

**UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA
BUCUREȘTI**

FACULTATEA DE INGINERIE CHIMICĂ ȘI BIOTEHNOLOGII

ȘCOALA DOCTORALĂ: INGINERIE CHIMICĂ ȘI BIOTEHNOLOGII

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

Evaluarea clinică și analitică a intoxicațiilor acute cu organofosforice: Utilizarea colinesterazelor ca biomarkeri și optimizarea metodelor de detecție a pesticidelor

Conducător de doctorat:

Prof. Dr. Ing. RADU GABRIEL-LUCIAN

Student-doctorand:

Ing. VĂRZARU (HÎRJĂU) ANDREEA-CAMELIA

BUCUREȘTI

2025

CUPRINS

MULȚUMIRI	4
Introducere	5
Capitolul 1 – Intoxicația cu pesticide organofosforice.....	6
1.1. Incidența intoxicațiilor cu pesticide organofosforice: O perspectivă globală	6
1.2. Chimia și clasificarea compușilor organofosforici	7
1.3. Spectrometria de masă în laboratorul clinic: Aplicații și validare.....	7
1.4. Metode de determinare a pesticidelor: Aplicații în toxicologia clinică.....	7
BIBLIOGRAFIE	8
Capitolul 2 - Activitatea enzimatică a colinesterazelor în intoxicațiile cu insecticide organofosforice	11
2.1. Mecanismul toxicității organofosforicelor	11
2.3. Evaluarea activității colinesterazelor în contextul intoxicațiilor cu organofosforice	12
BIBLIOGRAFIE	12
Capitolul 3 – Optimizarea metodei imunoenzimatică pentru cuantificarea butirilcolinesterazei.....	15
3.1. Introducere.....	15
3.2. Materiale și metode	15
3.3. Rezultate și discuții.....	15
3.4. CONCLUZII.....	16
3.5. BIBLIOGRAFIE	16
Capitolul 4 – Dezvoltarea metodei de cuantificare a diazinonului și malationului prin spectrometrie de masă	17
4.1. Introducere.....	17
4.2. Materiale și metode	17
4.3. Rezultate și discuții.....	17
4.3.1. Optimizarea metodei de extracție.....	17
4.3.2. Optimizarea metodei MRM	18
4.3.3. Validarea metodei MRM.....	18
4.3.4. Constatări clinice: analiza probelor pacienților intoxicați.....	19
4.4. Concluzii.....	19
4.5. Bibliografie	20
Capitolul 5 – Studiul activității colinesterazelor în intoxicațiile acute cu organofosforice ...	21
5.1. Introducere.....	21

5.2. Materiale și metode	21
5.2.1. Prelevarea și pregătirea probelor biologice	21
5.2.2. Principiul metodei	22
5.2.3. Analiza statistică a datelor.....	22
5.3. Rezultate și discuții.....	23
5.3.1. Determinarea activității butirilcolinesterazei	23
5.3.2. Corelații și variații între determinările BChE (Elman) și PsChE (EMIT)	23
5.3.3. Determinarea AChE prin metoda Elman	23
5.3.4. Corelația dintre Acetilcolinesterază (AChE) și Butirilcolinesterază (BChE)	23
5.3.5. Corelația dintre activitatea enzimatică și concentrația de pesticide	24
5.4. CONCLUZII.....	24
CONCLUZII GENERALE. CONTRIBUȚII PERSONALE. PERSPECTIVE DE DEZVOLTARE	25
C.1. CONCLUZII GENERALE	25
C.2. CONTRIBUȚII ORIGINALE	25
C.3. PERSPECTIVE DE DEZVOLTARE ULTERIOARĂ	26
ANEXE.....	27
A.1.1. ARTICOLE PUBLICATE ÎN TEMATICA TEZEI	27
A.1.2. COMUNICĂRI ȘTIINȚIFICE INTENATIONALE ÎN TEMATICA TEZEI DE DOCTORAT	27

MULȚUMIRI

Fiecare pagină a acestei teze de doctorat poartă amprenta sprijinului și a încrederii primite de la oameni minunați, fără de care acest parcurs nu ar fi fost posibil. Vreau să-mi exprim recunoștința profundă tuturor celor care mi-au fost alături.

În primul rând, din toată inima, îi adresez cele mai sincere mulțumiri Domnului Profesor Dr. Ing. RADU GABRIEL-LUCIAN, conducătorul meu de doctorat. Faptul că ați crezut în mine și în potențialul acestei cercetări, îndrumarea dumneavoastră excepțională, răbdarea infinită și sfaturile înțelepte au fost farul meu călăuzitor în fiecare etapă a acestui drum complex. Vă mulțumesc pentru generozitatea cu care mi-ați împărtășit expertiza și pentru timpul prețios dedicat.

Mulțumirile mele se îndreaptă, de asemenea, către distinșii membri ai Comisiei de Îndrumare și Integritate Academică (Doamna Profesor dr. ing. Cristina NECHIFOR, Doamna Profesor dr. chim. Claudia SIMONESCU și Domna Cercetător Științific Gradul II dr. chim. Sandra EREMIA), a căror viziune și ale căror observații constructive au contribuit esențial la rafinarea și aprofundarea acestei lucrări.

Aș vrea să adresez mulțumiri speciale și Doamnei Conferențiar universitar Dr. Emanuela CRĂCIUN pentru sprijinul valoros și implicarea practică în diseminarea rezultatelor, contribuind semnificativ la vizibilitatea și impactul cercetării mele.

Mulțumesc din suflet Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare Medico-Militară „Cantacuzino” pentru că mi-a pus la dispoziție un mediu de cercetare stimulant și pentru sprijinul financiar esențial, oferind resursele necesare realizării acestei teze. De asemenea, aduc un gând bun și un mulțumesc sincer întregului personal tehnic și administrativ, a căror eficiență și sprijin discret mi-au ușurat considerabil activitatea.

Nu în ultimul rând, dar cu cea mai profundă emoție, vreau să-mi exprim întreaga mea apreciere familiei mele. Voi ați fost stâlpul meu, lumina care nu s-a stins niciodată în momentele dificile, oaza mea de liniște și sursa inepuizabilă de putere. Înțelegerea voastră, sprijinul necondiționat, încurajările la fiecare pas și sacrificiile pe care le-ați făcut au fost fundamentul pe care s-a clădit această teză, piatra de temelie a reușitei mele. Fără voi, nimic din toate acestea nu ar fi fost posibil, iar fiecare rând scris aici este o mărturie a iubirii și a devotamentului vostru. Această lucrare vă este dedicată, vouă și tuturor celor care ați crezut în mine.

Introducere

Intoxicațiile acute cu compuși organofosforici (OP) reprezintă o problemă majoră de sănătate publică. Acești compuși, utilizați pe scară largă, exercită efecte neurotoxice puternice prin inhibarea ireversibilă a colinesterazelor (ChE), ducând la acumularea de acetilcolină și la manifestări clinice severe, inclusiv insuficiență respiratorie acută și deces.

Deși monitorizarea acetilcolinesterazei (AChE) și a butirilcolinesterazei (BChE) / pseudocolinesterazei (PsChE) este esențială pentru diagnostic și tratament, înțelegerea completă a dinamicii acestor enzime și a utilității lor ca markeri prognostici necesită clarificări suplimentare. Practica medicală actuală suferă adesea din cauza lipsei unei monitorizări continue.

Această teză de doctorat a investigat evoluția activității colinesterazelor la pacienții cu intoxicații acute cu diazinon și malation. Cercetarea a inclus compararea metodelor de determinare a BChE și AChE și dezvoltarea unei metode analitice validate pentru cuantificarea directă a diazinonului și malationului în probe urinare.

Studiul a evidențiat variabilitate interindividuală semnificativă în recuperarea enzimatică și corelații puternice (r 0.905-0.996) între activitatea diferitelor enzime și metode de măsurare, demonstrând fiabilitatea acestora. Un rezultat crucial este relația inversă puternică (r până la -0.9995) între concentrațiile urinare de pesticide și gradul de inhibiție enzimatică la internare, confirmând o relație doză-răspuns directă și relevanța ChE ca indicatori prognostici. Inhibarea severă a fost corelată cu spitalizarea prelungită în unitatea de terapie intensivă.

În concluzie, teza subliniază importanța monitorizării integrate a activității colinesterazelor și a concentrațiilor de pesticide în urină pentru managementul eficient al intoxicațiilor cu OP. Aceste enzime sunt biomarkeri fiabili pentru evaluarea severității și monitorizarea tratamentului, justificând utilizarea lor combinată pentru o imagine clinică completă. Descoperirile studiului, în ciuda limitărilor, furnizează o bază robustă pentru optimizarea protocoalelor clinice și dezvoltarea unor strategii terapeutice individualizate.

