

TEZĂ DE DOCTORAT - REZUMAT

---

# Utilizarea biomarkerilor în evidențierea modificărilor sistemice induse post- injurie termică

---

Doctorand: **Asistent Universitar Dr. Ioana Țichil**

---

Conducător de doctorat: **Șef de Lucrări Dr. Ciprian Tomuleasa**

---



## CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	3
<b>Studiul 1 – Tratamentul anemiei la pacienții cu injurie termică: un studiu al practicilor de transfuzie de sânge</b>	4
Ipoteza de lucru	4
Material și metodă	4
Rezultate	4
<b>Studiul 2 – Transfuziile de sânge la pacienții cu arsuri non-majore</b>	6
Ipoteza de lucru	6
Material și metodă	6
Rezultate	7
<b>Studiul 3- Factorii de predicție ai anemiei și transfuziilor de sânge la pacienții de chirurgie plastică</b>	8
Ipoteza de lucru	8
Material și metodă	8
Rezultate	9
<b>Studiul 4- Eritropoieza: rolul căilor de semnalizare, factori regulatori genetici și epigenetici</b>	10
Introducere	10
Eritropoieza în condiții fiziologice	10
Eritropoieza disfuncțională	10

**Cuvinte cheie:** anemie, arsuri, transfuzii de sânge

## INTRODUCERE

Pacienții arși reprezintă o categorie aparte de pacienți de chirurgie plastică care se deosebesc atât prin cerințele chirurgicale cât și prin cele medicale. Îngrijirea pacientului cu arsuri presupune interacțiunea complexă a unei echipe multidisciplinare care reunește chirurghi plasticieni specializați în tratamentul arsurilor, medici anesteziști și intensivști cu experiență, urgențiști, medici interniști, hematologi, neurologi, psihiatrii și specialiști în managementul durerii care lucrează împreună cu echipe dedicate și specializate de asistente medicale și fizioterapeuți în cadrul unităților de arsuri. Arsurile, mai ales cele majore afectează cel mai extins organ și anume pielea ceea ce compromite bariera între organism și mediul extern și antrenează un puternic răspuns sistemic.

Prognosticul pacienților arși a fost mult îmbunătățit odată cu progresele realizate în cercetare care au dus la o mai bună înțelegere a mecanismelor fiziopatologice implicate în boala arsului și progreselor în domeniul managementului chirurgical. Inițial evaluarea definitivă a profunzimii arsurilor pentru stabilirea indicației chirurgicale era temporizată timp de 3 săptămâni pentru a face diferența între arsurile superficiale care se vindecă per primam și arsurile profunde care necesită intervenție chirurgicală. În cazul acestor pacienți escarele de arsură provocau o reacție sistemică puternică ce evolua spre boala arsului și predisuneau la infecții severe care se dovedeau adesea fatale pentru pacient. Astfel principul de excizie precoce a arsurilor care astăzi se aplică în primele 24h de la injuria termică s-a dovedit a fi revoluționar în tratamentul acestor pacienți și a îmbunătățit semnificativ prognosticul. La acest principiu se adaugă utilizarea grefelor de piele de grosime parțială expandate, utilizarea grefelor de piele de la cadavru și a substituenților dermici de tipul Biobrane care sigilează plăgile de arsură și permit temporizarea, prioritizarea și secvențierea episoadelor de grefare precum și substituenții de tipul Integra care permit minimizarea cicatricilor în cazul reparării arsurilor profunde. Direcțiile actuale de cercetare sunt axate pe generarea de substituenți compoziți pentru a recrea atât stratul epidemic exterior cât și suportul dermic, în acest sens sunt explorate culturile celulare de celule epidermale, keratinocite și imprimarea biologică de structuri de suport pentru obținerea unui produs final multistratificat. În faza acută a îngrijirii pacientului cu arsuri câteva aspecte clinice au o importanță deosebită și anume resuscitarea lichidiană, suportul nutrițional, controlul local al infecției, leziunea de inhalare și răspunsul hipermetabolic la traumă. Aceste considerente sunt adresate succint în cadrul primului capitol al tezei.

Anemia la pacienții cu arsuri are etiologie multifactorială incluzând cauze extrinseci precum pierderea de sânge în momentul injuriei, prin intervenții chirurgicale seriate, schimbare de pansamente și multiple teste de sânge dar și cauze intrinseci care includ sechestrarea eritrocitară, hemoliza și disfuncția eritropoietică. Studiul 1 intitulat *Tratamentul anemiei la pacienții cu injurie termică: un studiu al practicilor de transfuzie de sânge* evaluează 948 de pacienți cu arsuri pentru care s-au identificat factori de risc ai transfuziilor, necesarul de transfuzii și pragurile declansatoare și s-a cuantificat impactul pe care aceste transfuzii l-au avut asupra evoluției pacienților. Studiul 2 intitulat *Transfuziile de sânge la pacienții cu arsuri non-majore* a fost al doilea studiu publicat în domeniu care se axează specific pe această categorie de pacienți și a evaluat factorii de risc, necesarul de transfuzii și prognosticul a 182 de pacienți cu arsuri pe o suprafață corporală de sub 20%. Studiul 3 intitulat *Factorii de predicție ai anemiei și transfuziilor de sânge la pacienții de chirurgie plastică* a fost creat pentru a ilustra o comparație între datele obținute la pacienții cu arsuri și restul populației de pacienți de chirurgie plastică. În acest scop au fost analizate date de la 350 de pacienți de traumă, oncologici și cu infecții severe ale țesuturilor moi pentru care am identificat și comparat factori de risc, necesar de produse de sânge, praguri de transfuzie și factori de prognostic. Studiul 4 *Eritropoieza: rolul căilor de semnalizare, factori regulatori genetici și epigenetici* a reprezentat un review al literaturii care detaliază mecanismele implicate în reglarea eritropoiezei fiziologice și disfuncționale întâlnite în anemii, sindroame mielodisplazice, neoplazii eritrocitare și stări inflamatorii.

## **Studiu 1. Tratamentul anemiei la pacienții cu injurie termică: un studiu al practicilor de transfuzie de sânge**

### **Ipoteza de lucru**

Obiectivele acestui studiu au fost de a determina practicile de transfuzie de sânge, factorii de risc și rezultatele asociate cu managementul acut a pacienților cu arsuri la Serviciul de Arsuri pentru Adulți din statul Victoria (Victorian Adult Burns Service VABS), cu scopul de a înțelege mai bine factorii asociați cu transfuziile și de a identifica oportunități pentru o mai bună gestionare a sângelui în populația de arși. Având în vedere datele publicate recent în favoarea protocoalelor de transfuzie restrictive, presupunem că nivelurile actuale ale transfuziei în practică sunt mai mari decât cele optime și, prin urmare, această studiu retrospectiv a fost, de asemenea, destinat să informeze cu privire la valoarea de referință a utilizării produselor de sânge la pacienții adulți cu arsuri și pentru a ajuta la formularea de ghiduri pentru managementul chirurgical al pacienților arși.

