lotul control, rezultat care coincide cu datele deja raportate în literatură. În cazul cercetării de față, la două ore de la intoxicația cu clorpirifos s-a detectat o creștere a nivelului plasmatic al T3, T4 și TSH, față de lotul control.

În lotul de studiu s-a identificat o corelație invers proporțională între nivelul plasmatic de corticosteronă și T4, date similare cu cele obținute în studiul lui Feralzzo et al pe cabaline, în care nivelul crescut de hormoni glucocorticoizi din timpul stresului fizic se asociază cu scăderea nivelului de hormoni tiroidieni(22). Mecanismele prin care cele două axe hormonale interacționează sunt reprezentate pe de-o parte de inhibarea acidului ribonucleic mesager (ARNm) pentru TRH la nivel hipotalamic și afectarea deiodinării hormonilor tiroidieni în periferie de către cortizol, și pe de alta de scăderea nivelului de ARNm pentru CRH la nivel hipotalamic și scăderea nivelului de cortizol plasmatic determinate de scăderea nivelului de hormoni tiroidieni(16). În cadrul lotului de studiu s-a înregistrat o creștere a nivelului de prolactină în raport cu lotul de control. Creșterea nivelului plasmatic de prolactină în cadrul răspunsului acut la stres favorizează cel mai probabil

activarea sistemului imun, acest hormon fiind catalogat ca un mediator între sistemul nervos central, cel endocrin și imunitate(23).

Unul din punctele forte ale studiului de față este reprezentat de evaluarea statusului hormonal la animale de laborator de vârstă mică, în condiții de intoxicație acută cu organofosforice, subiect despre care datele sunt insuficiente la ora actuală în literatură. Analizând întreg profilul hormonal al subiecților intoxicați putem afirma cu fermitate că această studiu susține datele din literatură cu privire la catalogarea acestui tip de intoxicație ca o situație de stres acut.

CAPITOLUL 7 - *Alterări histologice și citologice secundare intoxicației acute cu organofosforice –studiul 4*

Luând în considerare liposolubilitatea crescută a acestei clase de insecticide, se anticipează că virtual toate organele pot fi afectate de toxicitatea organofosforicelor(24). Studiile cu privire la efectele citotoxice ale organofosforicelor au relevat o creștere a numărului de celule necrotice și apoptotice în sângele periferic recoltat de la pacienți intoxicați(25). Cercetările de laborator au relevat de asemenea modificări ultrastructurale observate atât *in vitro*, pe linii celulare, cât și *in vivo* pe țesuturi recoltate de la animale intoxicate(26).

Având în vedere comportamentul toxicocinetic al organofosforicelor, unele din principalele organe afectate de toxicitatea organofosforicelor sunt reprezentate de ficat și rinichi(27). Ficatul reprezintă principalul organ implicat în metabolizarea tuturor substanțelor xenobiotice(27). În cazul compușilor organofosforici de tip tiofosfat ficatul reprezintă de asemenea situsul unde are loc bioactivarea acestora prin desulfurare oxidativă la compuși oxon(28). Compușii rezultați sunt ulterior metabolizați la același nivel prin hidroliza legăturii esterice rezultând compuși cu toxicitate mai redusă(29). Din punct de vedere morfopatologic studiile experimentale au relevat că diferitele tipuri de organofosforice testate determină accelerarea apoptozei hepatocitare, alterări structurale și vasculare(30). Mecanismul prin care compușii organofosforici produc leziuni tisulare renale nu sunt complet elucidate, cu toate acestea se incriminează și în acest caz implicarea exacerbării stresului oxidativ(31).

Cercetările au relevat că glandele suprarenale sunt foarte vulnerabile în condiții de expunere la organofosforice, identificându-se leziuni citoplasmice extensive și hipertrofierea zonei fasciculate în detrimentul zonei reticulare(32,33). Alte modificări histopatologice observate la animalele de laborator intoxicate au fost migrarea celulelor medulare la nivel cortical, precum și

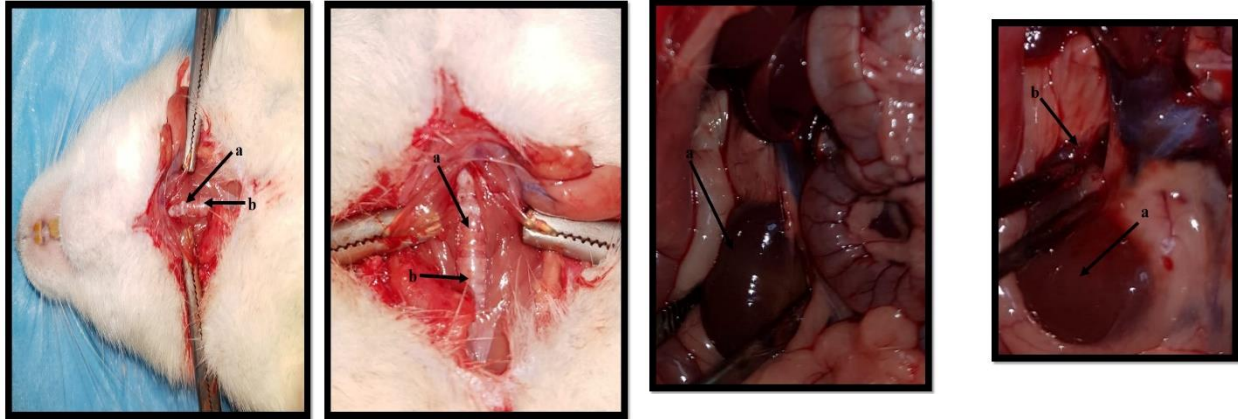


Figura 4.1 Aspecte macroscopice ale glandelor tiroidă și suprarenală

atrofie celulară generalizată(33).

