

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"CAROL DAVILA", BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**



**STUDIUL INFLUENȚEI ANEMIEI/DEFICITULUI DE FIER
ASUPRA EVOLUȚIEI PERIOPERATORII ÎN CHIRURGIA
MAJORĂ**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. GRINȚESCU IOANA MARINA

Student-doctorand:

ȚIGLIȘ MIRELA

Introducere

Anemia și deficitul de fier sunt situații clinice cu impact negativ asupra evoluției, prognosticului și calității vieții pacienților, fiind considerate probleme de sănătate publică. Prevalența anemiei perioperatorii variază între 26 și 75%, iar în cazul intervențiilor chirurgicale majore poate să ajungă până la 90% în perioada postoperatorie, prin prisma sângerărilor intra- și postoperatorii, având un impact negativ major asupra evoluției perioperatorii, mortalității, morbidității, duratei de spitalizare și costurilor generale [1, 2].

Una dintre principalele probleme ale pacientului chirurgical este dictată de lipsa de timp pentru realizarea unei intervenții de optimizare a statusului hematologic în perioada preoperatorie, timpul dintre momentul admisiei în spital și până la desfășurarea actului chirurgical fiind adeseori foarte redus.

În perioada perioperatorie se recurge adesea la transfuzia de produse de sânge, fiind asociată cu numeroase reacții adverse. Studiile arată faptul că fierul liber provenit în urma transfuziilor de sânge duce la amplificarea stresului oxidativ al organismului [3]. Pentru optimizarea statusului hematologic la acest subgrup de pacienți, folosirea fierului intravenos a devenit o opțiune validă, noii agenți farmacologici fiind extrem de stabili și permițând administrarea unor cantități mari de fier menite a acoperi deficitul dintr-o singură administrare, și se asociază cu riscuri și reacții adverse reduse [4]. Aceștia și-au demonstrat beneficiile în perioada preoperatorie, fiind folosiți atunci când este necesară o corectare rapidă a nivelului de fier pentru a îmbunătăți eritropoieza și concentrația hemoglobinei [5].

Problematica încă persistă în cazul perioadei perioperatorii imediate. Până în prezent există studii contradictorii care vizează administrarea de fier în aceste perioade și momentul ideal pentru efectuarea unei astfel de intervenții cu scopul optimizării evoluției pacientului.

Ținând cont de toate aspectele expuse anterior, consider că un studiu despre influența și beneficiile corectării anemiei și deficitului de fier la pacientul chirurgical în relație cu evoluția postoperatorie, precum și analiza momentului optim pentru realizarea unei astfel de intervenții în perioada perioperatorie imediată, își găsește pe deplin justificarea în contextul medical actual.

1. Homeostazia sistemică a fierului, deficitul de fier și anemia feriprivă

Organismul unui adult conține aproximativ 3-5 g de fier, mai mult de două treimi fiind încorporat în hemoglobina precursorilor eritroizi sau în eritrocitele mature. Acesta este implicat în special în sinteza ADN-ului, producția de energie, mielinizarea neuronală, dezvoltarea creierului și funcționarea optimă mitocondrială [6, 7].

Pătrunderea fierului în circulația sistemică este mediată la nivelul membranei bazolaterale de către transportorul feroportină. Acesta este exportat sub formă de Fe^{2+} , oxidat apoi la Fe^{3+} , ulterior încărcat la nivelul transferinei [8, 9]. Aproximativ 20-40% dintre situsurile de legare ale transferinei sunt ocupate de molecule de fier, reprezentând indicele de saturație al acesteia [6, 8].

Feritina este măsurabilă în torentul sanguin, provenind în special din macrofage și se corelează cu depozitele de fier, deși nivelurile ei pot fi influențate și de alte circumstanțe, precum inflamația, infecția, bolile hepatice, neoplaziile, etc [8].

Principalele elemente ce determină modularea homeostaziei fierului sunt nevoile celulelor eritroide, hipoxia, deficitul de fier, supraîncărcarea cu fier, anemia și inflamația persistentă. Ținând cont de faptul că fierul este folosit cu prioritate de către eritrocite, deficitul său face ca depozitele hepatice să fie primele afectate, urmând apoi musculatura scheletică, intestinul, inima, creierul și în cele din urmă eritrocitul [6].

Anemia feriprivă reprezintă o formă severă de deficit de fier și afectează, la nivel mondial, 1 din 8 persoane [10]. Principalii factori de risc de apariție a anemiei feriprive sunt: pierderile gastro-intestinale de sânge, reducerea absorbției intestinale, menoragiile, metroragiile, aportul alimentar inadecvat, malabsorbția, hematuria, epistaxisul, intervențiile chirurgicale extensive, trauma severă, flebotomiile repetate, dializa [11].

În prezent, gold-standardul pentru diagnosticul deficitului de fier îl reprezintă biopsia medulară osoasă [12]. Examinările paraclinice cele mai folosite pentru stabilirea diagnosticului de anemie feriprivă sunt: fierul seric, indicele de saturație al transferinei, capacitatea totală de legare a fierului, concentrația transferinei, feritina, volumul corpuscular mediu, hemoglobina celulară medie [13, 14] și înălțimea distribuției eritrocitare (RDW), receptorul solubil al transferinei [15].

2. Fierul și eritropoieza

Eritropoieza reprezintă producția de celulele roșii, pornind de la celulele stem hematopoietice pluripotente până la eritroblaste, celulele progenitoare hematopoietice și până la eritrocitele mature [16]. În fiecare secundă, organismul uman poate produce două milioane de celule roșii, reprezentând 50% din volumul sanguin [17], eritropoieza fiind cel mai mare consumator de fier (80% din fierul plasmatic) [18]. Necesarul zilnic de fier pentru desfășurarea în limite normale a eritropoiezei este de aproximativ 20-30 mg, cu doar 1-2 mg fiind absorbite din dietă [19].

În condiții de repaus, eritropoieza se produce la o rată bazală, în care aproximativ 1% din eritrocitele circulante sunt înlocuite zilnic de noi celule [19, 20]. Celulele roșii au o durată de viață de 120 zile, fiind sub controlul strict al macrofagelor hepatice și splenice [21]. În condițiile în care eritrocitele sunt pierdute din circulație în mod anormal, prin sângerări sau prin creșterea distrucției (hemoliză), rata eritropoiezei poate să ajungă până la un miliard pe zi [20].

Fierul este important în faza terminală a diferențierii celulelor eritroide, reprezentată de sinteza hemoglobinei și a hemului [22]. Atunci când fierul seric este redus, feritina poate participa în procesul de eritropoieză [23].

Deficitul funcțional de fier, acest dezechilibru dintre nevoile eritropoiezei și disponibilitatea reală a fierului (rata redusă a mobilizării din depozite) duce la dezvoltarea unei eritropoieze fier-deficitare, generând un deficit de hemoglobinizare a reticulocitelor și de maturare a eritrocitelor [24].

Eritropoieza de stress definește procesul care favorizează recuperarea din timpul unei anemii acute prin proliferarea rapidă a celulelor eritroide progenitoare. Prin supresia hepcidinei, crește cantitatea de fier disponibilă pentru acest răspuns la stres [16]. Acest proces de generare rapidă de celule roșii se menține pentru a asigura homeostazia până când organismul își poate relua eritropoieza bazală [25].

Sindromul numit eritropoieză fier-restrictivă cuprinde nu numai deficitul absolut și deficitul funcțional de fier (incapacitatea fierului din depozite de a răspunde nevoilor crescute ale hematopoiezei), cât și situațiile în care fierul din organism este sechestrat în depozite și nu poate fi eliberat (inflamație persistentă) [3, 19, 26].

3. Anemia perioperatorie și fierul parenteral. Elemente de vindecare tisulară postoperatorie

Aproximativ 40% dintre pacienții care urmează să fie supuși unei intervenții chirurgicale majore suferă de anemie, factor de risc independent de mortalitate, morbiditate, creștere a ratei de infecție și a necesarului transfuzional [27-29], prelungire a duratei de spitalizare [30], creștere a ratei de reinternare și a riscului de reintervenție [31].

Prevalența anemiei postoperatorii atinge 90%, având ca principali factori de risc: anemia/deficitul de fier preoperatorii, pierderile de sânge, suprimarea postoperatorie a eritropoezei [18, 32]. Aproximativ 70% dintre pacienții anemici supuși unei intervenții chirurgicale majore au deficit de fier și dezvoltă o eritropoeză fier-restrictivă [33], cauzat de sângerărilor acute/cronice, flebotomiile repetate, aportul alimentar redus și folosirii anumitor medicamente (anticoagulantele, antiacide, etc) [31, 34].

Noile formule de fier intravenos sunt molecule mai stabile, au puține contraindicații sau reacții adverse și permit administrarea unor doze mai mari [35]. Aceștia sunt: derisomaltoza ferică (*Monoferric®*) [35, 26], fier-izomaltoza 1000 (*Monofer®*) [2, 37, 38], carboximaltoza ferică (*Ferinject®*, *Injectafer®*), fier-sucroza (*Venofer®*) [2, 39], fier-dextranul cu greutate moleculară mică (*Cosmofer®*, *InFed®*), oxidul de fier (*Feraheme®*, *Rienso®*), gluconatul feric de sodiu (*Ferrlecit®*) [36,40].

La pacientul chirurgical, eliberarea de citokine inflamatorii duce la afectarea motilității tractului gastro-intestinal, scade absorbția de fier, induce sechestrarea acestuia la nivelul macrofagelor și estompează răspunsul celulelor eritroide la eritropoietină [41, 42].

Vindecarea plăgilor postoperatorii este un proces dinamic, controlat de o serie de mecanisme celulare, hormonale și moleculare. Principalele sale etape sunt: sângerarea inițială, vasoconstricția locală, formarea cheagului, reepitelizarea, formarea țesutului de granulație, a noului matrix extracelular, angiogeneza, contracția țesutului conjunctiv, remodelarea tisulară locală [43, 44]. Subiecții cu anemie sau deficit de fier prezintă o tensiune și o rezistență la expansiune mai mică la nivelul plăgii postoperatorii [45, 46].

La nivel osos, fierul este implicat în sinteza collagenului [149] și metabolismul vitaminei D [48]. Deficitul de fier inhibă osteogeneza, reduce densitatea minerală osoasă, conținutul de minerale la nivelul oaselor și arhitectura osoasă normală [49, 50].

4. Studiu experimental al influenței anemiei / deficitului de fier asupra evoluției perioperatorii în chirurgia majoră

4.1. Introducere (ipoteza de lucru și obiective specifice)

Obiectivul studiului a fost de a crea un model experimental în care deficitul de fier, asociat cu anemie, să fie indus acut, prin pierderi de volum sanguin, la subiecți ce urmează să fie supuși unei intervenții chirurgicale majore, care la rândul său presupune pierderi de sânge. Se va administra fier intravenos pentru optimizarea statusului hematologic, oferind astfel ”combustibilului” necesar întreținerii unei eritropoeze eficiente. Animalele vor fi supuse unor intervenții de fractură de femur și osteosinteză cu broșă centromedulară, comparându-se ulterior evoluția clinică, paraclinică, imagistică și procesul de vindecare tegumentar și osos al celor la care s-a administrat fier parenteral în patru momente distincte față de momentul inducerii anemiei, comparativ cu cei la care nu s-a realizat intervenția terapeutică. Se dorește identificarea momentului optim pentru realizarea intervenției, urmărirea optimizării eritropoezei și analiza instituirii sau nu de leziuni renale asociate.

