

# STUDIUL PERMEABILITĂȚII MEMBRANEI ERITOCITARE PRIN RMN ÎN ANEMIA MEGALOBLASTICĂ (BIERMER)

*Study of erythrocyte membrane permeability using NMR in megaloblastic anemia*

Dr. Gheorghe Stoian, Dr. Ruxandra Gătina, Conf. Dr. Nicolae Baltă  
Universitatea din București

## REZUMAT

În această lucrare s-a cercetat prin rezonanță magnetică nucleară (RMN) permeabilitatea membranei eritrocitare în anemia megaloblastică, inclusiv în condițiile administrării medicației specifice (vitamina B<sub>12</sub>, acid folic). Cercetarea a fost posibilă datorită faptului că membrana eritrocitului este accesibilă investigațiilor de RMN utilizând următoarele teste: timpul de viață a protonului în eritrocit; timpii de relaxare pe sedimentul eritrocitar (T<sub>2a</sub>), timpii de relaxare protonică transversală în plasmă (T<sub>2b</sub>); permeabilitatea membranelor eritrocitare pentru apă (PMEA).

Investigațiile efectuate prin rezultatele obținute au contribuit la aprofundarea cunoștințelor asupra funcționalității membranei eritrocitare în condiții fiziologice și patologice, în diferite forme clinice de anemie, cu precădere anemia megaloblastică.

**Cuvinte cheie:** rezonanța magnetică nucleară, anemie, permeabilitate membranelor eritrocitare

## ABSTRACT

In this paper, we investigated by nuclear magnetic resonance (NMR) erythrocyte membrane permeability in megaloblastic anemia, including specific conditions of medication (vitamin B12, folic acid). The research was possible because the erythrocyte membrane is accessible to NMR investigations using the following tests: the proton lifetime in erythrocyte, erythrocyte sediment relaxation times (T2a), and transverse proton relaxation times in plasma (T2b), erythrocyte membrane permeability for water (PMEA).

Investigations were carried out by the results obtained have contributed to increasing knowledge on the functionality of red blood cell membrane in physiological and pathological conditions, in different clinical forms of anemia, especially in megaloblastic anemia.

**Key words:** nuclear magnetic resonance, anemia, erythrocyte membrane permeability

## INTRODUCERE

Tehnica de rezonanță magnetică nucleară (RMN) permite efectuarea unor studii asupra permeabilității membranei eritrocitului în condiții fiziologice, precum și în diverse circumstanțe clinice hematologice, investigate în prezenta lucrare.

Membrana eritrocitului ilustrează starea funcțională (și capacitatea celulei de a se reînnoi în cursul celor 120 de zile de viață a hematiei), este accesibilă investigațiilor RMN (Baltă, 1998) ori imagistice (Constantinescu et al., 2010) care permit evidențierea modificărilor de permeabilitate, iar rezultatele

obținute pot contribui la o mai bună cunoaștere a fiziopatologiei diferitelor forme clinice de anemie, a procesului de îmbătrânire și, de asemenea, la corecta interpretare a mecanismelor patologice a bolilor hematologice.

## OBIECTIVUL ȘI METODOLOGIA DE STUDIU

Obiectivul acestui studiu este de a evidenția, evalua și interpreta modificările de permeabilitate la nivelul membranelor eritrocitare prin metoda de rezonanță magnetică nucleară, în diferite forme clinice de anemie în raport cu loturi de martori

Adresa de corespondență:

Dr. Gheorghe Stoian, Universitatea din București, Splaiul Independenței Nr. 91-95, București  
e-mail: gigistoian2007@yahoo.com

formate din persoane sănătoase și bolnave (cu alte boli considerate nehematologice). Modul de abordare este original și inedit.

Determinările s-au realizat pe eritrocite și în plasma provenită de la bolnavi cu anemie megaloblastică (10 cazuri), bolnavi cu alte forme de anemii (30 cazuri), precum și pe un lot martor format din persoane sănătoase (30 cazuri) și un lot de 100 de bolnavi cu alte boli decât anemie, selecționate aleator (după criteriul hazardului). Unele forme de anemie au beneficiat de tratament medicamentos.

