

# Miyokard İnfarktüsü Geçiren Hastalarda Eritrosit İçi 2,3-Difosfogliserat (2,3 DPG) ve ATP Seviyelerinin Tayini

INTRAERYTROCYTIC 2,3-DPG AND A TP LEVELS OF PATIENTS WITH MYOCARDIAL INFARCTION

Doç.Dr.Idris AKKUŞ\*, Bio.Recep GÖKÇE\*, Doç.Dr.AM BAYRAM\*\*, Dr.Abdurrahim KOÇYİĞİT\*, Dr.Ahmet ÇİĞLİ\*, Dr.Hilki PEKER\*\*\*

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi "Biyokimya ABD, "Kardiyoloji ABD, \*\*\*Göğüs Hastalıkları, KONYA

## ÖZET

*Myokard İnfarktüsü (Mİ) geçiren 38-72 yaşları arasındaki (ortalama 48.7+11.8) 31 hasta ile 30-78 yaşları arasındaki (ortalama 55.6+9.96) 42 sağlıklı kişide eritrosit için 2,3-Difosfogliserat (2,3-DPG) ve A TP seviyeleri tayin edildi. Hastalara alt 2,3-DPG seviyesi normallere göre önemli derecede yüksek (P<Q.001), ATP seviyeleri ise düşük (P<0.001) bulundu.*

*Mİ geçiren hastalarda meydana gelen hipoksiye adaptasyonu sağlamak amacıyla 2,3-DPG'in arttığı, bu esnada glikolizin Rapoport-Luebering yoluna sapması sonucu A TP seviyesinin de azaldığı kanaatine varıldı.*

*Bulgularımız literatür bulguları ışığında tartışıldı.*

Anahtar Kelimeler: Miyokard infarktüsü, 2,3-DPG, ATP

T Klin Kardiyoloji 1993, 6:129-132

## SUMMARY

*In this study, we have determined intraerythrocytic 2,3-DPG and ATP levels of 42 healthy controls aged 30-78 (mean 55.6+9.96) years and 31 patients with myocardial infarction (MI) aged 38-72 (mean 48.7+11.8) years 2,3-DPG levels of the patients significantly (P<0.001) increased while A TP levels decreased (P<0.001).*

*The Increase in 2,3-DPG levels was thought to be because of hypoxia occurred after infarction which results in reduction in A TP levels due to the shift of glycolysis to Rapoport-Luebering pathway.*

*Our findings are discussed in view of literature findings.*

Kel Words: Myocardial infarction, 2,3-DPG, ATP

Turk J Cardiol 1993, 6:129-132

Eritrositler; yapıları, metabolizmaları ve fonksiyonları bakımından diğer vücut hücrelerinden farklı özelliktedirler. Olgun eritrositlerin çekirdek ve mitokondri gibi hücre organelleri yoktur (1,2). Bu nedenle aerobik glikoliz ve oksidatif fosforilasyon reaksiyonları oluşmaz, ihtiyaçları olan enerjiyi anaerobik glikoliz yoluyla sağlarlar. Anaerobik glikoliz reaksiyonlarıyla glukoz stoplazmada laktik aside dönüşür ve eritrosit için yeterli miktarda ATP sentezlenir (3-5).

2,3-difosfogliserat (2,3-DPG), eritrosit içi glikoz reaksiyonlarında bir yan ürün olarak sentezlenir. Akut hipoksiye maruz kalınması halinde, 2,3-DPG sentezi artar ve tercihin deoksihemoglobinle birleşerek doku-

lara daha fazla oksijen gitmesi sağlanır (6-11). 2,3-DPG'in sentezlendiği bu iki basamaklı reaksiyon dizisine "Rapoport-Luebering" yolu denir (Şekil 1) (6).

2,3-DPG, O<sub>2</sub>'in Hb tarafından taşınmasında ve dokulara salıverilmesinde düzenleyici bir role sahiptir (6,8). Venöz kandaki 2,3-DPG miktarının arteriyel kandakinden %45 fazla olması bunu doğrulamaktadır (2). Hatta başta 2,3-DPG ve ATP olmak üzere kandaki bazı organik fosfat bileşiklerinin seviyelerinin doku hipoksisinin D<sub>r</sub> ölçüsü olabileceği belirtilmiştir (9).

Miyokard infarktüsünde (MI) kalp debisi azalır (10) ve normalin 2/5'i olan 2L/dak.'ya kadar düşer, gerekli O<sub>2</sub> taşınamaz ve CO<sub>2</sub> uzaklaştırılmaz (11). Buna bağlı olarak da doku hipoksisini geliştirir ve daha az ATP üretilir (10,12).

