**Suport LP Anemii I**

**Hematopoieza**

Reprezintă totalitatea mecanismelor prin care se asigură înlocuirea permanentă a celulelor sanguine, într-un ritm rapid, în vederea menţinerii numărului constant în sânge a celulelor sanguine mature, funcţionale.

 Hematopoieza îşi schimbă de multe ori sediul în timpul vieţii intrauterine, desfăşurându-se la nivel mezoblastic, hepatosplenic şi medular.

 Hematopoieza mezoblastică debutează în a treia săptămână de viaţă intrauterină prin formarea unor insule eritropoietice din celulele mezenchimale ale structurilor extraembrionare. Celulele exterioare ale acestor insule (celule stem embrionare) formează un endoteliu vascular, iar cele interioare (conţin cantităţi variabile de Hb) devin libere in interiorul vasului.

 Hematopoieza hepatică este iniţiată în săptamâna a şasea de viaţă intrauterină, este maximă în lunile 3-4, pentru a scădea din luna a şasea până la naştere. În această etapă se formează toate elementele sanguine, iar la sfârşitul lunii a treia, timusul prezintă un cortex bogat în limfocite şi o medulară alcătuită din eritroblaşti, mielocite şi limfocite. Din lunile 3-4 hematopoieza se desfăşoară şi la nivel splenic şi renal, luând naştere şi ganglionii limfatici.

 Hematopoieza medulară debutează în luna a cincea, reprezentând cel mai important organ hematopoietic în luna a şaptea, şi singurul sediu al hematopoiezei după naştere. La adult măduva hematopoietică este reprezentată de măduva conţinută în vertebre, coaste, stern, craniu, sacru, pelvis, extremităţile proximale ale femurului. Hematopoieza provine din celulele stem pluripotente, celule cu o mare capacitatede proliferare, autoreînnoire şi diferenţiere care, sub influenţa micromediului medular, produc elementele tuturor seriilor celulare: eritrocite, granulocite, monocite, limfocite, trombocite. Celulele stem hematopoietice pluripotente se diferenţiază dând naştere celulelor stem hematopoietice multipotente: mieloide (CFU-GEMM: unitatea formatoare de colonii granulo-eritro-megacario-monocitare) şi limfoide (CFU-L: unitatea formatoare de colonii limfoide). Celulele stem hematopoietice multipotente dau naştere progenitorilor (celule orientate pe o anumită linie, cu o capacitate de autoreînnoire limitată, dar cu o mare capacitate de diferenţiere). Astfel, celula stem multipotentă mieloidă dă naştere seriilor eritrocitară (CFU-E), granulo-monocitară (CFU-GM) şi megacariocitară (CFU-MK), iar celula stem multipotentă limfoidă dă naştere progenitorilor limfocitelor T şi B. Diferenţierea progenitorilor conduce la apariţia precursorilor seriilor celulare, cu o capacitate de diviziune limitată, celule tinere identificabile morfologic, care se diferenţiază spre celule mature, competente. Un rol important în proliferarea şi diferenţierea celulelor stem hematopoietice revine micromediului medular (alcătuit din celule endoteliale, fibroblaşti, macrofage, adipocite, celule reticulare). Între celulele hematopoietice şi micromediu se stabilesc interacţiuni directe, celulă-celulă, prin intermediul moleculelor de adeziune exprimate pe celulele stromale având corespondent pe celulele hematopoietice, sau indirecte, prin intermediul citokinelor. Citokinele au rol reglator al hematopoiezei în sens stimulator (EPO,TPO, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IL) sau inhibitor (TNF, TGF, IFN).

**Eritropoieza**

Este un proces fiziologic complex care cuprinde proliferarea, diferenţierea precursorilor eritrocitari şi eritrodiabaza. Seria eritroblastică se formează din celula stem hematopoietică pluripotentă via celula stem multipotentă orientată mieloid (CFC-GEMM). Din aceasta se formează celulele progenitoare eritroide: celula formatoare de colonii eritroide „burst” (CFC-EB), coloniile fiind dependente de IL-3 şi independente de eritropoietină (EPO), şi celula formatoare de colonii eritroide (CFC-E), dependente de EPO. Sub acţiunea EPO, CFC-E se transformă în precursori eritrocitari, identificabili morfologic reprezentaţi iniţial de proeritroblast. Sub acţiunea EPO acesta suferă două tipuri de mitoze: mitoza generatoare, rezultând eritroblaştii rezervei medulare, şi 3 mitoze de maturare, în urma cărora iau naştere eritroblastul bazofil, eritroblastul policromatofil şi eritroblastul oxifil. Reticulocitul ia naştere din eritroblastul oxifil în urma expulziei nucleului. Prin eritrodiabază (trecerea reticulocitelor din măduvă în sângele periferic prin mişcări active) se asigură procentul fiziologic de celule mature în sângele circulant (1-1,5% faţă de măduva osoasă hematogenă, unde peste 80% din hematii sunt reticulocite).