În anemia megaloblastică, determinările RMN s-au făcut în fiecare caz în perioadele fără tratament, în timpul și după efectuarea tratamentului medicamentos adecvat (cu vitamina B12 – 50-100  $\mu\text{g}$ ) timp de 15 zile asociat sau nu cu acid folie în doze de 4-8 mg kg/corp.

Metoda utilizată a fost RMN pentru a determina: *permeabilitatea membranelor eritrocitare pentru apă (PMEA); timpul de viață al protonilor în eritrocit; energiile de activare ale proceselor de relaxare protonică transversală în plasma (T2b) și din sedimentul eritrocitar (T2a); energia de activare a schimbului de apă prin membrana eritrocitară; determinarea timpilor de relaxare protonică a apei intra și extraeritrocitare; determinarea timpului de schimb al protonilor din membrana eritrocitară.*

Principiul metodei constă în caracterizarea unui sistem format din 2 componente (A și B) de doi timpi de relaxare,  $T_{2a}$  și  $T_{2b}$  ai aceluiași tip de nucleu (ce provin din respectivele compartimente). În sistemul eritrocite-plasmă avem de a face cu același tip de molecule distribuite. În compartimentele A și B, timpii de relaxare sunt corespunzător diferiți,  $T_{2a}$  și  $T_{2b}$ . Compartimentul A reprezintă pe cel intraeritrocitar, iar compartimentul B reprezintă compartimentul extracelular, respectiv plasma sanguină.

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele obținute prin metoda RMN asupra permeabilității membranare eritrocitare pot fi considerate argumente aduse în sprijinul ipotezei potrivit căreia anemiile antrenează modificări de permeabilitate ale membranei eritrocitare în grade diferite variate în funcție de etiopatogenia lor. Explorarea PMEa ilustrează existența acestor modificări, ceea ce sugerează din punct de vedere teoretic implicarea lor și în durata de viață a hematiei apreciată la circa 40 de zile în anemia megaloblastică. Se constată că PMEa este mult diferită în anemia megaloblastică în raport cu alte forme de anemii (de exemplu, anemia feriprivă) sau cu lotul persoanelor sănătoase și a celor cu boli nehematologice (de exemplu, hipertensiunea arterială).

Urmărindu-se modificările în funcționalitatea membranelor eritrocitare la bolnavii cu anemie megaloblastică (dar și cu alte forme clinice de anemie) în timpul tratamentului cu vitamină B12, acid folic sau cu preparate din fier, se evidențiază îmbunătățirea funcțională a permeabilității membranei odată cu ameliorarea simptomatologiei clinice ca reacție de răspuns la tratamentul medicamentos menționat.

Tulburări ale permeabilității membranei eritrocitare pentru apă din anemia Biermer antrenează modificări ale indicilor eritrocitari. În mod asemănător la bolnavii hipertensivi în stadiu incipient, când tonusul arterial este crescut, hematiile reacționează adaptativ față de rigiditatea vaselor prin creșterea de permeabilitate a membranei. Evaluarea în timp a valorilor permeabilității de membrană a eritrocitului la un bolnav hipertensiv ar putea fi considerată o modalitate de apreciere a riscului pentru posibile evenimente acute cardiovasculare. Se explică de ce asocierea anemiei Biermer cu hipertensiunea arterială, reprezintă o condiție favorizantă pentru accidente vasculare.

Asocierea unei anemii megaloblastice fără tratamentul specific menționat – cu boală hipertensivă – în care există, de asemenea, o scădere importantă a energiei de activare a proceselor de schimb, crește riscul potențial de apariție a accidentelor cerebrale. Dacă facem o comparație cu martorii nehipertensivi (care prezintă anemii feriprive) se remarcă o creștere a energiei de activare a schimbului de apă prin membrana eritrocitară la aceștia față de lotul hipertensiv, cât și în raport de lotul martor (Baltă, 2009).

Testul de permeabilitate membranară eritrocitară pentru apă prin metoda RMN corelat cu alte analize de laborator cum ar fi fibrinogenemia, calcemia, calciul ionic, contorizarea celulelor sanguine, calcularea indicelui eritrocitar, aprecierea diametrului mediu eritrocitar pe frotiuri din sânge periferic, furnizează date utile fiziopatologiei anemiilor. Examinarea valorilor energiei de schimb protonic transmembranar eritrocitar pe un lot de bolnavi cu anemie Biermer arată diferențe față de lotul martor, precum și față de anemiile nebermeriene, fiind ilustrativă pentru diferențele la cele patru loturi studiate (Fig. 1).