Bizim bu çalışmadaki amacımız, miyokard infarktüsü geçiren kişilerde dolaşımın yavaşlaması sonucu meydana gelen hipoksiye karşı 2,3-DPG ve eritrosit için ATP miktarlarında meydana gelecek değişiklikleri belirlemektir.

Geliş Tarihi: 26.3.1992

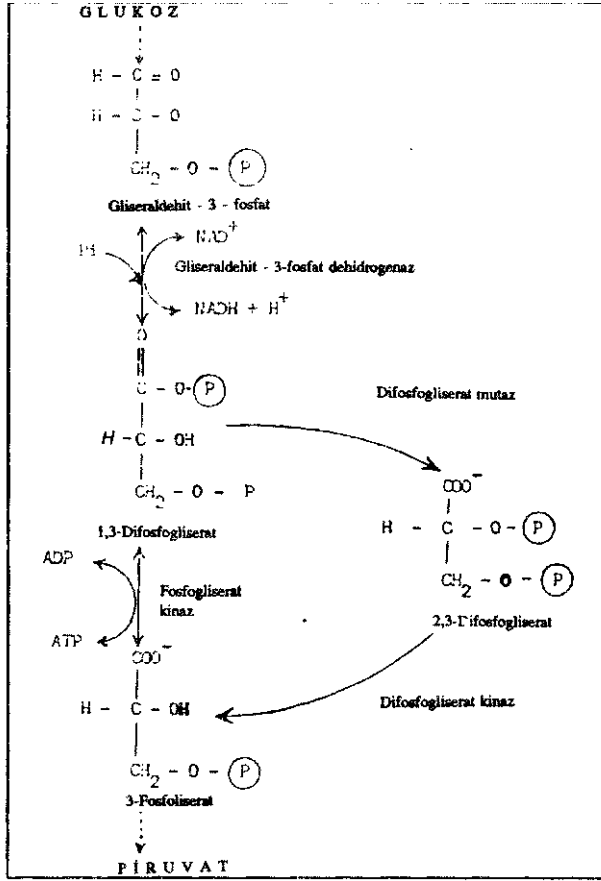
Kabul Tarihi: 30.1.1993

Yazışma Adresi: Doç.Dr.idris AKKUŞ  
S.U.Tıp Fakültesi Biyokimya ABD KONYA

*Bu makale 11-14 Mart 1992 Gevher Nesibe Tıp Günleri Kongresinde poster olarak sunulmuştur.*

TurkJCardiol 1993, 6

129



Şekil 1. Rapoport - Luebenng yolu

## MATERYAL VE METOD

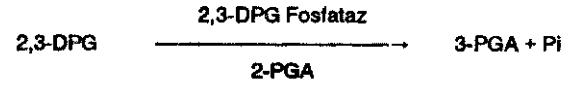
Bu çalışma, ilvil geçirmiş 38-72 yaşları arasında (ortalama  $55.6 \pm 9.96$ ) 31, (29 erkek, 2 kadın) hasta ile 30-78 yaşları arasında (ortalama  $48.7 \pm 11.8$ ) 42, (28 erkek, 14 kadın) sağlıklı kişiden oluşan kontrol grubu üzerinde gerçekleştirildi.

Kontrol grubu ruhsal, metabolik ya da başka bir hastalığı olmayan ve alkol kullanmayan kişilerden seçildi. Her iki gruptan sabah saat  $8.00 - 10.00$  arasında heparinli tüplere 5 ml venöz kan alındı. Hasta gruba ait kan örneklerinin infarktüsünden sonraki ilk üç gün içinde alınmasına özen gösterildi.

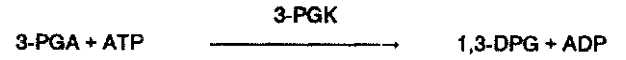
## 2,3-DPG ANALİZİ

2,3-DPG analizi Sigma firmasından temin edilen ticari kitle gerçekleştirildi (13). Çalışmada eritrosit paketi hazırlama yerine doğrudan tam kan kullanıldı. Alınan heparinli kanın 1 ml'si %8'lik 3 ml soğuk TCA çözeltisine ilave edildi. Birkaç saniye çalkalandı. Tüp buzlu suda 5 dakika bekletildi. 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant ayrıldı. Çalışma gününe kadar derin dondurucuda saklandı. En geç bir ay içinde çalışıldı.

