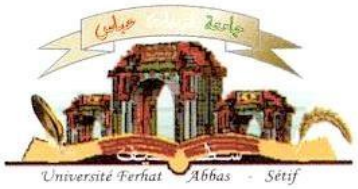
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

University of Ferhat Abbas Sétif1

Nature and life sciences Faculty



جامعة فرحات عباس،سطيف1

كلية علوم الطبيعة والحياة

Department of Animal Biology and Physiology

Master's Graduation Thesis

Presented by:

ACHOURIMeryem YAZIDSamiha ZERRATLINA

Infulfillment of the requirements for the

Master's degree

Department: Animal Biology and Physiology

Specialty: Cellular Physiology and Pathophysiology

THEME

Factors Affecting Hemolysis and The Relationship with Anemia

Presented publicly on:17/06/2026

In the front of:

Dr:GASMIL	**Univ-Sétif-1**	**President**
Pr:KACEMR	**Univ-Sétif-1**	**Supervisor**
Dr:BOUCENNAM	**Univ-Sétif-1**	**Examiner**

Academic year:2025/2026

TABLEOF CONTENTS

Acknowledgements i
Abstract(English) ii
Résumé(Français) iii
العربية/(Arabic ملخص) iv
Listof Abbreviations v
Listof Figures vi
Listof Tables vii
Tableof Contents viii

GENERALINTRODUCTION 1

PARTI—THEORETICAL PART

CHAPTER1—ANEMIA 3
1.1 DefinitionandClinicalSignificance 3
1.2 MorphologicalClassification 5
1.3 PathophysiologicalCauses 6
1.4 ClinicalFeaturesandDiagnosis 7

CHAPTER2—HEMOLYSIS 8
2.1 Definition 8
2.2 ExtravascularandIntravascularHemolysis 9
2.3 GeneralMechanismsofRedCellDestruction 10
2.4 ClinicalandLaboratoryHallmarks 11

CHAPTER3—ETIOLOGYOFHEMOLYTICANEMIA 13
3.1 Hereditary(Intrinsic)Causes 13
3.1.1 RedCellMembraneDefects 13
3.1.2 EnzymeDeficiencies 15
3.1.3 Hemoglobinopathies 15
3.2 Acquired(Extrinsic)Causes 17
3.2.1 Immune-MediatedHemolysis 17
3.2.2 MechanicalandMicroangiopathicHemolysis 18
3.2.3 Infections 19
3.2.4 ChemicalandPhysicalAgents 19

CHAPTER4PATHOPHYSIOLOGYOFHEMOLYTICANEMIA **20**
4.1 ErythrocyteHomeostasisandKineticImbalance **20**
4.2 MolecularMechanismsofCellularInjury **21**
4.3 CatabolicPathwayandBiologicalMarkers **22**
4.4 ConsequencesofHemolyticAnemia **23**

PARTIIMATERIALSANDMETHODS

II-1 PreparationofPBSSolutionatDifferentConcentrations **24**
II-2 StudyofRedBloodCellBehaviourinIsotonicPBS(0.9%) **26**
II-3 BloodSmearofaHemolyticCase **27**
II-4 EstimationofRBCHemolysisbyAbsorbance **29**
II-5 CBCinDifferentTypesofAnemia **31**
II-6 MicroscopicStudyofBloodSmears **33**

PARTIIIRESULTSANDDISCUSSION

1. EffectofOsmoticPressureonRedBloodCells **36**
2. EstimationofRedBloodCell Hemolysis **39**
3. CompleteBloodCountsinDifferentTypesofAnemia **40**
3.1 Case1—SampleNo.32—ThalassemiaTrait 40
3.2 Case2—SampleNo.26—IronDeficiencyAnemia 41
3.3 Case3—SampleNo.53 —MacrocyticAnemia(VitB12/ Folate) 41
3.4 Case4—SampleNo.33—Hemolytic Anemia 42
3.5 Case5—SampleNo. 21—MacrocyticAnemiawithSevereThrombo-cytopenia 42
3.6 GeneralComparisonBetweentheFiveCases 42
3.7 ComparisonoftheReferenceCase(SampleNo.3)withtheAnemia Cases 43
4. MicroscopicStudyofBloodSmears **45**
4.1 CaseStudy1—BloodSmearfromtheThalassemia Patient 45
4.2 CaseStudy2—BloodSmearfromtheHemolyticAnemiaPatient 47
4.3 GeneralComparisonBetweentheTwoSmears 48