Alterările histopatologice detectate la nivel tiroidian sunt reprezentate de alterări ale foliculilor tiroidieni, precum și de apariția zonelor de necroză focală(33,34).

În acest sens am elaborat un studiu experimental care a inclus șase șobolani de rasă Wistar de sex masculin. Cei șase șobolani au fost împărțiți în două loturi, astfel încât lotul 1, care a cuprins patru șobolani, a reprezentat grupul de studiu, iar lotul 2 care a cuprins doi șobolani a reprezentat grupul martor. Subiecților incluși în lotul 1 li s-a administrat prin intermediul unei sonde oro-gastrice clorpirifos. Protocolul a fost repetat la 48 de ore, iar la o săptămână subiecții au fost eutanasiați prin supradozare de izofluran în vederea recoltării de organe (ficat, rinichi, tiroidă, suprarenale și pancreas) pentru examenul histopatologic. Tehnica de eutanasiere face parte din metodele acceptate de ghidul IACUC.

În *Figurile 4.1* sunt prezentate imagini microscopice ale glandelor tiroidă și suprarenale efectuate în timpul prelevărilor probelor histologice.

Toți subiecții incluși în lotul de studiu au supraviețuit administrării de clorpirifos, doi dintre aceștia dezvoltând însă sindrom colinergic, manifestat în principal prin diaree și sialoree. La nivel hepatic cele mai importante modificări histologice au fost reprezentate de dilatația venei centrolobulare și a sinusoidelor, identificate pe toate secțiunile de ficat recoltate din în lotul de studiu expus la clorpirifos (*Figura 4.2*). Aceste modificări patologice hepatice sunt adesea descrise ca fiind rezultatul efectului toxic al diferitelor substanțe exogene(35). O altă afectare de tip vascular

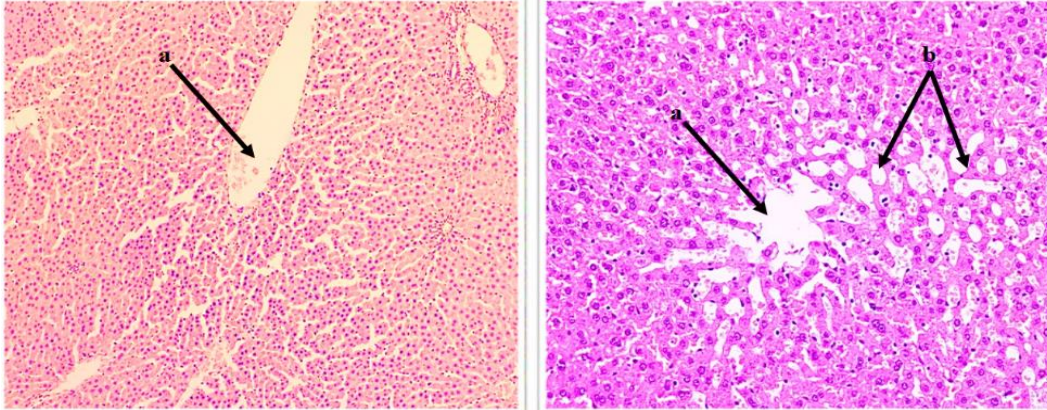


Figura 4.2 Țesut hepatic cu dilatație venă centro-lobulară și dilatație sinusoidală
a – dilatație centro-lobulară, **b** – dilatații sinusoidale

observată în grupul de șobolani intoxicați a fost reprezentată de dilatarea ramurilor venei porte, apărută cel mai probabil în același context ca și dilatarea sinusoidelor. În plus, s-a detectat o hipertrofie a celulelor Kupffer indicând o activitate fagocitică extensivă post expunere la clorpirifos.

Modificările histologice renale, evidențiate în lotul de studiu, au fost localizate atât la nivel glomerular, cât și la nivel tubular. La nivel glomerular cea mai frecventă a modificare detectată a fost reprezentată de atrofia glomerulilor, precum și vacuolizarea celulelor mezangiale, în timp ce la nivel tubular s-au observat în principal dilatație și atrofie epitelială (*Figura 4.3*).