- Proeritroblastul (rubriblast, pronormoblast) este o celulă rotundă sau ovalară, cu dimensiuni între 18-25μ, nucleu mare, rotund, situat excentric, cromatina nucleară fină, prezentând unul sau doi nucleoli proeminenţi. Citoplasma este redusă cantitativ, intens bazofilă, cu o arie palidă perinuclear (corespunzând sistemului Golgi), agranulară; raportul nucleo/citoplasmatic este în favoarea nucleului.

- Eritroblastul bazofil (prorubricit, normoblast bazofil) este o celulă de talie mai mică (12-17μ), nucleu mare, sferoidal, situat excentric, cromatina nucleară începe să se condenseze, nucleolii sunt mai puţin vizibili, citoplasma este bazofilă, raport nucleo/citoplasmatic:3/4. Este stadiul în care se sintetizează cea mai mare cantitate de globină.

- Eritroblastul policromatofil (rubricit) este o celulă mai mică (12-15μ), nucleul este rotund, situat excentric, are cromatina mai condensată, fără nucleoli, citoplasma are o culoare roz pal perinuclear, aspect ce se extinde spre periferie, ca urmare a încărcării cu hemoglobină. Raportul nucleo/citoplasmatic se modifică în favoarea citoplasmei.

- Eritroblastul oxifil (metarubricit, eritroblast ortocromatic) este cel mai mic precursor eritrocitar (9-13μ), rotund sau ovalar, având un nucleu picnotic cu cromatina condensată, citoplasma acidofilă, abundentă; raport nucleo/ citoplasmatic în favoarea citoplasmei.

- Reticulocitul este o celulă mai mare decât eritrocitul, având 8-9 μ diametru, formată prin expulzia nucleului eritroblastului oxifil; conţine organite celulare (aparat Golgi, ribozomi, mitocondrii). Are o durată de viaţă de 3-5 zile. Maturarea spre eritrocit se face în 48 ore (24 ore în măduva osoasă hematogenă, 24 ore în circulaţia sanguină).

- Eritrocitul(hematia, normocitul, globulul roşu) este o celulă cu diametru de 7,4 μ, rotundă, cu un centru palid, sau cu aspect de disc biconcav pe secţiune, anucleată, citoplasmă acidofilă, de culoare roz-roşie-portocalie, cu o plasticitate deosebită şi o durată de viaţă de 120 zile. Membrana hematiei este formată dintr-un bistrat lipidic, reprezentat de fosfolipide şi colesterol neesterificat, şi proteine structurale: glicoforina A (pe care se ataşează antigenele de grup sanguin), glicoforina B şi C (leagă ankirina), proteinele sistemului Rh, spectrina, actina (activează ATP-aza, via activarea miozinei), proteina 4.1 (intervine în cuplarea spectrină-actină), ankirina (intervine în ataşarea citoscheletului la membrană). In afara acestor proteine structurale, există şi proteine de transport (ATP-aze-Na/K dependente, Ca/Mg) şi enzime (proteinkinaze, acetilcolinesteraza, fosfataze acide, glicozidaze). Hemoglobina reprezintă componenta principală a eritrocitului, alcătuită din hem şi globină (tetramer format din 2 perechi de lanţuri polipeptidice). Principalul rol al eritrocitului este acela de transport al gazelor în sânge prin intermediul hemoglobinei (favorizat de o suprafaţă maximă de schimb în raport cu volumul). Fiecare gram de Hb fixează 1,39 ml O2, saturarea cu O2 depinzând de presiunea parţială a oxigenului şi fiind evaluată prin curba de disociere a hemoglobinei. Factorii care influenţează afinitatea Hb pentru oxigen sunt pH-ul şi concentraţia 2,3 difosfogliceratului. CO2-ul difuzează liber în hematie, unde sub acţiunea anhidrazei carbonice se formează acid carbonic ce va disocia în H+ (acceptat de Hb deoxigenată) şi bicarbonat (traversează membrana hematiei liber sau la schimb cu Cl-). Metabolismul energetic al eritrocitului se desfăşoară pe cale glicolizei anaerobe (calea Embden Meyerhof) şi şuntului pentozo-fosfat (NADPH-ul format pe această cale intervine în reducerea glutationului oxidat, cel mai important antioxidant). Durata de viaţă a eritrocitului este limitată la 120 zile (neavând organite celulare nu poate beneficia de sinteză proteică şi autoreparaţie). Catabolismul hemoglobinei se realizează sub acţiunea hemoxigenazei, care metabolizează hemul în biliverdină şi bilirubină ce apare în sânge, concentraţia ei depinzând de rata de sinteză şi clearance-ul hepatic. Bilirubina neconjugată ajunge la nivel hepatic unde este preluată, conjugată şi ulterior excretată în duoden, de unde ajunge în intestinul terminal şi colon sub formă de urobilinogen. O parte din acesta se reabsoarbe, ajunge pe calea circuitului entero-hepatic la ficat, fiind apoi filtrat la nivel renal.