4.2. Materiale și metodă

4.2.1. Variabilele studiului

Studiul s-a desfășurat în cadrul Laboratorului de Microchirurgie Experimentală al Spitalului Clinic de Urgență București după obținerea avizului Comisiei de Etică. Îngrijirea animalelor și protocolul experimental au respectat reglementările, ghidurile și recomandările *Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook* și legislația în vigoare.

4.2.2. Subiecții experimentali

Au fost utilizați $n=35$ șobolani adulți rasă Wistar, gen masculin, clinic sănătoși, cu vârste cuprinse între 10-13 luni și o greutate medie de $355.77 \text{ g} \pm 31.52 \text{ DS}$. Au fost găzduiți în perechi, primind apă și hrană *ad libitum*, fiind lăsați să se aclimatizeze 7 zile. S-au folosit cicluri zi-noapte de 12 ore, umiditate ambientală de 40-60% și temperatură de $23 \pm 2^\circ\text{C}$.

4.2.3. Protocol anestezic și analgezic

Inducția s-a realizat folosind Isoflurane 1%, scurtă inhalare într-o cameră de inducție, până la pierderea reflexelor. Pentru menținere s-a injectat intraperitoneal Ketamină/Xylazină (40/5 mg/kg). S-au folosit: unguent oftalmic Kanamicină sulfat 1%, antibioprolaxie cu cefuroximă 30 mg/kg intraperitoneal, analgezie cu lidocaină, ketorolac, acetaminofen și tramadol.

4.2.4. Inducerea anemiei

Inducerea anemiei acute s-a obținut prin îndepărtarea a aproximativ 15% din volumul sanguin. La aceasta au contribuit și pierderile sanguine secundare intervențiilor chirurgicale (fracturarea femurului, reducere și osteosinteză, disecție în planuri anatomice a regiunii cervicale anterioare pentru cateterizarea venei jugulare). S-a folosit formula [160]: **volum sanguin total** = 0.06 x greutatea animalului + 0.77.

4.2.5. Intervenția chirurgicală

Principalii timpi operatori au fost: incizie de 1.5-2 cm la nivelul tegumentului coapsei laterale stângi, disecția fasciei musculare, disecția planurilor musculare, osteotomie oblică și stabilizarea fracturii folosind broșa centromedulară, închiderea plăgii.

4.2.6. Intervenția terapeutică

S-a administrat carboximaltoză ferică intravenos (Ferinject®, Vifor Pharma), sub anestezie generală, doză unică, 20 mg/kg, în 30 minute, la subiecții la care a fost indusă anemia, în patru momente cheie: cu 7 zile preoperator, cu 48 ore preoperator, intraoperator și la 48 ore postoperator. Administrarea s-a realizat după cateterizarea venei jugulare interne, folosind canule intravenoase 26 G cu port de injectare (**Figura 4.1.**).



Figura 4.1. Realizarea intervenției terapeutice – administrarea fierului intravenos, în perfuzie continuă, cu ajutorul unui infuzomat, după cateterizarea venei jugulare interne sub microscopie intraoperatorie

4.2.7. Împărțirea loturilor de studiu

Subiecții experimentali (n=35) au fost împărțiți astfel:

- I. Lot Control (n=5)

- II. Lotul I (n=5): s-a indus anemia, s-a practicat intervenția chirurgicală și nu s-a administrat fier parenteral.
- III. Lotul II (n=7): s-a indus anemia, s-a practicat intervenția chirurgicală și s-a administrat carboximaltoză ferică 20 mg/kg intraoperator, la sfârșitul intervenției.
- IV. Lotul III (n=7): s-a indus anemia și s-a practicat intervenția chirurgicală. La 48 ore postoperator s-a administrat carboximaltoză ferică 20 mg/kg.
- V. Lotul IV (n=5): s-a indus anemia și s-a administrat carboximaltoză ferică 20 mg/kg. După 48 ore s-a practicat intervenția chirurgicală.
- VI. Lotul V (n=6): s-a indus anemia și s-a administrat carboximaltoză ferică 20 mg/kg. După 7 zile de la inducerea anemiei și administrarea de fier intravenos s-a practicat intervenția chirurgicală.

4.2.8. Examinări clinice

Principalele aspecte urmărite postoperator: variația greutății, reluarea hidratării și alimentației (precoce în primele 12 ore sau tardiv > 12 ore), reluarea activității (precoce în primele 24 ore sau tardiv > 24 ore) și toleranța la efort (testul escaladării unui grilaj oblic).

4.2.9. Recoltarea și prelucrarea probelor biologice

Pentru loturile I, II, III, și IV recoltările s-au realizat în ziua 7 de la inducerea anemiei, și respectiv în ziua 14 pentru lotul V. S-au obținut următoarele probe: hemoglobina, hematocritul, eritrocitele (RBC), volumul mediu eritocitar (MCV), hemoglobina eritocitară medie (MCH), concentrația de hemoglobină eritocitară medie (MCHC), lărgimea distribuției eritrocitare (RDW), leucocitele, trombocitele, granulocitele și limfocitele. Probele au fost de tip capilar, recoltate cu micropipete manuale.

Pentru profilul fierului s-au determinat: sideremia, transferina și feritina și s-au calculat capacitatea totală de legare a fierului (TIBC) și gradul de saturație al transferinei (TSAT).

În momentul recoltării, în a 7-a și respectiv a 14-a zi de la inducerea anemiei, o parte din subiecții experimentali au fost eutanasiați și s-au recoltat probe biologice pentru examinare histopatologică: plagă cutanată postoperatorie, femurul unde s-a realizat osteosinteza pentru analiza focarului de vindecare osoasă, femur indemn pentru studierea măduvei hematogene, splină, rinichi. Acestea au fost colectate în recipiente speciale ce conțineau soluție de formol 10%. S-a folosit colorația clasică hematoxilină-eozină (HE) pentru realizarea lamelor de studiu, analizate cu microscop electronic Olympus BX43®.

4.2.10. Analiza statistică

Rezultatele cantitative au fost exprimate sub forma valorilor medii $\pm$ DS. Analiza datelor statistice s-a efectuat în MedCalc (versiunea 14) și SPSS Statistics (versiunea 23), utilizând testul one-way ANOVA, Levene, testul *Student-Newman-Keuls*, tabele de contingență. Nivelul de semnificație a fost setat la $\alpha = 0.05$. Valorile p ($p < 0.05$) au fost considerate din punct de vedere descriptiv ținând cont de natura experimentală a studiului.

4.3. Rezultate

În urma realizării experimentelor, trei dintre subiecții loturilor de studiu au fost eliminați pentru apariția diverselor complicații. Subiecții experimentalii rămași în loturile de studiu sunt prezentați în **Tabelul IV.1**.

Distribuția subiecților experimentalii în loturile de studiu					
Lot	I	II	III	IV	V
Număr subiecți experimentalii (n)	n=5	n=6	n=6	n=5	n=5

Tabelul IV.1. Distribuția finală a subiecților experimentalii în loturile de studiu

4.3.1. Evaluarea clinică

A. Greutatea animalelor

A fost măsurată în ziua realizării anemiei (loturile I-IV) sau în ziua intervenției chirurgicale (lot V), ulterior în zilele 3, 5 și 7. Variația acestora a fost: lot I – 353 ± 25.51 g, lot II – 342.5 ± 28.18 g, lot III – 342.37 ± 41.53 g, lot IV – 349.85 ± 30.32 g, lot V – 359.55 ± 28.86 g, fără să se înregistreze modificări semnificative statistice ($p = 0.931$) (**Figura 4.2.**).

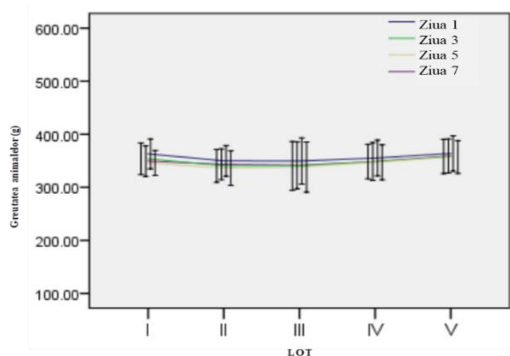


Figura 4.2. Distribuția valorilor greutății animalelor în zilele 1, 3, 5, 7

B. Reluarea alimentației

59.3% (n=16) din animalele și-au reluat precoce alimentația, dar niciunul din lotul I.

C. Reluarea activității fizice

48.1% (n=13) dintre subiecții experimentali și-au reluat activitatea fizică precoce, cei mai mulți făcând parte din lotul V și niciunul din lotul I.

D. Toleranța la efort

S-a folosit testul escaladării unui grilaj oblic, toleranța fiind cuantificată după cum urmează: 1 punct – rezistență < 3 minute, 2 puncte – între de 3-5 minute și 3 puncte pentru rezistență > 5 minute (**Figura 4.3.**). 14.8% (n=4) dintre subiecți au avut toleranță la efort sub 3 minute, toți fiind din lotul I. 25% (n=7) au avut toleranță între 3-5 min, în timp ce restul de subiecți (n=16) au avut toleranță > 5 min, niciun subiect din lotul I (**Figura 4.4.**).

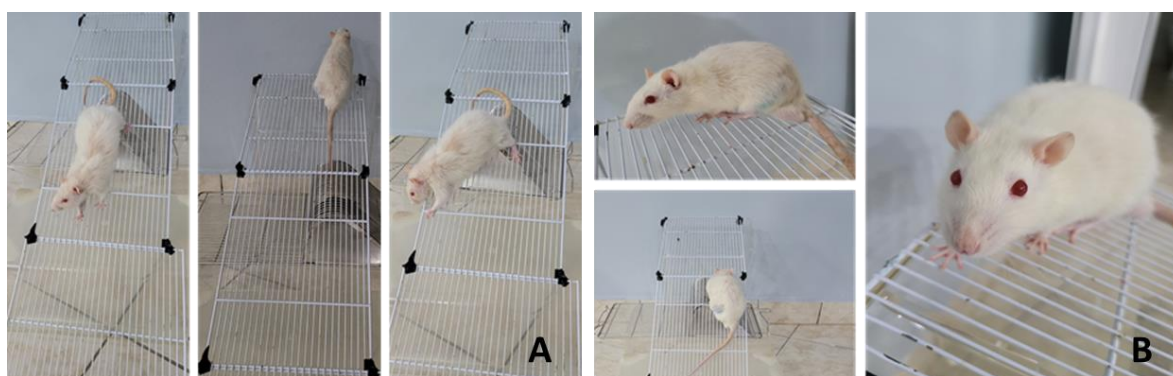


Figura 4.3. (A) - subiecți experimentali cu toleranță bună în timpul testului (urcă rapid până la cea de-a treia treaptă și coboară, reluând traseul). (B) - subiecți experimentali cu toleranță redusă (urcă până la cea de-a doua treaptă sau se opresc în mod repetat până ajung la capătul traseului, rămân la acest nivel sau coboară cu pauze repetate)

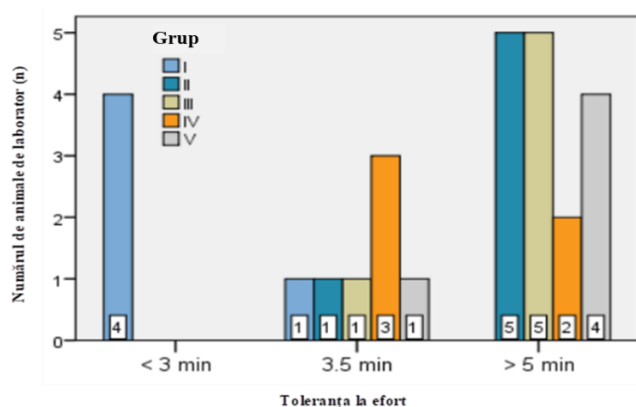


Figura 4.4. Distribuția animalelor în funcție de toleranța la efort la nivelul loturilor

4.3.2. Parametrii hemoleucogramei

Valorile medii $\pm$ deviația standard (DS) sunt prezentate în **Tabelul IV.2**.