Capitolul 1 – Intoxicația cu pesticide organofosforice

Prezentul studiu abordează o problemă critică de sănătate publică globală: intoxicațiile acute cu compuși organofosforici (OP). Utilizarea extinsă a acestor substanțe în agricultură și industrie generează riscuri semnificative datorită efectelor lor neurotoxice puternice [1, 2], mediate prin inhibarea ireversibilă a enzimelor colinesteraze (ChE) [3]. Această inhibare conduce la acumularea de acetilcolină, rezultând o stimulare excesivă a receptorilor colinergici și manifestări clinice polimorfe [4], adesea severe, incluzând insuficiență respiratorie acută, convulsii, comă și chiar deces [5].

Deși progresele în diagnostic și tratament sunt notabile, persistența unor lacune în înțelegerea dinamicii ChE în context clinic impune o investigație aprofundată. Monitorizarea activității acetilcolinesterazei (AChE) și a butirilcolinesterazei (BChE) / pseudocolinesterazei (PsChE) este esențială pentru evaluarea severității intoxicației, ghidarea terapiei și monitorizarea recuperării neurologice [6, 7]. Cu toate acestea, relațiile precise dintre aceste enzime, dinamica lor pe parcursul intoxicației și recuperării, precum și utilitatea lor relativă ca markeri diagnostici și prognostici rămân subiecte de dezbatere și cercetare activă [8, 9]. O deficiență notabilă în practica medicală actuală este monitorizarea adesea limitată a acestor enzime, lipsa unei urmăririi continue privând medicii de informații esențiale pentru ajustarea în timp real a tratamentului și optimizarea prognosticului.

Prezenta teză de doctorat își propune să răspundă acestor nevoi prin investigarea aprofundată a evoluției activității colinesterazelor la pacienții cu intoxicații acute cu organofosforice, cu un accent deosebit pe diazinon și malation. Cercetarea noastră a comparat metodele de determinare a BChE și AChE și a dezvoltat o metodă analitică validată pentru cuantificarea directă a diazinonului și malationului în probele urinare ale pacienților.

1.1. Incidența intoxicațiilor cu pesticide organofosforice: O perspectivă globală

Incidența intoxicațiilor cu OP variază semnificativ la nivel global, influențată de factori socio-economici și reglementări. Deși în țările dezvoltate s-a observat o scădere a cazurilor acute datorită reglementărilor mai stricte [7, 10], auto-intoxicarea deliberată cu pesticide OP rămâne o cauză majoră de decese la nivel mondial, contribuind la 13,7% din totalul sinuciderilor globale între 2010-2014 [11, 12, 13]. Se estimează că anual apar aproximativ 385 de milioane de cazuri de

intoxicație acută cu pesticide la nivel global, ducând la circa 11.000 de decese, majoritatea în țările în curs de dezvoltare [14], necesitând strategii de intervenție consolidate și reforme legislative [4, 13].

1.2. Chimia și clasificarea compușilor organofosforici

Compușii OP sunt esteri ai acidului fosforic [15], cu o toxicitate determinată de structura chimică [16]. Majoritatea pesticidelor OP sunt fosforotioați ($P=S$), necesitând **activare metabolică** în compuși oxonici ($P=O$) de către sistemul enzimatic citocrom P450 (CYP450) [17, 18], ceea ce poate întârzia debutul intoxicației. Diazinonul și malationul sunt lipofili, putând prezenta toxicitate întârziată datorită eliberării treptate din țesutul adipos [19, 20]. OMS clasifică pesticidele pe baza toxicității (LD_{50}), dar această clasificare nu prezice întotdeauna severitatea clinică [21]. Diazinonul este considerat „moderat periculos” (Categorie 2), iar malationul „ușor periculos” (Categorie 3) [22]. Diazinonul este acum **interzis în Uniunea Europeană** din motive de siguranță [23]. Ambele sunt asociate cu efecte toxice diverse, inclusiv asupra dezvoltării, reproducerii, sistemului imunitar și, posibil, cu riscul de cancer [4, 24-26, 27, 28]. De asemenea, au un **impact negativ asupra organismelor non-țintă și a mediului** [29, 30, 31].

1.3. Spectrometria de masă în laboratorul clinic: Aplicații și validare

Spectrometria de masă (MS) câștigă teren în laboratoarele clinice, fiind apreciată pentru sensibilitatea, specificitatea și capacitatea sa ridicată de procesare [32]. Cuplarea cu cromatografia gazoasă (GC) sau lichidă (LC) permite cuantificarea simultană a numeroși analiți [33]. Validarea riguroasă a metodelor MS este crucială, implicând parametri precum specificitatea, liniaritatea, acuratețea, precizia, limita de detecție (LOD) și limita de cuantificare (LOQ) [34].

Spectrometrul de masă triplu cuadrupol (QqQ) este deosebit de puternic [35], folosind trei filtre cuadrupol în serie pentru selecție, fragmentare și analiză (Q_1 , Q_2 , Q_3) [36]. Această configurație permite tehnici avansate precum monitorizarea reacțiilor multiple (MRM) [37], oferind o sensibilitate și specificitate excepționale pentru cuantificarea analiților, chiar și în matrici complexe [38].

1.4. Metode de determinare a pesticidelor: Aplicații în toxicologia clinică

Dezvoltarea unor metode rapide și fiabile pentru detectarea și cuantificarea pesticidelor în biofluide umane este urgentă [39]. Tehnicile cromatografice cuplate cu MS (GC-MS, LC-MS, GC-

MS/MS, LC-MS/MS) sunt cele mai utilizate, oferind sensibilitate și specificitate ridicate [40-42]. MS/MS constituie un instrument excepțional de puternic pentru analizarea pesticidelor OP în probe biologice [43-45]. Pregătirea probelor a evoluat, incluzând extracția în fază solidă (SPE) [46] și tehnici QuEChERS [47].

Pentru malation și diazinon, au fost dezvoltate metode GC-MS și GC-MS/MS pentru ser/plasmă [48-51]. Analiza urinară constituie o alternativă neinvazivă esențială pentru evaluarea expunerii umane la aceste pesticide OP, prin cuantificarea metaboliților specifici, cum ar fi 2-izopropil-6-metil-4-pirimidinolul (IMPy) pentru diazinon și acidul dicarboxilic malationic (MDCA) pentru malation [52]. O revizuire recentă (2010-2022) a arătat că GC-MS/MS a fost cea mai utilizată tehnică (56%) pentru detectarea pesticidelor în probe de urină [53]. Deși GC-MS/MS oferă selectivitate și sensibilitate superioare [54], prezintă limitări legate de necesitatea derivatizării și inadecvarea pentru compuși termolabili, în contrast cu LC-MS/MS care permite analiza unei game mai largi de compuși [55].

BIBLIOGRAFIE

- [1] Kumar, L.; Sharma, A.K.; Singh, D.P.; Dikshit, P.C. Homicide by organophosphorus compound poisoning: a case report. *Med. Sci. Law* **2009**, *49*, 136–138.
- [2] Rodgers, K.E. Immunotoxicity of Pesticides. In *Handbook of Pesticide Toxicology*; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2001; pp. 769–782.
- [3] Casida, J.; Quistad, G. Serine hydrolase targets of organophosphorus toxicants. *Chem. Biol. Interact.* **2005**, *277*, 157–157.
- [4] Balali-Mood, M.; Abdollahi, M. *Basic and Clinical Toxicology of Organophosphorus Compounds*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2014; pp. 67–151.
- [5] Singh, S.; Singh, S.P.; Sharma, N.; Singh, R.K.; Singh, M. Study of poisoning trends in north India—a perspective in relation to world statistics. *J. Forensic Legal Med.* **2013**, *20*, 14–18.
- [6] Eddleston, M.; Phillips, M. Self poisoning with pesticides. *BMJ* **2004**, *328*, 42–44.
- [7] Sudakin, D.L.; Power, L.E. Organophosphate exposures in the United States: a longitudinal analysis of incidents reported to poison centers. *J. Toxicol. Environ. Health A* **2007**, *70*, 141–147.
- [8] Gunnell, D.; Eddleston, M.; Phillips, M.R.; Lee, S. The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review. *BMC Public Health* **2007**, *7*, 357.
- [9] Rao, C.S.; Venkateswarlu, V.; Satyanarayana, D.; Kumar, S.A.; Satyanarayana, S.V.; Bhaskar, K.R. Pesticide poisoning in South India – opportunities for prevention and improved medical management. *Trop. Med. Int. Health* **2005**, *10*, 581–588.
- [10] Gummin, D.D.; Salomone-Russell, M.D.; Mowry, J.B.; Valento, M. 2020 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 38th Annual Report. *Clin. Toxicol. (Phila.)* **2021**, *59*, 1282–1501.
- [11] Mew, E.J.; Padmanathan, P.; Konradsen, F.; Eddleston, M.; Phillips, M.R.; Gunnell, D. The global burden of fatal self-poisoning with pesticides 2006–15: systematic review. *J. Affect. Disord.* **2017**, *219*, 93–104.
- [12] WHO/FAO. *Preventing suicide: a resource for pesticide registrars and regulators*; 2019. Available online: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/326947/9789241516389-eng.pdf> (accessed on 2024).

