

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Fierul și anemiile feriprive. Studii analitice și biochimice

Doctorand **Maria Băncioiu (Totan)**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Marius T. Bojiță**

Cluj – Napoca 2014



CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Anemia feriprivă	19
1.1. Diagnosticul de laborator	20
1.2. Diagnosticul diferențial în anemia feriprivă	22
1.3. Tratamentul anemiei feriprive	24
1.3.1. Tratamentul oral al anemiei feriprive	24
1.3.2. Terapia parenterală cu fier	24
2. Hemoglobina	25
3. Fierul seric	26
3.1. Metabolismul fierului	26
3.2. Factori de risc pentru deficitul de fier	32
3.3. Hepcidinul	33
3.3.1. Stocarea fierului în ficat și reglarea sintezei de hepcidin	34
4. Feritina	35
4.1. Structura feritinei	36
4.2. Funcția și reglarea biotransformării feritinei	37
4.2.1. Feritina în patologie	37
5. Valori de referință	39
5.3. Importanța stabilirii valorilor de referință	40
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	43
2. Metodologie generală	45
3. Studiul 1 - Stabilirea valorilor de referință pentru hemoglobină la copii și adolescenți din arealul Sibiu	49
3.1. Introducere	49
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	50
3.3. Pacienți și metodă	50
3.4. Rezultate	50
3.5. Discuții	54
3.6. Concluzii	55
4. Studiul 2 - Fierul, micronutrient esențial pentru organism. Importanța stabilirii valorilor de referință	57
4.1. Introducere	57
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	58
4.3. Pacienți și metodă	58
4.4. Rezultate	59
4.5. Discuții	61
4.6. Concluzii	63
5. Studiul 3 - Importanța clinică a determinării feritinei serice. Stabilirea valorilor de referință	65
5.1. Introducere	65
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	66

5.3. Pacienți și metodă	66
5.4. Rezultate	67
5.5. Discuții	68
5.6. Concluzii	69
6. Studiul 4 – Prevalența anemieie feriprive la copiii din arealul Sibiu	71
6.1. Introducere	71
6.2. Ipoteza de lucru/obiective	72
6.3. Pacienți și metodă	72
6.4. Rezultate	73
5.5. Discuții	78
6.6. Concluzii	80
7. Studiul 5 - Anemia feriprivă la copii. Frecvența și răspunsul la tratamentul cu fier pe cale orală	83
7.1. Introducere	83
7.2. Ipoteza de lucru/obiective	84
7.3. Pacienți și metodă	85
7.4. Rezultate	86
7.5. Discuții	89
7.6. Concluzii	90
8. Studiul 6 - Determinarea Fe²⁺ din comprimate prin metoda spectrofotometrică în domeniul VIS	93
8.1. Introducere	93
8.2. Ipoteza de lucru/obiective	94
8.3. Material și metodă	94
8.4. Rezultate	96
8.5. Discuții	99
8.6. Concluzii	100
9. Studiul 7 - Metoda spectrofotometrică pentru determinarea cantitativă a Fe³⁺ din complex de fier polimaltozat din forme farmaceutice	101
9.1. Introducere	101
9.2. Ipoteza de lucru/obiective	102
9.3. Material și metodă	102
9.4. Rezultate	104
9.5. Discuții	107
9.6. Concluzii	108
7. Concluzii generale	109
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	113
REFERINȚE	115

Cuvinte cheie: anemia feriprivă, hemoglobina, fierul seric, feritina, valori de referință, spectrofotometria UV-VIS.

Introducere:

Anemia este una din cele mai comune boli de sânge, reprezentând, în multe țări, o problemă majoră de sănătate publică. Cea mai frecventă cauză a anemiei este deficitul de fier.

Punerea în evidență a unei anemii feriprive, în oricare stadiu ar fi aceasta, se face cu ajutorul diferitelor teste de laborator, dintre care mai frecvent întâlnite sunt: dozarea hemoglobinei, sideremia și feritina serică, parametrii care ilustrează concentrația fierului în diferitele compartimente ale organismului (hematii, sânge, depozite).

Studiul de față subliniază importanța stabilirii valorilor de referință la diferitele categorii de vârstă, pentru o interpretare corectă și o încadrare în starea de boală sau sănătate a pacienților, atrăgând atenția asupra diferențelor care există între valorile de referință din literatura de specialitate (intervale care au fost stabilite pe populații cu o altă structură în ceea ce privește sexul, vârsta, rasa, obiceiuri alimentare, diferențe de aparatură și reactivi) și ceea ce găsim la populația din țara noastră.

Rezultatele cercetărilor clinice aduc pas cu pas lămuriri asupra efectelor negative care pot să apară în anemia feriprivă. La copii anemia feriprivă este o problemă care generează tulburări de dezvoltare neuropsihomotorie.

Anemia feriprivă, odată diagnosticată corect, trebuie tratată corespunzător. Tratamentul se face cu preparate care conțin fier, în diferite forme farmaceutice, iar rezultatele studiului de față au arătat că există o bună toleranță și rezultate la această terapie.

Prevalența anemiei ridicată cât și factorii care contribuie la apariția anemiei pot fi reduși prin implementarea și dezvoltarea unor programe benefice pentru identificarea și evitarea anemiei feriprive și a consecințelor negative, atât asupra pacienților, cât și asupra sistemului de sănătate.

În studiul de față pacienții au fost incluși consecutiv și nu după criterii predeterminate (sex, naționalitate, diagnostice precedente, terapii anterioare sau condiții de viață standardizate).

O altă direcție de cercetare a constat în dezvoltarea unei metode spectrofotometrice în VIS pentru dozarea Fe^{2+} , respectiv Fe^{3+} din forme farmaceutice.