Parametrii hemoleucogramei pentru loturile de studiu (valoarea medie $\pm$ DS)						
	Lot control	Lot I	Lot II	Lot III	Lot IV	Lot V
Hb (g/dL)	14.32 $\pm$ 2.01	10.4 $\pm$ 0.54	13.15 $\pm$ 0.61	12.2 $\pm$ 0.33	12.72 $\pm$ 0.54	14.26 $\pm$ 1.5
Ht (%)	36.88 $\pm$ 4.81	23.62 $\pm$ 1.23	34.58 $\pm$ 1.15	32.67 $\pm$ 1.63	34.18 $\pm$ 1.50	37.34 $\pm$ 3.43
Leucocite (10 ⁹ /L)	10.92 $\pm$ 2.76	10.12 $\pm$ 1.73	10.97 $\pm$ 0.80	10.18 $\pm$ 1.08	10.50 $\pm$ 1.27	9.92 $\pm$ 1.41
Trombocite (10 ⁹ /L)	227.20 $\pm$ 27.87	518.80 $\pm$ 56.53	300 $\pm$ 23.41	277.33 $\pm$ 43.54	276.60 $\pm$ 33.66	316.20 $\pm$ 17.37
RBC (10 ¹² /L)	7.64 $\pm$ 0.94	5.56 $\pm$ 0.11	7 $\pm$ 0.32	6.35 $\pm$ 0.23	6.74 $\pm$ 0.38	7.56 $\pm$ 0.78
MCH (pg)	18.70 $\pm$ 0.39	18.44 $\pm$ 0.54	18.78 $\pm$ 0.50	19.32 $\pm$ 0.67	18.94 $\pm$ 0.77	18.88 $\pm$ 0.86
MCV (fL)	48.28 $\pm$ 0.98	41.98 $\pm$ 1.51	49.25 $\pm$ 2.38	51.75 $\pm$ 2.87	50.82 $\pm$ 2.48	49.56 $\pm$ 3.40
RDW (%)	14.36 $\pm$ 0.53	19.20 $\pm$ 1.37	14.93 $\pm$ 0.45	14.62 $\pm$ 0.44	14.92 $\pm$ 1.06	15.32 $\pm$ 1.03

Tabelul IV.2. Parametrii hemoleucogramei pentru loturile de studiu (valoarea medie $\pm$ DS) măsurați la 7 (loturile I-IV) sau 14 zile (lot V) după inducerea anemiei

A. Hemoglobina

Valorile medii ale hemoglobinei (g/dL) diferă între ele semnificativ pentru cel puțin unul dintre loturile studiate ($F = 9.368$; $p < 0.001 < \alpha = 0.05$). Diferențe semnificative statistic sunt între loturile I și restul loturilor. Cea mai mică valoare medie a fost în lotul I (10.40 ± 0.54 g/dL), iar valoarea medie din lotul V (14.26 ± 1.50 g/dL) a fost cea mai apropiată de lotul control (14.32 ± 2.01 g/dL). Restul valorilor (loturile II, III, IV), deși au variat, diferențele nu au fost semnificative (**Figura 4.5.**)

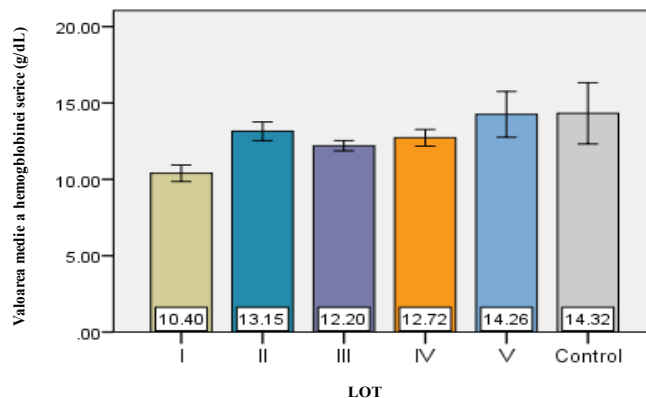


Figura 4.5. Distribuția valorilor medii ale hemoglobinei serice la nivelul loturilor

B. Hematocritul

Valorile medii ale hematocritului (%) diferă între ele semnificativ pentru cel puțin unul dintre loturile studiate ($F = 18.768$; $p < 0.001 < \alpha = 0.05$). Diferențe semnificative statistic sunt între loturile I și restul loturilor. Cea mai mică valoare medie a fost în lotul I ($23.62 \pm 1.23\%$), iar valoarea medie din lotul V ($37.34 \pm 3.43\%$) a fost cea mai apropiată de lotul control ($36.88 \pm 4.81\%$).

C. Eritrocitele (RBC)

S-a observat faptul că valorile medii ale eritrocitelor ($10^{12}/L$) diferă între ele semnificativ pentru cel puțin unul (lotul I) dintre loturile studiate ($F = 11.031$; $p < 0.001 < \alpha = 0.05$). Diferențe semnificative sunt între loturile I și restul loturilor. Cea mai mică valoare medie a fost în lotul I ($5.56 \pm 0.11 \times 10^{12}/L$).

D. Trombocitele

Valorile medii ale trombocitelor ($10^9/L$) diferă semnificativ pentru cel puțin două dintre loturi studiate ($F = 40.447$; $p < 0.001 < \alpha = 0.05$). Diferențe semnificative sunt între loturile I și restul loturilor, lotul II, IV, V și loturile I și VI, în timp ce lotul III diferă doar de lotul I. Cea mai mică valoare medie a fost în lotul control ($227.20 \pm 27.87 \times 10^9/L$), cea mai mare în lotul I ($518.80 \pm 56.53 \times 10^9/L$), iar valoarea medie din lotul III ($277.33 \pm 43.54 \times 10^9/L$) nu a fost diferită de lotul control ($227 \pm 4.81 \times 10^9/L$) (**Figura 4.6.**).

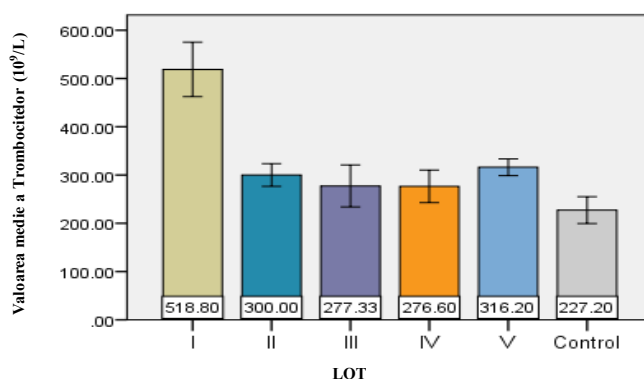


Figura 4.6. Distribuția valorilor medii ale trombocitelor la nivelul loturilor

E. Lărgimea distribuției eritrocitare (RDW)

Valorile medii diferă între ele semnificativ pentru cel puțin unul dintre loturile ($F = 22.343$; $p < 0.001 < \alpha = 0.05$). Cea mai mare valoare s-a înregistrat în lotul I ($19.20 \pm 1.37\%$).

F. Volumul eritrocitar mediu (MCV)

Valorile medii ale MCV (fL) diferă semnificativ pentru cel puțin unul dintre loturile studiate ($F = 10.532$; $p < 0.001 < \alpha = 0.05$). Diferențe semnificative sunt între loturile I și restul loturilor. Valoarea medie cea mai mică s-a înregistrat în lotul I (41.98 ± 1.51 fL).

4.3.3. Profilul fierului

Valorile medii $\pm$ DS sunt prezentate în **Tabelul IV.3**.

Parametri profilului fierului pentru loturile de studiu (valoarea medie $\pm$ DS)						
	Lot control	Lot I	Lot II	Lot III	Lot IV	Lot V
Sideremie ($\mu\text{g/dL}$)	60.50 $\pm$ 2.34	27.04 $\pm$ 6.92	61.50 $\pm$ 11.43	55.95 $\pm$ 7.26	38.84 $\pm$ 12.34	71.68 $\pm$ 21.68
Feritină (ng/mL)	29.86 $\pm$ 3.97	22.52 $\pm$ 0.53	28.73 $\pm$ 3.03	38.00 $\pm$ 4.89	27.34 $\pm$ 4.01	28.38 $\pm$ 1.59
Transferină (ng/mL)	67.54 $\pm$ 7.14	88.28 $\pm$ 7.65	71.85 $\pm$ 9.74	71.05 $\pm$ 6.65	77.26 $\pm$ 8.24	105.24 $\pm$ 12.51
TSAT (%)	72.42 $\pm$ 9.06	23.30 $\pm$ 6.53	68.93 $\pm$ 12.47	63.05 $\pm$ 5.99	40.20 $\pm$ 13.01	56.62 $\pm$ 13.89
TIBC ($\mu\text{g/dL}$)	84.38 $\pm$ 8.95	110.36 $\pm$ 9.59	89.80 $\pm$ 12.18	88.77 $\pm$ 8.30	96.52 $\pm$ 10.35	127.40 $\pm$ 23.41

Tabelul IV.3. Parametri profilului fierului pentru loturile de studiu (valoarea medie $\pm$ DS)

A. Nivelul seric al fierului (sideremia)

Valorile medii ale nivelului plasmatic al fierului ($\mu\text{g/dL}$) corespunzătoare celor 6 grupuri diferă între ele semnificativ pentru cel puțin două dintre grupurile studiate ($F = 9.887$; $p < 0.001 < \alpha = 0.05$). Diferențe semnificative sunt între loturile I și IV și restul loturilor (II, III, V, VI). Cea mai mică valoare medie s-a înregistrat în lotul I (27.04 ± 6.92 $\mu\text{g/dL}$), urmată de lotul IV (38.84 ± 12.34 $\mu\text{g/dL}$), restul valorilor fiind apropiate de cele înregistrate în lotul control (60.50 ± 2.34 $\mu\text{g/dL}$) (**Figura 4.7**).

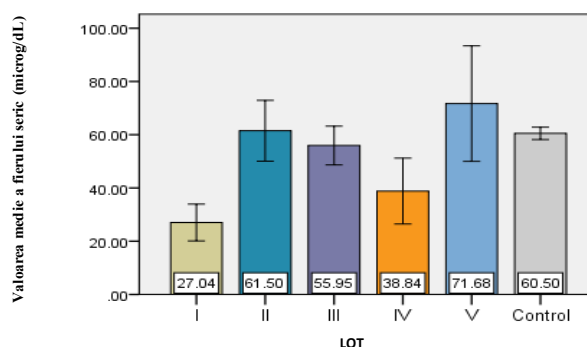


Figura 4.7. Distribuția valorilor medii ale fierului seric la nivelul loturilor

B. Nivelul seric al feritinei

Valorile medii ale feritinei (ng/mL) diferă între ele semnificativ pentru cel puțin două dintre grupurile studiate ($F = 12.143$; $p < 0.001 < \alpha = 0.05$). Diferențe semnificative sunt între loturile I și celelalte loturi, între lotul III și celelalte loturi, precum și între celelalte loturi (II, IV, V, VI) și loturile I și III. Cea mai mică valoare medie a fost în lotul I (22.52 ± 0.53 ng/mL), iar cea mai mare în lotul III (38.00 ± 4.89 ng/mL) (**Figura 4.8.**).

