

## Rezumatul Tezei de doctorat:

### *Farmaco-terapia și modificările paraclinice în hipertiroidism la feline*

#### **Prezenta teză conține:**

- Listă de abrevieri
- Rezumatele în limba Română și Engleză
- Parte de cercetări bibliografice 33 pagini
- Parte de cercetări proprii 99 pagini
- Tabele 52
- Figuri 43
- Surse bibliografice 242 titluri

#### **Motivația alegerii temei de doctorat**

Deși este descrisă încă din 1979 de către Mark Peterson, în România, hipertiroidismul felin rămâne un subiect dificil de abordat în cadrul clinicilor veterinare. Datele existente în literatură sunt limitate la cazuistica externă ceea ce ne arată că hipertiroidismul felin nu este o entitate frecvent diagnosticată la pisicile domestice. Deoarece excesul de hormoni tiroidieni are repercusiuni cu efect multisistemic, afecțiunile nontiroidiene ce debutează concomitent cu hipertiroidismul sunt de cele mai multe ori considerate afecțiunea primară ceea ce va determina limitarea investigațiilor inițiale.

Diagnosticarea și terapia aproape inexistentă a hipertiroidismului felin ne-a motivat să investigăm simptomatologia și modificările paraclinice caracteristice și totodată comune atât hipertiroidismului cât și altor afecțiuni fără origine tiroidiană.

Fiind limitați la un singur tip de terapie, dar și cu o cazuistică greu de procurat, această teză urmărește stabilitatea și eficacitatea substanțelor antitiroidiene administrate pe cale orală și transdermică și ca scop stabilirea unui protocol terapeutic eficient în hipertiroidismul felin împreună cu investigarea modificărilor hematologice și biochimice depistate în cazuistica proprie și compararea datele obținute cu cele existente în literatura de specialitate sau relatate de către alți clinicieni.

**Domenii de studiu:** medicină veterinară, farmaco-terapeutică, .

**Subdomeniile:** endocrinologie, hipertiroidism, hormonoterapie, patologie medicală

#### **Importanța și actualitatea temei**

În România, hipertiroidismul felin reprezintă o endocrinopatie slab reprezentată și diagnosticată ceea ce pune în dificultate stabilirea unui protocol terapeutic eficient și mai ales accesibil. Inexistența în clinicile veterinare a produselor medicamentoase destinate terapiei antitiroidiene atestă frecvența scăzută a hipertiroidismului. Confirmarea diagnosticului de hipertiroidism este un proces care cuprinde mulți factori decisivi, și anume: simptomatologia relatată de către proprietari și evaluarea clinică coroborate cu valorilor parametrilor biochimici determinați.

Deoarece terapia hipertiroidismului este limitată, teza s-a bazat exclusiv pe eficacitatea substanțelor antitiroidiene de tip tiouracil, în special metimazol, utilizând calea de administrare orală și cutanată.

Histologic, s-au făcut investigații cu privire la efectul excesului de hormonilor tiroidieni asupra arhitecturii tiroidiene, cardiace, ovariene și epididimale.

În prezent, abordarea unei căi cutanate pentru administrarea unor substanțe la animalele domestice nu este o temă frecvent discutată în literatura de specialitate, și mai ales în endocrinopatologia felină. Utilizarea acestui concept reprezintă o temă de cercetare interesantă care urmărește eficacitatea metimazolului vehiculat de diverși compuși cu afinitate lipofilică. Deoarece accesibilitatea acestui tip de compuși este dificilă și costisitoare, s-a încercat, în cadrul acestui topic, conceperea unei formulări noi și eficiente în hipertiroidismul felin.

Existența afecțiunilor concurente a căror simptomatologie este comună hipertiroidismului atestă importanța investigațiilor paraclinice necesare atunci când instaurarea unei terapii antitiroidiene nu îmbunătățește simptomatologia existentă.

În acest sens, s-au urmărit repercusiunile pe care hormonii tiroidieni le au asupra parametrilor hematologici și biochimici, precum și abordarea unei terapii medicamentoase a cărei eficiență să fie în permanență monitorizată și actualizată cu scopul îmbunătățirii calității vieții.