### **Material și metodă**

Acest studiu retrospectiv a fost înregistrat la Comitetul de Etică al Spitalului The Alfred, Melbourne, Australia, proiectul nr. 509/17, și a fost luat în considerare pentru o revizuire cu risc scăzut și aprobat la 16/10/2017. Acesta a inclus pacienți internați la VABS cu arsuri acute în timpul unei perioade de 6 ani între iulie 2011 și iulie 2017, care au suferit o intervenție chirurgicală de excizie și grefare. Criteriile de excludere au fost pacienții internați la peste 28 de zile după leziune (în principal pacienți care se prezintă pentru proceduri secundare non-acute); pacienții cu traume multiple și arsuri minore (<5%TBSA); pacienții considerați a avea leziuni incompatibile cu viața care nu au fost tratați activ și cei cu anemie de boală cronică înregistrată. Pacienții eligibili au fost identificați din datele colectate prospectiv folosind baza de date VABS și Registrul de Arsuri din Australia și Noua Zeelandă. (Burns Registry of Australia and New Zealand BRANZ). Aceste registre au furnizat date demografice, inclusiv vârsta și sexul pacientului, mecanismul arsurilor, data injuriei, % de suprafața coroprală arsă (Total Body Surface Area TBSA), durata de internare totală și la terapie intensivă (TI), cerințele chirurgicale și de ventilație. Prezența și severitatea leziunilor prin inhalare au fost, de asemenea, extrase din baza de date VABS și au fost diagnosticate folosind un sistem standardizat de notare bronhoscopic bazat pe scorul de injurie abreviat. Pacienții cu comorbidități cardiace asociate și coagulopatie c au fost identificați folosind codurile de comorbiditate ICD-10 și fișele medicale electronice. Datele despre unitățile de masa eritrocitară transfuzate fiecărui pacient au fost obținute din baza de date a unității de transfuzie a spitalului. Toate valorile de laborator ale hemoglobinei (Hb) determinate pe parcursul internării fiecărui pacient au fost analizate. Pentru fiecare pacient, o valoare medie a tuturor acestor valori a fost determinată și înregistrată ca Hb medie. Nivelurile minime și maxime ale Hb pe tot parcursul internării au fost, de asemenea, colectate pentru toți pacienții, precum și nivelurile de Hb la internare și externare. Pentru a identifica factorii declanșatori și țintele pentru transfuzie, au fost analizate „evenimentele de transfuzii”. Un eveniment de transfuzie a fost definit ca fiind o transfuzie secvențială de produse de sânge care se întinde pe o perioadă maximă de 72 de ore, cu mai puțin de 12 ore între fiecare unitate de masa eritocitară administrată. Evenimentele de transfuzie au fost fie perioperatorii, fie non-perioperatorii. Transfuziile perioperatorii au fost definite ca derulându-se în decurs a 24 de ore înainte de operație și până la 48 de ore după operație, acoperind astfel un interval perioperator de 72 de ore. Transfuziile efectuate în afara acestui interval au fost clasificate ca non-perioperatorii. „Triggerul” pentru transfuzie a fost definit ca fiind Hb imediat înainte de administrarea unității de sânge iar „ținta” („target”) a fost definită ca fiind prima determinare a Hb imediat după „evenimentul de transfuzie”. Datele de evoluție a pacienților au inclus rezultatele de la culturile de sânge, apariția trombozei venoase profunde, disfuncția de organ, mortalitatea și durata spitalizării.

Datele au fost analizate folosind software-ul SAS versiunea 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Variabilele continue au fost interpretate folosind media (deviația standard) sau mediana (intervalul interquartil) în funcție de distribuția datelor. Compararea dintre grupuri (transfuzati versus netransfuzati) a fost făcută folosind testul-t student pentru variabile continue distribuite normal, testul Wilcoxon rank-sum pentru variabilele continue non-normale distribuite și testul chi-square sau testul exact Fisher, după caz, pentru variabilele categorice. Analiza multivariată pentru transfuzie a fost efectuată utilizând regresia logistică multiplă, în timp ce durata spitalizării a fost analizată prin regresie liniară multiplă, cu rezultate raportate ca rate ale probabilităților (intervaluri de încredere de 95%) sau coeficienți de regresie (erori standard), după caz. Variabilele cu o valoare  $p < 0,05$  în analiza univariată sau cele considerate semnificative din punct de vedere clinic au fost luate în considerare pentru includere în modelele multivariate. Toate valorile  $p$  calculate au fost dublate, iar  $p < 0,05$  a indicat semnificație statistică.

## Rezultate

Între iulie 2011 și iulie 2017, au fost înregistrate 1636 de arsuri acute. Dintre acești 1636 de pacienți internați, 948 au suferit o intervenție chirurgicală de excizie și grefare. Dintre aceștia, 175 de pacienți au primit cel puțin o transfuzie de sânge. Analiza ulterioară au fost efectuată la pacienții care au suferit o intervenție chirurgicală. Caracteristicile generale ale acestor pacienți sunt prezentate în tabelul 1.

**Date de transfuzie:** în total 1890 de unități de masa eritocitară, 341 unități de plasmă, 69 unități trombocite și 3 unități de crioprecipitat au fost transfuzate în grupul chirurgical pe parcursul perioadei de studiu. Numărul mediu de unități transfuzate pacienților chirurgicali în funcție de extensia arsurilor este prezentat în Figura 1.

Analiza datelor de transfuzie a arătat diferențe în determinările Hb pe întreaga perioadă de spitalizare între grupurile de pacienți transfuzati și non-transfuzati (Tabel 1). În populația transfuzată, hemoglobina medie (Hb) la internare a fost de 147 mg/dl (IQR = 124-162) și 100 mg/dL (IQR = 92-108) la externare.

Nivelurile de Hb trigger pentru transfuziile perioperatorii pentru au fost mai variabile decât cele pentru transfuziile non-perioperatorii (Figura 2). Anemia asociată cu pierderea chirurgicală de sânge a declanșat transfuzii atunci când nivelurile medii de Hb au atins 80 (IQR = 76-84,9) mg/dl. Pragul mediu non-perioperator pentru transfuzii a fost ușor mai mic la 77 (IQR = 71,61-80,84) mg/dl. Nivelurile de Hb peste 100 mg/dl au declanșat rareori transfuzii. Țintele de transfuzie în intervalul de timp perioperator și non-perioperator au fost similare de 93,67 (IQR 88,63-98,38) mg/dl și, respectiv, 91,9 (ICR 87-97,75) mg/dL.

Diferențele dintre pacienții transfuzati și cei netransfuzati în funcție de sex sunt prezentate în tabelul 2. Pacienții de sex feminin au primit în medie 5 (IQR = 3-14) unități RBC, iar bărbații au fost transfuzati cu o medie de 4 (IQR=2-13) unități de RBC. 23% dintre pacienții cu arsuri care au suferit o intervenție chirurgicală au necesitat, de asemenea, o transfuzie de sânge, în timp ce un total de 17% dintre persoanele chirurgicale de sex masculin au fost transfuzate. Hb trigger și țintă pentru transfuzie catalogate în funcție de sex și nivelurile Hb pe tot parcursul internării sunt prezentate în tabelul 2.

**Factori de risc pentru transfuzie:** rezultatele analizei multivariate de regresie logistică (tabelul 3) au arătat că în acest studiu vârsta, sexul, % TBSA arsă, numărul de intervenții chirurgicale, coagulopatia asociată și durata internării la ATI au fost asociate independent cu transfuzia.

Analiza multivariată a duratei de spitalizare a arătat că transfuzia a fost asociată independent cu o creștere a duretei spitalizării (coeficient de regresie 0,511, eroare standard 0,085;  $p < 0,001$ ) după ajustarea pentru vârstă, %TBSA arsă și comorbidități. Analiza multivariată similară a disfuncțiilor de organ nu a demonstrat o asociere cu transfuziile (OR = 1,06, 95% CI: 0,62-1,83;  $p = 0,83$ ).

## Studiu 2. Transfuziile de sânge la pacienții cu arsuri non-majore

### Ipoteza de lucru

În studiul nostru, am presupus că cerințele de transfuzie la pacienții cu arsuri non-majore pot fi declanșate de factori intrinseci cum ar fi vârsta, % de suprafață corporală arsă, povara comorbidităților și coagulopatia. Ulterior, am căutat să stabilim impactul transfuziei de sânge asupra evoluției pacientului, în special asupra complicațiilor de plagă și a duratei spitalizării.

### Material și metodă

Acest studiu retrospectiv de cohort a fost efectuat la Departamentul de Chirurgie Plastică, Microchirurgie Reconstructivă și Arsuri al Spitalului Județean de Urgență din Cluj-Napoca România, în colaborare cu Departamentul de Hematologie al Institutului de Oncologie „Ion Chiricuta”, MEDFUTURE – Centrul de Cercetare pentru Medicină Avansată și Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hatieganu” Cluj- Napoca, România. Proiectul a fost aprobat de Comisia de Etică de Cercetare a UMF „Iuliu Hatieganu” Cluj-Napoca (aprobare nr. 144/30.03.2020).