- [13] Lee, Y.; Chang, S.-S.; Lee, S.-W.; Wu, P.P.; Hsiao, H.-J.; Chen, Y.-Y.; Chou, C.-P.; Chen, H.C.; Gunnell, D. The cost-effectiveness of banning highly hazardous pesticides to prevent suicides due to pesticide self-ingestion across 14 countries: an economic modelling study. *Lancet Glob. Health* **2021**, *9*, E291–E300.
- [14] WHO. *The global distribution of acute unintentional pesticide poisoning: estimations based on a systematic review*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2020; pp. 1–11.
- [15] Mukherjee, S.; Gupta, R.C. Organophosphorus Nerve Agents: Types, Toxicity, and Treatments. *J. Toxicol.* **2020**, 3007984.
- [16] Balali-Mood, M.; Balali-Mood, N.; Balali-Mood, B.; Balali-Mood, N. Health Aspects of Organophosphorus Pesticides in Asian Countries. *Iran. J. Public Health* **2012**, *41*, 1–14.
- [17] Kappers, W.A.; Van der Heiden, C.; Van Leerdam, E.J.; Vleeming, W. Diazinon is activated by CYP2C19 in human liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2001**, *177*, 68–76.
- [18] Ellison, C.M.; Coleman, K.; Cao, J.; Jortner, B.S.; Panzino, V.C.; Deck, K.J.; Albers, K.J.; Jortner, B.S.; Panzino, V.C.; Albers, K.J. Human Hepatic Cytochrome P450-Specific Metabolism of the Organophosphorus Pesticides Methyl Parathion and Diazinon. *Drug Metab. Dispos.* **2012**, *40*, 1–5.
- [19] Soummer, A.; Marzouk, M.; Alibeu, M.; Rémerand, G.; Bourdon, P.; Mégarbane, B. Severe and prolonged neurologic toxicity following subcutaneous chlorpyrifos self-administration: a case report. *Clin. Toxicol. (Phila.)* **2011**, *49*, 124–127.
- [20] Roberts, D.M.; Aaron, C.K. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *BMJ* **2007**, *334*, 629–634.
- [21] Dawson, A.H.; Eddleston, M.; Rajamanickam, R.; Buckley, N.A. Acute human lethal toxicity of agricultural pesticides: a prospective cohort study. *PLoS Med.* **2010**, *7*, e1000357.
- [22] WHO. *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard*; 2020. Available online: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/332193/9789240005662-eng.pdf> (accessed on 2024).
- [23] EU Pesticides Database - Active substances - Active substance details. Available online: <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/start/> (accessed on 2024).
- [24] Jerald, A.; Ehrich, M. Immunotoxicity of organophosphorus insecticides. *J. Immunotoxicol.* **2005**, *2*, 115–121.
- [25] Blair, A.; Zahm, S.H.; Dosemeci, M. Cancer incidence and mortality in agricultural workers exposed to pesticides. *J. Natl. Cancer Inst.* **2002**, *94*, 1301–1309.
- [26] Weichenthal, S.; Moase, C.; Kulka, R. Cancer incidence following exposure to diazinon in a Canadian case-control study. *Environ. Res.* **2010**, *110*, 258–262.
- [27] Rodgers, K.E. Immunotoxicity of Pesticides. In *Handbook of Pesticide Toxicology*; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2001; pp. 769–782.
- [28] Kalashnikova, A.K.; Rubin, A.L. Malathion. In *Encyclopedia of Toxicology*; Fourth Edition; Academic Press: Oxford, UK, 2024; pp. 1015–1026.
- [29] Relyea, R.A. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecol. Appl.* **2005**, *15*, 618–627.
- [30] Goulson, D. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *J. Appl. Ecol.* **2013**, *50*, 977–987.
- [31] Sanchez-Bayo, F.; Tennekes, H.A. Agricultural broad-spectrum insecticides and honeybees. *Environ. Pollut.* **2010**, *158*, 2562–2569.
- [32] Lee, M.S. *LC/MS Applications in Pharmaceutical Development: Analysis of Drugs, Metabolites, and Other Bioactive Compounds*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2012.
- [33] Vogeser, M.; Seger, C.; Steimer, W. LC-MS in the clinical laboratory—requirements and perspectives. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2016**, *54*, 1279–1290.
- [34] Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. *J. Anal. Toxicol.* **2013**, *37*, 452–474.
- [35] Clarke, W. Chapter 1 - Mass spectrometry in the clinical laboratory: determining the need and avoiding pitfalls. In *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*; Academic Press: Oxford, UK, 2017; pp. 1–15.

- [36] Wooding, K.M.; Auchus, R.J. Mass spectrometry theory and application to adrenal diseases. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2013**, *371*, 201–207.
- [37] Cramer, B.; Hübner, F.; Humpf, H.-U. Chapter 3 - Applications of High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Techniques for the Analysis of Chemical Contaminants and Residues in Food. In *Chemical Contaminants and Residues in Food*; Second Edition; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2017; pp. 51–66.
- [38] Kaklamanos, G.; Aprea, E.; Theodoridis, G. Mass Spectrometry: Principles and Instrumentation. In *Encyclopedia of Food and Health*; Academic Press: Oxford, UK, 2016; pp. 661–668.
- [39] Papoutsis, I.; Nikolaou, P.; Athanasis, S.; Pistos, C.; Spiliopoulou, C. Development and validation of a simple GC-MS method for the simultaneous determination of 11 anticholinesterase pesticides in blood-clinical and forensic toxicology applications. *J. Forensic Sci.* **2012**, *57*, 806–812.
- [40] Liu, S.; Pleil, J.D. Human blood and environmental media screening method for pesticides and polychlorinated biphenyl compounds using liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry analysis. *J. Chromatogr. B* **2002**, *769*, 155–167.
- [41] Huber, S.; Averina, M.; Brox, J.K. Automated sample preparation and GC-API-MS/MS as a powerful tool for analysis of legacy POPs in human serum and plasma. *Anal. Methods* **2020**, *7*, 2020.
- [42] Fang, J.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Li, H.; Deng, Y.; Luo, X.; Li, X. Performance of atmospheric pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of organochlorine pesticides in human serum. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411*, 4185–4191.
- [43] Sapahin, H.; Makahleh, A.; Saad, B. Determination of organophosphorus pesticide residues in vegetables using solid phase micro-extraction coupled with gas chromatography–flame photometric detector. *Arab. J. Chem.* **2019**, *12*, 1934–1944.
- [44] Cserhati, T.; Szogyi, M. Chromatographic determination of pesticides in foods and food products. *J. Nutr. Food Sci.* **2012**, *2*, 126.
- [45] Bhadekar, R.K.; Pote, S.S.; Tale, V.N.; Nirichan, B.G. Development in analytical methods for detection of pesticides in environmental samples. *Am. J. Anal. Chem.* **2011**, *2*, 1–15.
- [46] Yoshida, T.; Yoshida, J. Simultaneous analytical method for urinary metabolites of organophosphorus compounds and moth repellents in general population. *J. Chromatogr. B* **2012**, *880*, 66–73.
- [47] Iqbal, S.; Khan, A.K.; Ullah, S.; Ullah, F.; Ahmad, M. Modified QuEChERS extraction method followed by simultaneous quantitation of nine multi-class pesticides in human blood and urine by using GC-MS. *J. Chromatogr. B* **2020**, *1152*, 122227.
- [48] Adole, P.S.; Sharma, R.; Patel, S.; Sharma, S. Clinical utility of validated gas chromatography–ion trap mass spectrometry in patients with anticholinesterase pesticides poisoning. *Anal. Biochem.* **2021**, *621*, 114158.
- [49] Birich, B.; Laribi, A.; Ben Cheikh, R.; Limem, A.; Ben Hadj Salah, K.; Ben Saida, N. A selective method for quantification of diazinon in human plasma by GC-MS. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* **2020**, *78*, 617–622.
- [50] Luzardo, O.P.; Ruiz-Moya, J.; Fernández-Pérez, C.; Zumbado, M.; Boada, L.D. Validated analytical methodology for the simultaneous determination of a wide range of pesticides in human blood using GC–MS/MS and LC–ESI/MS/MS and its application in two poisoning cases. *Sci. Justice* **2015**, *55*, 307–315.
- [51] Chang, C.-J.; Lin, Y.-C.; Chung, H.-W.; Chen, Y.-L.; Hung, C.-L.; Chang, S.-H. Determination of twenty organophosphorus pesticides in blood serum by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Methods* **2016**, *8*, 4487–4496.
- [52] Hakme, E.; Poulsen, M.; Lassen, A. A Comprehensive Review on Pesticide Residues in Human Urine. *J. Agric. Food Chem.* **2024**, *72*, 17706–17729.
- [53] Birololi, W.G.; Lanças, F.M.; Neto, F.M.; Silveira, H.M. Determination of pesticide residues in urine by chromatography-mass spectrometry: methods and applications. *Front. Public Health* **2024**, *12*, 2024.
- [54] Chang, C.-J.; Lin, Y.-C.; Chung, H.-W.; Chen, Y.-L.; Hung, C.-L.; Chang, S.-H. Determination of twenty organophosphorus pesticides in blood serum by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Methods* **2016**, *8*, 4487–4496.
- [55] Brinco, J.; Loureiro, S.; Fardilha, M.; Padrão, J. Analysis of pesticide residues in soil: a review and comparison of methodologies. *Microchem. J.* **2023**, *195*, 109465.