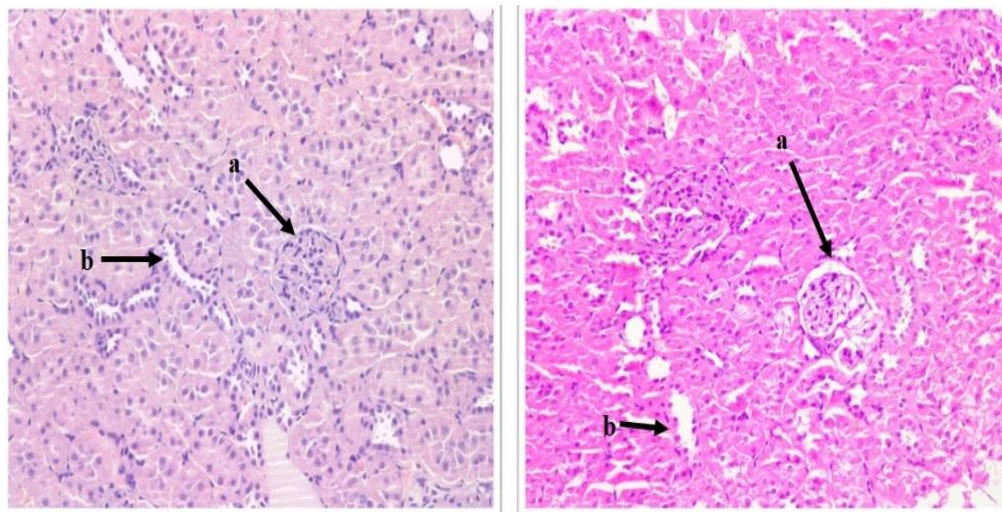


Figura 4.3 Țesut renal cu glomeruli atrofici și dilatații tubulare
a –atrofie glomerulară, **b** – dilatație tubulară

La nivelul suprarenalelor principala modificare observată în urma examenului microscopic a fost reprezentată de aspectul vacuolizat difuz al corticalei. Deși vacuolele lipidice sunt prezente în mod normal la nivelul corticalei, se poate observa o creștere semnificativă în cazul subiecților intoxicați. Creșterea numărului de vacuole, mai ales la nivelul zonei fasciculate se produce frecvent în condiții de expunere la substanțe toxice(36). Mai mult decât atât, s-a constatat că augmentarea numărului de vacuole apare de asemenea ca urmare a unei activități extensive a

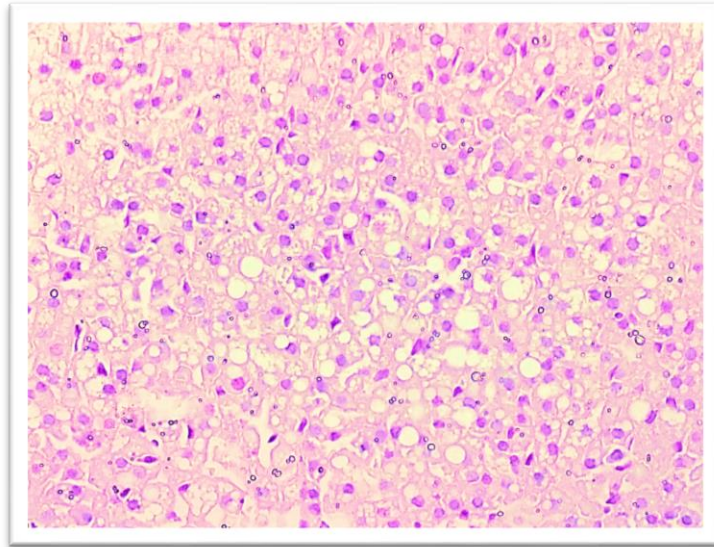


Figura 4.4 Țesut suprarenalian cu aspect vacuolizat al citoplasmei

corticotropinei(36).

În cazul probelor de țesut tiroidian, cele mai întâlnite modificări observate în urma evaluării

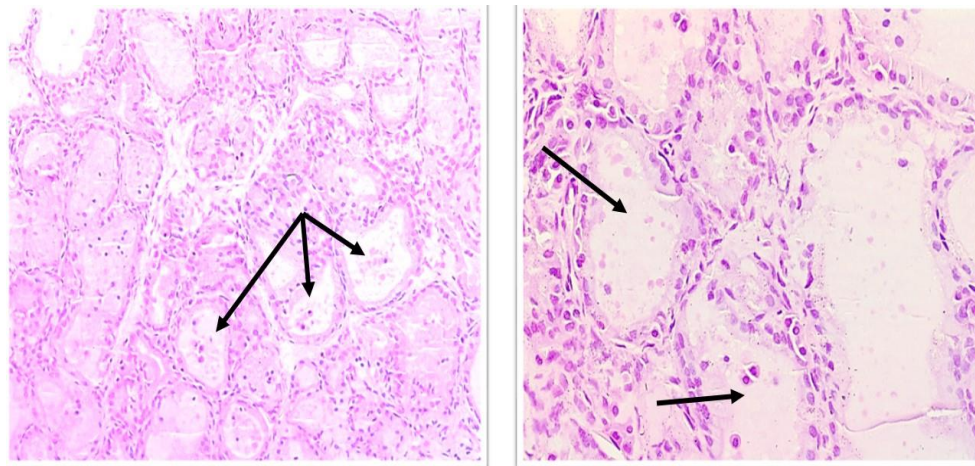


Figura 4.5 Folliculi tiroidieni cu celule epiteliale foliculare descuamate în coloid

la microscopul optic au fost legate de alterări la nivelul coloidului. Pe de-o parte s-a observat scăderea globală a conținutului de coloid la nivelul foliculilor, iar pe de altă parte s-a detectat modificarea consistenței acestuia, prin evidențierea aspectului spumos (*Figura 4.5*). Scăderea cantității de coloid la nivel folicular este cel mai adesea asociată cu procesul de seneșcență și nu se reflectă întotdeauna în modificări funcționale ale glandei(37).

Studiul de față a demonstrat că dincolo de alterările funcționale secundare expunerii la insecticide organofosforice, extrem de dezbătute în literatură, acestea produc de asemenea modificări histologice severe.