Spectrofotometria UV-VIS reprezintă o metodă ușor accesibilă și sigură în analiza farmaceutică. Metoda se bazează pe formarea complexilor dintre Fe^{2+} , respectiv Fe^{3+} și albastru de metiltimol. Spectrele de absorbție în VIS ale complexilor formați prezintă un maxim specific la lungimea de undă de 628 nm. Metoda a fost validată, parametrii de validare confirmând utilizarea ei cu succes în analiza farmaceutică.

Stadiul actual al cunoașterii

Structurată în cinci capitole, această primă parte a tezei de doctorat tratează aspecte teoretice legate de anemia feriprivă, hemoglobină, fierul seric, feritină și valori de referință.

Ipoteza de lucru/obiective

- realizarea unei cercetări aplicate pe trei grupe de pacienți într-un interval de timp de 12 luni de zile, pentru stabilirea valorilor de referință a parametrilor hematologici (hemoglobină, fierul seric și feritina serică) markeri utili în anemia feriprivă, precum și monitorizarea evoluției parametrilor de laborator;
- realizarea unei cercetări aplicate pe trei grupe de pacienți, într-un interval de timp de 12 luni, pentru stabilirea prevalenței anemiei;

- evaluarea impactului terapiei la pacienții cu anemie feriprivă prin monitorizarea tolerabilității și complianței pacienților față de tratament, precum și a reacțiilor adverse medicamentoase;
- elaborarea de noi metode de analiză a fierului din produse farmaceutice și validarea lor.

Studiu 1. Stabilirea valorilor de referință pentru hemoglobină la copii și adolescenți din arealul Sibiu

Ipoteza de lucru/obiective

Studiul a pornit de la premiza că valorile de referință pentru Hemoglobină au fost stabilite cu mulți ani în urmă, pe o populație diferită, folosind metode și reactivi diferiți comparativ cu cei utilizați în zilele noastre. Pentru a preveni și reduce riscul apariției unor erori în diagnostic este necesară stabilirea valorilor de referință pentru populația deservită.

Rezultate și discuții

Rezultatele studiului, pentru grupa de vârstă 1 lună – 2 ani nu au evidențiat o diferență semnificativă a valorilor, față de literatura de specialitate studiată. Pentru grupa de vârstă 2 – 10 ani s-a constatat că limita superioară a valorilor obținute în studiu actual este mai mică comparativ cu limita superioară prezentată în literatura de specialitate studiată.

Comparând rezultatele din studiul actual cu intervalele de referință din literatura de specialitate, pentru grupa de vârstă 10 – 18 ani, s-a constatat că limita superioară este mai mică în cazul adolescenților din studiu, ceea ce oferă un interval mai îngust, mai ușor de interpretat în context clinic.

Concluzii

- Intervalele de referință sunt specifice pentru populația deservită (1 lună–18 ani), precum și pentru metoda folosită, analizorul și reactivii utilizați pentru determinarea Hb.
- Valorile de referință din studiul actual sunt similare cu cele publicate în literatura de specialitate studiată și sunt specifice pentru populația în cauză.
- Intervalele de referință obținute în studiul actual nu pot fi extrapolate altor unități medicale fără ca acestea să fie validate, deoarece sistemele de sănătate (populația, aparatura, metoda, reactivii, etc.) pot varia mult între diferite centre sau țări.

Studiu 2. Fierul, micronutrient esențial pentru organism. Importanța stabilirii valorilor de referință

Ipoteza de lucru/obiective

Stabilirea valorilor de referință are numeroase efecte benefice atât asupra pacienților cât și a clinicienilor pentru o interpretare cât mai corectă a rezultatelor. Luând în considerație acest lucru, cercetarea aplicată de față a plecat inițial de la premiza că valorile de referință pentru fierul seric au fost stabilite cu mulți ani în urmă, pe o populație diferită, folosind metode, reactivi și analizoare diferite, comparativ cu ce se utilizează în zilele noastre. O interpretare corectă a rezultatelor ar avea un impact pozitiv asupra pacienților.

Rezultate și discuții

Rezultatele obținute în studiul de față pentru grupa de vârstă 1 lună – 2 ani sunt diferite față de rezultatele prezentate în literatura de specialitate studiată, unde limitele inferioare și superioare

ale valorilor de referință pentru această categorie de vârstă sunt mai ridicate. Pentru grupa de vârstă 2 – 10 ani nu există diferențe semnificative între limita inferioară a valorilor de referință obținute în studiul actual și limita inferioară prezentată în literatura de specialitate, limita superioară fiind mai ridicată comparativ cu valorile din studiul actual.

Pentru grupa de vârstă 10 – 18 ani, rezultatele studiului au evidențiat valori ale fierului seric, aproape identice cu cele din literatura de specialitate studiată.

Concluzii

- Intervalele de referință obținute în studiul de față sunt specifice pentru populația în cauză, sunt mai înguste, mai eficiente în context clinic.
- Determinarea și monitorizarea fierului seric alături de alți parametri (Hemoglobina și feritina serică), prezintă o importanță deosebită pentru diagnosticarea anemiei feriprive.
- Intervalele de referință obținute în studiul actual nu pot fi extrapolate altor unități medicale fără ca acestea să fie validate, deoarece sistemele de sănătate (populația, aparatura, metoda, reactivii, etc.) pot varia mult între diferite centre sau țări.

Studiu 3. Importanța clinică a determinării feritinei serice. Stabilirea valorilor de referință

Ipoteza de lucru/obiective

Studiul de față a plecat de la premiza că valorile de referință pentru feritina serică au fost stabilite cu mulți ani în urmă, pe o populație diferită, folosind metode, reactivi și analizoare diferite, comparativ cu ce se utilizează în zilele noastre. Stabilirea valorilor de referință are numeroase efecte benefice asupra pacienților cât și a clinicienilor. O interpretare corectă a rezultatelor ar avea un impact pozitiv asupra pacienților.