GENERALCONCLUSION **52**
REFERENCESLIST

GENERALINTRODUCTION

GENERALINTRODUCTION

Anemia is a widespread hematological disorder, characterised by a reduction in circulating hemoglobin (Hb) concentration or the number of healthy red blood cells (RBCs) resulitng in impaired oxygen delivery to tissue **(Turner et al., 2023).** Anemia is not a disease entity in itself but rather a clinical manifestation of an underlying pathological process **(Garcia-Casal et al., 2023; Turner et al., 2023).** Its major causes are classically grouped into three mechanisms: decreased red blood cell production ,increased red blood cell destruction, and blood loss **(Turner et al., 2023; Chaparro et Suchdev, 2019)**.Among these mechanism , hemolytic anemia is particularly important because it results from the premature destruction of erythrocytes before the end of their normal lifespan of approximately 90 – 120 **days (Merck Manual, 2024; Phillips et Henderson, 2018)**.When the rate of destruction exceeds the bone marrow's compensatory capacity , hemolytic anemia develops **(Baldwin et al., 2023).**

hemolytic anemia may be classified into intrinsic and extrinsic causes **((Hoffbrand, 2024; Lichtman et al., 2022)**.intrinsic causes are hereditary and include red cell membrane defects, enzymopathies, and hemoglobinopathies, whereas extrinsic causes are acquired and include immune-mediated hemolysis,mechanical injury, microangiopathic processes, infections, and chemical or physical agents **(Hoffbrand, 2024; Loriamini et al., 2024).**

this classification is important because it reflects different pathophysiological mechanisms and helps guide the diagnostic approach **(lichtman et al ,2022; Phillips et Henderson , 2018)** From mechanistic point of view, hemolysis may occur either intravascularly, through direct red blood cell lysis withein the circulation, or extravascularly, mainly through macrophage clearance in the spleen and liver **(Merck Manual, 2024 ;Cleveland Clinic 2022).** Understanding the pathophysiology of hemolytic anemia is essential for accurate diagnosis and appropriate management **(Hoffbrand, 2024; Kaushansky et al , 2021)** Accordingly, this thesis aims to provide a comprehensive overview of hemolytic anemia, with emphasis on its pathophysiology, classification , features, and clinical significance . Experimentally, it also evaluates erythrocyte membrane stability by analyzing morphological changes and hemolysis rates under varying osmotic condition, ranging from isotonic to hypotonic concentrations.

Abstract

This work investigates some influencing factors and parameters affecting Hemolysis with the relationship with Anemia. .Three complementary experimental approaches were used. First, the osmotic fragility of red blood cells was evaluated in phosphate-buffered saline (PBS) at decreasing concentrations. and the morphological changes observed under the microscope.Second, hemolysis was quantified by measuring the percentage of hymolysis based on the normal ratio in the case of isotonic solution.Third, the CBC of some clinical anemia samples was compared with normal values and complemented by microscopic study of two blood smears (thalassemia and hemolytic anemia).Hemolysis increased graduallyat low hypotonic concentrations with a sharp morphological transition between hypotonic PBS.Results of Clinical Anemia cases displayed distinct CBC values signatures, low MCV values with high RBC suggesting thalassemia trait; low MCV combined with low MCH and high RDW-CV pointed to iron deficiency anemia; a markedly high MCV and very low RBC supported a macrocytic anemia consistent with vitamin B12 or folate deficiency ; a very high MCHC together with elevated WBC and PLT was compatible with hemolytic anemia ; and a high MCV combined with severe thrombocytopenia (PLT 25) . Blood smears confirmed microcytic-hypochromic red cells in thalassemia and the presence of spherocytes and polychromasia in the hemolytic case.Osmotic fragility testing, quantitative hemolysis measurement, and CBC interpretation together with the peripheral smear provide a coherent framework for orienting the diagnosis of the different anemia subtypes, in particular hemolytic anemia.

Keywords: hemolytic anemia; osmotic hemolysis; complete blood count; thalassemia; iron deficiency.