Capitolul 2 - Activitatea enzimatică a colinesterazelor în intoxicațiile cu insecticide organofosforice

Acetilcolinesteraza (AChE) și butirilcolinesteraza (BChE) sunt enzime esențiale, vizate în intoxicațiile cu organofosforice (OP) [1, 2]. AChE este crucială în neurotransmisie, iar activitatea sa eritocitară reflectă fidel expunerea la OP [3, 4]. BChE, sintetizată hepatic, este un biomarker pentru funcția hepatică și un indicator potențial al expunerii la OP [4, 5].

Severitatea intoxicației cu OP este direct legată de gradul de inhibare a ChE [6]. Nivelurile de AChE sub 10% indică intoxicație severă, iar clasificări precum cea a lui Balali-Mood et al. corelează activitatea ChE (BChE și AChE) cu severitatea (ușoară, moderată, severă) [7]. Există o corelație demonstrată între severitatea intoxicației și colinesteraza serică la internare [8, 9].

2.1. Mecanismul toxicității organofosforicelor

Pesticidele organofosforice (OP), cum ar fi malationul și diazinonul, devin toxice în organism prin bioactivare metabolică. Acest proces le transformă din forme tiofosforil în oxoni, cu ajutorul enzimelor citocromului P-450 (CYP). Oxonii rezultați sunt metaboliți activi care inhibă puternic acetilcolinesteraza (AChE). Această inhibiție duce la acumularea de acetilcolină și, implicit, la o hiperstimulare colinergică [10]. Deși enzima Paraoxonaza 1 (PON1) detoxifică oxonii, transformându-i în metaboliți mai puțin toxici și hidrosolubili, care pot fi eliminați, balanța dintre activarea de către CYP450 și detoxifierea de către PON1 este decisivă pentru toxicitatea generală [11]. OP-urile formează un complex stabil cu AChE, iar un proces numit "îmbătrânire" poate face inhibiția ireversibilă. Tratamentul include administrarea de atropină pentru simptomele colinergice și oxime pentru reactivarea AChE, la care se adaugă benzodiazepine și terapie de suport [10].

Tabloul clinic al intoxicațiilor acute cu OP se manifestă prin sindromul colinergic acut, cu simptome muscarinice precum hipersecreția și nicotinică, ce includ fasciculații și convulsii. Anumite OP-uri, fiind liposolubile, pot cauza și o toxicitate întârziată [12]. Severitatea intoxicației este direct legată de gradul de inhibiție a AChE: cazurile ușoare (cu 50-90% activitate AChE) se manifestă prin greață și cefalee, cele moderate (10-50% AChE) prin slăbiciune și bradicardie, iar intoxicațiile severe (sub 10% AChE) pot evolua spre insuficiență respiratorie, convulsii și comă.

2.3. Evaluarea activității colinesterazelor în contextul intoxicațiilor cu organofosforice

Activitatea colinesterazelor (ChE) este evaluată prin metode spectrofotometrice [13], potențiometrice [14] și electrochimice [15–17]. Metodele spectrofotometrice și potențiometrice suferă din cauza diluării probei, care reduce acuratețea în cazurile de intoxicație ușoară [13]. Pentru determinarea AChE și BChE în sânge integral, se pot folosi inhibitori specifici de BChE, deși unii pot afecta și AChE [31]. O metodă inovatoare utilizează indoxilacetatul ca reactiv bifuncțional pentru o detecție sensibilă [13]. Kitul de teren Test-mate ChE 400 oferă o testare rapidă fiabilă la punctul de îngrijire [29]. Răcirea și diluarea imediată a probei sunt esențiale pentru AChE, în timp ce BChE, deși mai stabilă, are o variabilitate interindividuală ce-i limitează utilitatea prognostică [30].

Imunotestele, bazate pe interacțiunea anticorp-analit, sunt rapide și automatizate [32]. Metoda EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique), dezvoltată în 1973 [18], este o tehnică omogenă care cuantifică analiții prin competiția acestora cu un analog marcat enzimatic pentru legarea la un anticorp. Semnalul (absorbanta la 340 nm) este direct proporțional cu concentrația analitului [19–21]. Deși rapidă, EMIT necesită pretratament riguros al probelor pentru a minimiza interferențele optice și efectele compușilor cu reactivitate încrucișată sau ale inhibitorilor enzimatici [22].

Metoda Ellman, introdusă în 1961 [23], măsoară activitatea ChE prin hidroliza unui derivat de tiocolină și reacția ulterioară cu acidul 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoic (DTNB), formând un produs galben a cărui absorbție este măsurată [24]. Această metodă, deși larg utilizată, are limitări, inclusiv potențiala interferență a oximelor și probleme de stabilitate a reactivului [25–27]. O metodă Ellman modificată (Patel et al., 2023) a îmbunătățit simplitatea, rapiditatea și corelația cu metoda standard, având o limită de detecție scăzută, fiind potrivită pentru aplicații clinice de rutină [28].

BIBLIOGRAFIE

- [1] Pohanka, M.; Hrabínova, M.; Kuca, K.; Simonato, J. Assessment of acetylcholinesterase activity using indoxylacetate and comparison with the standard Ellman's method. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 2631–2640.
- [2] Pohanka, M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed. Pap. Olomouc* **2011**, *155*, 219–229, doi:10.5507/bp.2011.036.
- [3] Pohanka, M. Acetylcholinesterase inhibitors: a patent review (2008 – present). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2012**, *22*, 871–886, doi:10.1517/13543776.2012.701620.
- [4] Gupta, R.C. Biomarkers in toxicology. In *Biomarkers in Toxicology*; Second Edition; Gupta, R.C., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 173–185.

- [5] Pohanka, M. Cholinesterases in biorecognition and biosensor construction: A review. *Anal. Lett.* **2013**, *46*, 1849–1868, doi:10.1080/00032719.2013.780240.
- [6] Fina, P.; et al. *Human Toxicology of Pesticides*; CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA, 2019; pp. 26–29.
- [7] Balali-Mood, M.; Balali-Mood, K.; Moodi, M.; Balali-Mood, B. Health Aspects of Organophosphorous Pesticides in Asian Countries. *Iran. J. Public Health* **2012**, *41*, 1–14. Available online: <http://ijph.tums.ac.ir> (accessed on 2025).
- [8] V, H.; et al. A study on serum cholinesterase level in organophosphorus poisoning and its correlation with severity of organophosphorus poisoning. *Int. J. Adv. Med.* **2018**, *5*, 1021–1025, doi:10.18203/2349-3933.ijam20183140.
- [9] Senanayake, N.; de Silva, H.J.; Karalliedde, L. A scale to assess severity in organophosphorus intoxication: POP scale. *Hum. Exp. Toxicol.* **1993**, *12*, 297–299.
- [10] Gupta, R. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*; Second Edition; Academic Press: London, UK, 2015; pp. 1071–1087.
- [11] Miodovnik, A. Prenatal Exposure to Industrial Chemicals and Pesticides and Effects on Neurodevelopment. In *Earth Systems and Environmental Sciences*; Academic Press: New York, NY, USA, 2018; doi:10.1016/b978-0-12-409548-9.11008-5.
- [12] Clarke, W.; Marzinke, M. *Contemporary Practice in Clinical Chemistry*; Fourth Edition; Academic Press: St. Louis, MO, USA, 2020; pp. 917–951.
- [13] Pohanka, M. Determination of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity without dilution of biological samples. *Chem. Pap.* **2015**, *69*, 1044–1049, doi:10.1515/chempap-2015-0117.
- [14] Bazire, A.; Gillon, E.; Lockridge, O.; Vallet, V.; Nachon, F. The kinetic study of the inhibition of human cholinesterases by demeton-S-methyl shows that cholinesterase-based titration methods are not suitable for this organophosphate. *Toxicol. In Vitro* **2011**, *25*, 754–759, doi:10.1016/j.tiv.2011.01.006.
- [15] Pohanka, M. Voltammetric assay of butyrylcholinesterase in plasma samples and its comparison to the standard spectrophotometric test. *Talanta* **2014**, *119*, 412–416, doi:10.1016/j.talanta.2013.11.045.
- [16] Khaled, E.; Hassan, H.G.; Mohamed, G.F.; Ragab, F.M.; Seleim, A.R. Disposable potentiometric sensors for monitoring cholinesterase activity. *Talanta* **2010**, *83*, 357–363, doi:10.1016/j.talanta.2010.09.020.
- [17] Pohanka, M. Biosensors containing acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as recognition tools for detection of various compounds. *Chem. Pap.* **2015**, *69*, 4–16, doi:10.2478/s11696-014-0542-x.
- [18] Daime, M.; Ryutaro, A. Biosensors: Immunosensors. In *Encyclopedia of Sensors and Biosensors*; First Edition; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2023; pp. 298–314, doi:10.1016/B978-0-12-822548-6.00008-X.
- [19] Bertholf, R.L.; Reisfield, G.M. Chapter 18 - Drug Testing in Pain Management. In *Therapeutic Drug Monitoring*; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2012; pp. 397–416, doi:10.1016/B978-0-12-385467-4.00018-X.
- [20] Ullman, E.F. Chapter 2.3 - Homogeneous Immunoassays. In *The Immunoassay Handbook*; Fourth Edition; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2013; pp. 67–87, doi:10.1016/B978-0-08-097037-0.00006-3.
- [21] Melanson, S.E.F. The Utility of Immunoassays for Urine Drug Testing. *Clin. Lab. Med.* **2012**, *32*, 429–447, doi:10.1016/j.cll.2012.06.004.
- [22] Felgate, P. Methods of Analysis – Initial Testing. In *Encyclopedia of Forensic Sciences*; Second Edition; Academic Press: Waltham, MA, USA, 2013; pp. 249–264, doi:10.1016/B978-0-12-382165-2.00314-7.
- [23] Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V. Jr.; Featherstone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88–90.