Rezultate și discuții

Rezultatele studiului actual, au evidențiat o diferență semnificativă a intervalelor de referință, față de literatura de specialitate studiată. Valorile obținute în studiul actual pentru feritina serică prin metoda computerizată, Hoffmann indirectă prezintă limita inferioară mai ridicată, la toate grupele de vârstă și nu prezintă un interval foarte larg comparativ cu literatura de specialitate studiată, aceste rezultate fiind specifice pentru populația în cauză și mai ușor de interpretat în context clinic.

Concluzii

- Feritina este utilă pentru homeostazia fierului, dar este implicată și în variate boli, mai ales în bolile autoimune.
- În cele mai multe circumstanțe feritina serică este privită ca având sensibilitatea și specificitatea cea mai mare dintre analizele sanguine, disponibile în prezent, pentru determinarea diagnosticului carenței de fier.
- Intervalele de referință obținute în studiul de față sunt specifice pentru populația deservită, precum și pentru metoda de dozare folosită și analizorul utilizat pentru determinarea feritinei serice.
- Intervalele de referință obținute în studiul actual nu pot fi aplicate în alte unități medicale fără ca acestea să fie validate.

Studiul 4. Prevalența anemiei feriprive la copiii din arealul Sibiu

Ipoteza de lucru/obiective

La nivel mondial, anemia este o problemă de sănătate publică majoră. Deficitul de fier este cea mai frecventă cauză a anemiei la sugari, copii și adolescenți. Pentru elucidarea acestor ipoteze au fost selectați parametrii de laborator (Hemoglobina, feritina serică), ale căror valori pot indica nivelul și intensitatea deficitului de fier, precum și a anemiei feriprive.

Rezultate și discuții

La grupa de vârstă 0 – 2 ani, în studiul de față s-a constatat că mai mult de jumătate (54,6%) dintre pacienți au prezentat deficit de fier și un procent semnificativ (32,2 %) au prezentat rezervele de fier epuizate (anemie feriprivă). Pentru grupa de vârstă 2 – 10 ani s-a obținut o prevalență a anemiei de 5,2%, iar pentru grupa de vârstă 10 – 18 ani s-a obținut o prevalență a anemiei de 6,2%.

Concluzii

- În studiul actual prevalența anemiei la grupa de vârstă 0 – 2 ani este mare (32,3%), comparativ cu țările dezvoltate (2-4 %), însă este mai mică comparativ cu țările în curs de dezvoltare (39%-48%).
- Clasificarea pacienților în grupe diferențiate în funcție de sex, a evidențiat o ușoară scădere a prevalenței anemiei la pacienții de sex feminin iar în ceea ce privește mediul de proveniență a arătat că predomină pacienții din mediul urban.
- Pentru a rezolva problema deficienței de fier și a anemiei feriprive, sunt necesare mai multe strategii. Creșterea aportului de fier biodisponibil în dietă este o strategie mai eficientă pe termen lung.

Studiul 5. Anemia feriprivă la copii. Frecvența și răspunsul la tratamentul cu fier pe cale orală

Ipoteza de lucru/obiective

Studiul de față a avut la bază ipoteza că terapia cu preparate pe bază de fier (administrat persoanelor care prezintă deficit de fier sau anemie feriprivă), manifestă numeroase efecte benefice, fierul fiind constituintul funcțional esențial al hemului, leagă și transportă oxigenul, este implicat în numeroase procese biologice, printre care și sinteza ADN-ului. Luând în considerație acest lucru, cercetarea de față a plecat inițial de la premiza că terapia cu fier ar avea un impact pozitiv asupra echilibrului metabolic general, întrucât s-a dovedit a fi responsabil nu doar de corectarea anemiei, ci și de reglarea multor procese metabolice și enzimatice din organism, precum și obținerea unui control optim, dar și prevenirea unor reacții metabolice devastatoare ce ar putea succeda anumite disfuncții ale organismului.

Rezultate și discuții

În studiul actual au fost incluși pacienți, împărțiți în 2 grupuri. Grupurile nu au fost diferite în ceea ce privește datele demografice. Un grup care a prezentat la internare media concentrației de hemoglobină de 10,36 g%, media fierului seric de 3,9 $\mu\text{mol/L}$ și media feritinei serice de 34,20 $\mu\text{g/dl}$. Acest grup a primit tratament cu fier polimaltozat și vitamina C, iar după 6 săptămâni de terapie media concentrației de Hb a fost de 11,71 g%, media fierului seric a fost de 9,8 $\mu\text{mol/L}$ și media feritinei serice a fost de 38,41 $\mu\text{g/dl}$ și un grup care a prezentat la internare media concentrației de Hb de 9,88 g%, media fierului de 4,08 $\mu\text{mol/L}$ și media feritinei serice de 35,58 $\mu\text{g/dl}$. Acest grup a primit tratament cu fier polimaltozat și acid folic iar după 6 săptămâni de terapie media concentrației de Hb a fost de 11,39 g%, media fierului seric a fost de 8,95 $\mu\text{mol/L}$ și media feritinei serice a fost de 47,86 $\mu\text{g/dl}$.

Rezultatele studiului au evidențiat o îmbunătățire semnificativă a valorilor, pentru parametrii hematologici testați (Hemoglobină, sideremie, feritina serică) după 6 săptămâni de terapie cu fier polimaltozat și vitamina C, respectiv fier polimaltozat și acid folic.