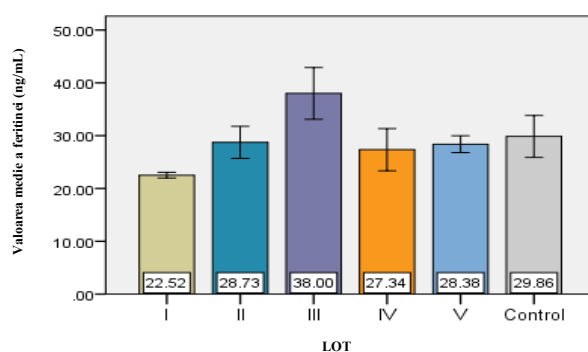


Figura 4.8. Distribuția valorilor medii ale feritinei serice la nivelul loturilor

C. Nivelul seric al transferinei

Valorile medii diferă între ele semnificativ pentru cel puțin un lot dintre cele studiate ($F=13.353$; $p < 0.001 < \alpha = 0.05$). Diferențe sunt între valorile medii din lotul I și loturile II, III, V, VI, precum și lotul III și I, V. Cea mai mică valoare medie a fost în lotul III (71.05 ± 6.65 ng/mL) fiind cea mai apropiată de lotul control (67.54 ± 7.14 ng/mL).

D. Saturația transferinei (TSAT)

Valorile medii ale TSAT (%) diferă între ele semnificativ pentru cel puțin două dintre loturi ($F=16.475$; $p < 0.001 < \alpha = 0.05$). Diferențe semnificative există între valorile medii din lotul I și loturile II-VI, din lotul IV și I-III, V, VI, precum și din lotul II, III, V, VI și I, IV. Cea mai mică valoare a fost în lotul I ($23.30 \pm 6.53\%$) (**Figura 4.9.**).

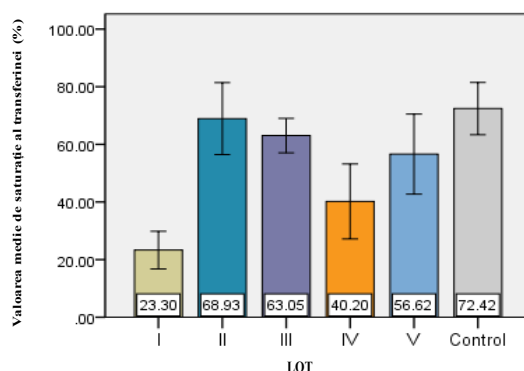


Figura 4.9. Distribuția valorilor medii de saturație al transferinei la nivelul loturilor

E. Capacitatea totală de legare a fierului (TIBC)

Valorile medii diferă semnificativ pentru cel puțin unul dintre loturile studiate ($F=8.182$; $p < 0.001 < \alpha = 0.05$). Diferențe semnificative există între valorile medii din lotul I și loturile II, V, VI, precum și din lotul III și lotul V. Valoarea medie înregistrată în lotul I ($110.36 \pm 9.59 \mu\text{g/dL}$) este mai mare comparativ cu lotul control ($84.38 \pm 8.95 \mu\text{g/dL}$) în timp ce valoarea medie din lotul III ($88.77 \pm 8.30 \mu\text{g/dL}$) a fost cea mai apropiată de acesta.

4.3.4. Evaluarea histopatologică

A. Analiza probelor tegumentare de la nivelul cicatricii postoperatorii

Se observă prezența de fragmente cutanate și țesut muscular striat cu țesut de granulație ce întrerupe pătura musculară striată. Existența o proliferare neocapilară, depunere de collagen stromală și infiltrat inflamator limfo-monocitar cu celularitate variată, în limite normale pentru stadiul de evoluție al unei plăgi postoperatorii închise recent (7 zile postoperator). Pentru analiza comparativă, s-a analizat celularitatea țesutului conjunctiv profund, și s-a apreciat semi-cantitativ prezența infiltratului limfocitar – densitatea celulară (extrem de rare – sub 20 celule, rare – între 20-50 celule și relativ frecvente – între 50-100 celule). Depunerea de collagen a fost apreciată folosind notarea: minimă, moderată, marcată. S-a observat o depunere de collagen moderat-marcată în probelor din loturile V, III și II, și minim-moderată în loturile IV și I (**Figura 4.10.**)

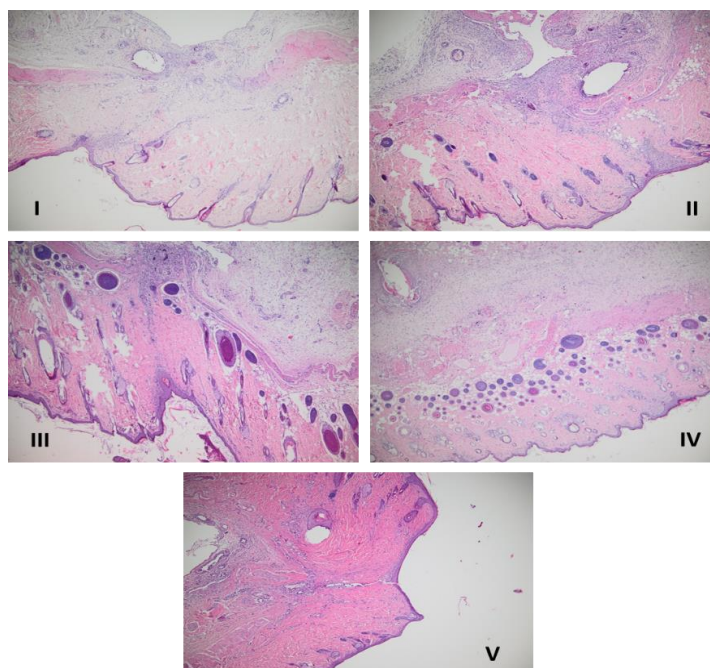


Figura 4.10. Fragmente cutanate și mușchi striat de la nivelul cicatricii postoperatorii (loturile I, II, III, IV, V), Colorație HE, 40x.

Cea mai importantă vascularizație s-a întâlnit în lotul III, urmat de lotul V, II. S-a observat faptul că neutrofilele au fost prezente în număr foarte mic sau chiar absente în probele din loturile V și III, urmate de lotul II, cu o prezență aproximativ egală pentru loturile IV și I (**Figura 4.11.**). Valorile medii ale dimensiunii fibrelor de collagen (μm) corespunzătoare celor 5 loturi diferă semnificativ pentru cel puțin unul dintre loturile studiate ($F = 4.549$; $p < \alpha = 0.05$). Diferențe semnificative sunt între lotul V și restul loturilor. Valoarea medie cea mai mare s-a înregistrat în lotul V ($6.15 \pm 2.34 \mu\text{m}$), cea mai mică în lotul IV ($3.99 \pm 0.81 \mu\text{m}$), iar valorile din celelalte loturi au fost apropiate (cea mai bună valoarea fiind în lotul III – $4.54 \pm 0.95 \mu\text{m}$) (**Figura 4.12.**).

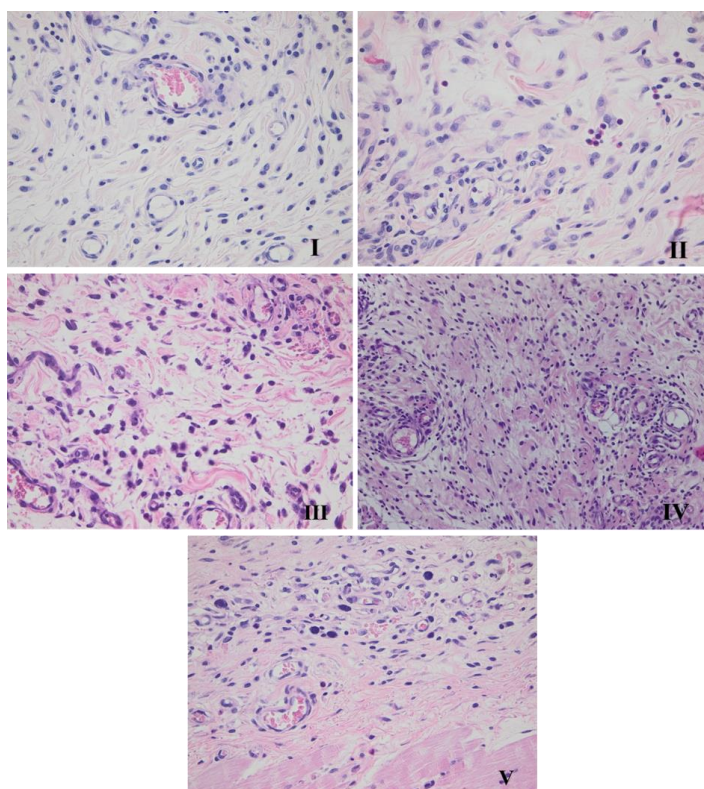


Figura 4.11. Țesut conjunctiv profund, loturile I, II, III, IV, V, Colorație HE, 400x.

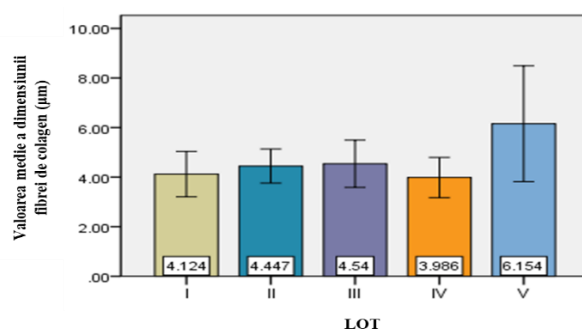


Figura 4.12. Distribuția valorilor medii ale dimensiunii fibrei de collagen la nivelul loturilor

B. Analiza procesului de vindecare osoasă (femur)

În loturile II și III traveele osoase ale reacției periosteale au o grosime mai mare față de lotul I, fiind de aproximativ 175-200% mai groase. (**Figura 4.13.**). Același lucru a fost observat și la nivelul calusului, asociat unui grad de mineralizare mai mic în lotul I comparativ cu II și III. În lotul IV s-a observat un număr mai redus al osteoblastelor.

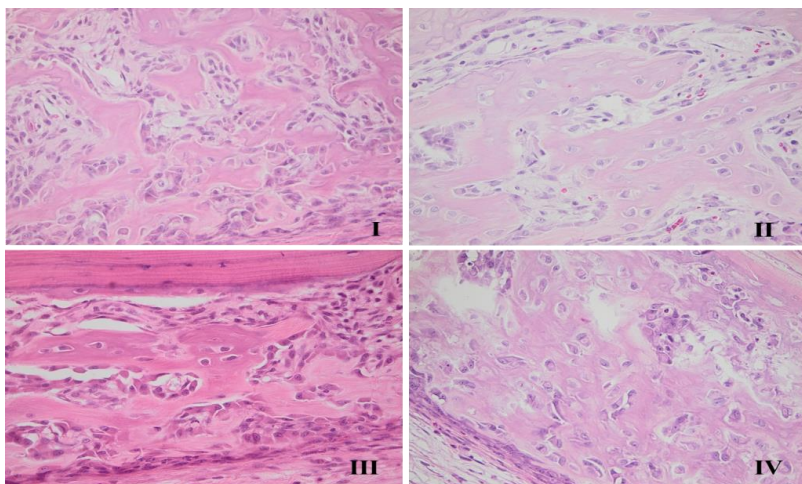


Figura 4.13. Reacție periosteală cu travee osoase mai groase în loturile II și III comparativ cu loturile I și IV; osteoblaste mai puține în lotul IV; Colorație HE, 400x

C. Analiza eritropoezei la nivelul măduvei osoase (femur)

Diferențele dintre loturile de studiu nu sunt semnificative, având celularitate și distribuție a acestora cvasinormale, fără anomalii de structură. loturile II și III prezintă celularitatea medulară cea mai aproape de normal, la fel și raportul (G:E).