Résumé

Ce travail examine certains facteurs et paramètres influençant l'hémolyse ainsi que sa relation avec l'anémie.Trois approches expérimentales complémentaires ont été utilisées. La première consistait à évaluer la fragilité osmotique des globules rouges dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) à des concentrations décroissantes, avec observation des modifications morphologiques au microscope. La deuxième approche a permis de quantifier l'hémolyse en mesurant le pourcentage d'hémolyse par rapport au rapport normal observé en solution isotonique. La troisième approche consistait à comparer la numération formule sanguine (NFS) de quelques échantillons cliniques d'anémie avec les valeurs normales, complétée par l'étude microscopique de deux frottis sanguins (thalassémie et anémie hémolytique).L'hémolyse a augmenté progressivement à de faibles concentrations hypotoniques, avec une transition morphologique marquée entre hypotonic PBS. Les résultats des cas cliniques d'anémie ont révélé des profils NFS distincts : un faible VGM associé à un nombre élevé de globules rouges évoquait un trait thalassémique ; un faible VGM combiné à une faible CCMH et un IDR-CV élevé orientait vers une anémie ferriprive ; un VGM nettement élevé avec un nombre de globules rouges très bas suggérait une anémie macrocytaire compatible avec une carence en vitamine B12 ou en folates ; une CCMH très élevée associée à une leucocytose et une thrombocytose était compatible avec une anémie hémolytique ; enfin, un VGM élevé combiné à une thrombocytopénie sévère (PLT 25). Les frottis sanguins ont confirmé la présence de globules rouges microcytaires hypochromes dans la thalassémie, ainsi que des sphérocytes et une polychromasie dans le cas hémolytique.Le test de fragilité osmotique, la mesure quantitative de l'hémolyse et l'interprétation de la NFS associée au frottis sanguin périphérique constituent un cadre cohérent pour orienter le diagnostic des différents sous-types d'anémie, en particulier l'anémie hémolytique.

Mots-clés : anémie hémolytique ; hémolyse osmotique ; numération formule sanguine ; thalassémie ; carence en fer.

ملخص

تناولت هذه الدراسة العوامل والمعاملات المؤثرة في الانحلال الدموي وعلاقته بفقر الدم من خلال ثلاثة مناهج تجريبية متكاملة شملت تقييم الهشاشة التناضحية لكريات الدم الحمراء في محاليل الفوسفات المنظمة (PBS) ذات التراكيز المتناقصة مع دراسة التغيرات المورفولوجية، وقياس نسبة الانحلال الدموي مقارنة بالحالة الطبيعية في المحلول متساوي التوتر، إضافة إلى تحليل نتائج صورة الدم الكاملة لعدد من حالات فقر الدم ومقارنتها بالقيم المرجعية مع دعمها بدراسة مسحتين دمويتين لمرضى الثلاسيميا وفقر الدم الانحلالي . أظهرت النتائج ازدياد الانحلال الدموي تدريجيا في الأوساط ناقصة التوتر مع حدوث انتقال مورفولوجي واضح بين وسط منخفض التركيز من PBS، كما كشفت الحالات السريرية عن أنماط مميزة لصورة الدم الكاملة؛ إذ ارتبط انخفاض MCV مع ارتفاع عدد الكريات الحمراء بالثلاسيميا، بينما دل انخفاضMCV و MCH مع ارتفاع RDW-CV على فقر الدم الناجم عن نقص الحديد وأشار ارتفاع MCV مع الانخفاض الشديد في عدد الكريات الحمراء إلى فقر الدم كبير الكريات المرتبط بنقص فيتامين B12 أو حمض الفوليك في حين كان الارتفاع الملحوظ في MCHC مصحوبا بزيادة الكريات البيضاء والصفائح الدموية متوافقا مع فقر الدم الانحلالي، كما ارتبط ارتفاعMCV مع نقص شديد في الصفائح الدموية بحالات أخرى من اضطرابات الدم .وأكدت المسحات الدموية وجود كريات حمراء صغيرة ناقصة الصبغة في الثلاسيميا، إضافة إلى الكريات الكروية والتعدد اللوني في فقر الدم الانحلالي .وتبرز نتائج الدراسة أهمية اختبار الهشاشة التناضحية وقياس الانحلال الدموي الكمي وتحليل صورة الدم الكاملة مع فحص المسحة الدموية المحيطية كإطار متكامل يساعد على تشخيص الأنواع الفرعية المختلفة لفقر الدم، ولا سيما فقر الدم الانحلالي.

الكلمات المفتاحية: فقر الدم الانحلالي، الانحلال التناضحي، صورة الدم الكاملة، الثلاسيميا، نقص الحديد.