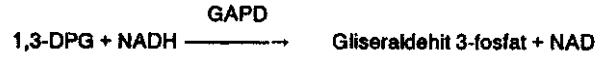
2,3-DPG'nin tayin prensibi şu şekildedir: 2,3-DPG, 3-fosfoglikolik asid ve inorganik fosfora 2,3-DPG fosfataz katalizörlüğünde hidroliz olmaktadır. 2-fosfoglikolik asid (2-PGA) ise bir stimülatör olarak kullanılmaktadır.



3-PGA, 3-fosfoglisarat kinaz (3-PGK) katalizörlüğünde ATP ile reaksiyona girerek 1,3-DPG ve ADP oluşmaktadır.



1,3-DPG, gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz etkisiyle gliseraldehit 3-fosfata (G-3-P) redüklenmektedir. Bu arada NADH da NAD'ye oksitlenmektedir



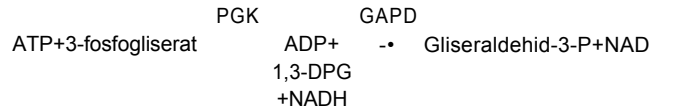
NADH'in 340 nm'deki absorbanısında meydana gelen azalmadan faydalanarak 2,3-DPG seviyesi ölçülebilir. Reaksiyon sonunda oluşan NAD miktarı, 2,3-DPG miktarı ile orantılıdır.

## ATP ANALİZİ

ATP analizi de Sigma firmasından temin edilen ticari kit ile gerçekleştirildi (14). Alınan heparinli kanın 1 ml'si %12'lik 1 ml soğuk TCA çözeltisine ilave edildi. 1 dakika kadar çalkalandı, tüp 5 dakika buzlu suda bekletildi. 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantı ayrıldı. Bekletilmeden süpernatanda ATP çalışıldı.

ATP'in tayin prensibi şu şekildedir. ATP, fosfoglisarat kinaz (PGK) katalizörlüğünde 3-fosfoglisaratla reaksiyona girerek ATP ve 1,3-difosfoglisarat (1,3-DPG) sentezlenir. 1,3-DPG, gliseraldehid 3-fosfata (G-3-P) dönüşür. Bu arada NADH'dan NAD sentezlenir. NADH miktarında meydana gelen azalma ATP miktarı ile orantılıdır.

ATP analizinin prensibi şu şekildedir:



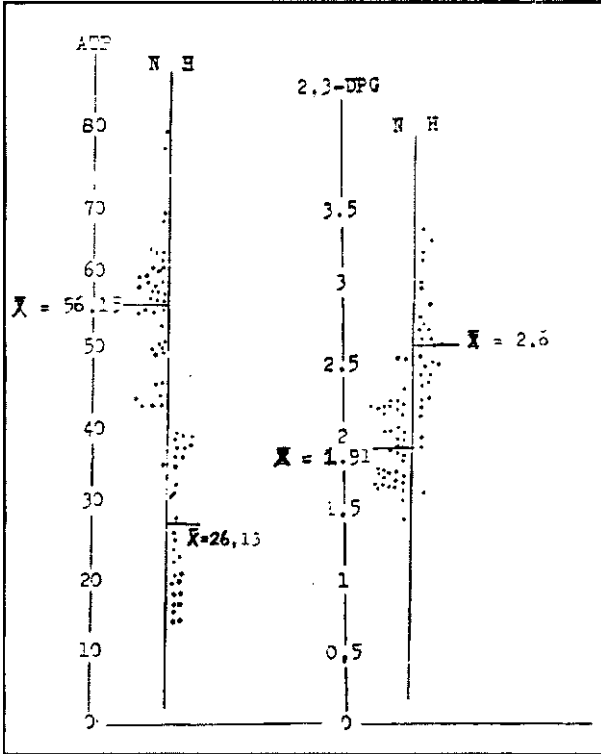
## BULGULAR

Mİ geçiren hastalarda kontrol grubuna ait 2,3-DPG ve ATP düzeyleri Tablo 1 ve Şekil 2'de gösterilmiştir.

Tablo 1'de görüldüğü gibi Mİ geçiren hastalara ait 2,3-DPG düzeyleri kontrol grubuna göre önemli ( $p < 0.001$ )

Tablo 1. Mİ geçirenlerde ve kontrol grubunda 2,3-DPG ve ATP düzeyleri (sonuçlar umol/dl total kan cinsindedir.)

| Parametreler | Birim                | X     | ıSD  | Mİ Grubu n=42 |      | t     | p       |
|--------------|----------------------|-------|------|---------------|------|-------|---------|
|              |                      |       |      | X             | ±SD  |       |         |
| 2,3-DPG      | fimol/dl             | 1.91  | 0.26 | 2.60          | 0.41 | 8.72  | p<0.001 |
| ATP          | fimo <sup>4</sup> dl | 56.15 | 0.18 | 26.13         | 8.59 | 14.23 | p<0.001 |



Şekil 2. Mİ geçiren hastalarla (H. hasta) sağlıklı kişilerde (N. normal) 2,3-DPG ve ATP değerlerinin karşılaştırılması.

oranda artmış, ATP düzeyleri ise önemli ( $p<0.001$ ) oranda azalmıştır.