D. Analiza hematopoeziei la nivelul splinei

La subiecții la care s-a realizat intervenția terapeutică există o densitate mai mare a precursorilor eritroizi (**Figura 4.14.**).

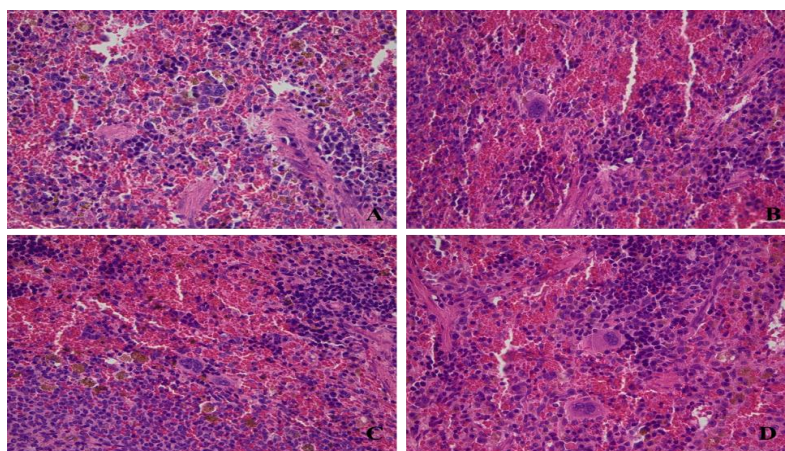


Figura 4.14. Procesul de eritropoeză de la nivelul splinei la subiecți care nu au primit fier (A) și care au primit (B, C, D), Colorație HE, 400x

4.4. Discuții

În acest model experimental original, s-au indus deficitul de fier și anemia, prin pierdere acută de volum sanguin (15% din volumul circulant + intervenție chirurgicală majoră), fiind un model recunoscut în studiile experimentale [5, 51]. Valorile scăzute ale sideremiei în lotul la care a fost indusă anemia ($27.04 \pm 6.92 \mu\text{g/dL}$), asociat cu o valoare a hemoglobinei de $10.4 \pm 0.54 \text{ g/dL}$ și a feritinei serice de $22.52 \pm 0.53 \text{ ng/mL}$, mult mai scăzute comparativ cu lotul control, traduc realizarea cu succes a modelului de studiu.

În fața anemiei acute, adaptarea organismului este mai lentă [52]. În studiul prezent, subiecții experimentali care nu au beneficiat de intervenția terapeutică și-au reluat mai greu hidratarea și alimentația și activitatea fizică în perioada postoperatorie. Cea mai bună toleranță la efort au avut-o subiecții din loturile V, III, și II, cele mai slabe fiind în lotul IV.

În lotul anemic (I), valorile hemoglobinei, hematocritului și eritrocitelor (indici cu sensibilitate și specificitate pentru diagnosticul anemiei [53]) au fost semnificativ reduse comparativ cu restul loturilor. În cele la care s-a realizat suplimentarea cu fier, valorile acestor parametri au fost crescuți ($p < 0.001$), cele mai bune valori întâlnindu-se la subiecții la care intervenția terapeutică s-a realizat cu 7 zile anterior operației. La celelalte loturi, deși valorile au fost comparativ mai bune față de lotul anemic, au fost mai mici decât în lotul control, cu variații nesemnificative între ele.

Indicii medii ai eritrocitelor, MVC, MCH, MCHC au valori scăzute și traducând existența unei anemii microcitare hipocrome (prin deficit de fier) [54, 55]. După administrarea de fier intravenos, aceștia au avut valori apropiate de normal, sugerând că intervenția terapeutică poate restitui dimensiunea hematiilor (MCV) și conținutul în hemoglobină al acestora (MCH) la animale de laborator la care a fost indusă anemia prin deficit de fier prin pierdere acută de volum sanguin.

Administrarea de carboximaltoză ferică intraoperator și la 48 ore postoperator au corectat fierul seric până la valori comparabile cu ale lotului control. Cea mai mică valoare s-a întâlnit la subiecții la care intervenția terapeutică s-a realizat cu 48 ore anterior preoperator. Suplimentarea cu fier în scopul corectării deficitului acestuia a dus la creșterea nivelului de fier circulant, rezultate obținute și în alte studii experimentale [56-58].

Modificările TSAT (%) după realizarea intervenției terapeutice sugerează faptul că administrarea de carboximaltoză ferică intraoperator și la 48 ore postoperator reprezintă timingul cel mai bun comparativ cu administrarea cu 48 ore preoperator sau la 7 zile anterior intervenției chirurgicale. Legat de feritină, indicele depozitelor de fier din organism [59],

intervenția terapeutică a dus la creșterea valorilor subiecților din loturile II-V comparativ cu lotul anemic.

Transferina, principala proteină transportoare a fierului din organism, în cazul unui deficit al acestuia prezintă valori crescute [60]. Acest lucru a fost înregistrat în loturile I și V. Loturile la care intervenția terapeutică s-a realizat intraoperator și la 48 ore postoperator au avut valori apropiate de lotul control. TIBC, o măsură indirectă a transferinei serice [61, 62], a prezentat modificări în concordanță cu aceasta, prezentând cele mai mari valori în loturile I și V, sugerând persistența unui deficit de fier. Totodată, valorile TIBC din lotul IV au fost mai mari comparativ cu lotul II și III, care s-au apropiat de lotul control.

Trombocitelor au avut valori mai mari în lotul I, aspect ce corespunde altor date raportate în literatura de specialitate, valorile corelându-se direct cu deficitul de fier [61, 63].

Vasele de neoformație joacă un rol esențial, livrând nutrienții esențiali pentru fibroblaștii migrați la nivelul cicatricei, ce au rolul de a sintetiza colagenul [64]. Începând cu ziua 3-4 post injurie, încep procesele de proliferare celulară și depunere de matrix, cu inițierea sintezei și depunerii de colagen de către fibroblaști, angiogeneză, și de sinteza matrixului celular, a fibronectinei și a proteoglicanilor [65, 66].

Proliferarea neovasculară cea mai accentuată a fost întâlnită la lotul III, urmat de lotul V, loturile II, I și IV fiind asemănătoare din acest punct de vedere. Neutrofilele au fost absente pe probele recoltate din lotul V și III, sugerând existența unui proces de vindecare mai rapid, și în număr foarte redus în loturile II și IV. Infiltratul limfocitar s-a dovedit a fi relativ frecvent în loturile II, III și V. Cel mai slab reprezentat a fost în lotul I, fiind sugestiv pentru o evoluție mai slabă a procesului de vindecare tegumentară.

Prezența țesutului de granulație se traduce prin inițierea stadiului de proliferare a procesului de vindecare a plăgii [67], fiind prezent la nivelul tuturor probelor studiate, dar cu o celularitate mai mare în loturile II și III. Nu în ultimul rând, la nivelul țesutului cutanat, o depunere mai semnificativă de colagen a fost întâlnită la loturile III și V, iar grosimea cea mai mare a fibrelor de colagen s-a întâlnit în loturile V, III și II, sugerând cea mai bună evoluție a plăgii postoperatorii ($p = 0.004$).

În studiul prezent, la nivelul reacției periosteale, s-a constatat faptul că în loturile II și III traveele osoase au fost mai groase prin comparație cu celelalte loturi, în special cu lotul anemic (lotul I). Același lucru a fost constatat și la nivelul calusului osos (în canalul endomedular), asociat și cu un grad de mineralizare mai mare în loturile II și III comparativ

cu subiecții anemici (lotul I). Așadar, se poate afirma faptul că administrarea de fier intravenos sau la 48 ore postoperator are un efect benefic asupra vindecării osoase.

Este bine cunoscut rolul fierului în producția de eritrocite de către țesuturile hematoformatoare [68], procesul de eritropoieză fiind cel mai mare consumator de fier [69]. În urma analizei morfopatologice a măduvei osoase, am constatat faptul că diferențele dintre loturile de studiu în ceea ce privește hematopoieza nu sunt semnificative, probabil datorită faptului că evenimentele sunt acute. Se pare că subiecții din loturile II și III prezintă celularitatea medulară cea mai aproape de normal, la fel și raportul granulocite:eritrocite.

La șobolani există în mod normal un grad de hematopoieză extramedulară, în special la nivelul splinei [70]. Am constatat faptul că la subiecții din loturile II-V a existat o celularitate mai mare a țesutului hematopoietic la nivelul probelor de splină iar megacariocitele erau dispuse izolat.

5. Studiu clinic privind corectarea deficitului de fier postoperator în chirurgia majoră în scopul optimizării statusului hematologic al pacienților

5.1. Introducere (ipoteza de lucru și obiective specifice)

Scopul principal al studiului este de a analiza dacă intervenția terapeutică de restabilire a depozitelor de fier ale organismului, epuizate / reduse prin pierdere de masă sanguină circulantă, la pacienții supuși unei intervenții chirurgicale majore, permite desfășurarea unei eritropoeze eficiente și duce la corectarea mai rapidă a nivelului hemoglobinei.

Obiectivele secundare sunt reprezentate de identificarea unei posibile corelații între trendul de corectare ale valorilor hemoglobinei și glicemie, lactat, uree și creatinină serice ale pacienților analizați.

Datele prezentate în acest studiu au fost publicate într-un articol de specialitate [71].

5.2. Materiale și Metodă

5.2.1. Variabilele studiului

Am realizat un studiu unicentric, descriptiv, ce a avut ca scop identificarea și tratamentul deficitului de fier, însoțit sau nu de anemie, la pacienții care au fost supuși unei intervenții chirurgicale majore asociate cu sângerări importante, și care au fost internați în cadrul Spitalului Clinic de Urgență București, în perioada 1 Mai - 31 August 2020. Studiul a primit avizul Comisiei de Etică a Spitalului Clinic de Urgență București.

Pentru a putea fi incluși în studiu, pacienții trebuiau să îndeplinească următoarele criterii de includere: vârsta cuprinsă între 18 și 90 ani; pacient supus unei intervenții chirurgicale majore; sângerare perioperatorie mai mare de 500 mL, sau mai mare de 250 mL dacă prezentau cel puțin anemie moderată anterior intervenției chirurgicale; anemie postoperatorie; deficit de fier identificat în cadrul screeningului postoperator.

Au fost excluși din studiu pacienții care îndeplineau una sau mai multe dintre următoarele criterii: transfuzia perioperatorie de produse de sânge; sepsis sau șoc septic; alergie la fier; status inflamator persistent; boală inflamatorie cronică; insuficiență renală cronică; lipsa monitorizării hemoglobinei după administrarea fierului intravenos;

5.2.2. Examinări paraclinice

Pentru screeningul anemiei în perioada postoperatorie s-au folosit: hemoglobina (preoperator, intraoperator, pre-intervenție terapeutică, la 48 și 72 ore după intervenție),

MCH (hemoglobina eritrocitară medie) și MCV (volumul mediu eritrocitar). În scopul identificării deficitului de fier s-au determinat: sideremia, feritina, saturația transferinei (TSAT) și capacitatea totală de legare a fierului (TIBC). De asemenea, au fost colectate valorile glicemiei, fibrinogenului, ureei, creatininei și lactatului seric. Fibrinogenul și feritina au fost folosite și în scopul evaluării statusului inflamator al pacienților.