**Granulopoieza**

 Se desfăşoară în măduva osoasă hematogenă pornind de la celula stem pluripotentă, celula formatoare de colonii mieloide, progenitorii granulocitari (celula formatoare de colonii granulo-monocitare) şi precursorii identificabili morfologic: mieloblast, promielocit, mielocit, metamielocit, granulocit nesegmentat şi granulocit segmentat.

*-* Mieloblastul este o celulă imatură, de formă rotundă, dimensiuni de 10 -18μ, cu un nucleu mare, rotund sau ovalar, situat excentric, cu cromatina fină, difuză, cu 2-6 nucleoli, inegali de culoare albastru deschis. Citoplasma este puţină, bazofilă, agranulară sau cu granulaţii puţine.

*-* Promielocituleste o celulă rotundă sau ovalară, cu diametrul de 12-25μ, nucleu rotund sau ovalar, cromatina fină, difuză, cu 1-3 nucleoli mari, albastru deschis. Citoplasma este abundentă, bazofilă, conţine granulaţii primare azurofile, inegale, variabile ca număr.

*-* Mielocitul neutrofil este o celulă cu diametrul de 12-18 μ; prezintă un nucleu rotund sau ovalar, situat excentric, cromatina mai condensată, nucleolii mici, greu vizibili. Citoplasma este slab bazofilă, conţine granulaţii azurofile şi granulaţii specifice neutrofile, mici, inegale, violet palid.

*-* Mielocitul eozinofil este asemănător ca formă, mărime şi aspect al nucleului cu mielocitul neutrofil. Prezintă granulaţii specifice, eozinofile: mari, egale între ele, rotunde colorate roşu-portocaliu.

*-* Mielocitul bazofil se deosebeşte de cel neutrofil prin granulaţii (bazofilele nu conţin decât granulaţii specifice de dimensiuni şi forme variabile, colorate în albastru-violet).

*-* Metamielocitul neutrofil are 10-18μ diametru, nucleu reniform, cromatina mai densă, dispusă în benzi şi blocuri grosolane, violet intens, fără nucleoli. Citoplasma este roz-palid, cu granulaţii specifice.

*-* Metamielocitul eozinofil şi bazofil diferă de metamielocitul neutrofil prin granulaţiile specifice.

- Neutrofilul nesegmentat este o celulă de 10-15μ, cu nucleul în formă de potcoavă sau litera S, cromatina condensată în benzi grosolane, citoplasma abundentă, acidofilă, cu numeroase granulaţii neutrofile fine, de culoare violaceu (conţin mieloperoxidază, fosfatază acidă, elastază, catepsină G, lizozim).

*-* Granulocitul neutrofil este o celulă de 13-15μ, cu nucleul format din 2-5 lobi uniţi prin filamente de cromatină; citoplasma este abundentă, acidofilă, cu un conţinut crescut de glicogen şi granulaţii violacee, inegale (conţin fosfatază alcalină, lactoferină, transcobalamine)

*-* Granulocitul eozinofil are un diametru de 14-16μ, nucleu bilobat cu lobii legaţi printr-un filament scurt (aspect ″în desagă″ ), bazicromatina dispusă în benzi accentuate, nucleu greu vizibil din cauza granulaţiilor specifice, mari, rotunde, egale între ele, colorate roşu-portocaliu, care acoperă întreaga citoplasmă acidofilă (conţin proteina cationică, proteina bazică majoră, neurotoxina, arilsulfataza, β-glucuronidaza).

- Granulocitul bazofil (mastocitul circulant) are dimensiuni în jur de 12μ, nucleul incomplet lobat, bazicromatina dispusă în benzi, citoplasma redusă, roz-violacee, cu granulaţii mari, numeroase, de formă neregulată, colorate violet-negru, care acoperă şi nucleul (conţin mieloperoxidază, histamină, heparină, SRSA, kalicreină, factor chemotactic pentru eozinofile). În ţesuturi se transformă în mastocite.