Am inclus pacienți adulți (>18 ani) internați între 2018 și 2020 cu arsuri non-majore, TBSA <20% (Total Body Surface Area). Pacienții cu arsuri non-acute (mai mult de 28 de zile după leziune) și cei internați pentru proceduri secundare au fost excluși. Pacienții cu anemie cronică înregistrată anterior au fost, de asemenea, excluși. Toate datele trimise pentru analiza statistică au fost de-identificate pentru a asigura confidențialitatea pacienților.

Pacienții eligibili au fost identificați utilizând baza de date electronică Atlasmed a spitalului. Aceste înregistrări au furnizat date demografice, cum ar fi vârsta și sexul, date referitoare la caracteristicile arsurii, precum %TBSA, %FT (Full thickness -grosime completă), localizarea arsurilor și mecanismul injuriei. Localizarea arsurilor au fost divizată în 5 categorii: cap și / sau gât, membrele superioare, trunchiul, membrele inferioare și leziune prin inhalare. Prezența leziunilor prin inhalare a fost înregistrată pe baza rezultatelor bronhoscopiei și a sistemului abbreviated injury scor. Mecanismul principal al leziunilor de arsuri a fost înregistrat ca arsură prin lichide fierbinți și arsură prin flacără. Nu au fost înregistrate arsuri de contact, chimice electrice sau de fricțiune la pacienții transfuzați și, ca atare, aceștia nu au fost incluși în analiza comparativă a grupurilor.

Comorbiditățile preexistente ale pacienților au fost identificate din dosarele medicale electronice utilizând codurile de comorbiditate ICD-1. Povara comorbidității individuale a pacientului a fost calculată folosind indicele de comorbiditate Charlson

Caracteristicile spitalizării înregistrate pentru fiecare pacient au fost obținute din baza de date a spitalului și au inclus durata spitalizării, internarea la ATI, managementul chirurgical, tipul și numărul de proceduri chirurgicale. Procedurile chirurgicale înregistrate au fost debridarea tangențială sau fascială excițională, grefele de piele, escarotomia, fasciotomia și închiderea directă a plăgilor, precum și lambourile locale sau regionale pentru acoperirea plăgilor. Pacienții care au dezvoltat coagulopatie, disfuncție renală, sepsis și complicații de plagă pe parcursul internării au fost identificați.

Am obținut nivelurile de Hb (hemoglobină) pentru toți pacienții unde au fost determinate din baza de date a spitalului. Când au fost disponibile, pentru fiecare pacient a fost calculată o valoare medie a tuturor nivelurilor de Hb identificate pe parcursul internării și valoarea a fost utilizată pentru compararea dintre pacienții transfuzați și cei netransfuzati. De asemenea, am comparat nivelurile de Hb la internare și externare la pacienții transfuzați și netransfuzati. Deoarece toate transfuziile de sânge necesită determinarea prealabilă a Hb, am considerat nivelurile minime ale Hb la pacienții transfuzați ca reprezentând "trigger" pentru transfuzie. Toate produsele de sânge transfuzate au fost obținute din registrul de transfuzii al spitalului. Acestea includ RBC (masa eritrocitară) și FFP (plasmă proaspătă congelată). Toate transfuziile de sânge respectă ghidul pentru pregătirea, utilizarea și asigurarea calității componentelor sanguine elaborat și actualizat periodic de Comitetul European pentru Transfuzii de Sânge al Direcției Europene pentru Calitatea Medicinii și Sănătății (EDQM).

Analiza datelor a fost efectuată utilizând R 4.0.1. Variabilele categorice sunt reprezentate ca valoare absolută (procent). Tabelele de contingență au fost evaluate folosind testul exact Fisher. Normalitatea distribuției a fost evaluată folosind evaluarea distorsiunii, vizualizarea histogramelor și luând în considerare numărul de subiecți pe grup. Datele nedistribuite în mod normal au fost reprezentate ca medie (Q1, Q3). Pentru analiza multivariată în cazurile în care a existat o variabilă dependentă binară, s-a utilizat modelul de regresie logistică multivariată. Pentru analiza multivariată în cazurile în care a existat o variabilă dependentă continuă, a fost utilizată o regresie liniară multivariată în cazul în care variabila dependentă a fost transformată logaritmic. O valoare  $p$  mai mică de 0,05 a fost considerată semnificativă din punct de vedere statistic.

## Rezultate

182 de pacienți cu arsuri acute non-majore (TBSA <20%) au fost internați pe o perioadă de 3 ani între 2018 și 2020 pe Secția de Chirurgie Plastică și Arsuri a Spitalului Clinic Județean de Urgență din Cluj-Napoca România. Caracteristicile pacienților sunt prezentate în tabelul 1. Distribuția pacienților pe %TBSA, %FT și o comparație a caracteristicilor între pacienții transfuzați și ne-transfuzați este prezentată în Figura 1. Arsurile prin lichide fierbinți au fost 49,5% (90) și arsurile prin flăcără 36,3% (66) reprezentând cele mai frecvent înregistrate cauze, fără diferențe semnificative între pacienții transfuzați și netransfuzizați. Arsurile localizate la nivelul trunchiului au fost asociate mai frecvent cu dezvoltarea anemiei și necesitate de transfuzie: 78,6% (11) la pacienții transfuzati comparativ cu 31% (52) la pacienții netransfuzati, valoarea  $p < 0.0001$ .

Din cei 182 de pacienți analizați, 37,9% (69) au dezvoltat anemie pe parcursul internării și 7,7% (14) au necesitat cel puțin o transfuzie de sânge. Au fost efectuate 64 de transfuzii, 61 de unități masa eritocitară și 2 mase de plasmă. O medie de 3,5 (IQR = 3-6,25) unități de masa eritocitară au fost transfuzate per pacient. Figura 2 prezintă cerințele de transfuzie în funcție de %TBSA. Valoarea medie a Hb pe tot parcursul internării a variat semnificativ între pacienții transfuzați și cei netransfuzizați (Figura 3) cu o medie de 9,2 (IQR = 8,8-9,9) g/dl în grupul transfuzat și de 12,8 (IQR = 11,5-13,8) g/dL în cadrul grupului netransfuzat,  $p < 0.0001$ . Nivelurile medii ale Hb minime la pacienții transfuzați au fost de 7,4 (IQR = 6,9-8,4) g/dl, în timp ce nivelurile minime ale Hb minime în grupul netransfuzat au fost înregistrate la 12,3 (IQR = 10,9-13,4) g / dl,  $p < 0.0001$  (Figura 4).

Analiza univariată (Tabelul 1) arată că vârsta, indicele de comorbiditate, %TBSA, %FT, internare ATI, coagulopatia și numărul de intervenții chirurgicale sunt factori de risc pentru transfuzii la pacienții cu arsuri non-majore. În plus, analiza a arătat diferențe semnificative în evoluția pacienților transfuzați și netransfuzizați atunci când au fost analizate variabile precum infecția plăgilor (valoarea  $p < 0.0001$ ), sepsis (valoarea  $p = 0,015$ ) și durata spitalizării (valorile  $p < 0.0001$ ). În perioada de desfășurare a studiului nu au fost înregistrate decese. La 23,6% dintre pacienți (43) au dezvoltat infecții de plagă, iar agenții patogeni identificați cel mai frecvent au fost Staphylococcus spp la 44,2% (19) și Pseudomonas aeruginosa la 25,6% (11), Klebsiella la 16,3% (7), Acinetobacter la 14% (6). Cazuri izolate de infecții cu Streptococcus, Morganella, Proteus. E. coli și Enterococcus au fost înregistrate. În 97,6% (42) din cazuri, cel puțin doi agenți patogeni au fost asociați și în 19% (8) de cazuri infecția a fost plurimicrobiană.