- [24] Mohammadi, H.; Jalilian, J.; Karimi, M.; Shetab-Boushehri, S. In vitro cysteine reactivates organophosphate insecticide dichlorvos-inhibited human cholinesterases. *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* **2017**, *17*, 293–300.
- [25] Komersová, A.; Komers, K.; Cegan, A. New findings about Ellman's method to determine cholinesterase activity. *Z. Naturforsch. C.* **2007**, *62*, 150–154.
- [26] Dingova, D.; Leroy, J.; Check, A.; Garaj, V.; Krejci, E.; Hrabovska, A. Optimal detection of cholinesterase activity in biological samples: Modifications to the standard Ellman's assay. *Anal. Biochem.* **2014**, *462*, 67–75.
- [27] Sinko, G.; Calić, M.; Bosak, A.; Kovarik, Z. Limitation of the Ellman method: cholinesterase activity measurement in the presence of oximes. *Anal. Biochem.* **2007**, *370*, 223–227.
- [28] Patel, A. Simple and rapid colorimetric method for determination of erythrocyte and plasma cholinesterase activities and comparison with the standard Ellman's method. *Public Health Toxicol.* **2023**, *3*, 14, doi:10.18332/pht/172229
- [29] Rajapakse, B.; Thiermann, H.; Eyer, P.; Worek, F.; Bowe, S.J.; Dawson, A.H.; Buckley, N.A. Evaluation of the Test-mate ChE (Cholinesterase) Field Kit in Acute Organophosphorus Poisoning. *Ann. Emerg. Med.* **2011**, *58*, 559–564.
- [30] Eddleston, M.; Buckley, N.A.; Eyer, P.; Dawson, A.H. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet* **2008**, *371*, 597–607, doi:10.1016/S0140-6736(07)61202-1.
- [31] Ramachandra, S.V.; et al. Comparison of methods used for the determination of cholinesterase activity in whole blood. *Chem. Biol. Interact.* **2008**, *175*, 298–302, doi:10.1016/j.cbi.2008.05.002.
- [32] Dasgupta, A. Immunoassay Design and Mechanism of Biotin Interference. In *Biotin and Other Interferences in Immunoassays*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2019; pp. 1–15, doi:10.1016/b978-0-12-816429-7.00001-0.

Capitolul 3 – Optimizarea metodei imunoenzimatică pentru cuantificarea butirilcolinesterazei

3.1. Introducere

Evaluarea rapidă a activității colinesterazelor (ChE) sau a nivelurilor de organofosforice (OP) este esențială pentru gestionarea pacienților intoxicați [1]. Lipsa metodelor rapide și accesibile, în special în țările în curs de dezvoltare, poate duce la întârzieri fatale în diagnostic și tratament [2]. Această lacună subliniază nevoia urgentă de instrumente diagnostice rapide și fiabile, având în vedere limitările metodelor existente (complexitate, cost) [3-7].

3.2. Materiale și metode

Studiul a utilizat analizorul Siemens Viva ProE și kituri comerciale pentru determinarea activității Pseudocolinesterazei (PChE) în plasma obținută din probe de sânge cu EDTA. Metoda se bazează pe principiul EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique), o imunoanaliză omogenă competitivă. În această metodă, analitul din probă concurează cu un analog enzimatic marcat cu glucoză-6-fosfat dehidrogenază (G6PD) pentru situsurile de legare ale anticorpilor. Activitatea G6PD, măsurată spectrofotometric prin producția de NADH, este invers proporțională cu concentrația analitului. Deși avantajoasă pentru stabilitatea reactivilor și lipsa etapelor de separare, metoda este sensibilă la interferențele matriciale [8]. Toate etapele de validare au respectat ghidurile SWGTOX [9].

3.3. Rezultate și discuții

Metoda EMIT pentru determinarea butirilcolinesterazei (BChE) a demonstrat o liniaritate robustă între absorbanță și concentrație, cu un coeficient de determinare excepțional ($R^2 = 0.9998$) și un coeficient de variație (CV) sub 10% pentru majoritatea punctelor de calibrare, indicând o precizie consistentă și o reproductibilitate excelentă. Analiza rezidualelor a confirmat adecvarea modelului de regresie liniară.

Precizia metodei a fost validată prin analiza de varianță (ANOVA), care nu a indicat diferențe semnificative statistic între seriile de măsurători ($p > 0.05$), atestând o reproductibilitate optimă. Acuratețea a fost demonstrată prin controlul calității, cu o abatere minimă de -3.2% față de

valoarea țintă și CV-uri intra-serie (8.85%) și inter-serie (7.42%) sub 10%. Aceste rezultate confirmă o precizie analitică satisfăcătoare pentru utilizarea clinică.

Limita de detecție (LOD) a fost stabilită la 319.96 U/L, iar limita de cuantificare (LOQ) la 1000.00 U/L, indicând capacitatea metodei de a detecta și măsura cu fiabilitate concentrații scăzute ale analitului.

3.4. CONCLUZII

Studiul a evaluat riguros performanța analitică a sistemului Siemens Viva ProE folosind metoda imunoanalitică omogenă EMIT pentru determinarea PChE, demonstrând o robustețe analitică consistentă și aplicabilitate clinică deplină. Metoda a prezentat liniaritate excepțională ($R^2 = 0.9998$) și precizie remarcabilă (CV-uri sub 10%). Acuratețea a fost confirmată printr-o abatere minimă (-3.2%) a controlului de calitate. Limitele de detecție (319.96 U/L) și cuantificare (1000.00 U/L) atestă fiabilitatea măsurătorilor, chiar și la concentrații scăzute. În concluzie, metoda EMIT pentru determinarea butirilcolinesterazei pe analizorul Siemens Viva ProE are caracteristici analitice superioare, fiind recomandată ferm pentru utilizarea clinică în monitorizarea precisă a nivelurilor de butirilcolinesterază, esențială în gestionarea intoxicațiilor cu organofosforice.

3.5. BIBLIOGRAFIE

- [1] Balali-Mood, M.; Saber, H. Recent advances in the treatment of organophosphorous poisonings. *Iran J. Med. Sci.* **2012**, *37*, 74–91.
- [2] Balali-Mood, M.; Abdollahi, M. Basic and Clinical Toxicology of Organophosphorus Compounds. Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2014; pp. 67–151.
- [3] Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V., Jr.; Featherstone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88–95.
- [4] Amouzegar, A.; Ghasemi, J.; Bahrami, S. Analytical methods for cholinesterase activity detection. *Talanta* **2016**, *154*, 60–73.
- [5] Ricci, F.; Moscone, D.; Palleschi, G. Electrochemical biosensors for cholinesterase determination. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2004**, *23*, 509–519.
- [6] Campàs, M.; Katakis, I. Biosensors for the detection of organophosphorus pesticides: A review. *Talanta* **2007**, *72*, 1–12.
- [7] Cătănescu, A.; Gălbinaș, I.; Popa, D.E.; Sinescu, A.C.; Puiu, D.; Ciucu, A.A. Enzymatic and immunological methods for cholinesterase activity assessment: A comparative review. *Anal. Lett.* **2021**, *54*, 1–18.
- [8] Dasgupta, A. Immunoassay Design and Mechanism of Biotin Interference. In *Biotin and Other Interferences in Immunoassays*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2019; pp. 1–15, doi:10.1016/B978-0-12-816429-7.00001-0.
- [9] SWGTOX. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. *J. Anal. Toxicol.* **2013**, *37*, 305–331

Capitolul 4 – Dezvoltarea metodei de cuantificare a diazinonului și malationului prin spectrometrie de masă

4.1. Introducere

Intoxicațiile cu pesticide organofosforice (OP) ca diazinonul și malationul reprezintă o problemă majoră de sănătate publică, necesitând un diagnostic rapid și precis. Metodele analitice existente sunt adesea limitate de complexitate și stabilitatea analiților. Acest studiu propune o metodă GC-MS/MS de înaltă performanță, utilizând modul de Monitorizare a Reacțiilor Multiple (MRM) pentru detecția ultra-sensibilă și specifică a acestor compuși în matrici biologice complexe [1-6].