Diferențe se constată și urmărind energia de activare a proceselor de relaxare a plasmei în toate cazurile de anemie Biermer netratată, fiind valori scăzute față de martori (Tabelul 1). În cazurile de anemie megaloblastică tratată se observă că energia de activare a proceselor de relaxare a apei intraeritrocitare este crescută față de martori și în raport cu alte forme clinice de anemie.

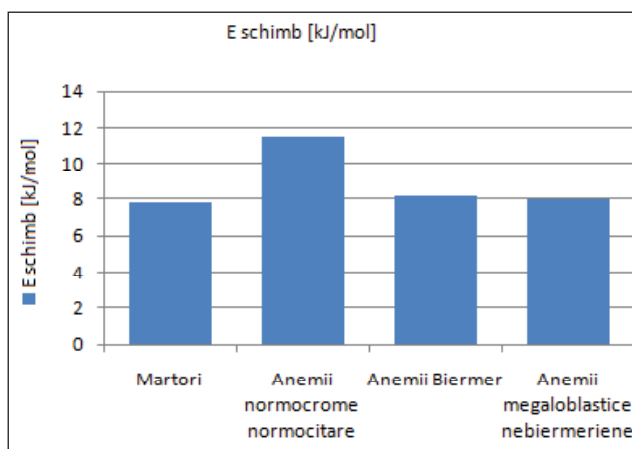
**TABELUL 1.** Energia de activare a proceselor de relaxare a plasmăi în cazurile de anemie Biermer înainte și după de tratament, anemie feriprivă înainte și după de tratament, comparativ cu lotul martor.

		Ea (plasmă) (KJ/mol)	Ea (sediment) (KJ/mol)	Ea (transmembranară eritrocitară)
Anemii feriprive	înainte de tratament	8,75	7,02	8,10
	după tratament	8,48	6,60	10,30
Martor		7,90	7,65	11,35
Anemii Biermer	înainte de tratament	7,10	5,52	3,91
	după tratament	8,98	8,30	8

Energia de activare a proceselor de schimb are valoare redusă, de 3,95 KJ/mol, înainte de administrarea tratamentului, față de 11,35 KJ/mol la lotul martor. Tratamentul aplicat în anemia Biermer corectează valorile energiei de activare ale proceselor de relaxare a protonilor astfel încât permeabilitatea (PMEA) să crească suficient apropiindu-se de valorile martorilor. În acest fel, permeabilitatea favorizează flexibilitatea cu trecerea facilă prin capilare a hematiei. Permeabilitatea membranelor eritrocitare pentru apă asigură capacitatea de acomodare a deformabilității hematiei pentru a parcurge lumenul capilar. Din cauza deformabilității scăzute, eritrocitele bătrâne nu pot străbate lumenul capilar.

Pe lângă modificarea în timp a permeabilității membranelor eritrocitare pentru apă (PMEA), în cazul anemiilor megaloblastice și feriprive, se mai constată și o creștere importantă a energiei de activare a proceselor de relaxare protonică a apei intraeritrocitare după tratament cu vitamină B<sub>12</sub>, cu o revenire a valorilor permeabilității membranelor eritrocitare pentru apă înspre valorile înregistrate la martori (persoane fără boli hematologice sau de altă natură). Se știe că vitamina B<sub>12</sub> este un factor necesar tuturor celulelor pentru dezvoltarea și funcționarea lor normală, iar absența este urmată de modificări ale celulelor. În cazul hematiei, aceste constatări sunt evidente în permeabilitatea membranelor eritrocitare pentru apă și ioni.

Din figură se observă că energia de activare (Ea) a proceselor de relaxare a apei intraeritrocitare este mai scăzută în toate cazurile, exceptând anemiile



**FIGURA 1.** Energia de activare a proceselor de schimb protonic transmembranar eritrocitar la pacienții anemici comparativ cu martorii

Biermer tratate; această micșorare a Ea eritrocitară semnifică faptul că, la creșterea temperaturii, timpul de relaxare protonică transversală crește mai puțin decât normal. Dovedind un deficit energetic, apa intraeritrocitară stagnează mai mult decât este necesar pentru buna desfășurare a proceselor metabolice intraeritrocitare. S-ar explica de ce bolnavii anemici suportă mai greu, din punct de vedere intim celular, boala febrilă sau canicula.