5.2.3. Intervenția terapeutică

Intervenția terapeutică a constat în administrarea de fier parenteral, carboximaltoză ferică (Ferinject®, Vifor Pharma) în perioada postoperatorie. Deficitul de fier a fost calculat cu ajutorul ecuației *Ganzoni*: deficitul total de fier = greutatea {kg} x (nivelul dorit al hemoglobinei – nivelul actual al hemoglobinei) {g/L} x 2.4 + iron stores {mg} [72]. Ulterior, pacienții au primit între 500 și 1000 mg de carboximaltoză ferică, doză unică.

5.2.4. Analiza statistică

Pentru analiza datelor colectate și realizarea graficelor, s-a folosit programul MedCalc 19.2.4. Media, mediana și deviația standard (DS) a parametrilor înregistrați a fost calculată folosind ”one sample testul *t*”, iar pentru a compara grupurile studiate s-a folosit ”testul ANOVA” (analiza varianței), corecția *Bonferroni*, testul de normalitate *Shapiro-Wilk* și testul *Mann-Whitney* pentru variabile independente. Astfel, a putut fi analizat trendul dinamic al variabilelor măsurate (linear, quadratic sau cubic). S-a considerat ca având valoare statistică un $p < 0.05$.

5.3. Rezultate

5.3.1. Caracteristicile generale ale grupului și examinările paraclinice

După aplicarea criteriilor de includere și excludere, din cei 30 pacienți care au beneficiat de intervenția terapeutică, doar 21 au rămas în analiza finală. Vârsta medie a acestora a fost de 58.90 ± 19.06 ani (între 19 și 86 ani). Din totalul intervențiilor chirurgicale, 11 au fost urgențe și 10 intervenții electiv. Durata medie de spitalizare a fost 10.09 zile ± 5.03 DS.

În **Tabelul V.2.** sunt prezentate caracteristicile generale ale pacienților.

Caracteristicile generale ale pacienților	
Sexul (numeric) (%)	
- femei	8 (38.09)
- bărbați	13 (61.90)
Scorul ASA* (numeric) (%)	

- ASA II	4 (19.05)
- ASA III	14 (66.67)
- ASA IV	3 (14.28)
Tipul intervenției chirurgicale (numeric) (%)	
- chirurgie generală	7 (33.33)
- ortopedie	9 (42.85)
- politraumă	5 (23.80)
Durata intervenției chirurgicale (minute; valoarea medie $\pm$ DS)	
- chirurgie generală	172.85 $\pm$ 57.74
- ortopedie	155.62 $\pm$ 41.18
- politraumă	88 $\pm$ 41.66
Sângerare intraoperatorie (mL; valoare medie $\pm$ DS)	
- chirurgie generală	745.71 $\pm$ 405.28
- ortopedie	653.7 $\pm$ 453.26
- politraumă	610 $\pm$ 111.35

*Legendă: ASA = American Society of Anesthesiology; mL – mililitru, mg – miligram, dL – decilitru.

Tabelul V.2. Caracteristicile generale ale pacienților (valoarea medie $\pm$ DS)

Variația valorilor hemoglobinei pe durata spitalizării este prezentată în **Tabelul V.3.**

Variația valorilor hemoglobinei (g/dL) (valoarea medie $\pm$ DS)	
- preoperator	11.78 $\pm$ 2.27 g/dL
- intraoperator	10.27 $\pm$ 1.81 g/dL
- pre-administrare de fier intravenos	8.51 $\pm$ 0.95 g/dL
- la 48 ore post-administrare (I)	8.65 $\pm$ 0.91 g/dL
- la 72 ore post-administrare (II)	8.84 $\pm$ 0.86 g/dL

Tabelul V.3. Variația valorilor hemoglobinei (valoarea medie $\pm$ DS)

Modificările valorilor hemoglobinei între momentul preoperator, intraoperator și anterior intervenției terapeutice sunt prezentate în **Figura 5.3.**

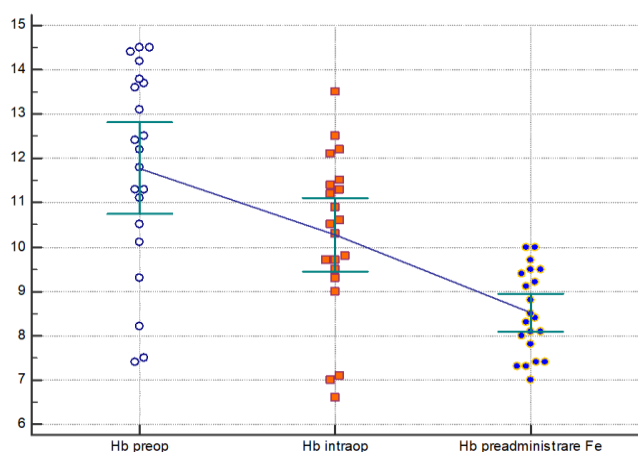


Figura 5.3. Variația nivelului hemoglobinei între momentele cheie analizate

Deficitului de fier postoperator a fost identificat la toți pacienții studiați (n=21). Valorilor parametrilor folosiți sunt prezentați în **Tabelul V.4**. Pentru stabilirea deficitului de fier s-au ales următoarele valori prag: feritină serică 100-200 $\mu\text{g/L}$ plus TSAT < 20%, sideremie < 10 $\mu\text{mol/L}$, dTIBC > 36 $\mu\text{mol/L}$, MVC < 92 fL și MCH < 33 g/dL.

Parametri serici folosiți în screeningul deficitului de fier	
Sideremie ($\mu\text{mol/L}$)	3.41 ± 1.67
Saturația transferinei - TSAT (%)	7.19 ± 2.74
Feritina ($\mu\text{g/L}$)	118.23 ± 17.22
Capacitatea totală de legare a fierului - dTIBC ($\mu\text{mol/L}$)	48.80 ± 12.20
Volumul mediu eritrocitar - MCV (fL)	85.46 ± 6.49
Hemoglobina eritocitară medie - MCH (g/dL)	28.34 ± 3.93

Tabelul V.4. Parametri bioumorali folosiți pentru screeningul deficitului de fier postoperator (valoarea medie $\pm$ DS)

Dintre pacienții incluși în studiu, 13 au primit 1000 mg și 3 au primit 500 mg de carboximaltoză ferică în primele 48 ore după intervenția chirurgicală, doi pacienți au primit 500 mg, respectiv 1000 mg după 3-5 zile, iar 3 pacienți au primit 1000 mg după 7 zile.

Suplimentar față de determinarea valorilor hemoglobinei la 48 și 72 ore post-intervenție terapeutică, au fost determinați și alți parametri bioumorali (**Tabelul V.5**). Valorile scăzute ale feritinei, asociate unei valori normale a fibrinogenului, au validat absența unui status inflamator acut persistent postoperator.

Parametri bioumorali determinați postoperator (valoare medie $\pm$ DS)		
	48 ore post-intervenție	72 ore post-intervenție
1. glicemie (mg/dL)	125.5 ($\pm$ 27.59)	124.8 ($\pm$ 28.28)
2. fibrinogen (mg/dL)	227.3 ($\pm$ 34.07)	250.1 ($\pm$ 25.15)
3. uree (mg/dL)	31.95 ($\pm$ 6.18)	29.86 ($\pm$ 5.97)
4. creatinină (mg/dL)	1.14 ($\pm$ 0.30)	1.06 ($\pm$ 0.22)
5. lactat seric (mmol/L)	1.25 ($\pm$ 0.48)	1.29 ($\pm$ 0.34)

Tabelul V.5. Determinări biumorale postoperatorii

Valorile glicemiei s-au corelat cu trendul de corecție al hemoglobinei, atât la 48 ore cât și la 72 ore post-intervenție ($p < 0.0001$). Așadar, valori crescute ale glicemiei par să reducă nivelul de creștere al valorilor hemoglobinei (**Figura 5.7.**). Nu au fost identificate corelații similare între lactatul, ureea sau creatinina serice.

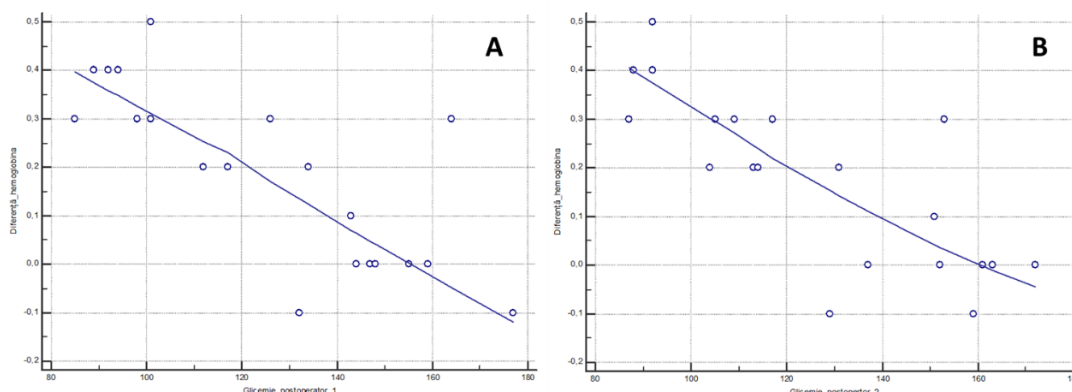


Figura 5.7. Corelația dintre valoarea glicemiei la 48 ore (A) și 72 ore (B) post-intervenție și trendul de creștere al hemoglobinei

Nu a fost identificată nicio corelație semnificativă din punct de vedere statistic între durata spitalizării și variația hemoglobinei ($p = 0.55$).

Folosind analiza statistică *Quadratică* am observat că deși nivelurile hemoglobinei nu diferă foarte mult între momentul anterior intervenției și măsurătorile realizate la 48 și respectiv 72 ore post-intervenție (8.51 g/dL versus 8.65 g/dL versus 8.84 g/dL), analiza trendului de creștere a avut o valoare $p < 0.0001$ (**Figura 5.9.**). Așadar, se așteaptă ca nivelul hemoglobinei să își mențină trendul de creștere în perioada următoare.

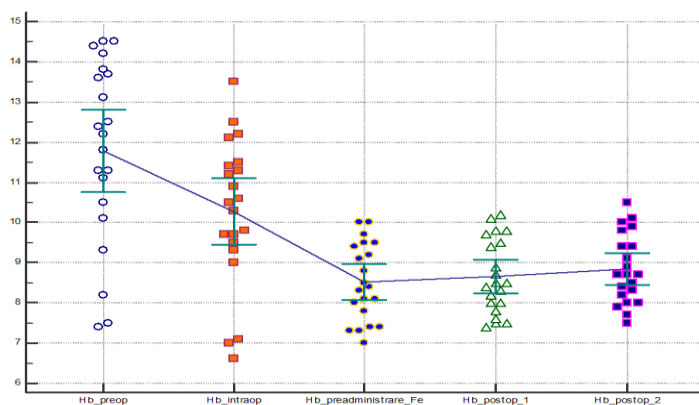


Figura 5.9. Analiza *Quadratică* a trendului variației valorilor hemoglobinei

5.4. Discuții

La pacienții cu pierderi importante de sânge, cauzate de intervenții chirurgicale majore, anemia se poate dezvolta sau agrava și la cei mai mulți dintre aceștia se asociază cu un deficit absolut sau funcțional de fier (din cauza răspunsului eritropoietic accentuat, aportul normal de fier este depășit) [73, 74]. Este bine cunoscut faptul că prin pierderea 1 mL de sânge se pierde circa 0.5 mg de fier [75]. Astfel, în condițiile pierderilor de volum sanguin circulant, deficitul de fier este cvasiprezent. Este și cazul pacienților din studiul acesta, la care deficitul de fier asociat anemiei a fost identificat în 100% dintre cazuri, administrarea de fier parenteral prevenind instalarea eritropoiezei fier-deficitare [76].