***Cuvinte cheie:*** *Farmaco-terapeutică, hipertiroidism, metimazol, feline.*

În conformitate cu instrucțiunile în vigoare, teza este compusă din două părți mari:

- Partea generală – Stadiul actual al cunoașterii și
- Cercetările proprii

### ***Partea generală*** **Stadiul actual al cunoașterii**

Cuprinde primele 33 de pagini și este împărțită în două capitole, respectiv:

#### ***Capitolul 1. Aspecte morfo-funcționale ale glandei tiroide,***

cuprinde noțiuni introductive începând cu istoricul, filogenia, embriologia și histologia glandei tiroide și continuând cu stadiile procesului de formare al hormonilor tiroidieni în cadrul glandei tiroidiene.

#### ***Capitolul 2. Hipertiroidismul felin.***

Reprezintă tema principală a acestei teze de doctorat și are ca scop descrierea aspectelor morfo – patologice, a simptomatologiei, a modificărilor parametrilor hematologici și biochimici cu rol important în stabilirea diagnosticului și abordarea terapeutică a hipertiroidismului la felinele domestice.

### ***Cercetările proprii***

Această parte se extinde pe 99 de pagini și cuprinde trei capitole mari și un capitol de concluzii generale:

***Capitolul 3. Aspecte privind alterarea histologică întâlnită în hipertiroidismul indus experimental la șoareci***

#### ***Locul desfășurării studiului și aparatura:***

Acest studiu experimental a fost realizat în cadrul temelor de cercetare întreprinse de grupul nostru, cu activități în cadrul Laboratorului de cercetare "Horia Cernescu" - Studii farmacotehnice de

laborator (B.12), proiect de infrastructură finanțat de: Cercetare de dezvoltare, educație și servicii în domeniul medicinei veterinare și tehnologiilor inovatoare RO 05. Codul SMIS-CSNR 2669.

Pentru valorificarea histo - patologică a probelor obținute s-a recurs la tehnica de colorare Haematoxylin - Eosin utilizată apoi în examinarea microscopică a acestora. Imaginile histologice au fost capturate folosind software-ul de analiză al microscopului CX41 (Olympus).

### ***Obiectivul studiului***

În acest capitol s-au urmărit modificările histologice, date de excesul plasmatic de hormoni tiroidieni, asupra parenchimului tiroidian, ovarian și testicular, în urma administrării exogene de levotiroxină la șoareci.

Din punct de vedere histologic, structura parenchimului tiroidian suferă modificări celulare manifestate prin hiperplazii, adenoame și carcinoame determinând apariția unui lanț de semne clinice cu repercusiuni asupra sistemului cardiovascular, renal și reproductiv.

Interacțiune puternică între cord și tiroidă este observată în numeroase lucrări științifice, atât la om cât și la animale. Alterarea hemodinamicii cardiovasculare, sub acțiunea hormonilor tiroidieni, reprezintă cauza principală a morbidității și mortalității datorate cardiomiopatiilor dobândite la pacienții cu hipertiroidism.

Un nivelul plasmatic normal de hormoni tiroidieni favorizează buna funcționare a aparatului reproductiv, iar excesul sau deficitul acestora are repercusiuni negative asupra funcției reproductive.

### ***Rezultatele obținute au relevat că:***

Administrarea exogenă de L-tiroxină în apa de băut în doză de 4  $\mu\text{g}$  / ml pe o perioadă scurtă de timp poate induce alterarea histologiei cardiace, ovariene și tiroidiene.

La loturile experimentale, modificările histologice ale celulelor foliculare au fost reprezentate de hiperplazie și hipertrofie, caracterizată prin mărirea difuză a glandei tiroidiene, absența coloidului (vacuole goale), margine celulară ondulantă și congestie vasculară evidentă.

Printre fenomenele hiperplazice și hipertrofice foarte difuze apărute la examenul histologic al glandei tiroide a lotului M3 s-a putut observa pierderea arhitecturii foliculare și lobulare.

Pe baza rezultatelor histologice, am ajuns la concluzia că primele modificări ale cordului hipertiroid sunt reprezentate de: infiltrate inflamatorii mononucleare și infiltrate fibroblastice care conduc în cele din urmă la fibroza cardiacă, considerată de unii autori un semn precoce al cardiomiopatiei observate în hipertiroidism.

Funcția reproductivă a fost de asemenea alterată de hiperfuncția tiroidiană. La femele, a fost observată prezența foliculilor atretici și persistența foliculilor terțiari, însoțiti de fenomene degenerative, precum și vacuolizarea masivă a celulelor luteale, iar la masculi lipsa spermatozoizilor în anumite sectoare a reprezentat singura alterare histologică.