Indicele de comorbiditate, coagulopatia, %TBSA, transfuziile de sânge, infecția de plagă și durata spitalizării au fost incluse în modelul statistic multivariat, rezultatele sunt prezentate în tabelul 2.

## **Studiu 3. Factorii de predicție ai anemiei și transfuziilor de sânge la pacienții de chirurgie plastică**

### **Ipoteza de lucru**

În studiul nostru am colectat date cu privire la trei categorii de pacienți de chirurgie plastică: pacienții cu traumatisme, pacienți oncologici pentru care s-a efectuat chirurgie reconstructivă și pacienți cu infecții severe ale țesuturilor moi. Scopul nostru a fost de a identifica factorii de risc pentru anemie și transfuzii de sânge și de a stabili impactul acestora asupra evoluției pacienților.

### **Material și metodă**

Acest studiu a fost realizat retrospectiv pe o cohortă de pacienți internați pe Compartimentul de Chirurgie Plastică al Spitalului Clinic Județean de Urgență din Cluj-Napoca pe o perioadă de 3 ani între 2018 și 2020, în colaborare cu Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hatieganu” și Departamentul de Hematologie al Institutului Oncologic „Ion Chiricuta”. Comitetul de Etică de Cercetare al Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hatieganu” a acordat aprobarea pentru acest proiect (aprobare nr. 14-30/03/2020). 350 de pacienți au fost incluși, prezentând diferite afecțiuni care au fost clasificate în 3 categorii. În primul grup au fost incluși pacienții cu traumatisme, clasificați suplimentar în funcție de localizare, mecanism și severitate a leziunii. Al doilea grup a inclus pacienți cu afecțiuni maligne care au necesitat proceduri de chirurgie plastică reconstructivă. Pacienții din acest grup au suferit de cancer de sân, de piele, sfera ORL, osos și de alte tumori ale țesutului conjunctiv, înregistrate în consecință. Al treilea grup a inclus pacienți cu infecții necrotizante ale țesuturilor moi (NSTI) și alte infecții mai puțin severe ale tegumentului și țesutului subcutanat. Am exclus pacienții internați pentru proceduri reconstructive planificate pentru alte afecțiuni cronice, deoarece pierderea de sânge în astfel de cazuri este minimă și adesea nu este asociată cu anemie sau necesită transfuzie.

Caracteristicile pacienților au fost obținute folosind Atlasmed, sistemul electronic de înregistrări medicale al spitalului și datele de transfuzie au fost colectate din registrul unității de transfuzii a spitalului. Datele demografice, precum vârsta și sexul, au fost înregistrate pentru toți pacienții, precum și caracteristicile de internare, cum ar fi durata spitalizării, internarea la ATI și durata acesteia. Comorbiditățile cardiovasculare, neurologice, gastro-intestinale și renale ale pacienților individuali, împreună cu diabetul zaharat, au fost identificate utilizând codurile de comorbiditate ICD-10 și înregistrările medicale electronice și au fost incluse în calculul indicelui comorbidității Charlson pentru analiza datelor. Toți pacienții incluși în studiu au suferit o intervenție chirurgicală. Am identificat și catalogat procedurile chirurgicale din fișele medicale electronice. Procedurile de închidere a plăgilor au inclus sutura directă, grefe de piele, lambouri locale sau regionale și lambouri libere. Alte proceduri chirurgicale efectuate au fost debridare, fasciotomie, rezecții oncologice, intervenții chirurgicale pentru leziuni ale membrelor superioare și inferioare, inclusiv reducerea deschisă și fixarea internă a fracturilor, repararea tendoanelor, repararea musculară, repararea nervilor periferici, repararea arterelor și amputarea sau replantarea membrelor la nivel proximal și distal.

Toate valorile Hb înregistrate pentru pacienții individuali au fost incluse. În scopul analizei datelor, am folosit valorile Hb la internare și externare, Hb medie pe tot parcursul internării și nivelurile minime ale Hb. La pacienții transfuzați, am considerat nivelurile minime de Hb ca declanșatori pentru transfuziile de sânge. Pe baza fișelor medicale electronice, am identificat și catalogat complicațiile individuale ale pacienților pe parcursul spitalizării.

Analiza statistică a fost efectuată cu ajutorul software R versiunea 4.1.2 (R Core Team, 2021). Pentru toate testele statistice, pragul de semnificație a fost stabilit la  $p = 0.05$ . Variabilele categorice sunt prezentate ca număr absolut și ca procent (%). Variabilele continue sunt descrise fie ca mediane și quartile, fie ca medii și deviații standard, după caz. Pentru comparații între grupuri, am folosit testele Fisher pentru teste categorice și testele Wilcoxon pentru variabile continue. Pentru a identifica factorii de risc pentru



transfuzie, anemie și alte rezultate categorice, am efectuat analize de regresie logistică. Pentru a identifica factorii de risc pentru durată prelungită de spitalizare, am folosit regresia liniară.

## Rezultate

Dintre cei 350 de pacienți incluși în studiul nostru, 228 (65%) au prezentat leziuni traumatice acute, 76 (22%) au suferit o intervenție chirurgicală reconstructivă pentru afecțiuni oncologice și 46 (13%) au suferit de infecții ale țesuturilor moi. Un rezumat al caracteristicilor pacienților și al analizei bivariante este prezentat în tabelul 1 pentru pacienții cu și fără anemie și în Tabelul 2 pentru cei cu sau fără transfuzie de sânge.

La pacienții cu traumatisme, 5% din leziuni au avut loc consecutiv accidentelor de circulație, 4% au fost accidente de muncă și restul de 91% au fost accidente casnice. 46,5% dintre pacienții cu traumatisme au dezvoltat anemie pe parcursul internării, din care 19% au fost transfuzați. 28 (12%) pacienți au prezentat amputații ale membrilor superioare sau inferioare, toți dezvoltând anemie. În total, în 68% din cazuri, replantarea a fost indicată și s-a efectuat cu succes. 19 pacienți au avut amputație distală a mâinii și transfuzii de sânge au fost înregistrate la 42% din cazuri. În 12 cazuri au fost efectuate replantări și 2 pacienți au primit transfuzii de sânge. În 7 cazuri, replantarea nu s-a fost efectuat, iar 6 dintre pacienți au fost transfuzați. 9 pacienți au suferit amputații proximale, 6 la nivelul membrului superior și 3 la nivelul membrului inferior, dintre care 4 au primit transfuzii de sânge. Replantarea s-a efectuat la 7 cazuri și 3 dintre pacienți au fost transfuzați. În 2 cazuri, unul de amputație a membrului inferior și unul a membrului superior replantarea nu a fost posibilă, pacientul cu amputația membrului inferior a primit o transfuzie de sânge. Din cei 76 de pacienți oncologici incluși în studiu 24 au avut cancer de sân 92% dintre acești pacienți au avut anemie și 4% au primit transfuzii de sânge. 34 de pacienți au avut cancer de piele dintre care 18% au prezentat anemie și 3% au fost transfuzați. 10 pacienți au suferit proceduri reconstructive după rezecția de tumori osoase, 60% au prezentat anemie și 10% au fost transfuzați. 6 pacienți au prezentat tumori în sfera ORL dintre care 83% au dezvoltat anemie și 50% au primit transfuzii de sânge. 46 pacienți au necesitat intervenții chirurgicale pentru tratamentul infecțiilor de țesuturi moi, 46% au prezentat fascită necrotizantă și 54% infecții mai puțin severe. Toți pacienții cu infecții necrotizante au dezvoltat anemie și 48% au fost transfuzați. 35% dintre pacienții cu infecții mai puțin severe au prezentat anemie și 7,6% au necesitat o transfuzie de sânge. Graficul 1 prezintă o comparație a procedurilor chirurgicale la pacienții cu și fără transfuzie de sânge.