Ficatul, ca principal situs de activare și metabolizare a compușilor organofosforici a prezentat modificări severe atât la nivel vascular, cât și la nivelul hepatocitelor. Considerat principalul organ implicat în detoxifierea xenobioticelor, alterarea structurii hepatice prin expuneri repetate la organofosforice va duce la instituirea unui cerc vicios în care efectele toxice vor crește progresiv, în paralel cu scăderea funcției de hepatice.

În urma evaluării datelor din literatură, s-a constatat că acesta este primul studiu care a relevat un grad de severitate atât de crescut în ceea ce privește afectarea renală post expunere la organofosforice. Modificările extensive post intoxicație au cuprins întregul parenchim renal, identificându-se alterări atât la nivel glomerular, tubular și interstițial.

În ceea ce privește afectarea la nivelul glandelor suprarenale, creșterea numărului de vacuole în toate zonele corticosuprarenale se corelează cu datele obținute în studiile precedente conform cărora intoxicația cu organofosforice se asociază cu o hiperfuncție a axei hipotalamo-hipofizo-corticosuprarenaliană.

La nivel tiroidian alterările observate la nivelul foliculilor se încadrează modificările secundare procesului inflamator asociate expunerii la organofosforice.

CAPITOLUL 8 - *Contribuții cu privire la modificările statusului hormonal secundare intoxicației acute cu organofosforice voluntare la pacienți suicidari – studiul 5,*

Conform OMS, cea mai frecventă metodă utilizată pentru sinucidere la nivel global este auto-otrăvirea cu pesticide (20 % din cauze)(38). De-a lungul timpului se consideră că această

cauză de suicid a determinat aproximativ 260 000 de deces anual, reprezentând o treime din metodele de sinucidere(39). Din punct de vedere regional s-a constatat o rată mai mare de suicid prin ingestia de pesticide în Asia de Est și Sud-Est, clasificată de OMS ca zona Pacificului de Vest, unde procentele ajung până la 55 %(39,40). Cu toate că Uniunea Europeană și Statele Unite ale Americii sunt printre cei mai mari utilizatori de pesticide, rata intoxicațiilor voluntare cu pesticide este scăzută(40–42). Cercetările recente au relevat că numărul de cazuri de suicid este crescut în rândul fermierilor sau a persoanelor care sunt implicate în manipularea pesticidelor, față de populația generală, indicând astfel că pesticidele *per se* reprezintă un factor de risc pentru suicid(43).

În acest sens am elaborat un studiu prospectiv, observațional, în care s-a evaluat din punct de vedere biochimic statusul hormonal al pacienților intoxicați cu insecticide organofosforice, în contextul unei tentative de suicid.

În grupul de studiu au fost incluși pacienții internați cu diagnosticul de intoxicație acută cu insecticide organofosforice, din cadrul secției de Anestezie și Terapie Intensivă a Spitalului Clinic de Urgență București. Pacienții cu patologii endocrine preexistente sau în tratament cu inhibitori de acetilcolinesteraza au fost excluși din lotul de studiu.

După îndeplinirea criteriilor clinice de includere în lotul de studiu, pentru fiecare pacient au fost colectate date demografice (vârstă, sex, mediu de viață). Mai apoi, fiecărui pacient i s-au prelevat probe sangvine în vederea determinării nivelului plasmatic de butirilcolinesterază, inhibarea acesteia fiind considerat criteriul biochimic de includere în grupul de studiu. Ulterior a fost dozat nivelul plasmatic de TSH, fT3, fT4, cortizol, IGF-1 și prolactină. Au fost efectuate dozări repetate la admisie și, respectiv la 24 de ore de la internare.

În perioada iulie 2017- iulie 2018, în secția de Anestezie și Terapie Intensivă, a Spitalului Clinic de Urgență București, au fost identificați 15 pacienți intoxicați cu pesticide organofosforice prin autoingestie în contextul unei tentative de suicid. În urma aplicării criteriilor de excludere, lotul de studiu a cuprins 7 pacienți, intoxicați cu pesticide organofosforice în urma unei tentative de suicid.

Din punct de vedere demografic, vârsta medie în lotul de studiu este 49 de ani, iar sexul predominant a fost cel masculin. Pseudocolinesteraza a fost sever inhibată la momentul admisie certificând din punct de vedere biochimic caracterul de intoxicație acută. Valoarea plasmatică a cortizolului a fost crescută la admisie până la o valoare de 50 ng/L, pentru ca la 24 de ore să se

înjumătățească. Un trend similar s-a observat și în cazul hormonilor tiroidieni, astfel atât T3, T4 și TSH au crescut inițial în faza acută pentru ca la 24 de ore să scadă semnificativ. În ceea ce privește evoluția IGF-1 în condiții de intoxicație acută la 24 de ore valoarea medie este mai mică cu 21 ng/ml față de baseline. Principalele corelații parametrice semnificative statistice din lotul de studiu au fost reprezentate de cea dintre IGF-1 și FT3, între care s-a obținut o relație invers proporțională și cea dintre cortizol și FT4 măsurati la admisie între care s-a obținut o relație pozitivă.

În cadrul studiului de față manifestările clinice, specifice toxidromului colinergic, nu au fost prezente decât în cazul unui singur pacient, deși nivelul de inhibare al butirilcolinesterazei a fost semnificativ în cazul întregului lot. După cum se observa măsurarea nivelului de butirilcolinesterază reprezintă o metodă validă pentru determinarea acestui tip de intoxicații, cu toate acestea valoarea scăzută a pseudocolinesterazei de la admisie nu a reprezentat însă un marker de severitate al intoxicației, fiind cunoscut faptul că gradul de inhibare al acesteia nu se corelează cu gradul de inhibare a acetilcolinesterazei sau cu apariția manifestărilor clinice specifice(44,45).