## ***Capitolul 4. Aspecte privind profilul sangvin și terapia cu metimazol în hipertiroidism la felinele domestice***

### ***Locul desfășurării studiului și aparatura:***

Desfășurarea acestor investigații au fost realizate pe parcursul a celor cinci ani de studiu (perioada 2013-2018), unde au fost evaluate **238 de pisici** a căror semne clinice s-au încadrat în simptomatologia caracteristică hipertiroidismului, iar dintre acestea, 28 au fost diagnosticate la Cabinetul Veterinar Pommerhof, Plaidt, Germania, 5 cazuri au fost diagnosticate la Clinica de Patologie Medicală din cadrul Facultății de Medicină Veterinară din Timișoara, una a fost diagnosticată la Cabinetul Veterinar Dr. Popa O & R, iar una la Cabinetul Veterinar Siam – Vet.

În cadrul acestui capitol, aparatura de laborator utilizată a fost constituită din analizor de biochimie Fujifilm DRI-CHEM NRX500i, analizor automat de hematologie (ABAXIS, Vet Scan HM 5), analizor automat (EUROlyser solo) pentru dozarea Tiroxinei totale și un aparat pentru măsurarea tensiunii arteriale, *CARDELL Veterinary Monitor 9401*.

### ***Analiza statistică***

Toate rezultatele cu importanță statistică au fost analizate, folosind analiza bidirecțională a variației (ANOVA) utilizând Software-ul statistic GraphPad Prism 7.04 pentru Windows (GraphPad Software, San Diego, SUA).

### ***Motivația și Obiectivele studiului***

În România, hipertiroidismul felin este considerat o entitate rar întâlnită, iar depistarea unor afecțiuni cu simptomatologie comună acestea determină clinicianul să își schimbe atenția către afecțiunea primară sau cauzatoare a acestei simptomatologii, înlăturând în final investigarea funcției glandei tiroide.

Datorită nediagnosticării, prevalența hipertiroidismului și instituirea unei terapii eficiente pentru combaterea acestuia este pusă în dificultate.

În prezent, *la nivel mondial*, există trei tipuri de terapie antitiroidiană, dintre care: terapia medicamentoasă, radioactivă și chirurgicală. Ușor de procurat, dar reprezentând și singura posibilitate de tratament destinată hipertiroidismului felin, metimazolul, a reprezentat în acest capitol medicamentul de elecție în restaurarea funcției tiroidiene asigurând îmbunătățirea calității vieții.

Fiind considerat alegerea numărul unu de către clinicienii veterinari, metimazolul, este ales din mai multe considerente:

- premergător intervenției chirurgicale sau radioactive,
- la pisicile cu azotemie în scopul stadializării afecțiunii renale concurente și
- ca terapie de lungă durată, atunci când celelalte opțiuni terapeutice nu sunt disponibile.

Datorită terapiei limitate, scopul acestui capitol a fost de a institui o terapie eficientă, atât pe termen scurt, cât și pe termen lung, la pisicile cu hipertiroidism, indiferent de vârsta sau de tipul afecțiunii concurente, utilizând terapia medicamentoasă cu substanțe antitiroidiene și am avut ca obiective:

- diagnosticarea cazurilor de hipertiroidism prin dozarea profilului tiroidian,
- instituirea terapiei cu substanțe antitiroidiene cu administrare orală sub formă de tablete sau sirop,
- compararea rezultatelor de laborator înainte și după administrarea tratamentului,
- monitorizarea terapiei pe toată perioada de tratament și ajustarea dozelor pentru a asigura o continuitate eficientă și
- management-ul hipertiroidismului în cazul depistării de boli concurente ce pun în pericol viața pacientului.

### ***Rezultatele obținute au relevat că:***

În prezent, procentul de confirmare a diagnosticului de hipertiroidism este redus, iar datorită vârstei la care se depistează, acesta este frecvent asociat cu prezența unei boli concurente ce poate fi depistată în ziua diagnosticului sau pe perioada tratamentului antitiroidian, de regulă, după restaurarea stării de eutiroidism.

Utilizarea unei doze de 2,5 mg de metimazol, precum și divizarea dozei totale de medicament în două administrări a dus la obținerea unor rezultate satisfăcătoare în ceea ce privește restaurarea funcției tiroidiene, fără apariția efectelor secundare descrise frecvent în literatură.