În prezent există numeroși agenți farmacologici cu conținut de fier care pot fi administrați în astfel de situații. Nu există recomandări standardizate pentru alegerea acestor produse, alegerea bazându-se pe disponibilitate, profilul alergic, deficitul de fier calculat, timpul disponibil pentru administrare și experiența medicului prescriptor [77, 78, 79].

Se consideră că există o conexiune între metabolismul glucozei și al fierului. La subiecți sănătoși, un aport crescut de glucoză pare să ducă la creșterea nivelului de hepcidină, care la rândul său determină o scădere a valorilor fierului seric [80]. La pacienții incluși în această analiză, niveluri crescute ale valorilor glicemiei s-au corelat cu o reducere a trendului de corectare a nivelului hemoglobinei, cel mai probabil prin același mecanism.

Concluziile generale ale cercetării

1. Realizarea intervenției terapeutice de administrare de fier intravenos intraoperator și la 48 ore postoperator a prezentat rezultate superioare din punct de vedere clinic, paraclinic și histopatologic, comparativ cu administrarea cu 48 ore preoperator și cele mai mari diferențe față de lipsa intervenției terapeutice.
2. Intervenția terapeutică de administrare perioperatorie a carboximaltozei ferice în cadrul studiului experimental a dus la optimizarea parametrilor hematologici: hemoglobină, hematocrit, eritrocite, RDW, trombocite.
3. Corectarea perioperatorie a deficitului de fier duce la îmbunătățirea evoluției clinice postoperatorii a subiecților experimentali, favorizând reluarea precoce a hidratării, alimentației și a mobilității, precum și creșterea toleranței la efort.
4. Refacerea indicilor fierului circulant (sideremie, TSAT, TIBC) și a depozitelor de fier (ferritina) este mai eficientă în cazul în care intervenția terapeutică de administrare a fierului intravenos se realizează intraoperator sau la 48 ore postoperator, comparativ cu administrarea cu 48 ore preoperator.
5. Subiecții la care administrarea de carboximaltoză ferică s-a realizat cu 7 zile preoperator, intraoperator și la 48 ore postoperator au prezentat cea mai bună evoluție a procesului de vindecare tegumentară, exprimată printr-o proliferarea neovasculară accentuată, un număr redus de neutrofile, infiltrat inflamator cu celularitate relativ frecventă, depunere mai semnificativă de collagen cu o grosime optimă a fibrelor.
6. Administrarea de fier intravenos intraoperator sau la 48 ore postoperator s-a corelat cu cel mai eficient proces de vindecare osoasă (reacție periosteală și calus cu travee osoase mai groase; grad de mineralizare mai mare la nivelul calusului)
7. În momentul screeningului deficitului de fier la pacienții care au fost supuși unei intervenții chirurgicale majore, toți pacienții care au prezentat sângerări mai mari de 500 ml au prezentat nu numai deficit de fier, ci și o formă de anemie asociată.
8. Toți pacienții care au primit tratament intravenos cu carboximaltoză ferică s-au dovedit a avea un trend favorabil de creștere al nivelului hemoglobinei.
9. Niveluri crescute ale valorilor glicemiei la pacienții fără diabet zaharat se corelează cu o reducere a trendului de corectare a valorilor hemoglobinei.

Contribuții personale

Contribuția personală a constat în primul rând în crearea unui model experimental original, reproductibil, de inducere a anemiei și a deficitului de fier în mod acut, prin pierdere de volum sanguin, urmat de practicarea unor intervenții chirurgicale majore de osteosinteză de femur cu broșă centromedulară și expunere a anatomică a zonei cervicale anterioare pentru abordarea venei jugulare interne. S-a realizat o intervenție terapeutică ce a constat în administrarea de carboximaltoză ferică intravenos, în doză unică, abordată în patru momente cheie: cu 7 zile preoperator, cu 48 ore preoperator, intraoperator și cu 48 ore postoperator. Scopul acesteia a fost de a corecta deficitul de fier apărut secundar pierderilor de volum sanguin circulant și de a optimiza statusul hematologic al subiecților experimentali. Secundar, s-a analizat comparativ răspunsul la această atitudine terapeutică, atât din punct de vedere clinic și praclinic, cât și radiologic și morfoopatologic.

După cunoștințele mele, este primul studiu în care a fost analizat atât de complex răspunsul la suplimentarea intravenoasă cu fier, în funcție de momentul intervenției terapeutice în perioada perioperatorie imediată, analizându-se multidisciplinar evoluțiile postoperatorii ale subiecților experimentali.

Pornind de la studiul experimental, am realizat un studiu clinic menit a identifica incidența postoperatorie a anemiei și a deficitului de fier la pacienții supuși unei intervenții chirurgicale majore și realizarea unei intervenții postoperatorii de administrare de fier intravenos în scopul corectării nivelului hemoglobinei. Rezultatele obținute demonstrează faptul că această intervenție duce la optimizarea nivelului hemoglobinei. Totodată, am observat faptul că niveluri crescute ale glicemiei, la pacienți fără diabet zaharat, se corelează cu reducerea trendului de optimizare a valorilor hemoglobinei.

Cercetarea realizată în cadrul acestei teze de doctorat s-a concretizat prin publicarea a trei lucrări științifice *in extenso*, două de tip „review” și una de tip „original research”, publicate în reviste indexate BDI – Baze de date internaționale (1) și ISI Web of Knowledge (2) și printr-o lucrare științifică din studiul experimental, de tip „original research”, trimisă spre publicare într-o revistă indexată ISI. Consider că această lucrare, prin rezultatele obținute, reprezintă un suport pentru cercetări viitoare. Analizarea elementelor studiate, dincolo de perioada acută perioperatorie, ne va ajuta să identificăm beneficiile pe termen lung ale unei astfel de atitudini terapeutice, și să evidențiem diferențele dintre evoluțiile subiecților în funcție de momentul realizării acesteia.

Bibliografia

1. Muñoz M, Acheson AG, Bisbe E, Butcher A, Gómez-Ramírez S, Khalafallah AA, Kehlet H, Kietaibl S, Liumbruno GM, Meybohm P, Rao Baikady R. An international consensus statement on the management of postoperative anaemia after major surgical procedures. *Anaesthesia*. 2018 Nov;73(11):1418-31.
2. Girelli D, Ugolini S, Busti F, Marchi G, Castagna A. Modern iron replacement therapy: clinical and pathophysiological insights. *International journal of hematology*. 2018 Jan;107(1):16-30.
3. Litton E, Xiao J, Allen CT, Ho KM. Iron-restricted erythropoiesis and risk of red blood cell transfusion in the intensive care unit: a prospective observational study. *Anaesthesia and intensive care*. 2015 Sep;43(5):612-6.
4. Keating GM. Ferric carboxymaltose: a review of its use in iron deficiency. *Drugs*. 2015 Jan;75(1):101-27.
5. Ma J, Wen X, Mo F, Wang X, Shen Z, Li M. Effects of different doses and duration of iron supplementation on curing iron deficiency anemia: an experimental study. *Biological trace element research*. 2014 Dec;162(1):242-51.
6. Andrews NC, Schmidt PJ. Iron homeostasis. *Annu. Rev. Physiol.*. 2007 Mar 17;69:69-85.
7. Getu S, Shiferaw E, Melku M. Neonatal Iron: Factors Influencing its Level and Associated Complications-a Review Article. *Clinical laboratory*. 2020 Mar 1;66(3).
8. Dev S, Babitt JL. Overview of iron metabolism in health and disease. *Hemodialysis International*. 2017 Apr;21:S6-20.
9. Nai A, Lidonnici MR, Rausa M, Mandelli G, Pagani A, Silvestri L, Ferrari G, Camaschella C. The second transferrin receptor regulates red blood cell production in mice. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2015 Feb 12;125(7):1170-9.
10. Thomas L, Thomas C. Detection of iron restriction in anaemic and non-anaemic patients: New diagnostic approaches. *European journal of haematology*. 2017 Sep;99(3):262-8.
11. Goodnough LT, Nemeth E, Ganz T. Detection, evaluation, and management of iron-restricted erythropoiesis. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2010 Dec 2;116(23):4754-61.
12. Camaschella C. Iron deficiency: new insights into diagnosis and treatment. *Hematology*. 2015 Dec 5;2015(1):8-13.
13. Cappellini MD, Motta I. Anemia in clinical practice—definition and classification: does hemoglobin change with aging?. In *Seminars in hematology* 2015 Oct 1 (Vol. 52, No. 4, pp. 261-269). WB Saunders.
14. Bouri S, Martin J. Investigation of iron deficiency anaemia. *Clinical Medicine*. 2018 Jun;18(3):242.
15. Dahlerup JF, Eivindson M, Jacobsen BA, Jensen NM, Jorgensen SP, Laursen SB. Diagnosis and treatment of unexplained anemia with iron deficiency without overt bleeding. *Dan Med J* 2015; 62: C5072. 2014 Jan 12.
16. Yeo JH, Colonne CK, Tasneem N, Cosgriff MP, Fraser ST. The iron islands: Erythroblastic islands and iron metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2019 Feb 1;1863(2):466-71.

17. Camaschella C, Pagani A, Nai A, Silvestri L. The mutual control of iron and erythropoiesis. *International journal of laboratory hematology*. 2016 May;38:20-6.
18. Rishi G, Subramaniam VN. The relationship between systemic iron homeostasis and erythropoiesis. *Bioscience reports*. 2017 Dec 22;37(6).
19. **TIGLIS M**, GRINTESCU IC, NEAGU TP, GRINTESCU IM. Iron and Erythropoiesis–Optimizing the Link. *Modern Medicine*. 2020;27(2):92.
20. Dzierzak E, Philipsen S. Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2013 Apr 1;3(4):a011601.
21. Zivot A, Lipton JM, Narla A, Blanc L. Erythropoiesis: insights into pathophysiology and treatments in 2017. *Molecular Medicine*. 2018 Dec;24(1):11.
22. Ponka P. Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 1997 Jan 1;89(1):1-25.
23. An X, Schulz VP, Li J, Wu K, Liu J, Xue F, Hu J, Mohandas N, Gallagher PG. Global transcriptome analyses of human and murine terminal erythroid differentiation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2014 May 29;123(22):3466-77.
24. Li Y, Huang X, Wang J, Huang R, Wan D. Regulation of iron homeostasis and related diseases. *Mediators of inflammation*. 2020 May 2;2020.
25. Paulson RF, Shi L, Wu DC. Stress erythropoiesis: new signals and new stress progenitor cells. *Current opinion in hematology*. 2011 May;18(3):139.
26. Brittenham GM. Iron-chelating therapy for transfusional iron overload. *New England Journal of Medicine*. 2011 Jan 13;364(2):146-56.
27. Gómez-Ramírez S, Bisbe E, Shander A, Spahn DR, Muñoz M. Management of perioperative iron deficiency anemia. *Acta haematologica*. 2019;142(1):21-9.
28. Fowler AJ, Ahmad T, Phull MK, Allard S, Gillies MA, Pearse RM. Meta-analysis of the association between preoperative anaemia and mortality after surgery. *British Journal of Surgery*. 2015.
29. Dunne JR, Malone D, Tracy JK, Gannon C, Napolitano LM. Perioperative anemia: an independent risk factor for infection, mortality, and resource utilization in surgery. *Journal of Surgical Research*. 2002 Feb 1;102(2):237-44.
30. Leichtle SW, Mouawad NJ, Lampman R, Singal B, Cleary RK. Does preoperative anemia adversely affect colon and rectal surgery outcomes?. *Journal of the American College of Surgeons*. 2011 Feb 1;212(2):187-94.
31. Gómez-Ramírez S, Jericó C, Muñoz M. Perioperative anemia: Prevalence, consequences and pathophysiology. *Transfusion and Apheresis Science*. 2019 Aug 1;58(4):369-74.
32. Miles LF, Kunz SA, Na LH, Braat S, Burbury K, Story DA. Postoperative outcomes following cardiac surgery in non-anaemic iron-replete and iron-deficient patients—an exploratory study. *Anaesthesia*. 2018 Apr;73(4):450-8.
33. Shander A, Knight K, Thurer R, Adamson J, Spence R. Prevalence and outcomes of anemia in surgery: a systematic review of the literature. *The American journal of medicine*. 2004 Apr 5;116(7):58-69.