Funcţiile granulocitelor: Granulocitele neutrofile  au funcţie de apărare şi funcţie secretorie. Granulocitele eozinofile  intervin în reacţiile de hipersensibilitate imediată, apărarea antiparazitară. Granulocitele bazofile  intervin în reacţiile de hipersensibilitate, inflamaţie, reacţiile alergice acute.

 **Monocitopoieza**

 Precursorii seriei monocitare sunt reprezentaţi de monoblast şi promonocit.

 *Monoblastul* nu este identificabil morfologic în MOH, are un nucleu mare, incizat, prezintă 1-2 nucleoli, citoplasmă intens bazofilă.

 *Promonocitu*l este o celulă de 10-20μ, nucleul este mare, rotund sau ovalar, uneori incizat, cu nucleoli; citoplasma intens bazofilă prezintă granulaţii ce conţin esterază nespecifică, arilsulfatază, fosfatază acidă, lizozim.

 *Monocitul* este o celulă de talie mare, de 15-20μ, prezentând un nucleu mare, situat central, cu aspect polimorf, fără nucleoli, citoplasmă abundentă, albastru gri, cu numeroase granulaţii şi vacuole (aspect de sticlă mată). Se află în circulaţie 16-36 ore, după care intră în ţesuturi şi se transformă în macrofag.

 *Macrofagul* este o celulă mare (25-50 μ) cu nucleu ovalar sau reniform situat excentric, cromatină fină, cu 1-2 nucleoli, citoplasmă abundentă, gri-pal, cu numeroase vacuole şi granulaţii conţinând lizozomi, enzime hidrolitice.

 Funcţiile monocitelor/macrofagelor: apărarea antimicrobiană, apărarea antitumorală, modularea răspunsului inflamator.

 **Limfocitopoieza**

 La adult limfocitopoieza se desfaşoară în măduva osoasă hematogenă progenitorii limfoizi luând naştere din celula stem multipotentă limfoidă (CFU-L). O parte din celulele stem limfoide migrează din măduva osoasă hematogenă în timus unde proliferează şi se diferenţiază dobândind caractere de limfocit T. Alte celule stem multipotente limfoide rămân în măduvă sau recirculă între măduvă şi structurile limfoide periferice, se divid şi se diferenţiază spre limfocite B. Precursorii limfoizi sunt reprezentaţi de limfoblast, prolimfocit şi limfocit.

 *Limfoblastul* este o celulă sferoidală, cu un diametru cuprins între 12–17 μ, nucleu rotund, situat excentric, cromatina nucleară dispusă în travee fine, prezentând un nucleol. Citoplasma este redusă cantitativ, bazofilă, fără granulaţii.

 *Prolimfocitul* are un diametru de 8-10 μ, nucleu rotund, cromatina dispusă în benzi şi ochiuri densificate, prezentând un nucleol. Citoplasma este bazofilă, agranulară.

 *Limfocitele adulte* sunt celule rotunde cu dimensiuni variate: între 7-9 μ (limfocite mici), 12–14 μ (limfocite mijlocii), sau 16–20 μ (limfocite mari). Nucleul este sferoidal sau uşor incizat, situat central, cromatina dispusă în benzi neregulate; nu prezintă nucleol.

 *Plasmocitul* este o celulă sferoidală sau ovalară, cu un nucleu mare, situat excentric, cromatina nucleară dispusă în blocuri cromatiniene, orientate ''în spiţă de roată'', citoplasmă abundentă, intens bazofilă (datorită concentraţiei crescute de ribonucleoproteine.

 Limfocitele, plasmocitele şi seria monocito-macrofagică formează sistemul imun al organismului, în care limfocitele au rolul principal prin secreţia de anticorpi, reglarea imunologică, reacţiile citotoxice, hipersensibilitatea de tip întârziat etc.

**Megacariopoieza**

 Reprezintă filiaţia seriei trombocitare pornind de la celula stem pluripotentă, via unitatea formatoare de colonii megacariocitare şi compartimentul de megacariocite, până la trombocitul circulant.

 Compartimentul progenitorilor seriei megacariocitare este heterogen având diferite grade de diferenţiere: unitatea formatoare de colonii megacariocitare de tip *exploziv*: CFU-MegB, unitatea formatoare de colonii megacariocitare: CFU-Meg şi compartimentul de megacariocite (megacarioblaştii si megacariocitele observate prin microscopie optică).

 Precursorii megacariocitari sunt reprezentaţi de: megacarioblast, megacariocit bazofil, megacariocit granular.