Se consideră că o creștere a cortizolului în condiții de intoxicație acută cu insecticide organofosforice este multifactorială, fiind pe de-o parte secundară stresului acut și pe de altă parte mediată de nivelul crescut de acetilcolină de la nivel hipotalamic.

Intoxicația cu organofosforice se caracterizează printr-o disfuncție tiroidiană specifică patologiilor critice, precum politrauma sau sepsisul, cunoscută sub denumirea de „*sick euthyroid syndrom*”(46) Studiul de față este în concordanță cu datele din literatura deși valorile inițiale au fost crescute peste limitele superioare a normalului, acestea au scăzut semnificativ la 24 ore.

Deși evoluția IGF-1 în lotul de studiu a fost în contradicție cu o serie de rezultate disponibile în literatură, aceasta poate fi explicată prin faptul că excesul de acetilcolină de la nivel hipofizar.

Corelația pozitivă dintre cortizol și FT4 ilustrează relația deja descrisă în literatură dintre axele corticosuprarenală și tiroidiană. Astfel se consideră că creșterea nivelului de cortizol favorizează activitatea deiodinazei 3 care inhibă transformarea T4 în T3.

Corelația negativă dintre nivelul de IGF-1 și FT3 poate fi explicată pe baza datelor relevate de studiile experimentale conform cărora creșterea nivelului de IGF-1 scade numărul de receptori pentru T3, indicând astfel o posibilă alterare a efectelor hormonilor tiroidieni la nivelul organelor țintă.

În concluzie intoxicația cu organofosforice poate produce o afectare sistemică severă chiar în absența apariției manifestărilor clasice tipice sindromului colinergic. Tulburările endocrine polimorfe specifice stresului acut și afectării tiroidiene eutirodiene trebuie avute în vedere în cazul unui pacient intoxicat cu pesticide organofosforice având în vedere morbiditatea asociată pe termen lung.

CONCLUZII GENERALE

Lucrarea de față care a avut ca scop principal evaluarea modificărilor hormonale post intoxicație cu compuși organofosforici, a relevat o serie de rezultate solide cu privire atât asupra axei hormonale tiroidiene, corticosuprarenaliene, somatotropice, prolactinei, dar și asupra disfuncției metabolismului glucidic asociate. Metodologia fiecărui studiu a fost bine pusă la punct și în fiecare caz respectarea acesteia a fost întocmai. Compararea datelor obținute cu rezultatele deja existente din literatură s-a bazat pe o bibliografie extensivă. Prezentarea principalelor rezultate obținute sunt:

- ⇒ Nivelul butirilcolinesterazei scade semnificativ post intoxicație cu compuși organofosforici, cu toate acestea gradul de inhibare nu se corelează cu apariția manifestărilor de tip colinergic sau nicotinic. În plus scăderea acesteia nu oferă date cu privire la afectarea de organ asociată intoxicației.
- ⇒ Imediat post intoxicație cu organofosforice survine o creștere semnificativă a nivelului de T3 și TSH, care scade ulterior semnificativ la 48 de ore de la intoxicație.
- ⇒ Valoarea T4 crește post intoxicație cu organofosforice, cel mai probabil printr-o afectare a transformării T4 în T3, considerată forma activă a hormonilor tiroidieni.
- ⇒ Expunerea la compuși organofosforici induce apariția rapidă a unui status hiperglicemic.
- ⇒ Secundar administrării orale de organofosforice s-a dovedit o creștere concomitentă atât a nivelului de insulină, cât și a celui de IGF-1.

- ⇒ Profilul metabolic stabilit al subiectului intoxicat s-a caracterizat prin hiperglicemie, rezistență la insulină și creșterea nivelului de IGF-1.
- ⇒ Evaluarea statusului hormonilor de stres post intoxicație acută a relevat o creștere semnificativă a nivelului plasmatic al corticosteronei în rândul animalelor de laborator de vârstă mică.
- ⇒ Analiza statusului hormonilor tiroidieni în cazul șobolanilor înțărcați a relevat de asemenea o creștere a T3, T4 și TSH.
- ⇒ Prolactina a înregistrat o creștere post expunere acută la organofosforice.
- ⇒ Profilul hormonal al subiectului intoxicat în condiții acute a fost caracterizat de o creștere a nivelului de corticosteronă, T3 și TSH.
- ⇒ Modificările histologice identificate la nivelul organelor prelevate au relevat modificări structurale extensive atât la nivelul hepatic și renal, dar și la nivelul glandelor endocrine analizate.
- ⇒ Pacienții intoxicați acut cu diferite tipuri de organofosforice au prezentat din punct de vedere hormonal o creștere a nivelului de cortizol, care s-a menținut ulterior la limita superioară a normalului.
- ⇒ În ceea ce privește afectarea tiroidiană a pacienților intoxicați, s-a observat o creștere inițial a nivelului de T3, urmată de o scădere a acestuia la 24 de ore. T4 și TSH, deși nu au prezentat creșteri în cazul determinărilor inițiale au înregistrat scăderi semnificative la 24 de ore.
- ⇒ Dacă nivelul de IGF-1 a fost crescut în faza inițială, acesta a scăzut semnificativ la 24 de ore.