34. Jans Ø, Nielsen CS, Khan N, Gromov K, Troelsen A, Husted H. Iron deficiency and preoperative anaemia in patients scheduled for elective hip-and knee arthroplasty—an observational study. *Vox sanguinis*. 2018 Apr;113(3):260-7.
35. Wu Y, Petrochenko P, Chen L, Wong SY, Absar M, Choi S, Zheng J. Core size determination and structural characterization of intravenous iron complexes by cryogenic transmission electron microscopy. *International journal of pharmaceutics*. 2016 May 30;505(1-2):167-74.
36. Pollock RF, Biggar P. Indirect methods of comparison of the safety of ferric derisomaltose, iron sucrose and ferric carboxymaltose in the treatment of iron deficiency anemia. *Expert review of hematology*. 2020 Feb 1;13(2):187-95.
37. Larson DS, Coyne DW. Update on intravenous iron choices. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2014 Mar 1;23(2):186-91.
38. Martin-Malo A, Borchard G, Flühmann B, Mori C, Silverberg D, Jankowska EA. Differences between intravenous iron products: focus on treatment of iron deficiency in chronic heart failure patients. *ESC heart failure*. 2019 Jan 29.
39. Neiser S, Rentsch D, Dippon U, Kappler A, Weidler PG, Göttlicher J, Steininger R, Wilhelm M, Braitsch M, Funk F, Philipp E. Physico-chemical properties of the new generation IV iron preparations ferumoxitol, iron isomaltoside 1000 and ferric carboxymaltose. *Biometals*. 2015 Aug 1;28(4):615-35.
40. Kassianides X, Bodington R, Bhandari S. An evaluation of ferric derisomaltose as a treatment for anemia. *Expert Review of Hematology*. 2021 Jan 2;14(1):7-29.
41. Lau KK, Utukuri MM, Ramachandran M, Jones DH. Iron supplementation for postoperative anaemia following major paediatric orthopaedic surgery. *The Annals of The Royal College of Surgeons of England*. 2007 Jan;89(1):44-6.
42. D'John J, Hutchins M, Januchowski R. Medical management of anemia in the surgical patient. *Osteopathic Family Physician*. 2016;8(5).
43. Wright JA, Richards T, Srai SK. The role of iron in the skin and cutaneous wound healing. *Frontiers in pharmacology*. 2014 Jul 10;5:156.
44. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *European surgical research*. 2012;49(1):35-43.
45. Sandberg N, Zederfeldt B. Influence of acute hemorrhage on wound healing in the rabbit. *Acta chirurgica Scandinavica*. 1960 Apr 14;118:367-71.
46. Sampaio SC, Monteiro JS, Cangussú MC, Santos GM, dos Santos MA, dos Santos JN, Pinheiro AL. Effect of laser and LED phototherapies on the healing of cutaneous wound on healthy and iron-deficient Wistar rats and their impact on fibroblastic activity during wound healing. *Lasers in medical science*. 2013 May;28(3):799-806.
47. Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annual review of biochemistry*. 2009 Jul 7;78:929-58.
48. Pikuleva IA, Waterman MR. Cytochromes p450: roles in diseases. *Journal of Biological Chemistry*. 2013 Jun 14;288(24):17091-8.
49. Katsumata SI, Katsumata-Tsuboi R, Uehara M, Suzuki K. Severe iron deficiency decreases both bone formation and bone resorption in rats. *The Journal of nutrition*. 2009 Feb 1;139(2):238-43.

50. Medeiros DM, Stoecker B, Plattner A, Jennings D, Haub M. Iron deficiency negatively affects vertebrae and femurs of rats independently of energy intake and body weight. *The Journal of nutrition*. 2004 Nov 1;134(11):3061-7.
51. Shi Xin WG (2008) *Animal models of human diseases*. Beijing: People's Health Publishing House. 9
52. Giger UR. Regenerative anemias caused by blood loss or hemolysis. *Textbook of veterinary internal medicine*. 2005;2:1886-907.
53. Murphy JF. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. Geneva, World Health Organization, 2011 (WHO/NMH/NHD/MNM/11.1); <http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf>, accessed mai 2021.
54. Naigamwalla DZ, Webb JA, Giger U. Iron deficiency anemia. *The Canadian Veterinary Journal*. 2012 Mar;53(3):250.
55. Susanti T, Paramasari D, Indarto D. Development of rat model with iron deficiency anemia by modification of its standard food. 2nd PHICo 2017. 2017 Dec;9.
56. Wang FR, Xie ZG, Ye XQ, Deng SG, Hu YQ, Guo X, Chen SG. Effectiveness of treatment of iron deficiency anemia in rats with squid ink melanin–Fe. *Food & function*. 2014;5(1):123-8.
57. He H, Huang Q, Liu C, Jia S, Wang Y, An F, Song H. Effectiveness of AOS–iron on iron deficiency anemia in rats. *RSC advances*. 2019;9(9):5053-63.
58. Conrad ME, Umbreit JN. Iron absorption and transport—an update. *American journal of hematology*. 2000 Aug;64(4):287-98.
59. Bailey LB, Stover PJ, McNulty H, Fenech MF, Gregory III JF, Mills JL, Pfeiffer CM, Fazili Z, Zhang M, Ueland PM, Molloy AM. Biomarkers of nutrition for development—folate review. *The Journal of nutrition*. 2015 Jul 1;145(7):1636S-80S.
60. Elsayed ME, Sharif MU, Stack AG. Transferrin saturation: a body iron biomarker. *Advances in clinical chemistry*. 2016 Jan 1;75:71-97.
61. Dan K. Thrombocytosis in iron deficiency anemia. *Internal medicine*. 2005;44(10):1025-6.
62. Kasvosve I, Delanghe J. Total iron binding capacity and transferrin concentration in the assessment of iron status.
63. Yessayan L, Yee J, Zasuwa G, Frinak S, Besarab A. Iron repletion is associated with reduction in platelet counts in non-dialysis chronic kidney disease patients independent of erythropoiesis-stimulating agent use: a retrospective cohort study. *BMC nephrology*. 2014 Dec;15(1):1-7.
64. Eckes B, Aumailley M, Kreig T. Collagens and the reestablishment of dermal integrity. In: Clark R, editor. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. New York: Plenum Press; 1996. p. 493.
65. Gantwerker EA, Hom DB. Skin: histology and physiology of wound healing. *Clinics in plastic surgery*. 2012 Jan 1;39(1):85-97.
66. Greaves NS, Ashcroft KJ, Baguneid M, Bayat A. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *Journal of dermatological science*. 2013 Dec 1;72(3):206-17.

67. Dreifke MB, Jayasuriya AA, Jayasuriya AC. Current wound healing procedures and potential care. *Materials Science and Engineering: C*. 2015 Mar 1;48:651-62.
68. Kautz L, Nemeth E. Molecular liaisons between erythropoiesis and iron metabolism. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2014 Jul 24;124(4):479-82.
69. Papanikolaou G, Pantopoulos K. Systemic iron homeostasis and erythropoiesis. *IUBMB life*. 2017 Jun;69(6):399-413.
70. Cesta MF. Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicologic pathology*. 2006 Aug;34(5):455-65.
71. **Țiglis M**, Cobilinschi C, Mirea LE, Băetu AL, Peride I, Neagu TP, Niculae A, Checherită AL, Grintescu IM. The Importance of Iron Administration in Correcting Anaemia after Major Surgery. *The Journal of Critical Care Medicine*. 2021 Jul;7(3):184-191.
72. <https://www.mdcalc.com/ganzoni-equation-iron-deficiency-anemia>, accesat mai 2021
73. Makam AN, Nguyen OK, Clark C, Halm EA. Incidence, Predictors, and Outcomes of Hospital-Acquired Anemia. *J Hosp Med*. 2017;12:317-22.
74. Bodley T, Chan M, Clarfield L, Levi O, Longmore A, Lin W, Yip D, Orla S, Friedrich JO, Hicks LK. Patient Harm from Repetitive Blood Draws and Blood Waste in the ICU: A Retrospective Cohort Study.
75. Auerbach M, Goodnough LT, Shander A. Iron: the new advances in therapy. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*. 2013 Mar 1;27(1):131-40.
76. Muñoz M, Franchini M, Liunbruno GM. The post-operative management of anaemia: more efforts are needed. *Blood Transfusion*. 2018 Jul;16(4):324.
77. **Țiglis M**, Neagu TP, Niculae A, Lascăr I, Grințescu IM. Incidence of Iron Deficiency and the Role of Intravenous Iron Use in Perioperative Periods. *Medicina*. 2020 Oct;56(10):528.
78. Muñoz M, Gómez-Ramírez S, Bhandari S. The safety of available treatment options for iron-deficiency anemia. *Expert opinion on drug safety*. 2018 Feb 1;17(2):149-59.
79. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/208171s000lbl.pdf, accesat May 2021
80. Aigner E, Felder TK, Oberkofler H, Hahne P, Auer S, Soyak S, Stadlmayr A, Schwenoha K, Pirich C, Hengster P, Datz C. Glucose acts as a regulator of serum iron by increasing serum hepcidin concentrations. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2013 Jan 1;24(1):112-7

Lista cu lucrări științifice publicate

1. **Tiglis M**, Grintescu IC, Neagu TP, Grintescu IM. Iron and Erythropoiesis – Optimizing the link. Modern Medicine. 2020; 27(2):92, BDI, https://medicinamoderna.ro/wp-content/uploads/2020/06/RMM_art-5.pdf (Anexa 1)
2. **Țigliș M**, Neagu TP, Niculae A, Lascăr I, Grintescu IM. Incidence of Iron Deficiency and the role of intravenous iron use in perioperative periods. Medicina. 2020 Oct; 56(10):528, Impact Factor 2.430, <https://www.mdpi.com/1648-9144/56/10/528> (Anexa 2)
3. **Tiglis M**, Cobilinschi C, Mirea LE, Băetu AE, Peride I, Neagu TP, Niculae A, Checherită IA, Grintescu IM. The Importance of Iron Administration in Correcting Anaemia after Major Surgery. The Journal of Critical Care Medicine. 2021 Jul; 7(3):184, <https://jccm.ro/wp-content/uploads/2021/07/jccm-2021-0028.pdf> (Anexa 3)