4.2. Materiale și metode

Studiul a folosit materiale de referință certificate pentru diazinon și malation. Probele de urină (30 mL), colectate de la pacienți suspecți de intoxicație, au fost supuse unei extracții lichid-lichid (LLE) cu un amestec de cloroform/diclorometan/clorură de metil (1:1:1, v/v/v). Extractul a fost evaporat, reconstituit cu metanol și 1 μ L a fost injectat într-un sistem GC Agilent 8890 cuplat cu un spectrometru de masă triplu cuadrupol 7010B. Condițiile MS/MS au fost optimizate pentru modul MRM, cu ionizare prin impact electronic (EI, 70 eV), asigurând sensibilitate și specificitate maxime prin monitorizarea tranzițiilor ionice caracteristice fiecărui analit. Analiza datelor a fost realizată cu software-ul MassHunter (Agilent).

4.3. Rezultate și discuții

4.3.1. Optimizarea metodei de extracție

Diverse tehnici de extracție au fost comparate, extracția lichid-lichid (LLE) fiind preferată față de extracția în fază solidă (SPE). Această preferință s-a bazat pe eficiența, costul redus și rapiditatea LLE, atribute critice în situațiile de urgență [7–9]. Un amestec optim de solvenți, compus din dicloretan, clorură de metil și cloroform (1:1:1, v/v/v), a demonstrat o rată de recuperare excepțională de 94% pentru pesticidele organofosforice din probele de urină, asigurând o cuantificare precisă.

4.3.2. Optimizarea metodei MRM

Pentru o detecție sensibilă și selectivă, parametrii GC-MS/MS au fost optimizați riguros în modul MRM (Monitorizare Reacție Multiplă). Au fost stabiliți timpii de retenție specifici (ex: standardul intern cipermetrin la 32.14 min) și au fost selectate tranzițiile ionice cele mai caracteristice pentru a minimiza interferențele. Analiza spectrelor de masă a identificat ioni fragment specifici pentru diazinon (m/z 179.2) și malation (m/z 99.0), permițând identificarea precisă în matrici complexe. Optimizarea energiei de coliziune (CE) a fost crucială. Pentru diazinon, tranziția $137.1 \rightarrow 84$ la 15 V CE a oferit cea mai bună sensibilitate (intensitate semnal 237.858,9). Pentru malation, tranziția $126.9 \rightarrow 99$ la 5 V CE a demonstrat cea mai înaltă sensibilitate (intensitate semnal 338.545,3). Timpii de retenție optimizați au fost de 16.65 min pentru diazinon și 19.91 min pentru malation. Aceste optimizări asigură o detecție eficientă și precisă, conform standardelor internaționale (Decizia Comisiei Europene 2002/657/CE) [10].

4.3.3. Validarea metodei MRM

Validarea metodei de Monitorizare a Reacțiilor Multiple (MRM) pentru diazinon și malation a demonstrat performanțe analitice excelente. Domeniul de liniaritate a fost stabilit între 5 și 1000 ng/mL. Pentru diazinon, curba de calibrare a arătat o liniaritate remarcabilă, cu un coeficient de determinare (R^2) de 0.9998 și un coeficient de variație (CV) între 0.17% și 4.69%. Similar, pentru malation, liniaritatea a fost și mai puternică, cu un R^2 de 0.9999 și CV-uri între 0.03% și 4.99%. Analizele ANOVA au confirmat robustitudinea modelelor de regresie liniară pentru ambii analiți.

Acuratețea metodei a fost evaluată prin analize de probe fortificate, iar toate abaterile s-au încadrat în limitele acceptabile de $\pm 20\%$, indicând o acuratețe satisfăcătoare, în special la concentrații mai mari. Precizia (intra-serie și inter-serie) a fost de asemenea bună, cu un CV sub 5% la 50 ng/mL și sub 1% la 500 ng/mL pentru ambii analiți, demonstrând o reproductibilitate remarcabilă.

Limita de detecție (LOD) a fost de 0.60 ng/mL pentru diazinon și 0.33 ng/mL pentru malation, confirmând capacitatea metodei de a detecta concentrații foarte scăzute. Limita de cuantificare (LOQ) a fost stabilită la 5 ng/mL pentru ambii analiți, la acest nivel fiind respectate criteriile de acuratețe și precizie. În cele din urmă, selectivitatea și specificitatea metodei au fost demonstrate prin cromatograma totală a ionilor (TIC) în modul MRM, care a arătat un singur vârf

major, ascuțit și intens, la timpul de retenție specific, minimizând interferențele matriciale. Această validare riguroasă confirmă fiabilitatea metodei pentru analiza în matrici biologice complexe.

4.3.4. Constatări clinice: analiza probelor pacienților intoxicați

Metoda GC-MS/MS validată a fost aplicată cu succes în analiza toxicologică a probelor biologice (urină) de la pacienți internați cu suspiciune de auto-intoxicație intenționată cu pesticide.

Inițial, probele pacienților au fost supuse unei analize preliminare în modul SCAN (GC-MS) pentru screeningul general. Această abordare a permis identificarea preliminară a xenobioticului necunoscut, cum ar fi diazinonul (la ~12.023 min) și malationul (la ~16.770 min), prin compararea spectrelor de masă cu biblioteci de referință. Este important de subliniat că, în ciuda identificării preliminare, complexitatea matricii biologice din probele reale (ilustrată de multitudinea de picuri în cromatogramele SCAN) poate afecta precizia.

Pentru confirmarea precisă și cuantificarea riguroasă a diazinonului și malationului, s-a utilizat metoda MRM validată anterior. Această abordare selectivă și sensibilă a fost indispensabilă pentru a obține rezultate fiabile în cazurile clinice reale, unde precizia este crucială pentru managementul pacientului.

Analiza a opt cazuri de intoxicație acută (perioada 2021-2023) a relevat o corelație pozitivă notabilă între concentrația de insecticid detectată în urină și durata spitalizării în ATI. Concentrațiile de insecticid în urină au variat între 87 și 495 ng/mL, iar durata internării în ATI a fluctuat între 11 și 24 de zile. Această tendință sugerează că pacienții cu niveluri mai ridicate de expunere, reflectate de concentrații urinare crescute, tind să necesite perioade mai lungi de spitalizare. Aceste constatări din lumea reală subliniază potențialul concentrațiilor urinare de a servi drept indicator al severității intoxicației și al prognosticului, având implicații directe pentru alocarea resurselor și managementul clinic în urgențe.

4.4. Concluzii

Acest capitol a detaliat dezvoltarea și validarea unei metode analitice robuste bazate pe GC-MS/MS pentru cuantificarea diazinonului și malationului în urină. Optimizarea parametrilor cromatografici și spectrometrici a fost realizată exhaustiv. Contribuțiile cheie includ optimizarea precisă a energiilor de coliziune (CE) pentru tranzițiile MRM (15 V pentru diazinon și 5 V pentru malation), maximizând sensibilitatea și selectivitatea. Metoda a demonstrat selectivitate excelentă, liniaritate excepțională ($R^2 > 0.999$), acuratețe robustă ($\pm 20\%$) și precizie remarcabilă

(CV intra-grup între 0.03% și 4.69%), cu reproductibilitate inter-serie confirmată. Sensibilitatea a fost adecvată, cu LOD de 0.60 ng/mL pentru diazinon și 0.33 ng/mL pentru malation, și LOQ de 5 ng/mL pentru ambii analiți. Metoda validată a fost aplicată cu succes în analiza probelor de urină de la pacienți intoxicați, facilitând un diagnostic rapid și precis. Observațiile clinice au evidențiat o corelație pozitivă între concentrațiile de pesticide în urină și durata spitalizării în ATI, sugerând o legătură între nivelul de expunere și severitatea clinică. În concluzie, metoda GC-MS/MS dezvoltată este un instrument analitic de înaltă performanță, caracterizat prin atribute analitice superioare, validând fiabilitatea și utilitatea sa pentru investigațiile toxicologice de rutină și de urgență, contribuind semnificativ la îmbunătățirea capacității de diagnostic și management al expunerii la pesticidele organofosforice.