Importanța și originalitatea rezultatelor tezei

Tematica cercetării prezintă o importanță majoră pentru specialiști atât din domeniul toxicologie clinice, cât și pentru cei din terapie intensivă, având în vedere că tratamentul intoxicației acute nu a înregistrat progrese semnificative recente. Aceste rezultate indică faptul că abordarea unui pacient intoxicat cu insecticide implică o evaluare, monitorizare și un tratament mult mai complexe decât cel actuale. Mai mult decât atât această lucrare semnalează că situația expunerii la organofosforice reprezintă o problemă de sănătate publică mult mai gravă decât părea inițial fiind asociată cu repercursiuni pe termen lung.

Deși România face parte din țările care au raportat o scădere globală a comerțului de pesticide, accesibilitatea crescută la acest tip de produse pentru persoane neinstruite în manipularea și utilizarea acestora sugerează nevoia unor reglementări mai stricte.

Ținând seama de faptul că în literatura de specialitate studiile dedicate la momentul actual acestui subiect sunt extrem de limitate, acestea relevă în parte o serie de rezultate contradictorii. Ca urmare consider că rezultatele obținute în lucrarea de față, vin în completarea tabloului clinic complex asociat intoxicației cu organofosforice.

O concluzie inovatoare a lucrării a fost caracterizarea intoxicației acute cu compuși organofosforici din punct de vedere al hormonilor de stres. S-a dovedit astfel că se impune clasificarea acestui tip de intoxicație ca o situație de stres acut, similară traumei sau sepsisului. Trebuie avut în vedere că mecanismele de producere a creșterii hormonilor de stres sunt stimulate în paralel prin acumularea de acetilcolină la nivel sinaptic.

Elaborarea profilului hormonal și metabolic al subiectului post intoxicație acută cu organofosforice reprezintă elemente de noutate extrem de utile atât pentru viitoare cercetări, cât și pentru o monitorizare clinică mai eficientă a pacienților.

Un element de noutate a fost identificarea unor modificări histologice și citologice polimorfe, în toate organele analizate la microscopul optic și, respectiv, electronic. În mod special s-au remarcat leziunile glomerulare și tubulare de la nivel renal, pentru care nu au fost identificate echivalențe în literatură.

O altă idee inovatoare a lucrării a fost stabilirea unui cerc vicios între modificările hormonale survenite la pacienții cu patologii psiho-emoționale preexistente, care s-au intoxicat în mod

voluntar cu insecticide și posibila agravare statusul psihiatric. În acest sens se consideră oportun ca pacienții cu aceste antecedente personale patologice, expuși la insecticide organofosforice să beneficieze de o monitorizare psihiatrică sporită post externare din secția de terapie intensivă.

Datele obținute în lucrarea de față s-au bucurat de apreciere atât la nivel național, prin premiarea din cadrul Congresului Național al Societății de Anestezie și Terapie Intensivă din România, precum și la nivel internațional în cadrul a numeroase conferințe științifice precum Congresul Societății Europene de Terapie Intensivă (ESICM), Congresul Societății Europene de Anestezie (ESA), Congresul Societăților Europene de Toxicologie (EuroTox), Congresul Societății Europene de Nutriție Enterală și Parenterală.

BIBLIOGRAFIE

1. Garfitt SJ, Jones K, Mason HJ, Cocker J. Exposure to the organophosphate diazinon: Data from a human volunteer study with oral and dermal doses. *Toxicol Lett.* 2002;134(1–3):105–13.
2. Griffin PY, Mason H, Heywood K, Cocker J. Oral and dermal absorption of chlorpyrifos : a human volunteer study. *Occup Env Med.* 1999;56:10–3.
3. WHO. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009. 2017.
4. Greenpeace. The EU Pesticide Blacklist. 2016; Available from: www.greenpeace.de
5. Agency for Toxic Substances and Human Services. Toxicological Profile for Chlorpyrifos. ATSDR's Toxicological Profiles. 2010.
6. Dow Agrosciences. Reldan™ 22 EC [Internet]. [cited 2019 Mar 26]. Available from: <https://www.dowagro.com/ro-ro/romania/produse/insecticid/reldan-22-ec.html>
7. Ingels C, Gunst J, Van den Berghe G. Endocrine and Metabolic Alterations in Sepsis and Implications for Treatment. *Crit Care Clin* [Internet]. 2018;34(1):81–96. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2017.08.006>
8. Rezg R, Benahmed M, Mornagui B, El-fazaa S, Gharbi N. Effect of subchronic exposure to an organophosphorus compound on corticotropin releasing factor mRNA expression in rat hypothalamus. *Toxicol Lett.* 2008;180(2008):S173.
9. Xiao X, Clark JM, Park Y. Potential contribution of insecticide exposure and development of obesity and type 2 diabetes. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2017;105:456–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.003>
10. Pournourmohammadi S, Ostad SN, Azizi E, Ghahremani MH, Farzami B, Minaie B, et al. Induction of insulin resistance by malathion: Evidence for disrupted islets cells metabolism and mitochondrial