Prin dozarea periodică a tiroxinei am observat că eficiența metimazolului scade după o perioadă de terapie de 7 - 9 luni, astfel că mărirea dozei de metimazol la 10 mg a fost necesară, însă cu monitorizarea obligatorie a funcției renale și cardiace la pisicile diagnosticate cu aceste afecțiuni concurente.

Existența pacienților reticenți reprezintă o temă important de abordat, deoarece în acest capitol, agresivitatea crescută, observată la un număr mare de pisici, a pus în dificultate administrarea orală a tabletelor, fiind necesară schimbarea terapiei orale cu cea topică.

Odată ce funcția tiroidiană este restaurată, afecțiunile non-tiroidiene pot fi depistate cu ușurință. Insuficiența renală cronică reprezintă una din afecțiunile frecvent mascate în hipertiroidism, a cărei prezență este semnalată de valorile ușor crescute ale BUN, valori ce devin evidente pe parcursul terapiei antitiroidiene.

Din punct de vedere hematologic, am observat că modificările parametrilor hematologici nu sunt considerate caracteristice acestei afecțiuni endocrine, însă unele alterări biochimice ale activității enzimelor hepatice au fost observate.

La evaluarea funcției hepatice au fost înregistrate alterări ale enzimelor hepatice la 13 din cele 29 de pisici evaluate. ALT și ALP au fost enzimele hepatice cel mai frecvent afectate. Deoarece concentrația serică a enzimelor hepatice s-au încadrat în limite normale după restaurarea funcției tiroide am exclus existența unor afecțiuni hepatice.

În ciuda modificărilor biochimice și a simptomatologiei existente, dozarea serică a tiroxinei totale reprezintă parametrul decisiv în confirmarea diagnosticului de hipertiroidism.

Pe baza rezultatelor obținute pe parcursul perioadei terapeutice am stabilit că dozarea repetată a tiroxinei la 6, 13 și 32 de săptămâni este obligatorie, ușurând obținerea unei doze terapeutice de metimazol care să asigure stabilitate tiroidiană pe o perioadă mai lungă de timp.

## ***Capitolul 5. Eficacitatea metimazolului după administrarea topică într-o singură doză la motani sănătoși***

### ***Locul desfășurării studiului și aparatura:***

Acest studiu s-a desfășurat pe o perioadă de 15 zile, la care au participat motani a cărui habitat a fost diferit pentru fiecare felină în parte.

Substanța activă, metimazol, a fost obținută de la firma Sigma-Aldrich Co. LLC, (Methimazole M8506  $\geq$  99%, Lot: WXBC1539V), iar baza de cremă (Mayam) utilizată în formulare a fost obținută de la Elemental SRL Ro (Lot 74102)

Produsul final a constat în amestecarea a 100 mg de Metimazol sub formă de pulbere pură cu 1 ml de bază de cremă ce au fost ulterior stocate la temperatura camerei în seringi de insulină în concentrație de 100 mg/ml. Au fost realizat în total 12 seringi de 1 ml.

### ***Obiectivul studiului***

Terapia hipertiroidismului felin rămâne încă un subiect ce trebuie studiat în profunzime, în special datorită surselor limitate utilizate în acest scop, deoarece abordarea chirurgicală sau radioactivă a tiroidei patologice este limitată sau inexistentă.

Atunci când vorbim despre tratamentul pisicilor cu hipertiroidism ne referim în majoritatea cazurilor la ramura farmacologică a terapiei accesibile în România.

Farmacologic, terapia antitiroidiană curentă utilizează substanțele grupei de tionamide, grupă din care metimazolul și carbimazolul fac parte. Administrat pe cale orală, metimazolul reprezintă medicamentul de elecție preferat în terapia hipertiroidismului de către medicii veterinari.

Prezența numărului mare de efecte adverse apărute consecutiv administrării orale, a dus la formularea unor compuși topici a-i metimazolului de către cercetători, cu scopul de a limita sau elimina aceste efecte nedorite ce pot duce la întreruperea tratamentului.

Dificultatea de procurare a unor formulări topice ne-a determinat să cercetăm existența unor compuși în care prin încorporarea metimazolului, să reprezinte o alternativă eficientă și accesibilă clinicienilor și proprietarilor.