În total 78 de unități de sânge au fost transfuzate pentru 38 de pacienți, în medie 2 unități transfuzate pe pacient, cu un maxim de 6 unități transfuzate în cazul unui pacient cu traumatism. Graficul 2 prezintă o comparație a unităților de masă eritocitară transfuzate per pacient catalogate în funcție de diagnostic, vârstă, sex și numărul de intervenții chirurgicale. Nivelul mediu al Hb înregistrate a fost de 7,7 (IQR = 7,1-8,1) g/dl. Graficele 3 și 4 prezintă un rezumat comparativ și corelația valorilor Hb pe tot parcursul internării la pacienții transfuzați și netransfuzați.

Am efectuat analiză univariată pentru toate caracteristicile pacienților pentru a identifica variabile eligibile pentru includere în analiza multivariată. Analiza de regresie logistică a identificat că procedurile chirurgicale efectuate la nivelul membrilor, comorbiditățile asociate și numărul de intervenții chirurgicale au fost factori de risc semnificativi pentru anemie la pacienți, rezultatele sunt prezentate în tabelul 3. În mod similar, am analizat factorii de risc pentru transfuzie (tabelul 4) și, după compensarea variabilelor de eroare, am constatat că pacienții cu infecții ale țesuturilor necrotizante au fost cel mai probabil să necesite transfuzii de sânge, iar numărul de intervenții chirurgicale a fost un predictor independent al transfuziei. Cu fiecare intervenție chirurgicală suplimentară, șansele de a necesita o transfuzie de sânge cresc de mai mult de două ori (OR = 2,67, p = 0,002). Acest lucru este valabil în toate secvențele de regresie logistică. Am identificat faptul că închiderea primară directă a plăgilor a reprezentat un factor de protecție independent atât pentru dezvoltarea anemiei (OR=0.06, p<0.001) cât și pentru nevoia de transfuzie de sânge (OR =0.35, p =0.01) în comparație cu procedurile chirurgicale reconstructive mai extinse. Acest lucru se corelează cu rical crescut de sângerare asociat cu creșterea numărului de intervenții chirurgicale. Analiza de regresie logistică a fost efectuată pentru a determina impactul transfuziei asupra evoluției pacientului. Am

compensat pentru diferențele în caracteristicile demografice ale pacienților, diagnostic și management chirurgical și am constatat că transfuzia de sânge crește în mod independent riscul global de complicații (OR=4.42,  $p<0.001$ ) precum și riscul de complicațiile specifice: sepsis (OR = 5.22,  $p=0.05$ ) și complicații de plagă (or = 4.50,  $p <0.001$ ). Regresia liniară a arătat că utilizarea produselor din sânge este independent asociată cu o ședere mai lungă în spital (OR=12,  $p<0.001$ ).

## **Studiul 4: Eritropoieza: rolul căilor de semnalizare, factori regulatori genetici și epigenetici**

### **Introducere**

Hematopoieza este procesul de formare de celule sanguine mature: celule roșii, celule albe și trombocite dintr-un progenitor comun numit celule stem hematopoietice (HSC). Este un proces activ și continuu pe tot parcursul vieții. Ierarhia de diferențiere a celulelor sanguine începe de la HSC, fiecare tip de celulă fiind derivat din propriile lor celule progenitoare. Procesul de hematopoieză se caracterizează prin cinci căi primare de diferențiere: eritropoieză, limfopoieză, granulopoieză, monopoieză și trombopoieză. Inițial, două căi principale ale progenitorului provin de la HSC: progenitorul mieloid comun (CMP) și progenitul limfoid comun (CLP). Din progenitorul mieloid comun, se formează inițial trei tipuri de linii: megacarioblastică, proeritroblastică și mieloblastică. Pe de altă parte, limfoblastul este derivat din progenitorul limfoid comun. Progenitorii eritrocitari dedicați susțin producerea a 2 milioane de eritrocite pe secundă la adulți umani printr-o reglementare sincronizată a biosintezei fier-hem, prin hormonii hepcidină și eritroferonă, semnalizarea mTOR indusă de aminoacizi și metabolismul glucozei, indispensabile pentru bio-sinteza de-novo a nucleotidelor.

### **Eritropoieza în condiții fiziologice**

Este subunitatea hematopoiezei dedicată producției de celule roșii din sânge, în măduva osoasă a adulților sănătoși, prin maturarea completă a eritrocitelor din proeritroblasts. Toate aceste etape ale transformării de la BFU-E (Burst forming units-erythroid) la starea de reticulocit au loc în insula eritroblastică (EBI), unde celulele eritrocitare în curs de dezvoltare înconjoară un macrofag central. Reticulocitul, odată introdus în sânge, se maturizează prin remodelarea membranei sale plasmatică (pierde organelle interne) și, în cele din urmă, se transformă în eritrocit.

### **Eritropoieza disfuncțională**

În anumite stări patologice, această rețea de reglare devine supraîncărcată sau disfuncțională, ducând fie la policitemie, fie la anemie. Peste un milion și jumătate de oameni din întreaga lume sunt afectați de anemie, aducând povara totală a bolilor la nivel mondial la aproximativ 9% dintre pacienții cu număr scăzut de eritrocite sănătoși și hemoglobină scăzută în sânge. Tulburările care afectează celulele roșii din sânge acoperă o gamă largă de afecțiuni, variind de la tulburări ereditare, cum ar fi talasemia și anemia cu celule scuamoase, până la boli dobândite, precum policitemia vera și hemoglobinuria nocturnă paroxistică (PNH), care pot duce la evoluții clinice care variază de la ușoară la fatală.

DOCTORAL THESIS - SUMMARY

---

# The Use of Biomarkers in Highlighting Systemic Changes Induced by Thermal Injury

---

PhD student: **Assistant Professor Dr. Ioana Țichil**

---

PhD Coordinator: **Lecturer Dr. Ciprian Tomuleasa**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## SUMMARY

<b>INTRODUCTION</b>	3
<b>Study 1 – Treatment of Anaemia in Patients with Acute Burn Injury: A Study of Blood Transfusion Practices</b>	4
Working Hypothesis	4
Material and method	4
Results	4
<b>Study 2 – Blood transfusions in non-major burns patients</b>	6
Working Hypothesis	6
Material and method	6
Results	7
<b>Study 3- Predictors for anaemia, blood transfusion and outcome in plastic surgery patients</b>	8
Working Hypothesis	8
Material and method	8
Results	9
<b>Study 4- A Review of Key Regulators of Steady-State and Ineffective Erythropoiesis</b>	10
Introduction	10
Steady-state erythropoiesis	10
Ineffective erythropoiesis	10

**Keywords:** anemia, burns, blood transfusions

## INTRODUCTION

Burned patients are a separate category of plastic surgery patients who differ in both surgical and medical requirements. Caring for a burn patient involves the complex interaction of a multidisciplinary team that brings together plastic surgeons specializing in burn treatment, experienced anesthesiologists and intensive care practitioners, emergency medical professionals, internists, hematologists, neuroscientists, psychiatrists and pain management specialists working together with dedicated and specialized teams of nurses and physiotherapists within burn units. Burns, including the major ones, affect the most extensive organ, namely the skin, which compromises the barrier between the body and the external environment and triggers a strong systemic response.

The prognosis of burned patients has been greatly improved with the advances made in research that have led to a better understanding of the physiopathological mechanisms involved in burn disease and advances in the field of surgical management. Initially, the final assessment of the burn depth for determining the surgical indication was timed for 3 weeks to distinguish between superficial burns that heal per primam and deep burns requiring surgery. In these patients, the burn eschars caused a strong systemic reaction that evolved into burn disease and predisposed to severe infections that were often fatal to the patient. Thus, the principle of early excision of burns that today applies in the first 24h after the thermal injury proved to be revolutionary in the treatment of these patients and significantly improved the prognosis. To this principle is added the use of expanded partial thickness leather grafts, use of body skin grafts and dermal substitutes of the type Biobrane that seal burn wounds and allow the timing, prioritization and sequencing of grafting episodes as well as Integra substitutes that allow the minimization of scars in the case of deep burn repair. Current research directions are focused on the generation of composite substitutes to recreate both the outer epidemic layer and the dermal support, in this regard are explored cell cultures of epidermal cells, keratinocytes and biological printing of support structures for obtaining a multilayered final product. In the acute phase of the care of the patient with burns several clinical aspects have a special imprint namely fluid resuscitation, nutritional support, local control of infection, inhalation lesion and hypermetabolic response to trauma. These considerations are briefly addressed in the first chapter of the thesis.