## CONCLUZII

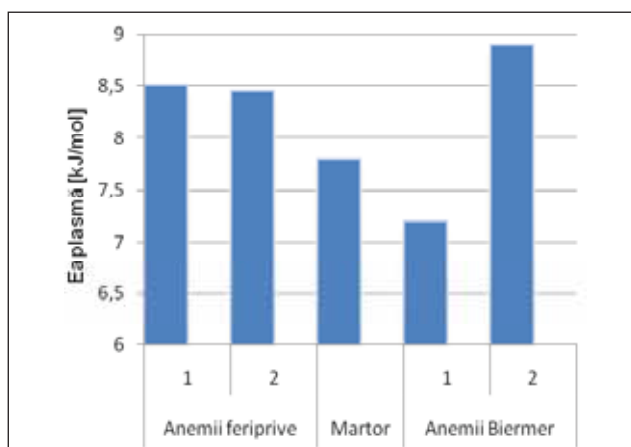
Investigațiile moderne cu metodologia RMN pun în evidență modificări în funcționalitate a membranelor eritrocitare în diferite forme clinice de anemie cu predilecție anemia pernicioasă și ar putea contribui la o mai bună înțelegere a mecanismelor patogenetice a anemiei megaloblastice, cu privire la durata de viață a hematiei, apreciată la cca. 40 de zile în cazul anemiei Biermer.

Utilizarea simultană a RMN cu investigațiile moderne biochimice asupra membranelor eritrocitare contribuie la evidențierea a mai multor modificări patologice ce privesc compoziția protido-lipidică, permeabilitatea pentru apă și ioni, care diferă în anemia megaloblastică față de alte forme clinice de anemie.

Prin tehnica RMN s-a putut identifica și evalua unele posibile corelații între schimburile ce survin în transportul apei prin membrana eritrocitară pre-

**TABELUL 2.** Timpul de viață al protonului în eritrocit ( $\tau$ ), permeabilitatea membranelor eritrocitare pentru apă (PMEA), timpii de relaxare protonică transversală în plasma (T2b), timpii de relaxare pe sediment eritrocitar (T2a)

	$\tau$ (ms)	PMEA (cm/s)*10 <sup>-3</sup>	T2b (ms)	T2a (ms)	Nr. cazuri
Martori	20,58 ± 0,6	3,46 ± 0,17	2,23 ± 0,05	149,3 ± 8	15
Anemii megaloblastice	17,59 ± 0,48	5,53 ± 0,4	1,83 ± 0,11	209,92 ± 17,2	10
Anemii feriprive	27,3 ± 1,4	2,1 ± 0,2	2,32 ± 0,14	170,58 ± 16,8	10



**FIGURA 2.** Energia de activare pentru procesele de relaxare ale apei plasmatice la anemia megaloblastică (Biermer), anemia feriprivă, comparativ cu un lot martor. 1. Înainte de tratament; 2. După tratament.

cum și modificările structural-funcționale în anemia megaloblastică (anemia Biermer) unde sideremia este întotdeauna crescută. Răspunsul favorabil la administrarea de vitamina B12 poate influența și activitatea membranei eritrocitului.

În anemia Biermer netratată, se remarcă o creștere a energiei de activare a schimbului de apă prin membrana eritocitară, comparativ cu lotul martor, format din persoane sănătoase și din bolnavi care suferă de alte îmbolnăviri ca: HTA, ulcer duodenal, litiază renală, obezitate. La lotul considerat martor nu se evidențiază nici o modificare a energiei de activare a transportului apei prin membrane eritocitare. Energiile de activare a proceselor de relaxare

a protonilor din sediment sunt scăzute la anemii față de lotul martor, cu excepția anemiei Biermer, tratată.

Timpii de relaxare protonică transversală a apei din sedimentul eritocitar (T2a) au valori ridicate în anemiile megaloblastice, fapt ce indică o diluare a conținutului eritocitar prin aportul mărit de apă, favorizat de creșterea importantă a permeabilității membranei eritocitare pentru apă.