#### ***Rezultatele obținute au relevat că:***

Conceperea unei formulări topice de metimazol a avut rezultatele dorite, obținându-se modificări biochimice relevante pentru acest subiect. Eficacitatea administrării cutanate a acestei creme cu metimazol în doză de 10 mg /0,1 ml a fost evidentă.

Aceste modificări au fost comparabile cu cele obținute de alți autori, folosind PLO sau geluri liofile, ceea ce face ca asociația noastră să aibă un impact pozitiv în managementul hipertiroidismului felin. Pe baza acestor rezultate, putem concluziona că introducerea unei astfel de formulări în terapia hipertiroidismului are rezultate similare cu doza orală de metimazol de 2,5 mg.

#### **Prezența teză de doctorat are câteva priorități cu note de originalitate / noutate:**

- Inducerea experimentală de hipertiroidism la animalele de laborator este posibilă și prin administrarea substanțelor sub formă de pulbere în apa de băut, obținându-se o metodă ușoară și rapidă de inducere a stării de hipertiroidism la șoareci, fără a recurge la administrări dificile, cum este administrarea injectabilă utilizând calea peritoneală sau subcutanată. Obținerea concentrației serice semnificativ ridicate la lotul experimental, comparativ cu valoarea serică a lotului martor și observarea efectelor negative asupra organismului după o perioadă redusă de numai șapte zile, confirmă abilitatea acestei metode simple de a induce hiperfuncția tiroidiană.
- Efectele negative ale hormonilor tiroidieni asupra parenchimul tiroidian, cardiac și ovarian au fost bine reprezentate la examenul histologic, atestând efectul multisistemic al hipertiroidismului.
- În terapia hipertiroidismului felin se obțin rezultate mult mai eficiente atunci când doza de metimazol este administrată la 12 ore.
- Datele anamnetice și determinarea serică a tiroxinei, precum și a altor parametri biochimici, sunt pași esențiali în confirmarea diagnosticului de hipertiroidism, în principal pentru depistarea unor afecțiuni concurente pre-existente mascate de simptomatologia comună.
- Administrarea topică de metimazol, utilizând o bază de cremă ca excipient de vehiculare, a fost considerată o cale nouă și eficientă de administrare a substanței antitiroidiene la felinele cu caracter reticent, unde utilizarea căii orale reprezintă un impediment.
- Prin utilizarea unei doze de 0,1 ml de cremă cu metimazol am obținut reducerea serică a tiroxinei totale la pisicile sănătoase, ceea ce ne indică, că utilizarea acestei noi formulări va avea rezultatele dorite și la pisicile afectate de hipertiroidism.

## Summary of PhD Thesis titled:

### *Pharmaco-therapy and paraclinic changes in feline hyperthyroidism*

#### **This PhD thesis contains:**

- List of abbreviations
- Content in Romanian and English
- Part of Bibliographic research: 33 pages
- Part of Own Research: 99 pages
- Tables: 52
- Figures: 43
- Bibliographical sources: 242 titles

#### ***Motivation of choosing the research theme***

Described since 1979 by Mark Peterson, in Romania, feline hyperthyroidism remains a difficult subject to be approached in veterinary clinics. Existing data in literature is limited to external casuistic, which shows that feline hyperthyroidism is not a commonly diagnosed entity in domestic cats.

Because thyroid hormone excess has repercussions with a multisystemic effect, non-thyroid disorders diagnosed concurrently with hyperthyroidism are most often considered the primary illness, leading to the limitation of initial investigations.

The diagnosis and almost non-existent therapy of feline hyperthyroidism has motivated us to investigate the symptomatic and characteristic paraclinical changes considered common in both hyperthyroidism and other non-thyroid diseases.

Being limited to one type of therapy but also to a case-hard to obtain, this thesis follows the stability and efficacy of oral and transdermal anti-thyroid drugs and aims at establishing an effective therapeutic protocol in feline hyperthyroidism and investigating hematological and biochemical changes detected in our own cases and comparing the data obtained with those existing in the literature or reported by other clinicians.

***Fields of study:*** *veterinary medicine, pharmaco-therapeutics.*

***Subdomains:*** *endocrinology, hyperthyroidism, hormonotherapy, medical pathology*

#### ***The importance of the topic***

In Romania, feline hyperthyroidism is a poorly represented and diagnosed endocrinopathy which makes it difficult to establish an effective and especially accessible therapeutic protocol. The absence of antithyroid therapy in veterinary clinics attests the low frequency of hyperthyroidism.