Anemia in patients with burns has a multifactorial etiology including extrinsic causes such as loss of blood at the time of injury, through serial surgeries, change of bandages and multiple blood tests but also intrinsic reasons including erythrocytal seizure, hemolysis and erythropoietic dysfunction. Study 1 entitled Treatment of anemia in patients with thermal injury: a study of blood transfusion practices evaluates 948 patients with burns for whom risk factors of transfusions, the need for transfusion and trigger thresholds have been identified and the impact that these transfusion has had on the progress of patients has been quantified. Study 2 entitled Blood transfusions in patients with non-major burns was the second study published in the field that specifically focused on this category of patients and assessed the risk factors, the need for transfusion and the prognosis of 182 patients with burns on a body surface of less than 20%. Study 3 entitled Factors of prediction of anemia and blood transfusions in plastic surgery patients was created to illustrate a comparison between data obtained from patients with burns and the rest of the population of plastic surgical patients. To this end, data from 350 patients with trauma, oncology and severe soft tissue infections were analyzed for which we identified and compared risk factors, the need for blood products, transfusion thresholds and prognostic factors. Study 4 Eritropoieza: the role of signaling pathways, genetic and epigenetic regulatory factors represented a review of the literature that details the mechanisms involved in the regulation of physiological and dysfunctional erythropoiesis encountered in anemias, myelodysplastic syndromes, erythrocytal neoplasms and inflammatory conditions.

## **Study 1 – Treatment of Anaemia in Patients with Acute Burn Injury: A Study of Blood Transfusion Practices**

### **Working Hypothesis**

The objectives of this study were to determine blood transfusion practices, risk factors and outcomes associated with acute management of patients with burns at the Victoria Adult Burns Service (VABS), with the aim of better understanding the factors related to transfusions and identifying opportunities for better blood management in the burns population. Given recent data published in favour of restrictive transfusion protocols, we assume that current transfusion levels in practice are higher than optimal and, therefore, this retrospective study was also intended to inform about the reference value of the use of blood products in adult patients with burns and to help formulate guidelines for the surgical management of burned patients.

### **Material and method**

This retrospective study was recorded at the The Alfred Hospital Ethics Committee, Melbourne, Australia, draft No. 509/17, and was considered for a low-risk review and approved on 16/10/2017. It included hospitalized VABS patients with acute burns during a 6-year period between July 2011 and July 2017, who underwent excision and transplant surgery. Exclusion criteria were patients hospitalized more than 28 days after the injury (mainly patients presenting for non-acute secondary procedures); patients with multiple trauma and minor burns (<5%TBSA); patients considered to have life-incompatible lesions who were not actively treated and those with chronic disease anaemia registered. The eligible patients were identified from data collected prospectively using the VABS database and the Australian and New Zealand Burns Register. (Burns Registry of Australia and New Zealand BRANZ). These registers provided demographic data including the patient's age and gender, the mechanism of the burns, the date of injury, % of total body surface area burned (TBSA), total stay and intensive care (IT) duration, surgical and ventilation requirements. The presence and severity of inhalation lesions were also extracted from the VABS database and were diagnosed using a standardized bronchoscopic scoring system based on the abbreviated injury score. Patients with associated cardiac comorbidities and coagulopathy were identified using ICD-10 comorbidity codes and electronic medical records. Data on transfused erythrocyte mass units for each patient were obtained from the database of the hospital transfusion unit. All laboratory values of hemoglobin (Hb) determined during the internment of each patient were analyzed. For each patient, an average value of all these values was determined and recorded as average Hb. Minimum and maximum levels of Hb throughout hospitalization were also collected for all patients, as well as hospitalized and discharged Hb levels. To identify triggers and transfusion targets, "transfusion events" were analysed. A transfusion event was defined as a sequential transfusion of blood products that extends over a maximum period of 72 hours, with less than 12 hours between each unit of erythrocyte mass administered. Transfusion events were either perioperative or non-perioperative. Perioperative transfusions were defined as taking place within 24 hours before surgery and up to 48 hours after surgery, thus covering a perioperative interval of 72 hours. Transfusions carried out outside this range were classified as non-perioperative. The "trigger" for transfusion was defined as Hb immediately before the unit of blood was administered and the "target" ("target") has been defined to be the first determination of Hb directly after the "transfusion event". Patient evolution data included results from blood cultures, the onset of deep vein thrombosis, organ dysfunction, mortality and hospitalization duration.

The data was analyzed using SAS software version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Continuous variables were interpreted using the mean (standard deviation) or median (interquartile interval) depending on the data distribution. The comparison between groups (transfused versus non-transfused) was made using the student t test for normal distributed continuous variables, the Wilcoxon rank-sum test for non-normal distributed continuous variables and the chi-square test or the exact Fisher test, as appropriate, for categorical variables. The multivariate analysis for transfusion was performed using multiple logistic regression, while the duration of hospitalization was analyzed by multiple linear regression with results as probability rates (95% confidence intervals) or regression coefficients (standard errors), as appropriate. Variables with a p value < 0.05 in the univariate analysis or those considered

clinically significant were considered for inclusion in the multivariate models. All calculated p values were doubled, and  $p < 0.05$  indicated statistical significance.

### Results

Between July 2011 and July 2017, there were 1636 acute burns. Of these 1,636 hospitalized patients, 948 underwent excision and transplant surgery. Of these, 175 patients received at least one blood transfusion. Further analysis was carried out in patients who had undergone surgery. The general characteristics of these patients are presented in table 1. Transfusion data: a total of 1890 erythrocytes, 341 plasma units, 69 platelets and 3 cryoprecipitates were transplanted into the surgical group during the study period. The average number of transfused units to surgical patients according to the extent of the burns is shown in Figure 1. Analysis of transfusion data showed differences in Hb determinations over the entire hospitalization period between transfused and non-transfused patients (Table 1). In the transfused population, average hemoglobin (Hb) at home was 147 mg/dl (IQR = 124-162) and 100 mg/dL (IQR = 92-108) at discharge.

Hb trigger levels for perioperative transfusions were more variable than for non-perioperative (Figure 2). Anemia associated with surgical blood loss triggered transfusions when mean levels of Hb reached 80 (IQR = 76-84.9) mg/dl. The average non-perioperative threshold for transfusions was slightly lower at 77 (IQR = 71,61-80,84) mg/dl. Hb levels above 100 mg/dl rarely triggered transfusions. Transfusion targets in the perioperative and non-perioperative time intervals were similar at 93.67 (IQR 88.63-98.38) mg/dl and 91.9 (ICR 87-97.75) mg/dL, respectively.

The differences between transplanted and non-transplanted patients by sex are shown in table 2. The female patients received an average of 5 (IQR = 3-14) RBC units, and the male patients were transplanted with an average of 4 (IQR=2-13) RBC Units. 23% of patients with burns who underwent surgery also needed a blood transfusion, while a total of 17% of male surgeons were transfused. Hb trigger and target for transfusion cataloged by sex and Hb levels throughout admission are shown in table 2.

Risk factors for transfusion: Results of the multivariate logistical regression analysis (table 3) showed that in this study age, sex, % TBSA burned, number of surgeries, associated coagulopathy and duration of admission to ATI were independently associated with the transfusion. The multivariate analysis of hospitalization duration showed that the transfusion was independently associated with an increase in hospitalisation hardness (regression coefficient 0.511, standard error 0.085;  $p < 0,001$ ) after age adjustment, %TBSA burn and comorbidities. Similar multivariate analysis of organ dysfunctions showed no association with transfusions (OR = 1.06, 95% CI: 0.62-1.83;  $p = 0.83$ ).