4.5. Bibliografie

- [1] Kumar, L.; Agarwal, S.; Chavali, K.; Mestri, S. Homicide by organophosphorus compound poisoning: a case report. *Med. Sci. Law* **2009**, *49*, 136–138.
- [2] Papoutsis, I.; et al. Development and validation of a simple GC-MS method for the simultaneous determination of 11 anticholinesterase pesticides in blood-clinical and forensic toxicology applications. *J. Forensic Sci.* **2012**, *57*, 806–812, doi:10.1111/j.1556-4029.2011.02031.x.
- [3] John, H.; Eddleston, M.; Clutton, R.; Worek, F.; Thiermann, H. Simultaneous quantification of the organophosphorus pesticides dimethoate and omethoate in porcine plasma and urine by LC-ESI-MS/MS and flowinjection-ESI-MS/MS. *J. Chromatogr. B* **2010**, *878*, 1234–1245.
- [4] Fina, P.; et al. Human Toxicology of Pesticides. In *Human Toxicology of Pesticides*; CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA, 2019; pp. 26–29.
- [5] Lambropoulou, D.; Albanis, T. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography–mass spectrometry based techniques: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 1663–1683.
- [6] Pang, G.; et al. High-throughput GC/MS and HPLC/MS/MS techniques for the multiclass, multiresidue determination of 653 pesticides and chemical pollutants in tea. *J. AOAC Int.* **2011**, *94*, 1253–1296.
- [7] Musshoff, F.; Junker, H.; Madea, B. Simple Determination of 22 Organophosphorous Pesticides in Human Blood Using Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography with Mass Spectrometric Detection. *J. Chromatogr. Sci.* **2002**, *40*, 29–39, doi:10.1093/chromsci/40.1.29.
- [8] Raposo, R.; et al. Determination of eight selected organophosphorus insecticides in postmortem blood samples using solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 3187–3194, doi:10.1002/rcm.4765.
- [9] EURL. *Determination of Pesticide Residues in Wheat by GC-MS/MS*. Available online: [https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/\(11\)%20Appendix%203%20Validation%202012%20cerealier%20FC-MSMS%20SweEt%20report%2011.pdf](https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/(11)%20Appendix%203%20Validation%202012%20cerealier%20FC-MSMS%20SweEt%20report%2011.pdf) (accessed on 25 November 2024).
- [10] SWGTOX. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. *J. Anal. Toxicol.* **2013**, *37*, 452–474, doi:10.1093/jat/bkt054.

Capitolul 5 – Studiul activității colinesterazelor în intoxicațiile acute cu organofosforice

5.1. Introducere

Intoxicațiile acute cu compuși organofosforici (OP) sunt o urgență medicală majoră. Acești compuși, larg utilizați, exercită neurotoxicitate severă prin inhibarea ireversibilă a colinesterazelor (ChE), ducând la acumulare de acetilcolină (ACh) și simptome neurologice potențial letale.

Evaluarea promptă și precisă a activității ChE este crucială pentru diagnostic, monitorizare și prognostic. O scădere semnificativă confirmă expunerea, iar gradul de inhibare reflectă severitatea. Monitorizarea dinamică a ChE permite evaluarea eficacității tratamentului, cu considerații pentru factori individuali.

Două metode principale sunt utilizate: testul colorimetric Ellman și tehnica imunoenzimatică EMIT. Ellman este simplă, dar susceptibilă la interferențe; EMIT este o imunoanaliză omogenă, rapidă și eficientă. Ambele sunt fundamentale, dar pot fi influențate de interferențe biologice. Sunt disponibile atât dispozitive portabile (Ellman), cât și sisteme automate (EMIT).

Acest studiu compară metodele de determinare a inhibării acetilcolinesterazei (AChE) și butirilcolinesterazei (BChE) în intoxicațiile acute cu diazinon și malation. Pentru claritate, BChE se referă la activitatea din sânge total (metoda Ellman), iar pseudocolinesteraza (PsChE) la aceeași enzimă cuantificată din plasmă (metoda EMIT). Această distincție terminologică este esențială pentru interpretarea riguroasă a datelor.

5.2. Materiale și metode

5.2.1. Prelevarea și pregătirea probelor biologice

Studiul a respectat Declarația de la Helsinki, asigurând revizuirea fișelor pacienților, obținerea consimțământului informat și anonimizarea datelor. Probele de sânge au fost recoltate de la pacienți internați în secția ATI Toxicologie a Spitalului Clinic de Urgență București, cu diagnostic confirmat de intoxicație acută cu compuși organofosforici. S-au efectuat determinări repetate ale activității enzimactice pentru monitorizarea zilnică a stării pacienților. Nu s-au colectat probe biologice suplimentare. Pentru a preveni coagularea, probele de sânge integral au fost

colectate în tuburi vidate cu EDTA, depozitate la 4 °C și analizate în maximum o oră de la recoltare. Pentru analiza prin EMIT, plasma a fost separată prin centrifugare la 4000 rpm timp de patru minute.

5.2.2. Principiul metodei

Instrumentele analitice utilizate au fost: Sistemul Mobil Securetec ChE Check și Sistemul Viva ProE Siemens, ambele utilizând kituri de reactivi comerciale specifice.

Sistemul Securetec ChE Check a măsurat activitatea AChE și BChE prin fotometria cinetică Ellman. A necesitat o citire inițială a absorbantei cuvei, urmată de introducerea probei de sânge pentru determinarea concentrației hemoglobinei. Substratul specific (capac roșu pentru AChE, capac galben pentru BChE) a fost dizolvat prin agitare. Rezultatele au fost generate în aproximativ patru minute, fără calibrare prealabilă. Activitatea enzimatică a fost exprimată în unități de activitate raportate la gramul de hemoglobină pentru AChE și unități la litru pentru BChE, cu corecție pentru interferența hemoglobinei.

Sistemul Siemens Viva ProE a utilizat reactivi lichizi ELITechGroup pentru butirilcolinesterază, alături de calibratorul liofilizat ELICAL2 și controalele ELITROL I și II. Acestea au fost reconstituite cu apă ultrapură pentru a asigura o calibrare și un control al calității optime.

5.2.3. Analiza statistică a datelor

Analizele statistice au fost efectuate cu Microsoft Excel versiunea 16.92. S-a utilizat coeficientul de corelație Pearson pentru a evalua relația dintre activitatea BChE (măsurată cu dispozitivul point-of-care) și PsChE (determinată prin EMIT). Această metodă a cuantificat direcția și intensitatea corelației liniare între rezultatele obținute prin cele două metode. De asemenea, s-a comparat activitatea BChE cu cea a AChE pentru fiecare pacient pe parcursul spitalizării. Pentru evaluarea concordanței, s-au utilizat coeficientul de corelație Pearson și analiza Bland-Altman. Aceasta din urmă, special concepută pentru evaluarea acordului dintre două măsurători cantitative, a oferit o evaluare detaliată a similarității, fiind preferabilă coeficientului Pearson în acest context. O valoare $p < 0.05$ a fost considerată semnificativă statistic. Alegerea acestor metode statistice a fost motivată de specificitatea lor pentru tipul de date analizate și de obiectivele studiului, asigurând o evaluare riguroasă a performanței metodelor comparate.

5.3. Rezultate și discuții

5.3.1. Determinarea activității butirilcolinesterazei

Evoluția activității butirilcolinesterazei (BChE, din sânge integral) și pseudocolinesterazei (PsChE, din plasmă) a variat semnificativ la pacienții cu intoxicație acută cu diazinon și malation. Unii pacienți au prezentat o recuperare lentă și incompletă, în timp ce alții au avut o recuperare rapidă și completă, evidențiind diferențe în cinetica de regenerare sau sensibilitatea la metabolizarea pesticidului. Deși ambele substanțe inhibă BChE, dinamica recuperării diferă, fiind adesea mai rapidă în intoxicațiile cu malation și mai lentă în cele cu diazinon. Este crucial de reținut că BChE și PsChE desemnează aceeași enzimă, diferențele observate datorându-se metodelor de detecție și matricilor biologice (sânge integral versus plasmă). Prin urmare, monitorizarea duală a ambelor măsurători ale butirilcolinesterazei este imperativă pentru o evaluare completă a severității și evoluției clinice.

5.3.2. Corelații și variații între determinările BChE (Elman) și PsChE (EMIT)

Analiza coeficientului de corelație Pearson a relevat corelații pozitive, puternice și semnificative statistic între nivelurile de BChE și PsChE pentru toți pacienții (r între 0.905 și 0.996), confirmând o asocierie liniară fidelă. Evaluarea acordului prin analiza Bland-Altman a indicat un acord bun pentru intoxicația cu diazinon, dar un acord mai limitat și o abatere pozitivă semnificativă pentru intoxicația cu malation, sugerând variabilitate individuală sau influența matricei. Diagrama de dispersie a procentajelor de inhibare a demonstrat o corelație pozitivă puternică, liniară, între %BChE și %PsChE pentru ambele intoxicații.