 Megacarioblastul este o celulă mare (30-40μm), de aspect neregulat, cu un nucleu mare, rotund, ovalar sau trapezoidal, cromatina densă, cu nucleoli; citoplasmă bazofilă, agranulară; raportul nucleo-citoplasmatic este în favoarea nucleului.

 Megacariocitul bazofil este o celulă mai mare decât megacarioblastul (40-50 μm), cu nucleul polilobat, cromatină densă, citoplasmă intens bazofilă, conţinând puţine granulaţii azurofile.

 Megacariocitul granular este o celulă mare (50-100 μm) cu nucleu polilobat, cromatină condensată, citoplasmă abundentă (raport nucleo-citoplasmatic in favoarea citoplasmei), acidofilă, cu prelungiri conţinând numeroase granulaţii azurofile, care atunci când se grupează câte 10-12 eliberează trombocitele prin fragmentarea citoplasmei.

 Trombocitelesunt fragmente de citoplasmă megacariocitară, de formă discoidală, având 2-4 μm, anucleate, cu o durată de viaţă de 8-11 zile. Numărul normal de trombocite aflat în circulaţia generală este de 150.000-450.000/μl (reprezentând 2/3 din numărul total de trombocite, restul de 1/3 fiind sechestrat în splină). Structural, trombocitele prezintă trei zone: o zonă periferică, zona sol-gel,zona organitelor. Principalul rol al trombocitelor este în hemostaza.

***Medulograma***

 Reprezintă exprimarea procentuală a celulelor seriilor medulare. Prezintă variaţii fiziologice şi în mod normal, un aspect heterogen al celularităţii măduvei osoase hematogene (MOH). Oferă informaţii legate de celularitatea medulară, raportul G/E (normal 3/1), gradul de diferenţiere şi maturare al celulelor medulare, numărul de mitoze, prezenţa celulelor străine.

**Medulograma ( după WINTROBE)**

|  |  |
| --- | --- |
| **MIELOBLAŞTI** | **0,5-5%** |
| **PROMIELOCITE** | **1-8%** |
| **MIELOCITE NEUTROFILE** | **5-10%** |
| **MIELOCITE BAZOFILE** | **0-0,5%** |
| **MIELOCITE EOZINOFILE** | **0,5-3%** |
| **METAMIELOCITE** | **13-22%** |
| **GRANULOCITE NEUTROFIL** | **7-30%** |
| **GRANULOCITE BAZOFILE** | **0-0,7%** |
| **GRANULOCITE EOZINOFILE** | **0,5-4%** |
| **PRECURSORI LIMFOCITARI** | **3-17%** |
| **PLASMOCITE** | **0-2%** |
| **MONOCITE** | **0,5-5%** |
| **CELULE RETICULARE** | **1-2%** |
| **MEGAKARIOCITE** | **0,03-3%** |
| **PROERITROBLAŞTI** | **1-8%** |
| **ERITROBLAŞTI** | **7-32%** |

**Explorarea seriei eritrocitare**

**Hemoleucograma**

 Este un test screening hematologic care constă în determinarea următorilor parametri: număr de eritrocite, concentraţia de hemoglobină, hematocrit, indici eritrocitari (VEM, HEM, CHEM), lărgimea distribuţiei eritrocitare (RDW), număr de leucocite şi formula leucocitară, număr de trombocite şi indici trombocitari: volumul trombocitar mediu (VTM) şi lărgimea distribuţiei trombocitare (PDW), număr de reticulocite.

*Numărul de eritrocite*

 Evaluează eritropoieza, în corelaţie cu hematocritul şi concentraţia hemoglobinei fiind un test util pentru detectarea anemiei şi poliglobuliei. Valorile variază în funcţie de vârstă şi sex:

 - bărbaţi: 4,2-5,6 x 106 /μL

 - femei : 3,8-5,2 x106/μL

 Scăderea numărului de eritrocite apare în anemii, iar creşterea numărului de eritrocite apare în poliglobulii.

*Hematocritul (Ht)*

 Reprezintă raportul dintre volumul eritrocitar şi volumul sanguin total, fiind dependent de masa eritrocitară, volumul eritrocitar mediu şi volumul plasmatic. Valorile variază în funcţie de vârstă şi sex:

 - bărbat: 40- 45%

 - femeie 36-40%

Scăderea Ht se întâlneşte în anemie, creşterea volumului plasmatic (sarcină), iar creşterea sa în poliglobulii şi stări însoţite de hemoconcentraţie (şoc, poliurie, aport insuficient de lichide).