Confirming the diagnosis of hyperthyroidism is a process that involves many decisive factors, namely: the owner-reported symptomatology and the clinical evaluation corroborated with the values of the biochemical parameters obtained.

Because hyperthyroidism therapy is limited, the thesis was based exclusively on the efficacy of antithyroid drugs such as methimazole, using the oral and dermal route of administration.

Nowadays, approaching a skin pathway for administering substances to domestic animals is not a topic frequently discussed in the literature, and especially in feline endocrinology. The use of this

concept is an interesting research topic and monitors the efficacy of various methimazole compounds with lipophilic affinity

Because the accessibility of this type of compounds is difficult and costly, in this topic it has been attempted to design a new and effective formulation destined in feline hyperthyroidism therapy.

The existence of concurrent affections whose symptoms are common to hyperthyroidism attest to the importance of paraclinical investigations needed when the introduction of antithyroid therapy does not improve the existing symptomatology. Histologically, we made investigations about the effect of excess thyroid hormone on thyroid, cardiac, ovarian and epididymal architecture.

Regarding this aspect, we investigated the repercussions that thyroid hormones have on hematological and biochemical parameters, as well as the approach of a medicinal therapy whose effectiveness is constantly monitored and updated with a view to improving the quality of life.

**Key words:** *Pharmaco-therapeutics, hyperthyroidism, methimazole, feline.*

In accordance with the instructions in force, the thesis is composed of two large parts:

- The general part– The current state of knowledge and
- Own research

### ***The general part*** **The current state of knowledge**

It is extended to 33 pages and structured into two chapters, namely:

**Chapter 1.** *Morpho-functional aspects of the thyroid gland, includes introductory notions starting with the histology, phylogeny, embryology, and histology of the thyroid gland and continuing with the stages of thyroid hormone formation in the thyroid gland.*

#### **Chapter 2.** *Feline hyperthyroidism.*

*It is the main theme of this doctoral thesis and aims to describe morpho - pathological aspects, symptoms, changes in hematological and biochemical parameters with an important role in the diagnosis and the therapeutic approach of hyperthyroidism in domestic cats.*

### ***Own research***

This part extends to 99 pages and is composed of three chapters and the chapter of general conclusions:

**Chapter 3.** *Cytohistic architecture after experimentally induced hyperthyroidism in mice*

#### ***Place of study and equipment:***

This work was carried out within the research topics undertaken by our group, with activities in the Complex Research Laboratory “*Horia Cernescu*” - Pharmaco-toxicological laboratory studies (B.12), infrastructure project financed by: Development Research, education and services in the fields of veterinary medicine and innovative technologies EN 05. Code SMIS-NSRF 2669.

For the histopathological evaluation of the obtained samples we used the Haematoxylin - Eosin staining technique in the microscopic examination. Histological images were captured using the CX41 (Olympus) microscope analysis software.

### ***The objective of the study***

In this chapter, we observed histological changes, due to excess of plasma thyroid hormone, on thyroid, ovarian and testicular parenchyma following exogenous levothyroxine administration in mice.

From the histological point of view, the structure of parenchymal cell undergoes changes manifested by thyroid hyperplasia, adenomas, and carcinomas resulting in the emergence of a chain of clinical signs with repercussions on the cardiovascular, renal and reproductive system.

Strong interaction between the heart and the thyroid is seen in many scientific papers, both in humans and animals. The alteration of cardiovascular hemodynamics under the action of thyroid hormones is the leading cause of morbidity and mortality due to acquired cardiomyopathy in patients with hyperthyroidism.

A normal plasma thyroid hormone level favors the proper functioning of the reproductive system and their excess or deficiency has negative impact on its function.

### ***The results revealed that:***

Exogenous administration of L-tyrosine in drinking water at a dose of 4 µg / ml over a short period of time may induce alteration in cardiac, ovarian and thyroid histology.

In experimental groups histological changes of follicular cells were hyperplasia and hypertrophy characterized by diffuse enlargement of the thyroid gland, absence of colloid (empty vacuoles), corrugated margins and evident vascular congestion.

Among the phenomena of very diffuse hyperplasia and hypertrophy in the thyroid parenchyma, that occurred in the histological examination of the M3 group, the loss of follicular and lobular architecture was observed.