5.3.3. Determinarea AChE prin metoda Elman

La pacienții cu intoxicație acută cu diazinon și malation, s-a observat o reducere inițială marcată a nivelurilor de acetilcolinesterază (AChE) la internare, urmată de o fază de recuperare cu rate și amplitudini variabile interindividual. Aceste variații subliniază necesitatea monitorizării individualizate a activității AChE pentru evaluarea severității și eficacității tratamentului.

5.3.4. Corelația dintre Acetilcolinesterază (AChE) și Butirilcolinesterază (BChE)

Analiza corelației Pearson a evidențiat o corelație pozitivă puternică și semnificativă statistic între nivelurile de AChE și BChE în majoritatea cazurilor de intoxicație cu diazinon (r între 0.962 și 0.976) și malation (r între 0.935 și 0.967), sugerând un răspuns fiziologic coordonat și un

mecanism comun de inhibare și reactivare enzimatică. Excepțiile observate indică necesitatea luării în considerare a variabilității individuale. Analizele Bland-Altman au indicat o concordanță acceptabilă între măsurătorile AChE și BChE/PsChE, cu o variabilitate considerabilă între diferențe, dar cu o abatere sistematică minoră ce reflectă caracteristici generale ale dinamicii colinesterazelor. Acestea subliniază importanța monitorizării concomitente a ambelor enzime.

5.3.5. Corelația dintre activitatea enzimatică și concentrația de pesticide

Studiul a demonstrat o relație inversă puternică și semnificativă statistic între concentrațiile urinare de insecticide și gradul de inhibare a colinesterazelor la internare. Pacienții cu concentrații urinare mai mari de diazinon și malation au prezentat o inhibare enzimatică mai severă a AChE, BChE și PsChE. Corelația Pearson a confirmat această observație, indicând coeficienți negativi ridicați (ex. -0.9500 pentru AChE în caz de diazinon; -0.9995 pentru AChE în caz de malation), cu valori p semnificative. Aceasta validează o relație doză-răspuns directă între expunerea la OP și inhibarea colinesterazelor. La externare, s-a observat o îmbunătățire a activității colinesterazelor, indicând o recuperare parțială. Rata de recuperare a fost variabilă și a corelat direct cu severitatea inițială a intoxicației, reflectată de nivelurile scăzute ale enzimelor la internare. Pacienții cu inhibare enzimatică inițială mai severă au necesitat, predictibil, o perioadă prelungită de internare în ATI, validând activitatea colinesterazelor ca un indicator prognostic valoros.

Comparativ cu alte studii, recuperarea activității colinesterazelor în prezentul studiu a evidențiat o variabilitate mai mare, sugerând influența unor factori precum specificitatea organofosforicului, gradul de inhibare și complexitatea compensării fiziologice individuale.

5.4. CONCLUZII

Acest studiu a evaluat comparativ metodele de determinare a inhibării colinesterazei (ChE) în intoxicațiile acute cu diazinon și malation. S-a constatat o variabilitate individuală în recuperarea activității ChE, influențată de matricea biologică. Au fost identificate corelații puternice între diferitele măsurători ale enzimelor (BChE, PsChE, AChE), confirmând interoperabilitatea metodelor. Un rezultat crucial este relația inversă puternică între concentrațiile urinare de pesticide și inhibarea enzimatică, indicând o relație doză-răspuns. Inhibarea severă a fost asociată cu spitalizări prelungite, validând ChE ca indicator prognostic. Studiul subliniază importanța monitorizării integrate a activității ChE și a concentrațiilor de pesticide urinare pentru managementul intoxicațiilor.

CONCLUZII GENERALE. CONTRIBUȚII PERSONALE. PERSPECTIVE DE DEZVOLTARE

C.1. CONCLUZII GENERALE

Teza a optimizat diagnosticul și managementul intoxicațiilor cu organofosforice (OP) prin cuantificarea colinesterazei și a compușilor OP.

Am validat și optimizat metode analitice pentru:

1. Butirilcolinesterază (BChE) prin metoda imunoenzimatică EMIT, demonstrând performanțe excelente pentru uz clinic.
2. Diazinon și Malation în urină prin GC-MS/MS, confirmând înalta specificitate și sensibilitate. S-a observat o corelație între concentrațiile de pesticide și durata spitalizării.

Cercetarea a confirmat relevanța clinică a biomarkerilor enzimatici:

1. S-a demonstrat o corelație puternică și consistentă între BChE și PsChE, precum și între AChE și BChE, validând interoperabilitatea metodelor.
2. Un rezultat cheie este corelația inversă puternică între concentrațiile urinare de pesticide și gradul de inhibare enzimatică la internare, confirmând o relație doză-răspuns.

În concluzie, teza stabilește activitatea colinesterazelor și concentrațiile urinare de pesticide ca biomarkeri fiabili pentru evaluarea severității intoxicației și monitorizarea tratamentului, oferind o bază solidă pentru optimizarea protocoalelor clinice.

C.2. CONTRIBUȚII ORIGINALE

Această teză aduce contribuții originale substanțiale în toxicologia clinică și analitică:

1. **Metodologie Analitică Integrată:** Am dezvoltat și validat o abordare holistică pentru caracterizarea intoxicațiilor cu OP, combinând cuantificarea enzimatică cu detectarea directă a pesticidelor.
2. **Robustețe Analitică și Interoperabilitate:** Am demonstrat performanța riguroasă a metodei EMIT pentru BChE și am confirmat concordanța rezultatelor între diferite tehnici de măsurare a colinesterazelor.
3. **Corelații Enzimatiche Elucidate:** Am clarificat relațiile puternice dintre AChE, BChE și PsChE în intoxicațiile cu OP, consolidând înțelegerea mecanismului de inhibiție.

4. **Cuantificarea Relației Doză-Răspuns:** Am stabilit o corelație inversă puternică între concentrațiile urinare de OP și gradul de inhibiție enzimatică, oferind un instrument valoros pentru evaluarea severității și prognosticului.
5. **Fundamentarea Monitorizării Clinice Individualizate:** Am subliniat necesitatea unei abordări personalizate în managementul pacienților, pe baza variabilității interindividuale și a corelațiilor demonstrate.

Aceste contribuții avansează semnificativ înțelegerea patofiziologiei și capacitatea de gestionare a intoxicațiilor cu organofosforice.

C.3. PERSPECTIVE DE DEZVOLTARE ULTERIOARĂ

Cercetările deschid direcții viitoare pentru îmbunătățirea managementului intoxicațiilor cu OP:

- **Extinderea Studiilor Clinice:** Necesitatea unor eșantioane mai mari și monitorizarea longitudinală pentru validare externă și înțelegerea recuperării pe termen lung.
- **Biomarkeri Avansați și Abordări Inovatoare:** Explorarea rolului PsChE ca predictor și integrarea biomarkerilor de stres oxidativ/inflamație, alături de abordări "omice" (proteomică, metabolomică), pentru o perspectivă moleculară detaliată.
- **Modele Preclinice și Standardizare:** Dezvoltarea de modele *in vitro* și *in vivo* pentru testarea noilor agenți terapeutici și standardizarea metodelor analitice pentru implementare clinică extinsă.

Aceste direcții vor contribui la avansarea cunoștințelor și la îmbunătățirea semnificativă a diagnosticului, monitorizării și strategiilor terapeutice.

ANEXE

A.1.1. ARTICOLE PUBLICATE ÎN TEMATICA TEZEI

1. **Hîrjău, A.C.**; Marandiuc, I.M.; Radu, G.L. Improving Diagnostic Accuracy In Dimpylate Poisoning: A Comparative Study Of Cholinesterase Assays, *Farmacia*, 2024, Vol. 72, 5, pp. 1191-1198; <https://doi.org/10.31925/farmacia.2024.5.22> (IF = 1.4)
2. **Hîrjău, A.-C.**; Crăciun, M.E.; Marandiuc, I.-M.; Radu, G.-L. Assessing Diazinon Exposure: A GC-MS/MS Validation Study of BChE Measurement by Point-of-Care Testing and Enzyme Multiplied Immunoassay Technique. *Molecules* **2025**, 30, 2382. <https://doi.org/10.3390/molecules30112382> (IF = 4.2)
3. **Hîrjău, A.-C.**; Marandiuc, I.-M.; Radu, G.-L. Quantifying Acetylcholinesterase Inhibition: A Diagnostic Tool for Organophosphate Poisoning. *U.P.B. Sci. Bull., Series B* 2025, *accepted*.

A.1.2. COMUNICĂRI ȘTIINȚIFICE INTENATIONALE ÎN TEMATICA TEZEI DE DOCTORAT

1. **Hîrjău, A.-C.**; Marandiuc, I.-M.; Negrea, Ș.M.; Ardeleanu, D. Paraclinical Studies and Medical Management of Dimpilate Poisoning. In *Abstracts of the 25th Balkan Military Medical Committee Congress*; Albena, Bulgaria, 28–31 May 2023; *Military Medicine* 2023, p. 87.
ORAL PRESENTATION