- dysfunction. *Pestic Biochem Physiol*. 2007;88(3):346–52.
11. Richardson SB, Hollander CS, D'eleto R, Greenleaf PW, Thaw C. Acetylcholine Inhibits the Release of Somatostatin from Rat Hypothalamus in Vitro. *Endocrinology*. 1980;107(1):122–9.
 12. Dutta P, Kamath S, Bhalla A, Shah V, Srinivasan A, Gupta P, et al. Effects of acute organophosphate poisoning on pituitary target gland hormones at admission, discharge and three months after poisoning: A hospital based pilot study. *Indian J Endocrinol Metab* [Internet]. 2015;19(1):116. Available from: <http://www.ijem.in/text.asp?2015/19/1/116/131771>
 13. Angelier F, Parenteau C, Ruault S, Angelier N. Endocrine consequences of an acute stress under different thermal conditions: A study of corticosterone, prolactin, and thyroid hormones in the pigeon (*Columbia livia*). *Comp Biochem Physiol -Part A Mol Integr Physiol* [Internet]. 2016;196:38–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.02.010>
 14. Lennartsson AK, Jonsdottir IH. Prolactin in response to acute psychosocial stress in healthy men and women. *Psychoneuroendocrinology*. 2011;36(10):1530–9.
 15. Marik PE. *Endocrinology of the Stress Response During Critical Illness* [Internet]. Third Edit. Critical Care Nephrology: Third Edition. 2017. 446-454.e4 p. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44942-7.00076-5>
 16. Helmreich DL, Parfitt DB, Lu XY, Akil H, Watson SJ. Relation between the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid (HPT) axis and the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis during repeated stress. *Neuroendocrinology*. 2005;81(3):183–92.
 17. Rezg R, Mornagui B, Benahmed M, Gharsalla Chouchane S, Belhajhmidia N, Abdeladhim M, et al. Malathion exposure modulates hypothalamic gene expression and induces dyslipidemia in Wistar rats. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2010;48(6):1473–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.03.013>
 18. Smallridge RC, Carr FE, Fein HG. Diisopropylfluorophosphate (DFP) reduces serum prolactin, thyrotropin, luteinizing hormone, and growth hormone and increases adrenocorticotropin and corticosterone in rats: Involvement of dopaminergic and somatostatinergic as well as cholinergic pathways. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1991;108(2):284–95.
 19. Everett CJ, Matheson EM, States U. Pesticide Exposure and Diabetes ☆ [Internet]. 2nd ed. *Encyclopedia of Environmental Health* 2nd Edition. Elsevier Inc.; 2018. 1-6 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.10647-5>
 20. Clement JG. Hormonal consequences of organophosphate poisoning. *Toxicol Sci*. 1985;5(6 PART2):61–77.
 21. McPhail BT, White CA, Cummings BS, Muralidhara S, Wilson JT, Bruckner J V. The immature rat as a potential model for chemical risks to children: Ontogeny of selected hepatic P450s. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2016;256:167–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.07.005>
 22. Ferlazzo A, Cravana C, Fazio E, Medica P. Is There an Interplay Between the Hypothalamus-Pituitary-Thyroid and the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axes During Exercise-Stress Coping in Horses? *J Equine Vet Sci* [Internet]. 2018;62:85–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2017.08.018>
 23. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, György N. Prolactin : Structure , Function , and Regulation of

- Secretion MOLECULAR BIOLOGY. October. 2000;80(4):1523–631.
24. Selmi S, Rtibi K, Grami D, Sebai H, Marzouki L. Malathion, an organophosphate insecticide, provokes metabolic, histopathologic and molecular disorders in liver and kidney in prepubertal male mice. *Toxicol Reports* [Internet]. 2018;5(January):189–95. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.12.021>
 25. Gundogan K, Donmez-altuntas H, Hamurcu Z, Hakk I. Mutat Res Gen Tox En Evaluation of chromosomal DNA damage , cytotoxicity , cytostasis , oxidative DNA damage and their relationship with endocrine hormones in patients with acute organophosphate poisoning. 2018;825(October 2017):1–7.
 26. Zahn T, Arnold H, Braunbeck T. Cytological and biochemical response of R1 cells and isolated hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to subacute in vitro exposure to disulfoton. *Exp Toxicol Pathol* [Internet]. 1996;48(1):47–64. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0940-2993\(96\)80093-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0940-2993(96)80093-5)
 27. Deng Y, Zhang Y, Lu Y, Zhao Y, Ren H. Hepatotoxicity and nephrotoxicity induced by the chlorpyrifos and chlorpyrifos-methyl metabolite, 3,5,6-trichloro-2-pyridinol, in orally exposed mice. *Sci Total Environ* [Internet]. 2016;544:507–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.162>
 28. Vale JA. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicol Lett*. 1998;102–103:649–52.
 29. King AM, Aaron CK. Organophosphate and Carbamate Poisoning. *Emerg Med Clin NA* [Internet]. 2015;33(1):133–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.emc.2014.09.010>
 30. Saraei F, Sadoughi M, Kaka G, Sadraie SH, Foaddodini M. Study of the Effects of Diazinon on Fetal Liver in BALB/c Mice. *Iran Red Crescent Med J*. 2016;18(4).
 31. Cakici O, Akat E. Effects of oral exposure to diazinon on mice liver and kidney tissues biometric analyses of histopathologic changes. *Anal Quant Cytol Histol*. 2013;35(1):7–16.
 32. Raees K, Ishfaq R, Ullah A, Tahir MZ, Abbas T, Tahir HM, et al. Histological and micrometric effects of diazinon exposure on adrenal medulla and cortex in mice. *J Appl Anim Res*. 2012;40(4):267–72.
 33. Jeong SH, Kim BY, Kang HG, Ku HO, Cho JH. Effect of chlorpyrifos-methyl on steroid and thyroid hormones in rat F0- and F1-generations. *Toxicology*. 2006;220(2–3):189–202.
 34. Angelis S De, Tassinari R, Maranghi F, Eusepi A, Virgilio A Di, Chiarotti F, et al. Developmental Exposure to Chlorpyrifos Induces Alterations in Thyroid and Thyroid Hormone Levels Without Other Toxicity Signs in Cd1 Mice. 2009;108(2):311–9.
 35. Nakhleh RE. The pathological differential diagnosis of portal hypertension. *Clin Liver Dis*. 2017;10(3):57–62.
 36. Hoernerhoff MJ, Hill GD, Gruebbel MM. Adrenal Gland, Cortex – Vacuolization, Cytoplasmic. In: *NTP Nonneoplastic Lesion Atlas*. p. 1–4.
 37. Lee J, Yi S, Kang YE, Kim H-W, Joung KH, Sul HJ, et al. Morphological and Functional Changes in the Thyroid Follicles of the Aged Murine and Humans. *J Pathol Transl Med*. 2016;50(6):426–35.
 38. World Health Organization. Suicide [Internet]. 2018 [cited 2019 Feb 25]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/suicide>
 39. Mew EJ, Padmanathan P, Eddleston M, Konradsen F, Chang S-S, Phillips MR, et al. The global burden of