Concluzii

- Terapia cu fier a avut un impact pozitiv asupra parametrilor hematologici (hemoglobină, sideremie, feritina serică), înregistrându-se o normalizare a nivelului acestora în fiecare grupă de studiu.
- Nu au existat diferențe semnificate între pacienții care au urmat tratamentul cu fier polimaltozat și vitamina C și pacienții care au urmat tratamentul cu fier polimaltozat și acid folic.
- Pentru corectarea deficienței de fier și a anemiei feriprive este nevoie de aplicarea unor strategii fie singure, fie în combinație: educația combinată cu diversificarea dietei pentru îmbunătățirea aportului de fier; suplimente cu fier pe lângă alimentație și fortificarea alimentelor cu fier.

Studiul 6. Determinarea Fe²⁺ din comprimate prin metoda spectrofotometrică în domeniul VIS

Ipoteza de lucru/obiective

La baza desfășurării acestei cercetări au stat următoarele obiective: realizarea unei metode spectrofotometrice UV-VIS care să permită determinarea cantitativă a Fe²⁺ prin complexare cu albasru de metiltimol atât pentru substanța activă cât și din forme farmaceutice; realizarea unui studiu asupra cineticii de formare a combinațiilor complexe: Fe²⁺:albastru de metiltimol, în vederea evaluării stabilității acestora, respectiv pentru stabilirea timpilor optimi de analiză; stabilirea raportului de combinare între cationul metalic (Fe²⁺) și reactivul analitic, folosind metoda Job's; validarea metodei atât pe substanța activă cât și pe forme farmaceutice, urmând parametrii de validare.

Rezultate și discuții

S-au înregistrat spectrele și s-au citit valorile absorbanțelor la lungimea de undă la care spectrul a prezentat maximul de absorbție. De asemenea, s-au reprezentat grafic absorbanțele în funcție de fracția molară a reactivului respectiv a cationului metalic. Raportul de combinare între cationul metalic (Fe²⁺) și reactivul analitic a fost de 1:1.

Validarea metodei s-a realizat prin urmărirea parametrilor: liniaritate ($r=0,9998$), repetabilitate, reproductibilitate, acuratețe.

Concluzii

- spectrul UV ne-a permis determinarea Fe²⁺ din forme farmaceutice, care a constituit obiectivul studiului efectuat;
- a fost dezvoltată metoda spectrofotometrică UV-VIS care permit determinarea cantitativă a Fe²⁺, din comprimate de sulfat feros.
- Validarea metodei spectrofotometrice în VIS pentru determinarea Fe²⁺ din forme farmaceutice s-a realizat prin studiul parametrilor: liniaritate, acuratețe, repetabilitate și reproductibilitate;

- metoda propusă este simplă, rapidă, adecvată pentru laborator și a fost folosită cu succes pentru determinarea cantitativă a Fe^{2+} din produse farmaceutice (comprimate cu sulfat feros).

Studiul 7. Metoda spectrofotometrică pentru determinarea cantitativă a Fe^{3+} din complex de fier polimaltozat din forme farmaceutice

Ipoteza de lucru/obiective

La baza desfășurării acestei cercetări au stat următoarele obiective: dezvoltarea unei noi metode spectrofotometrice care să permită determinarea cantitativă a Fe^{3+} în domeniul VIS prin complexare cu albastru de metiltimol, atât pentru substanța activă cât și pentru forme farmaceutice; realizarea unui studiu asupra cineticii de formare a combinațiilor complexe: Fe^{3+} :albastru de metiltimol, în vederea evaluării stabilității acestora, respectiv pentru stabilirea condițiilor optime de analiză; stabilirea raportului de combinare între cationul metalic (Fe^{3+}) și reactivul analitic, folosind metoda Job's; validarea metodei atât pe substanța activă cât și pe forme farmaceutice.

Rezultate și discuții

S-au înregistrat spectrele și s-au citit valorile absorbanțelor la lungimea de undă la care spectrul a prezentat maximul de absorbție. De asemenea, s-au reprezentat grafic absorbanțele în funcție de fracția molară a reactivului respectiv a cationului metalic. Raportul de combinare între cationul metalic (Fe^{3+}) și reactivul analitic a fost de 1:1.

Liniaritatea metodei spectrofotometrice UV-Vis a fost verificată prin metoda dreptei de calibrare, coeficientul de corelație a fost $r=0,9997$. S-au determinat parametrii de validare ai metodei (liniaritate, repetabilitate, reproductibilitate, acuratețe).

Concluzii

- spectrofotometria UV-VIS ne-a permis determinarea cantitativă a Fe^{3+} și din forme farmaceutice, care a constituit obiectivul studiului efectuat;
- în studiul de față a fost dezvoltată o metodă spectrofotometrică în VIS care permite determinarea cantitativă a Fe^{3+} , din complecși de fier polimaltozat;
- Validarea metodei spectrofotometrice în VIS pentru determinarea Fe^{3+} din forme farmaceutice s-a realizat prin studiul parametrilor liniaritate, acuratețe, repetabilitate și reproductibilitate;
- metoda propusă este simplă, adecvată pentru laborator și a fost folosită cu succes pentru determinarea cantitativă a fierului polimaltozat din produse farmaceutice comerciale.

Concluzii generale

Anemia, chiar și anemia ușoară, are o influență negativă asupra sănătății populației.

Diagnosticul și managementul terapeutic al deficitului de fier este un subiect mult dezbătut, descoperirea de noi metode și teste de diagnostic fiind importantă pentru monitorizarea modernă a pacienților.

Deficitul de fier este mai frecvent întâlnit în rândul copiilor, mai ales în țările în curs de dezvoltare, unde dietele monotone bazate pe alimente de origine vegetală oferă cantități scăzute de fier biodisponibil. Epuizarea rezervelor medulare de fier apar numai în anemia feriprivă și reprezintă o condiție sine qua non pentru diagnostic. Diagnosticul de anemie nu este suficient, trebuie elucidată și cauza care o determină.