*Hemoglobina (Hb)*

 Reprezintă principalul element al eritrocitelor fiind implicată în transportul gazelor în sânge (fiecare gram de Hb transportă 1,34 ml O2), sistemele tampon.

 Valorile variază în funcţie de vârstă şi sex:

 - bărbat: 13,0-16,0 g/dl

 - femeie: 12.0-15,0 g/dl

 Valoarea Hb scade în anemii şi creşte în poliglobulii.

*Indicii eritrocitari*

*Volumul eritrocitar mediu (VEM)*

 VEM = Ht(%) x 10 / Nr. eritrocite x 106 μL

 Permite depistarea precoce a unor situaţii care vor cauza anemie.

 Valori normale: 80-95 fL anemie normocitară

 < 80 fL anemie microcitară

 > 100 fL anemie macrocitară/megalocitară

*Hemoglobina eritrocitară medie (HEM)*

 HEM = Hb(g/dl) x 10/Nr. eritrocite x 106 μL.

 Valori normale: 26-32 pg /dL normocromie

 < 26 pg/dL anemie hipocromă

*Concentraţia eritrocitară medie de Hb (CHEM)*

 CHEM=Hb(g/dl)x100/Ht(%)

 Valori normale: 32-36 g/dl normocromie

 < 30 g/dl anemie hipocromă

*Lărgimea distribuţiei eritrocitare (RDW)*

 Apreciază heterogenitatea volumului celular (gradul de anizocitoză).

 Se calculează cu analizorul automat după formula:

 RDW(CV%) = deviaţia standard a mărimii eritrocitelor x 100/ VEM

 Valori normale: 11,6-14,8 coeficient de variaţie (CV) a volumului eritrocitar. Este util în caracterizarea iniţială a anemiilor, diferenţierea β-talasemiei minore necomplicate de anemia feriprivă, anemiei din bolile cronice de anemia feriprivă incipientă [6].

***Viteza de sedimentare a hematiilor (VSH)***

 Reprezintă rata la care sedimentează hematiile dintr-o probă de sânge anticoagulat în decurs de o oră. VSH-ul este cu atât mai mare cu cât hematiile sedimentează mai repede. Valori normale: bărbaţi: < 50 ani: <15mm/h ; >50 ani: <20mm/h

 femei: < 50 ani: <25mm/h ; >50 ani: <30mm/h

VSH crescut: neoplazii, inflamaţii, infecţii, colagenoze, gamapatii monoclonale, infarct miocardic acut, postoperator.

VSH scăzut: policitemia vera, infecţii virale, alergie acută, insuficienţă cardiacă.

***Determinarea duratei de viaţă a ertrocitelor (DVE)***

 Se realizează prin marcare radioactivă utilizând substanţe încorporate selectiv în eritroblaşti (Fe59, glicină marcată cu N15) sau în eritrocitele circulante de vârste diferite (Cr51). DVE se determină din timpul de înjumătăţire a radioactivităţii corectat.

***Reticulocitele***

 Sunt eritrocite anucleate tinere care conţin resturi de acizi nucleici (ARN). Apar pe frotiul colorat Wright-Giemsa ca macrocite policromatofile. Materialul nuclear se colorează cu coloranţi supravitali (albastru de cresil briliant sau albastru de metilen).

 Determinarea numărului de reticulocite aduce informaţii legate de capacitatea regenerativă medulară, permiţând diferenţierea anemiilor produse prin mecanism central (a/hiporegenerative) de cele produse prin mecanism periferic (hiperregenerative), monitorizarea răspunsului la terapia cu fier, vitamina B12, acid folic, evaluarea eritropoiezei în aplazia medulară sau posttransplant medular.

 Valori normale: 0,5-2% din numărul total de eritrocite

 %Rt corectat = % Rt x Ht pacient/45

*Fracţia reticulocitelor imature (IRF)*

 Reprezintă procentul de reticulocite cu un conţinut crescut sau intermediar de ARN, fiind un parametru mai sensibil şi mai specific pentru monitorizarea regenerării medulare posttransplant, postchimioterapie, monitorizarea tratamentului şi clasificarea anemiilor

 Valori normale: bărbaţi: 2,3 - 13,4%

 femei: 3,0 - 15,9%

*Coloraţia vitală cu albastru cresil pentru reticulocite*

 Albastru de cresil colorează vital substanţa granulo-filamentoasă a reticulocitului, care apare de culoare albastru închis pe fondul albastru deschis al celulei.