Populațiile de hematii microcitare au PMEAs scăzută față de martor, în timp ce populațiile de hematii macrocitare prezintă PMEAs crescute în raport cu martorii, valorile PMEAs apropiindu-se de valorile martorilor în cazul tratamentului substitutiv cu fier (în anemia feriprivă) și cu vitamina B12 în anemia Biermer.

Testul RMN ar putea fi o modalitate utilă în evaluarea funcțională a membranei eritrocitului în condiții normale și patologice, ca în cazul anemiilor feriprive și megaloblastice. Studiile de imagistică confocală prin marcarea eritrocitului cu hipericină corelează datele biofizice ale modificărilor parametrilor de transport al apei și confirmă, prin altă metodă, alterarea membranei eritocitare în stări patologice ori senescență (Constantinescu et al., 2010; Stoian et al., 2010; Dobreanu, 2011).

Parametrii ilustrativi pentru PMEAs în relație cu testele ce evidențiază tulburări ale metabolismului lipidic arată prezența unor modificări structurale și funcționale ale membranei eritocitare (în raport cu lotul martor) care atestă participarea acestor schimbări la patogenia anemiilor megaloblastice.

## BIBLIOGRAFIE

- Baltă N. – Unele considerații despre colesterolului ca factor prioritar în dinamica aterosclerozei sistemice. *Cliujul Medical* 82:309, 2009.
- Baltă N. – Anemia Biermer diagnosticată prin RMN. Comunicare. I.F.N.P. 1998.
- Baltă N., Gătina R., Ioan M., Stoian G. – Unele considerații privind permeabilitatea membranei eritrocitului în anemii. Comunicare I.F.N.P. 1998.
- Baltă N., Stoian Gh., Boca A., Burtea C., Petec Gh., Moisin C., Teleianu C., Dumitru I.F. – Biochemical and histo-enzymological investigations of the myocardium and coronary system in assessing experimental cardiac hypertrophy. *J. Med. Biochem.* 1:161-182, 1997.
- Beris P., Tobler A. – Diagnostic de l'anémie. *Med. Hyg.* 55:1812-1816, 1997.
- Constantinescu A.A., Dobreanu M., Popoiu G., Tanase A., Sturzoiu C., Stoian Gh. – Studying the aging of banked erythrocytes using a fluorescence marker, hypericin *Analele Științifice ale "Universității Alexandru Ioan Cuza" din Iași, Genetică și Biologie Moleculară*, TOM XI, 183-196, 2010.
- Dobreanu M. – Monitorizarea parametrilor hematologici din concentratele eritocitare în scopul evaluării vitalității eritrocitelor pe perioada de stocaj până la utilizare, Teză doctorat, Universitatea din București, București, 2011.
- Gătina R., Baltă N. – Studiul afectării membranelor celulare în anemii prin RMN. Comunicare. Al XXX-a Simpozion Național de Morfologie Normală și Patologică Inst. V. Babeș, 1999<sup>o</sup>.
- Gătina R., Baltă N., Botea S. – Spectroscopie RMN în impulsuri pentru determinarea permeabilității membranare eritocitare în diferite forme de anemii. Al XXX-a Simpozion Național de Morfologie Normală și Patologică Inst. V. Babeș, 1999<sup>o</sup>.
- Goodnough L. T., Monk T.G., Andriole G.L. – Erythropoietin therapy. *N Engl J Med.* 336:933-938, 1996.
- Popescu R.E. – Hematologie clinică. Pag. 105, Ed. Med. 1966.
- Provan D., O'Shaughnessy D.F. – Recent advances in haematology. *Clinical Review. Br. Med. J.* 318: 991, 1999.
- Smith A.G. – Tratamentul anemiei și al deficitului de fier. Update 3:172-177, 1998.
- Stoian Gh., Constantinescu A.A., Dobreanu M., Sturzoiu C., Ungureanu A. – Metodă imagistică de analiză a viabilității eritocitare. *Brevet RO 126187 A0/17.11.2010*
- Toh B.H., Van Driel, I.R., Gleeson, P.A. – Pernicious anemia. *N Engl J Med.* 337:1441-1448, 1997.
- Vannotti, A. – Scientific raisins from 125 years SMW (Swiss Medical Weekly). Biermer's anemia and hypothyroidism. *Schweiz Med Wochenschr.* 125:1653-1655, 1995