Valorile de referință, din literatura de specialitate, au fost stabilite cu mulți ani în urmă, pe o populație diferită, folosind metode și reactivi diferiți de cei utilizați în zilele noastre, încadrate în intervale foarte largi, greu de interpretat în context clinic.

În consecință se impunea stabilirea unor valori proprii de referință, valabile pentru populația deservită, realizate cu ajutorul aparatelor moderne utilizate acum în laboratoarele medicale.

Stabilirea propriilor valori de referință sunt foarte utile deoarece diagnosticul de anemie se bazează mai mult pe parametrii de laborator pentru o terapie țintită și eficientă în administrarea dozei corespunzătoare de preparate cu fier. O interpretare corectă a rezultatelor ar avea un impact pozitiv asupra pacienților.

Medicii și oamenii de știință din domeniul sănătății, precum și producătorii de aparatură de laborator ar trebui să colaboreze strâns pentru a dezvolta materiale informaționale privind intervalele de referință, în concordanță cu evoluția tehnologiei.

Cea mai mare prevalență a anemiei (32,2%) s-a înregistrat la grupa de vârstă 0 – 2 ani. Această prevalență este mare comparativ cu țările dezvoltate (2–4%), dar este mai mică comparativ cu țările în curs de dezvoltare (39-48%).

O modernizare a sistemului sanitar românesc ar trebui să includă programe care să conducă la scăderea prevalenței anemiei, în beneficiul pacienților, dar și al sistemului sanitar, prin reducerea costurilor.

Pentru aceasta ar trebui intervenit asupra factorului care determină apariția anemiei, și anume deficitul de fier din alimentație. Ar trebui elaborate recomandări pentru îmbunătățirea aportului de fier pentru diversificarea dietei în perioada copilăriei. Debutul suplimentării cu fier ar trebui să înceapă de la vârsta de șase luni odată cu diversificarea alimentației sugarului, prin introducerea de suplimente cu fier și a alimentelor care au conținut mare de fier. Totodată ar trebui implementate programe de screening pentru depistarea precoce a anemiei.

Pentru determinare fierului din preparatele comerciale disponibile se poate utiliza spectrofotometria UV-VIS. În vederea valorificării avantajelor spectrofotometriei UV-VIS (accesibilitatea instrumentelor, simplitate, reproductibilitate, robustețe etc.) în studiul actual am dezvoltat o nouă metodă spectrofotometrică UV-VIS, care a permis determinarea cantitativă a fierului prin complexare cu albastru de metiltimol.

Inițial s-au stabilit condițiile de complexare ale Fe^{2+} , respectiv Fe^{3+} cu albastru de metiltimol precum și raportul de combinare al acestora prin metoda Job's. A fost aleasă lungimea de undă de 628 nm corespunzătoare unui maxim de absorbție caracteristic numai complexilor formați.

Metodele analitice cantitative au fost validate urmărind: liniaritatea, acuratețea, repetabilitatea, reproductibilitatea. Parametrii de validare dovedesc aplicabilitatea metodei în scopul propus.

DOCTORAL THESIS ABSTRACT

Iron and iron deficiency anaemia. Analytical and biochemical studies

Ph.D. candidate **Maria Băncioiu (Totan)**

Ph.D. coordinator **Prof. Dr. Marius T. Bojiță**

Cluj – Napoca 2014



CONTENTS

INTRODUCTION	15
CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE	
1. Iron deficiency anaemia	19
1.1. Laboratory diagnosis	20
1.2. Differential diagnosis of iron deficiency anaemia	22
1.3. Treatment of iron deficiency anaemia	24
1.3.1. Oral treatment of iron deficiency anaemia	24
1.3.2. Parenteral iron therapy	24
2. Haemoglobin	25
3. Serum iron	26
3.1. Iron metabolism	26
3.2. Risk factors in iron deficiency	32
3.3. Hepcidin	33
3.3.1. Iron storage in the liver and regulation of hepcidin synthesis	34
4. Ferritin	35
4.1. Ferritin structure	36
4.2. Function and regulation of ferritin biotransformation	37
4.2.1. Ferritin in pathology	37
5. Reference values	39
5.3. The importance of establishing reference values	40
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Working hypothesis/objectives	43
2. General methodology	45
3. Study 1 – Establishing haemoglobin reference values for children and teenagers in Sibiu area	49
3.1. Introduction	49
3.2. Working hypothesis/objectives	50
3.3. Patients and method	50
3.4. Results	50
3.5. Discussions	54
3.6. Conclusions	55
4. Study 2 – Iron, an essential micronutrient for the body. The importance of establishing reference values.	57
4.1. Introduction	57
4.2. Working hypothesis/objectives	58
4.3. Patients and method	58
4.4. Results	59
4.5. Discussions	61
4.6. Conclusions	63
5. Study 3 – Clinical significance of determining serum ferritin. Establishing reference values.	65
5.1. Introduction	65
5.2. Working hypothesis/objectives	66