***Frotiul de sânge periferic***

 Frotiul de sânge periferic se efectuează din sângele venos recoltat pentru hemogramă sau dintr-o picătură de sânge capilar obţinută din deget. Se realizează pe lamele sau lame de sticlă bine degresate şi uscate. Picătura de sânge este întinsă pe suprafaţa lamei, este uscată la aer, fixată cu metanol anhidru şi colorată May-Grunwald-Giemsa (MGG - conţine albastru de metilen convertit la azur metilen şi eozină)***.*** Azur metilenul este un colorant bazic care colorează structurile celulare acide în albastru violet (acizi nucleici, proteine), iar eozina colorează componentele celulare bazice în roz-portocaliu (elemente citoplasmatice, Hb). Granulaţiile leucocitare se colorează diferit în funcţie de proprietăţile lor.

 Frotiul astfel colorat se examinează la microscop, iniţial cu obiectivul de 10x/20x (pentru evaluarea coloraţieişi distribuţiei celulare, estimarea numărului de leucocite şi existenţa elementelor anormale, agregate eritrocitare sau trombocitare), apoi cu obiectivul de 100x cu imersie, fiecare tip celular fiind evaluat cantitativ şi morfologic.

 În mod normal nu trebuie să existe anomalii morfologice pe frotiu.

 Pe frotiul de sânge periferic se evaluează:

- eritrocitele din punct de vedere al variaţiilor de mărime (anizocitoză - microcite, macrocite),

 formă (poikilocitoză - sferocite, dacriocite, ovalocite, hematii "în semn de tras la ţintă", stomatocite, schizocite, acantocite), distribuţia Hb (anizocromie - normocromie, hipocromie, policromatofilie), prezenţa incluziunilor intraeritrocitare (inele Cabot, corpi Howell-Jolly punctaţii bazofile, corpi Pappenheimer);

- leucocitele - se evaluează distribuţia şi morfologia leucocitară (anomalie Pelger-Hüet, hipersegmentare nucleară, granulaţii toxice, hipogranulare, corpi Döhle, anomalie Adler-Reilly, sindrom Chédiak-Higashi, vacuolizări citoplasmatice, limfocite reactive, umbre Gumprecht, celule Türk, blaşti, celule păroase, celule limfomatoase);

- trombocitele - se evaluează numărul şi morfologia trombocitară (macrotrombocite, trombocite gigante, agregate trombocitare, trombocite agranulare, fragmente de megakariocite).

***Studiul hemosiderinei medulare (coloraţia Perls)***

 Coloraţia Perls cu albastru de Prusia evaluează prezenţa depozitelor totale de fier la nivel medular şi compartimentarea fierului în macrofage şi eritroblaşti. Coloraţia se bazează pe reacţia albastrului de Prusia în mediu acid (format din HCl diluat şi ferocianură de potasiu), cu eliberarea fierului liber şi fixat, ionii ferici precipitând ca ferocianură ferică insolubilă, de culoare albastră.

 Granulele de fier neheminic de culoare albastră pe fondul roz-portocaliu celular sunt reduse numeric(1-6) sau absente în anemia feriprivă. În anemia sideroblastică granulele albastre de hemosiderină apar localizate în eritroblaşti (sideroblaşti) iar în anemia inflamatorie cronică în macrofage.

***Determinarea feritinei***

 Feritina este o formă de depozit a fierului intracelular, alături de hemosiderină şi un reactant de fază acută (nivelul ei creşte şi în situaţii care nu se corelează cu deficitul de fier: infecţii, inflamaţii, neoplazii, boli cronice Feritina se determină din sânge venos, recoltat fără anticoagulant, prin metoda imunochimică cu detecţie prin electrochemiluminiscenţă.

 Valori normale: bărbaţi: 30 - 400 μg/L

 femei: 13-150 μg/L

 Creşteri peste 400 μg/L evidenţiază o supraîncărcare cu fier: boli hepatice parenchimatoase, infecţii, inflamaţii, tumori, hipertiroidism, anemie megaloblastică, hemolitică, sideroblastică, talasemie, porfirie cutanată tardivă.

 Scăderea sub 12 μg/L: anemie feriprivă necomplicată

***Receptorul solubil al transferinei (sTfr)***

 Concentraţia serică a sTfr este un indicator mai fidel decât feritina pentru aprecierea statusului fierului în organism, nivelul lui fiind invers proporţional cu depozitele de fier din organism, nefiind influenţat de reacţiile de fază acută. Deficitul de fier induce creşterea exprimării receptorilor transferinei pe suprafaţa celulară şi indirect nivelul sTfr, iar supraîncărcarea cu fier are un efect invers .