## **Study 2 – Blood transfusions in non-major burns patients**

### **Working Hypothesis**

In our study, we assumed that the transfusion requirements in patients with non-major burns may be triggered by intrinsic factors such as age, % of body surface burned, the burden of comorbidities and coagulopathy. Subsequently, we sought to establish the impact of blood transfusion on the patient's progress, especially on the wound complications and the duration of hospitalization.

### **Material and method**

This retrospective cohort study was carried out at the Department of Plastic Surgery, Reconstructive Microsurgery and Burns of the County Emergency Hospital in Cluj-Napoca Romania, in collaboration with the Hematology Department of the Institute of Oncology "Ion Chiricuta", MEDFUTURE – Research Center for Advanced Medicine and the Medical and Pharmacy University "Iuliu Hatieganu" Cluj- Napoca, Romania. The project was approved by the Research Ethics Commission of UMF "Iuliu Hatieganu" Cluj-Napoca (approval no. 144/30.03.2020). We included adult patients (>18 years) hospitalized between 2018 and 2020 with non-major burns, TBSA <20% (Total Body Surface Area). Patients with non-acute burns (more than 28 days after injury) and those hospitalized for secondary procedures were excluded. Patients with previously recorded chronic anemia were also excluded. All data sent for the statistical analysis was de-identified to ensure patient confidentiality.

The eligible patients were identified using the hospital's electronic Atlasmed database. These records provided demographic data such as age and gender, data related to burn characteristics such as %TBSA, %FT (Full thickness -full weight), burn location and injury mechanism. The localization of the burns were divided into 5 categories: head and/or neck, upper limbs, trunk, lower limbs and inhalation injury. The presence of inhalation lesions was recorded based on the results of bronchoscopy and the abbreviated injury score system. The main mechanism of burn injuries was recorded as burning by hot liquids and burning through flame. No contact, electrical or chemical friction burns were in transfused patients and, as such, were not included in the comparative analysis of the groups. Pre-existing comorbidities of patients were identified from electronic medical records using ICD-1 comorbidity codes. The patient's individual comorbidity burden was calculated using the Charlson comorbidity index

The characteristics of the recorded hospitalization for each patient were obtained from the hospital database and included the duration of the hospital, the admission to the ATI, the surgical management, the type and number of surgery procedures. The surgical procedures recorded were tangencial or excisional fascial debridement, skin transplants, escharotomy, fasciotomy and direct wound closure, as well as local or regional lambours for covering wounds. Patients who developed coagulopathy, renal dysfunction, sepsis and wound complications during hospitalization were identified.

We obtained Hb (hemoglobin) levels for all patients where they were determined from the hospital database. When available, an average of all Hb levels identified during hospitalization was calculated for each patient and the value was used for comparison between transfused and non-transfused patients. We also compared Hb levels at reception and withdrawal in transfused and non-transfused patients. Since all blood transfusions require prior determination of Hb, we considered the minimum levels of HB in transfused patients as representing the "trigger" for transfusion. All transfused blood products were obtained from the hospital's transfusion register. These include RBC (erythrocyte mass) and FFP (fresh frozen plasma). All blood transfusions comply with the guidelines for the preparation, use and quality assurance of blood components developed and regularly updated by the European Blood Transfusion Committee of the European Directorate for Quality of Medicine and Health (EDQM).

Data analysis was carried out using R 4.0.1. Categorical variables are represented as absolute value (procent). The contingency tables were evaluated using the exact Fisher test. Normality of distribution was evaluated using distortion assessment, histogram visualization and taking into account the number of subjects per group. Normally non-distributed data was represented as an average (Q1, Q3). For multivariate analysis in cases where there was a binary dependent variable, the logistical regression model was used. For multivariate analysis in cases where there was a continuous dependent variable, a multi-variable linear



regression was used where the dependant variable was logarithmically transformed. A p value less than 0.05 was considered statistically significant.

### Results

182 patients with acute non-major burns (TBSA <20%) were hospitalized for a period of 3 years between 2018 and 2020 at the Plastic Surgery and Burns Section of the County Clinical Emergency Hospital in Cluj-Napoca Romania. The characteristics of patients are presented in table 1. The distribution of patients on %TBSA, %FT and a comparison of characteristics between transfused and non-transfused patients is shown in Figure 1. Liquid burns were 49.5% (90) and flame burns 36.3% (66) representing the most commonly causes, with no significant differences between transfused and non-transfused patients. Localized torso burns were more often associated with the development of anemia and the need for transfusion: 78.6% (11) in transfused patients compared to 31% (52) in non-transfused patients, p value <0.0001.

Of the 182 patients analysed, 37.9% (69) developed anemia during hospitalization and 7.7% (14) required at least one blood transfusion. 64 transfusions, 61 units of erythrocyte mass and 2 plasma masses were performed. An average of 3.5 (IQR = 3-6.25) units of erythrocyte mass were transfused per patient. Figure 2 shows the transfusion requirements according to %TBSA. The average Hb throughout the stay varied significantly between transfused and non-transfused patients (Figure 3) with an average of 9.2 (IQR = 8.8-9.9) g/dl in the transfused group and 12.8 (IqR = 11.5-13.8) g/dL in the non-Transfused group, p <0.0001. Average minimum Hb levels in transfused patients were 7.4 (IQR = 6.9-8.4) g/dl, while minimum levels of Hb in the non-transfused group were recorded at 12.3 (IqR = 10.9-13.4) g / dl, p <0.0001 (Figura 4).

The univariate analysis (Table 1) shows that age, comorbidity index, %TBSA, %FT, inpatient ATI, coagulopathy and number of surgeries are risk factors for transfusions in patients with non-major burns. In addition, the analysis showed significant differences in the progression of transplanted and non-transplanted patients when variables such as wound infection (p value <0.0001), sepsis (p rate = 0.015) and hospitalization duration (p values<0.0001) were analysed. No deaths were recorded during the study period. 23.6% of patients (43) developed wound infections, and the most commonly identified pathogens were *Staphylococcus* spp at 44.2% (19) and *Pseudomonas aeruginosa* at 25.6% (11), *Klebsiella* at 16.3% (7), *Acinetobacter* at 14% (6). Isolated cases of infections with *Streptococcus*, *Morganella*, *Proteus*. *E. coli* and *Enterococcus* have been recorded. In 97.6% (42) of cases, at least two pathogens were associated and in 19% (8) of cases the infection was plurimicrobial.

Comorbidity index, coagulopathy, %TBSA, blood transfusions, wound infection and hospitalization duration were included in the multivariate statistical model, the results are presented in table 2.

### **Study 3- Predictors for anaemia, blood transfusion and outcome in plastic surgery patients**

#### **Working Hypothesis**

In our study we collected data on three categories of plastic surgery patients: patients with trauma, cancer patients who have undergone reconstructive surgery and patients with severe soft tissue infections. Our goal was to identify the risk factors for anemia and blood transfusions and to establish their impact on the progress of patients.