5.3. Patients and method	66
5.4. Results	67
5.5. Discussions	68
5.6. Conclusions	69
6. Study 4 – Prevalence of iron deficiency anaemia among children in Sibiu area	71
6.1. Introduction	71
6.2. Working hypothesis/objectives	72
6.3. Patients and method	72
6.4. Results	73
5.5. Discussions	78
6.6. Conclusions	80
7. Study 5 – Iron deficiency anaemia among children. Frequency and response to oral treatment with iron.	83
7.1. Introduction	83
7.2. Working hypothesis/objectives	84
7.3. Patients and method	85
7.4. Results	86
7.5. Discussions	89
7.6. Conclusions	90
8. Study 6 – Determination of Fe²⁺ in tablets using spectrophotometry in the VIS	93
8.1. Introduction	93
8.2. Working hypothesis/objectives	94
8.3. Material and method	94
8.4. Results	96
8.5. Discussions	99
8.6. Conclusions	100
9. Study 7 – Using spectrophotometry for quantitative determination of Fe³⁺ in poly-maltose iron complex in pharmaceutical forms	101
9.1. Introduction	101
9.2. Working hypothesis/objectives	102
9.3. Material and method	102
9.4. Results	104
9.5. Discussions	107
9.6. Conclusions	108
7. General conclusions	109
8. The originality and innovative contributions of the thesis	113
REFERENCES	115

Key words: iron deficiency anaemia, haemoglobin, serum iron, ferritin, reference values, UV-VIS spectrophotometry.

Introduction:

Anaemia is one of the most common blood diseases, which represents a major problem of public health in many countries.

Iron deficiency anaemia, regardless of its stage, can be determined by means of various laboratory tests, the most common of which are: haemoglobin determination, serum iron and serum ferritin, parameters illustrating the iron concentration in various compartments of the body (red blood cells, blood, and deposits).

This study emphasizes the importance of establishing reference values for different age groups in order to facilitate the correct interpretation and classification of patients as sick or healthy; it also points to the difference between the reference values in the literature (intervals that were established for a population with a different structure in terms of gender, age, race, diet, equipment and reagents) and the situation of the population in our country.

Clinical research results provide step by step explanations of the negative effects that may occur as a result of iron deficiency anaemia. In the case of children, iron deficiency anaemia is a problem that generates neuro-psycho-motor developmental disorders.

Once properly diagnosed, iron deficiency anaemia should be treated accordingly. The treatment consists in medicines containing iron, in various formulations. The results of this study show that the therapy is well tolerated and leads to the desired outcome.

High anaemia prevalence and the factors determining it can be reduced through the implementation and development of certain beneficial programmes meant to identify and counter iron deficiency anaemia and its adverse consequences on both patients and the healthcare system.

In this study, the patients have been included consecutively, and not according to predetermined criteria (gender, nationality, previous diagnoses, previous therapy or standardized living conditions).

Another direction of research has consisted in the development of a VIS spectrophotometric method for the determination of Fe^{2+} and Fe^{3+} respectively in pharmaceutical formulations.

UV-VIS spectrophotometry is an easily accessible and safe method in pharmaceutical analysis. It consists in the formation of complexes between Fe^{2+} , or Fe^{3+} respectively, and methyl thymol blue. VIS absorption spectra of the complexes formed have a specific maximum at the wavelength of 628 nm. The method has been validated and the validation parameters have confirmed its successful use in pharmaceutical analysis.

Current stage of knowledge

Divided into five chapters, the first part of the doctoral thesis approaches theoretical issues related to iron deficiency anaemia, haemoglobin, serum iron, ferritin and reference values.

Working hypothesis/objectives

- accomplishment of applied research on three groups of patients within a period of 12 months in order to establish reference values for haematological parameters (haemoglobin, serum iron, and serum ferritin, useful markers in iron deficiency anaemia, as well as the monitoring of laboratory parameters evolution;
- accomplishment of applied research on three groups of patients within a period of 12 months in order to establish anaemia prevalence;

- assessment of the impact of the therapy on patients with iron deficiency anaemia by monitoring patient tolerability and compliance to treatment, as well as adverse drug reactions;
- development of new methods of iron analysis in pharmaceuticals and their validation.

Study 1. Establishing haemoglobin reference values for children and teenagers in Sibiu area

Working hypothesis/objectives

The study started from the premise that the reference values for haemoglobin were established many years ago on a different population, using different methods and different reagents compared to those used today. It is necessary to establish reference values for the population served in order to prevent and reduce the risk of errors in diagnosis.

Results and discussions

The results of the research revealed no significant difference in values from the literature studied for the age group of 1 month – 2 years. For the age group of 2 – 10 years, it has been noted that the upper limit of the values obtained within the current research is lower compared to the upper limit presented in the literature studied.

Comparing the results of the current study to the reference intervals provided by the literature studied for the age group of 10 – 18 years, it has been noted that the upper limit is lower in the case of the teenagers involved in the research, which offers a narrower interval, more easily interpreted in clinical contexts.

Conclusions

- The reference intervals are specific to the population served (1 month – 18 years), as well as for the method, the analyzer, and the reagents used for Hb determination.
- The reference values provided by the current study are similar to those published in the literature studied and they are specific to the population served.
- The reference intervals obtained in the current study can be extrapolated to other medical units without being validated since health systems (population, equipment, method, reagents etc) can vary widely between different centres or countries.

Study 2. Iron, an essential micronutrient for the body. The importance of establishing reference values

Working hypothesis/objectives

Establishing reference values has many beneficial effects on both patients and clinicians for a more accurate interpretation of results. Taking this into consideration, the current research started from the premise that reference values for serum iron were established many years ago on a different population, using different methods, reagents and analyzers compared to those used today. The correct interpretation of results would have a positive impact on patients.

Results and discussions

The results obtained in the current study for the age group 1 month – 2 years are different from those presented in the literature studied, where both the lower and the upper limits of the reference values for this age group are higher. For the age group 2 – 10 years there is no significant difference between the lower limit of the reference values obtained in the current study and the

lower limit presented in the literature studied, but the upper limit in the literature is higher compared to the values of the current study.

For the age group 10 – 18 years, the results of the research have revealed values of serum iron which are almost identical to those in the literature studied.