- fatal self-poisoning with pesticides 2006-15: Systematic review. *J Affect Disord* [Internet]. 2017;219(May):93–104. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2017.05.002>
40. Gunnell D, Eddleston M, Phillips MR, Konradsen F. The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: Systematic review. *BMC Public Health*. 2007;7(c):1–15.
 41. Eurostat. Agri-environmental indicator - consumption of pesticides - Statistics Explained [Internet]. Agri-environmental indicator - consumption of pesticides. 2016 [cited 2019 Feb 1]. Available from: http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Agri-environmental_indicator_-_consumption_of_pesticides
 42. Marquez Emily. In the U.S. and the world, pesticide use is up | Pesticide Action Network [Internet]. Pesticide Action Network. 2018 [cited 2019 Feb 1]. Available from: <http://www.panna.org/blog/us-and-world-pesticide-use>
 43. Kim J, Shin DH, Lee WJ. Suicidal ideation and occupational pesticide exposure among male farmers. *Environ Res* [Internet]. 2014;128:52–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2013.10.007>
 44. Eddleston M, Buckley NA, Eyer P, Dawson AH. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet*. 2008;371(9612):597–607.
 45. C Kwong T, Kwong, T. C. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. *Ther. Drug Monit*. 24, 144-149. *Ther Drug Monit*. 2002;24:144–9.
 46. Satar S, Ahmet S, Metin T. Endocrine Effects of Organophosphate Antidotal Therapy. *Adv Ther*. 2004;21(5):301–11.

Lista cu lucrări științifice publicate

Articole:

Tomescu D, **Cobilinschi C**, Tincu RC, Totan A, Neagu P, Diaconu CC, Tiglis M, Bratu OG, Macovei RA, Changes of Thyroid Hormonal Status in Organophosphate Exposure A systematic literature review. Rev Chim. 2018;69(12):3364–6.

<http://www.revistadechimie.ro/pdf/6%20TOMESCU%201%20%2012%2018.pdf>

Factorul de impact pe anul 2017: 1.412

(ANEXA 2)

Tomescu D, **Cobilinschi C**, Baetu A, Totan A, Neagu P, Diaconu CC, Tincu IF, Stoian AP, Bratu OG, Macovei RA, Effects of acute organophosphate poisoning on glycemic profile in weanling rats - An experimental study. Rev Chim. 2018;69(12):3469–72.

<http://www.revistadechimie.ro/pdf/27%20TOMESCU%202%20%2012%2018.pdf>

Factorul de impact pe anul 2017: 1.412

(ANEXA 3)

Abstracte:

Cobilinschi C, Tincu RC, Neagu PT, Totan A., Baetu A., Tincu IF, Cobilinschi CO, Macovei RA, Thyroid dysfunction caused by organophosphate poisoning. Toxicology Letters 280:S169, DOI: 10.1016/j.toxlet.2017.07.473;

(ANEXA 4)

Prezentări orale:

Cobilinschi C, Tincu RC, Totan A, Ghiorghiu Z, Neagu P, Macovei RA, Sick euthyroid syndrome induced by acetylcholinesterase inhibition, SRATI 2017

(ANEXA 5)

Cobilinschi C, Tincu RC, Totan A, Ghiorghiu Z, Neagu P, Macovei RA, Nutritional aspects of organophosphate exposure, ROSPEN 2017

http://www.rospen.ro/content_files/file/simpozion-si-curs-2017/caiet-program-ROSPEN2017_WEB.pdf

Cobilinschi C, Tincu RC, Totan A, Baetu A, Macovei RA, Hormonal disbalance induced by acute cholinesterase inhibition, SRATI 2019

<https://az659834.vo.msecnd.net/eventsairwesteuprod/production-ralcom-public/d633df392457496fb580a306c0140f5f>

(ANEXA 6)

Prezentare poster:

Cobilinschi C, Tincu RC, Neagu PT, Totan A., Baetu A., Tincu IF, Cobilinschi CO, Macovei RA, Endocrine consequences of an acute stress induced by acetyl cholinesterase inhibition – experimental study in weanling rats, Euroanesthesia 2019

<https://myesa.esahq.org/Public/Agenda?eventId=1006>
(ANEXA 7)