#### **Material and method**

This study was conducted retrospectively on a cohort of patients interned in the Plastic Surgery Division of the County Clinical Emergency Hospital in Cluj-Napoca for a period of 3 years between 2018 and 2020, in collaboration with the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hatieganu" and the Department of Hematology of the Oncological Institute "Ion Chiricuta". The Research Ethics Committee of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hatieganu" has given approval for this project (approval no. 14-30/03/2020). 350 patients were included, presenting different conditions that were classified into 3 categories. In the first group were included patients with trauma, further classified according to the location, mechanism and severity of the lesion. The second group included patients with malignancies that required reconstructive plastic surgery procedures. Patients in this group suffered from breast, skin, ENT sphere, bone and other connective tissue tumors, registered accordingly. The third group included patients with necrotic soft tissue infections (NSTIs) and other less severe infections of the tissue and subcutaneous tissue. We have excluded hospitalized patients for planned reconstructive procedures for other chronic diseases, as blood loss in such cases is minimal and is often not associated with anemia or requires transfusion. Patient characteristics were obtained using Atlasmed, the electronic medical records system of the hospital and transfusion data were collected from the hospital's transfusion unit register. Demographic data, such as age and gender, were recorded for all patients, as well as the characteristics of hospitalization such as the duration of the hospital stay, the admission to the ATI and its duration. Cardiovascular, neurological, gastrointestinal and renal comorbidities of individual patients, together with diabetes mellitus, were identified using ICD-10 comorbidity codes and electronic medical records and were included in the calculation of the Charlson comorbidity index for data analysis. All patients included in the study underwent surgery. We have identified and cataloged surgical procedures from electronic medical records. The wound closure procedures included direct suture, skin transplants, local or regional blades, and loose blades. Other surgical procedures carried out were debridation, fasciotomy, oncological resections, surgery for injury to the upper and lower limbs, including open reduction and internal fixation of fractures, tendon repair, muscle repairs, peripheral nerve repairing, artery repair and amputation or replanting of limbs at the proximal and distal levels. All recorded Hb values for individual patients were included. For the purposes of data analysis, we used Hb values at internation and expulsion, average Hb throughout internation, and minimum levels of Hb. In transfused patients, we considered minimum levels of Hb as triggers for blood transfusions. Based on electronic medical records, we have identified and cataloged individual complications of patients during hospitalization. The statistical analysis was carried out using R software version 4.1.2 (R Core Team, 2021). For all statistical tests, the threshold of significance was set to  $p = 0.05$ . Categorical variables are presented as an absolute number and as a percentage (%). Continuous variables are described either as medians and quartiles, or as averages and standard deviations, as appropriate. For group-to-group comparisons, we used the Fisher tests for categorical tests and the Wilcoxon tests for continuous variables. To identify the risk factors for transfusion, anemia and other categorical results, we conducted logistical regression analyses. To identify risk factors for prolonged hospitalization, we used linear regression.

## Results

Of the 350 patients included in our study, 228 (65%) experienced acute traumatic lesions, 76 (22%) underwent reconstructive surgery for oncological conditions and 46 (13%) suffered from soft tissue infections. A summary of patient characteristics and bivariate analysis is presented in Table 1 for patients with and without anaemia and in Table 2 for those with or without blood transfusion.

In trauma patients, 5% of injuries occurred as a consequence of traffic accidents, 4% were occupational accidents and the remaining 91% were domestic accidents. 46.5% of traumatized patients developed anemia during hospitalization, of which 19% received a blood transfusion. 28 (12%) patients experienced amputations of the upper or lower limbs, all developing anemia. In total, in 68% of cases, replanting was indicated and successfully carried out. 19 patients had a distal amputation of the arm and blood transfusions were recorded in 42% of cases. In 12 cases, transplants were performed and 2 patients received blood transfusions. In 7 cases, replantation was not performed, and 6 of the patients were transplanted. Nine patients had proximal amputations, six at the upper limb and three at the lower limb, four of whom received blood transfusions. Replanting was performed in 7 cases and 3 of the patients were transplanted. In 2 cases, one of amputation of the lower limb and one of the upper limb replantation was not possible, the patient with amputation of the inferior limb received a blood transfusion. Of the 76 cancer patients included in the study, 24 had breast cancer. 92% of these patients had anaemia and 4% received blood transfusions. 34 patients had skin cancers of which 18% had anaemia and 3% had a blood transfusion. 10 patients underwent reconstructive procedures after resection of bone tumors, 60% experienced anaemia and 10% were transplanted. 6 patients had tumors in the ENT sphere of whom 83% developed anemia and 50% received blood transfusions. 46 patients required surgery to treat soft tissue infections, 46% had necrotic fasciitis and 54% had less severe infections. All patients with necrotic infections developed anemia and 48% were transplanted. 35% of patients with less severe infections developed anaemia and 7.6% required a blood transfusion. Graph 1 shows a comparison of surgical procedures in patients with and without blood transfusion.

A total of 78 units of blood were transfused for 38 patients, an average of 2 transfused units per patient, with a maximum of 6 units transfused in the case of one patient with trauma. Graph 2 shows a comparison of transfused erythrocyte mass units per patient cataloged by diagnosis, age, sex and number of surgeries. The average recorded Hb level was 7.7 (IQR = 7.1-8.1) g/dl. Graphs 3 and 4 show a comparative summary and correlation of Hb values throughout hospitalization in transfused and non-transfused patients.

We conducted univariate analysis for all patient characteristics to identify variables eligible for inclusion in the multivariate analyze. The logistic regression analysis identified that surgical procedures performed at the limbs, associated comorbidities and number of surgeries were significant risk factors for anemia in patients, the results are presented in table 3. Similarly, we looked at the risk factors for transfusion (table 4) and, after compensating for the error variables, found that patients with necrotic tissue infections were most likely to require blood transfusions, and the number of surgeries was an independent predictor of the transfusion. With each additional surgery, the chances of requiring a blood transfusion increase more than twice (OR = 2.67, p = 0.002). This is true in all logistical regression sequences. We identified that direct primary wound closure represented an independent protective factor for both the development of anemia (OR=0.06, p<0.001) and the need for blood transfusion (OR =0.35, p =0.01) compared to more extensive reconstructive surgical procedures. This is correlated with increased bleeding risk associated with an increase in the number of surgeries. The logistical regression analysis was performed to determine the impact of the transfusion on the patient's progress. We compensated for the differences in the demographic characteristics of patients, diagnosis and surgical management and found that blood transfusion independently increases the overall risk of complications (OR=4.42, p<0.001) as well as the risk of specific complications: sepsis

## **Study 4- A Review of Key Regulators of Steady-State and Ineffective Erythropoiesis**

### **Introduction**

Hematopoiesis is the process of formation of mature blood cells: red cells, white cells and platelets from a common progenitor called hematopoietic stem cells (HSC). It is an active and continuous process throughout life. The differentiation hierarchy of blood cells starts with HSC, each cell type being derived from their own progenitor cells. The process of hematopoiesis is characterized by five primary differentiation paths: erythropoiesis, lymphoiesis, granulopoiesis, monopoiesis and thrombopoiesis. Initially, two main pathways of the progenitor come from HSC: the common myeloid progenitor (CMP) and the common lymphoid progenitor (CLP). From the common myeloid progenitor, three types of lines are initially formed: megacarioblastic, proerythroblastic, and myeloblastic. On the other hand, the lymphoblast is derived from the common lymphoid progenitor. Dedicated erythrocyte progenitors support the production of 2 million erythrocytes per second in adult humans through a synchronized regulation of iron-hem biosynthesis, through the hormones hepcidine and erythroferon, amino acid-induced mTOR signaling and glucose metabolism, indispensable for the de-novo bio-synthesis of nucleotides.

### **Steady-state erythropoiesis**

It is the subunit of hematopoiesis dedicated to the production of red blood cells, in the bone marrow of healthy adults, by the complete maturation of erythrocytes in proerythroblasts. All these stages of the transformation from BFU-E (Burst forming units-erythroid) to the reticulocyte state take place in the erythroblastic island (EBI), where the developing erythrocyte cells surround a central macrophage. The reticulocyte, once introduced into the bloodstream, matures by remodelling its plasma membrane (lossing internal organelles) and eventually turning into the erythrocytes.

### **Ineffective erythropoiesis**

In certain pathological conditions, this regulatory network becomes overloaded or dysfunctional, leading to either polycythemia or anemia. More than one and a half million people worldwide are affected by anaemia, bringing the total burden of disease worldwide to about 9% of patients with low number of healthy erythrocytes and low hemoglobin in the blood. Disorders affecting red blood cells cover a wide range of conditions, ranging from hereditary disorders such as thalassemia and sickle cell anemia, to acquired diseases such as polycythemia vera and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH), which can lead to clinical developments ranging between mild and fatal.