Conclusions

- The reference intervals obtained in the current study are specific to the population in question; they are narrower and more efficient in clinical contexts.
- Determining and monitoring serum iron together with other parameters (Haemoglobin and serum ferritin) are of particular importance for the diagnosis of iron deficiency anaemia.
- The reference intervals obtained in the current study can be extrapolated to other medical units without being validated since health systems (population, equipment, method, reagents etc) can vary widely between different centres or countries.

Study 3. Clinical significance of determining serum ferritin. Establishing reference values

Working hypothesis/objectives

The current research started from the premise that reference values for serum iron were established many years ago on a different population, using different methods, reagents and analyzers compared to those used today. Establishing reference values has many beneficial effects on both patients and clinicians. The correct interpretation of results would have a positive impact on patients.

Results and discussions

The results of the current study have revealed significant differences of the reference intervals compared to the literature studied. The serum ferritin values obtained in the current study through the indirect Hoffmann computerized method present a higher lower limit for all age groups and do not have a very wide interval compared to the literature studied; these results are specific to the population in question and more easily interpreted in clinical contexts.

Conclusions

- Ferritin is useful for iron homeostasis, but it is also involved in various diseases, especially autoimmune diseases.
- In most circumstances, serum ferritin is regarded as having the greatest sensitivity and specificity among the blood tests currently available for determining iron deficiency.
- The reference intervals obtained are specific to the population served, as well as to the method and analyzer used to determine serum ferritin.
- The reference intervals obtained in this study cannot be used in other medical units without being validated.

Study 4. Prevalence of iron deficiency anaemia among children in Sibiu area

Working hypothesis/objectives

Anaemia is a major health problem worldwide. Iron deficiency is the most common cause of anaemia for infants, children and teenagers. Laboratory parameters (Haemoglobin, serum ferritin)

have been selected to elucidate these hypotheses; their values indicate the level and intensity of iron deficiency and iron deficiency anaemia.

Results and discussions

For the age group 0 – 2 years, the present study has found that more than a half of the patients (54.6%) have iron deficiency and for a significant proportion of them (32.2%) the iron stores in the body have been depleted (iron deficiency anaemia). For the age group 2-10 years, the anaemia prevalence obtained is 5.2% and for the age group 10 – 18, it is 6.2%.

Conclusions

- According to the current study, the prevalence of anaemia for the age group 0 – 2 years is larger (32.3%) than in developed countries (2-4%), but it is lower than the one in developing countries (39%-48%).
- The classification of patients into gender groups has shown a slight decrease in the prevalence of anaemia in female patients; as regards the area of origin, the study has shown that anaemia is prevalent in patients from the urban area.
- Multiple strategies are necessary in order to solve the problem of iron deficiency and iron deficiency anaemia. Increased intake of bio-available iron in the diet is a more effective long-term strategy.

Study 5. Iron deficiency anaemia among children. Frequency and response to oral treatment with iron

Working hypothesis/objectives

The present study has been based on the hypothesis that treatment with iron preparations (administered to those suffering from iron deficiency or iron deficiency anaemia) has many beneficial effects considering the fact that iron is an essential functional constituent of the heme; it binds and carries oxygen, and it is involved in many biological processes, including DNA synthesis. Taking all these into consideration, the present study has started from the premise that iron therapy would have a positive impact on the overall metabolic balance of the body; iron has been proved to be responsible not only for the correction of anaemia, but also for the regulation of many metabolic and enzymatic processes in the body, as well as for the achievement of optimum control and prevention of devastating metabolic reactions that could succeed certain dysfunctions in the body.

Results and discussions

This study included patients divided into two groups. The groups did not differ in terms of demographics. At the beginning of hospitalization, the former group presented the following values: average haemoglobin concentration 10.36g%, average serum iron 3.9 $\mu\text{mol/L}$, and average serum ferritin 34.20 $\mu\text{g/dl}$. These patients were treated with poly-maltose iron and vitamin C and after 6 weeks of treatment the values were the following: average Hb concentration 11.71g%, average serum iron 9.8 $\mu\text{mol/L}$, and average serum ferritin 38.41 $\mu\text{g/dl}$. The latter group presented the following values: average Hb concentration 9.88g%, average serum iron 4.08 $\mu\text{mol/L}$, and average serum ferritin 35.58 $\mu\text{g/dl}$. These patients were treated with poly-maltose iron and folic acid and after 6 weeks of therapy, the values were the following: average Hb concentration 11.39g%, average serum iron 8.95 $\mu\text{mol/L}$, average serum ferritin 47.86 $\mu\text{g/dl}$.

The results have therefore shown significant improvement of the values for the haematological parameters tested (Haemoglobin, serum iron, serum ferritin) after 6 weeks of

treatment with poly-maltose iron and vitamin C on the one hand and poly-maltose iron and folic acid on the other hand.

Conclusions

- Iron therapy has had a positive effect on the haematological parameters (Haemoglobin, serum iron, serum ferritin) leading to a normalization of their values for both groups of patients.
- No significant differences have been noted between the patients treated with poly-maltose iron and vitamin C and those treated with poly-maltose iron and folic acid.
- The correction of iron deficiency and iron deficiency anaemia can be achieved through the implementation of certain strategies, either alone, or in combination: education combined with a varied diet to improve iron intake, iron supplements in addition to food and food fortification with iron.

Study 6. Determination of Fe²⁺ in tablets using spectrophotometry in the VIS

Working hypothesis/objectives

This research was based on the following objectives: the achievement of a UV-VIS spectrophotometric method to allow for quantitative determination of Fe²⁺ through complexes with methyl thymol blue both for the active substance and for the pharmaceutical forms; the development of a study on the kinetics of the formation of complexes: Fe²⁺ and methyl thymol blue to assess their stability and the optimal analysis time; the determination of the combination ratio between the iron cation (Fe²⁺) and the analytic reagent using Job's method; the validation of the method on both the active substance and the pharmaceutical forms following the validation parameters.