Based on cardiac histological results, we concluded that the first changes in the hyperthyroid cord are: mononuclear infiltrate and fibroblast infiltrates that eventually lead to cardiac fibrosis, considered by some authors to be an early sign of cardiomyopathy seen in hyperthyroidism.

Reproductive function was also altered by thyroid hyperfunction. In females, the presence of atrophic follicles and the persistence of tertiary follicles accompanied by degenerative phenomena as well as massive vacuolization of luteal cells were observed, and in males the lack of sperm in certain sectors was the only histological alteration.

## ***Chapter 4. Aspects regarding the blood profile and the methimazole therapy in hyperthyroidism in domestic felines***

### ***Place of study and equipment:***

These investigations were conducted during the five years of the study (2013-2018), where 238 cats were evaluated whose clinical signs were placed in the characteristic of hyperthyroidism, and 28 of them were diagnosed with Veterinary clinic Pommerhof, Plaidt, Germany, 5 cases were diagnosed at the Medical Pathology Clinic of the Faculty of Veterinary Medicine in Timisoara, one was diagnosed in the Veterinary Cabinet Dr. Popa O & R, and one at the Veterinary Cabinet Siam-Vet.

In this chapter, the laboratory equipment used was a Fujifilm DRI-CHEM NRX500i biochemistry machine, automatic hematology analyzer (ABAXIS, Vet Scan HM 5), automated analyzer (EUROlyser solo) for total Thyroxine dosing and the measurement of blood pressure was made using CARDELL Veterinary Monitor 9401.

All results of statistical significance were analyzed using bidirectional variance analysis (ANOVA) with the GraphPad Prism 7.04 Statistical Software for Windows (GraphPad Software, San Diego, USA).

### ***The objective of the study***

In Romania, feline hyperthyroidism is considered a rare entity and detection of diseases with common symptoms it causes the clinician to change his or her attention to the primary or causative condition of this symptomatology, ultimately removing the investigation of thyroid function.

Due to low diagnosis, the prevalence of hyperthyroidism and the introduction of effective therapy in order to treat this affection is difficult.

Presently, there are three types of antithyroid therapy worldwide, including: drug therapy, radioactive and surgical therapy. Easy to procure, but also the only treatment option for feline hyperthyroidism, metimazole, was the drug of choice in the restoration of thyroid function in this chapter, ensuring an improved quality of life.

Being the number one choice of veterinary clinicians, metimazole, is chosen for several reasons:

- prior to surgical or radioactive surgery,
- in cats with azotemia to determine the severity of kidney disease and
- as long-term therapy, when other therapeutic options are not available.

Due to limited therapy, the purpose of this chapter was to establish an effective therapy, both in the short and long term, in cats with hyperthyroidism, regardless of the feline's age or the type of competing disease, using antithyroid drug therapy and we had as objectives:

- diagnosis of hyperthyroidism cases by dosing the thyroid hormone,
- establishing oral antithyroid therapy under the form of tablets or syrup,
- comparing laboratory results before and after treatment,
- monitoring the therapy throughout the treatment period and dose adjustment to ensure effective continuity and management of hyperthyroidism in case of concurrent diseases that endanger the life of the patient.

### ***The results revealed that:***

The percentage of confirmed hyperthyroidism diagnosis is reduced and due to the age at which it is detected, it is frequently associated with the presence of concurrent disease that can be detected on the day of diagnosis or during antithyroid therapy, usually after restoring the euthyroid state.

Using a 2.5 mg dose of methimazole as well as splitting the total dose of the drug into two administrations resulted in satisfactory results in restoring thyroid function without the occurrence of side effects, commonly described in the literature.

By periodic determination of thyroxine, it was observed that the efficacy of methimazole decreased after a period of 7 to 9 months of therapy, so increasing the dose of methimazole to 10 mg was necessary, but with mandatory monitoring of renal and cardiac function in cats diagnosed with these competing disorders.

The presence of reluctant patients is an important subject to be addressed, because in this chapter, increased aggression, observed in many cats, has led to difficulty in orally administration of tablets, which made the oral route of administration be replaced by the topical route.

Once thyroid function is restored, non-thyroid diseases can easily be detected. Chronic renal failure is one of the commonly-hidden diseases in hyperthyroidism, the presence of which is signaled by the slightly elevated BUN values, which become evident during antithyroid therapy.