 Valori normale: bărbaţi: 2,2 - 5,0 mg/dl

 femei: 1,9 - 4,4 mg/dl

 Valorile cresc în afecţiuni cu eritropoieză hiperplazică (anemii hemolitice, feriprive), afecţiuni cu eritropoieză ineficientă (SMD, anemie megaloblastică), tratament cu EPO. Valorile scad în afecţiuni cu eritropoieză diminuată (aplazie medulară, posttransplant, IRC), supraîncărcare cu fier.

***Vitamina B12 serică***

 Determinarea concentraţiei vit.B12 serice este indicată în anemia megaloblastică, gastrita atrofică, gastrectomie, afecţiuni ale ileonului terminal, etilism cronic, dietă vegetariană prelungită, ingestie îndelungată de inhibitori de pompă de protoni sau blocanţi de receptori H2, SIDA.

 Valori normale: 191-663 pmol/L sau 200-900 pg/ml

 Valori crescute apar în: LMC, LAP, LLC, policitemia vera, injurie renală, cancer metastatic însoţit de reacţie leucemoidă sau afectare hepatică, hepatom, hepatite, ciroză, diabet zaharat, obezitate, insuficienţă cardiacă congestivă.

 Valori scăzute se întâlnesc în: anemia megaloblastică

***Folaţii serici***

Determinarea folaţilor serici este indicată în: diagnosticul diferenţial al anemiei megaloblastice, etilism cronic, sindroame de malabsorbţie, afecţiuni hepatice cronice, malnutriţie, monitorizarea tratamentului cu anticonvulsivante.

 Valori normale: 4,6 - 18,7 ng/ml (ng/ml x 2,27 = nmol/L).

 Valori crescute: vegetarieni, deficit de vit B12, sindrom de ansă oarbă

 Valori scăzute: anemie megaloblastică prin deficit de folaţi.

**Anemia feriprivă**

*Explorarea de laborator în anemia feriprivă:*

- scăderea Hb, Ht, nr. hematii;

- indicii eritrocitari evidenţiază microcitoză şi hipocromie;

- sideremia semnificativ scăzută ( sub 70μg%);

- protoporfirina liberă eritrocitară semnificativ crescută (până la 600 μg%);

- siderofilina crescută peste 250-350 mg/dl;

- capacitatea latentă de saturaţie a siderofilinei crescută prin scăderea sideremiei;

- capacitatea totală de saturaţie a siderofilinei crescută ca urmare a creşterii transferinei în valoare absolută ;

- coeficient de saturaţie scăzut sub 15% ; feritina serică mult scăzută ( < 10μg/l);

- feritina eritrocitară scăzută;

Examenul frotiului de sânge periferic evidenţiază: microcitoză, poikilocitoză, hipocromie; uneori anulocite; curba Price-Jones deviată la stânga;

-reticulocitoză uşoară;

- nr.leucocite normal, formulă leucocitară normală;

- trombocitoză .

Examenul MOH relevă o măduvă hiperplazică, cu hiperplazie eritroblastică, ″eritroblaşti feriprivi″: mici, bazofili si policromatofili, cu citoplasma redusă, margini franjurate.Coloratia Perls arată reducerea marcată sau absenţa hemosiderinei medulare.

**Anemia megaloblastică**

*Explorarea de laborator în anemia megaloblastică*

-scăderea Hb, Ht, nr.hematii

 Indicii eritrocitari evidenţiază megalo-macrocitoză şi normocromie.

 Examenul frotiului de sânge periferic arată: anizocitoza cu megalocitoză, poikilocitoză cu ovalocitoză, normocromie, prezenţa de incluziuni intraeritrocitare (corpi Howell–Jolly, inele Cabot), punctaţii bazofile ;

- reticulocitopenie

- leucopenie cu granulocite hipersegmentate

- trombocitopenie cu macrotrombocite.

 Examenul măduvei osoase hematogene evidenţiază „măduva albastră" hiperplazică, eritropoieză megaloblastică, metamielocite gigante, megakariocite cu nucleu „ în explozie”; coloraţia Perls arată hemosiderină medulară crescută.

- scăderea cobalaminei serice sub 100 pg/ml

- creşterea homocisteinei şi acidului metil-malonic

- creşterea bilirubinemiei indirecte

- prezenţa anticorpilor anti-factor intrinsec sau anticelule parietale gastrice

- anaciditate gastrică histamino-refractară

- EDS - atrofia mucoasei gastrice

- testul Schilling pozitiv.

In anemia megaloblastică prin deficit de acid folic tabloul hematologic este asemănător dar nivelul vit B12 este normal, folatemia este < 3 ng/ml, testul Schilling este negativ.