Results and discussions

The spectra have been recorded and the absorbance values have been read at the wavelength where the spectrum presented maximum absorption. Also, the absorbances have been plotted according to the mole fraction corresponding to the metallic cation reagent. The combination ratio between the metallic cation (Fe²⁺) and the analytic reagent was 1:1.

The method validation has been performed by following the parameters: linearity ($r=0.9998$), repeatability, reproducibility, and accuracy.

Conclusions

- The UV spectrum allowed for the determination of Fe²⁺ in pharmaceutical forms, which had been the objective of the study conducted ;
- The UV-VIS spectrophotometric method has been developed, which allows for the quantitative determination of Fe²⁺ in ferrous sulphate tablets.
- The validation of the spectrophotometric method in the VIS for the determination of Fe²⁺ in pharmaceutical forms has been performed through the study of parameters: linearity, accuracy, repeatability, and reproducibility;
- The method is simple, fast and suitable for laboratory tests; it has been used successfully for quantitative determination of Fe²⁺ in pharmaceutical products (ferrous sulphate tablets).

Study 7. Using spectrophotometry for quantitative determination of Fe³⁺ in poly-maltose iron complex in pharmaceutical forms

Working hypothesis/objectives

This research was based on the following objectives: the achievement of a new spectrophotometric method in the VIS to allow for quantitative determination of Fe^{3+} through complexes with methyl thymol blue both for the active substance and for the pharmaceutical forms; the development of a study on the kinetics of the formation of complexes: Fe^{3+} and methyl thymol blue to assess their stability and the optimal analysis time; the determination of the combination ratio between the iron cation (Fe^{3+}) and the analytic reagent using Job's method; the validation of the method on both the active substance and the pharmaceutical forms.

Results and discussions

The spectra have been recorded and the absorbance values have been read at the wavelength where the spectrum presented maximum absorption. Also, the absorbances have been plotted according to the mole fraction corresponding to the metallic cation reagent. The combination ratio between the metallic cation (Fe^{3+}) and the analytic reagent was 1:1.

The linearity of the UV-VIS spectrophotometric method has been verified through the straight line method of calibration; the correlation coefficient was $r=0.9997$. The validation parameters have been determined (linearity, repeatability, reproducibility, and accuracy).

Conclusions

- The UV spectrum allowed for the determination of Fe^{3+} in pharmaceutical forms, which had been the objective of the study conducted;
- The present study has developed a spectrophotometric method in the VIS which allows for the quantitative determination of Fe^{3+} in poly-maltose iron complexes;
- The validation of the spectrophotometric method in the VIS for the determination of Fe^{3+} in pharmaceutical forms has been performed through the study of parameters: linearity, accuracy, repeatability, and reproducibility;
- The method is simple and suitable for laboratory tests; it has been used successfully for quantitative determination of poly-maltose iron in commercial pharmaceutical products.

General conclusions

Anaemia, even in mild form, has a negative influence upon public health.

The diagnosis and therapeutic management of iron deficiency is a much debated topic; therefore, the development of new diagnosis methods and tests is of utmost importance for modern patient monitoring.

Iron deficiency is common among children, especially in developing countries, where monotonous diets based on vegetable food provide low amounts of bio-available iron. Bone marrow iron depletion only occurs in iron deficiency anaemia and it is a prerequisite of diagnosis. The diagnosis of anaemia is not sufficient; the cause determining it must also be elucidated.

The reference values in the literature studied were established many years ago on a different population, using different methods and different reagents compared to those used today; they provide very large intervals, which are difficult to interpret in clinical contexts.

Consequently, there aroused the necessity of establishing our own reference values for the population served, which should be determined by means of the modern equipment used in medical laboratories today.

Establishing such reference values is useful because the diagnosis of anaemia is very much based on laboratory parameters for effective targeted therapy with the appropriate dose of iron preparations. The correct interpretation of results would have a positive impact on patients.

Doctors, health scientists and laboratory equipment manufacturers should collaborate closely in order to develop informational materials on reference intervals, in accordance with the development of technology.

The highest prevalence of anaemia (32.2%) has been recorded within the age group 0 – 2 years. This proportion is large compared to developed countries (2 – 4%), but lower than in developing countries (39 – 48%).

The modernization of the Romanian health system should include programmes that will lead to lower prevalence of anaemia to the benefit of both the patients and the healthcare system by reducing costs.

In order for this to happen, one should first deal with the factor causing anaemia, namely iron deficiency in the diet. Recommendations should be developed for the improvement of iron intake and diet diversification in childhood. Iron supplementation should begin at the age of six months, when the infant's diet becomes more varied; also, it is at this age that foods with high content of iron should be introduced. At the same time, screening programmes should be implemented for early detection of anaemia.

The iron quantity in the commercial preparations available can be determined by means of UV-VIS spectrophotometry. In order to exploit the advantages of UV-VIS spectrophotometry (tools accessibility, simplicity, reproducibility, robustness etc.), this study has developed a new UV-VIS spectrophotometric method, which allows for the quantitative determination of iron in complexes with methyl thymol blue.

The first step was to set the conditions for forming complexes of Fe^{2+} (Fe^{3+} respectively) and methyl thymol blue, as well as their combination ratio through Job's method. The wavelength of 628 nm was chosen, which corresponded to the maximum of absorption characteristic to the complexes formed only.

The quantitative analytical methods have been validated following the parameters: linearity, accuracy, repeatability, and reproducibility. The validation parameters prove the applicability of the method for the intended purpose.