From the hematological point of view, we have noticed that changes in hematological parameters are not considered to be characteristic of this endocrine disease, but some biochemical alterations of hepatic enzyme activity have been reported.

Hepatic enzyme alterations were recorded in 13 of the 29 evaluated cats in liver function evaluation. ALT and ALP were the most commonly affected liver enzymes. As the serum concentration of liver enzymes fell within normal limits after restoration of thyroid function, we excluded the existence of liver disorders.

Despite the existing biochemical and symptomatic changes, we consider that serum total serum thyroxine is the decisive parameter in confirming the diagnosis of hyperthyroidism.

Based on the results obtained during the therapeutic period, we have established that repeated dosing of thyroxine at 6, 13 and 32 weeks is mandatory, making it easier to obtain a therapeutic dose of metimazole to provide thyroid stability over a longer period of time.

### *Chapter 5. The influence of methimazole after topical administration in a single dose in healthy tom-cats*

#### *Place of study and equipment*

This study was conducted over a period of 15 days, using five male cats whose habitat was different for each feline.

The active substance, metimazole, was obtained from Sigma-Aldrich Co. LLC (Methimazole M8506  $\geq$  99%, Lot: WXBC1539V), and the cream base (Mayam) used in the formulation was obtained from Elemental SRL Ro (Lot 74102)

The final product consisted of mixing 100 mg of Metimazole as a pure powder with 1 ml of cream base which was then stored at room temperature in 100 mg / ml insulin syringes. A total of 12 1 ml syringes were made.

#### *The objective of the study*

Feline hyperthyroidism therapy remains a subject that should be studied, especially due to limited sources used for this purpose, because the surgical or radioactive approach of the thyroid pathology is limited or nonexistent.

When talking about the treatment of cats with hyperthyroidism, we refer in most cases to the pharmacological branch of affordable therapy in Romania.

Pharmacologically, current antithyroid therapy uses the substances of the thionamide group, a group of which methimazole and carbimazole are part of. Orally administered, metimazole is the preferred drug of choice in hyperthyroid therapy by veterinarians.

The presence of a large number of adverse effects following oral administration has led to the formulation of a topical methimazole compounds by researchers in order to limit or eliminate these unwanted effects which can lead to discontinuation of therapy.

The difficulty in obtaining topical formulations has led us to investigate the existence of compounds in which the incorporation of methimazole results in effective and accessible alternative to clinicians and owners.

#### *The results revealed that:*

The design of a topical formulation of metimazole had the desired results, resulting in biochemical changes relevant to this subject.

The incorporation of methimazole in a simple dermatological cream base induced, at the dose of 10 mg / 0.1 mL, significant changes in total thyroxine and reticulocytes levels. These changes were

comparable to those obtained by other authors using PLO or lipophilic gels, making our proposed association noteworthy for the management of feline hyperthyroidism.

Based on these results, we can conclude that the introduction of such formulation into the therapy of hyperthyroidism has similar results to the 2.5 mg oral dose of metimazole.

### **This PhD research has several priorities with originality / novelty notes:**

1. Experimental induction of hyperthyroidism in laboratory animals is also possible by administering powdered substances to drinking water, providing a quick and rapid method of inducing hyperthyroidism in mice without resorting to difficult administrations such as injectable administration using the peritoneal or subcutaneous route. Obtaining significantly higher serum concentrations in the experimental group when compared to the serum of the control group and observing the negative effects on the body after a limited period of administration, attests the usefulness of this simple method in inducing hyperthyroidism in mice.
2. The negative effects of thyroid hormones on thyroid, cardiac and ovarian parenchyma were well represented in the histological examination, demonstrating the multisystemic effect of the hyperthyroidism.
3. In the treatment of our patients, we obtained better results when the methimazole dose was given at 12 hours.
4. Anamnesis and serum determination of thyroxine, as well as other biochemical markers, are essential steps in confirming the diagnosis of hyperthyroidism, mainly for the detection of pre-existing competing disorders masked by common symptomatology.
5. Topical administration of methimazole, using a cream base as excipient, was considered a novel and effective route of administration of the antithyroid to reluctant cats, where use of the oral route is an impediment.
6. Using a 0.1 ml dose of metimazole cream, serum total thyroxine was reduced in healthy cats, indicating that the use of this new formulation will have the desired results in cats affected by hyperthyroidism.