## TARTIŞMA

2,3-DPG ve ATP tayininde kullanılan antikoagülanın önemli olduğu ve bu hususta en iyi antikoagülanın heparin olduğu kaydedilmiştir (14,15). Biz de bu çalışmamızda antikoagülan olarak heparin kullandık.

Tayinlerde lokosit ayırma ve eritrosit paketi hazırlama yoluna gidilmeden doğrudan tam kan kullanıldı ki hemen bütün araştırmacılar da aynı metodu uygulamışlardır (13,14,16). Çünkü lokosit içi 2,3-DPG miktarının tam kandakinden ancak %3'ü kadar olduğu bildirilmiştir (16-19). Ayrıca, lokosit sayısı eritrosit sayısından çok az olduğundan, eritrosit paketi yerine tam kullanılarak deneysel işlemlerin azaltılması ve böylece metodların klinik uygulamalarda kullanılabilir hale getirilmesi amaçlanmıştır.

Tablo 1'de görüldüğü gibi Mİ geçiren hastalarda 2,3-DPG düzeyleri kontrollere göre artmış ve bu artış

istatistik açıdan önemli ( $p<0.001$ ) bulunmuştur. Mİ geçirenlerde doku oksijenasyonu yetersizdir (20-22). Bunu düzeltmek için hemoglobinin  $O_2$  affinitesini azaltan 2,3-DPG'in artması beklenir ki bizim bulgularımızda bu yöndedir (23). 2,3-DPG seviyesinin artması için glikoliz reaksiyonları Rapoport-Luebering yoluna saptığında ATP sentezi de azalır.

Bu konuda literatürde rastladığımız tek çalışma Kedziora ve arkadaşlarınınkidir (23). Bu araştırmacılar 2,3-DPG ve ATP düzeylerini sağlıklı kişilerde sırasıyla  $357.8\pm 38.64$  ve  $135.13\pm 21.77$  umol/100 ml eritrosit, Mİ geçirenlerde ilk üç gün içinde  $416.3\pm 59.4$  ve  $72.8\pm 8.6$  umol/100 ml eritrosit olarak bulmuşlardır. Görüldüğü gibi Kedziora ve arkadaşlarının bulguları bizim bulgularımızı desteklemektedir. Ayrıca çalışmamızdaki vaka sayısı 31 iken Kedziora ve arkadaşlarınınki 12'dir. Dolayısı ile bulgularımız ve istatistiki değerlendirilmesi daha sağlıklıdır.

Hasta grubunda bulunan sonuçlar kendi aralarında karşılaştırıldığında tedavi uygulanan kişilerde uygulanmayan kişiler arasında infarktüsün ilk üç gününde önemli bir fark olmadığı görülmüş ve bundan dolayı bütün hastalar tek grup olarak değerlendirilmiştir. Nitekim Kedziora ve ark. da vakalarını aynı şekilde sınıflandırmışlardır. Bu araştırmacılar bulgularını tedavi öncesi, tedaviden 2-3 gün ve 7-8 gün ve 20-21 gün sonra olmak üzere sınıflandırmışlardır. Her üç evrede de 2,3-DPG seviyelerinin normallere göre yüksek olduğunu ATP seviyesinin ise düşük olduğunu bulmuşlardır.

Yukarıdaki araştırmacılar, Mİ geçiren kişilerde eritrosit için 2,3-DPG seviyesinin infarktüstün sonraki 20 güne kadar yüksek kaldığını ATP seviyesinin ise biraz arttığını göstermiştir.

Mİ, koroner kan akımının ani kesilmesi sonucu veya tıkanma olmaksızın koroner kan akımının hacim ya da  $O_2$  içeriğinin azalması sonucu oluşabilir (24). Neticede dokulara yeterince  $O_2$  sağlanamaz. Bunu düzeltmek için glikoliz reaksiyonları Rapoport-Luebering yoluna sapar ve 1,3-DPG'den 2,3-DPG oluşumu artar. ATP sentezi azalır. 2,3-DPG özellikle oksijensiz hemoglobine bağlanır (6,26). Bu bağlanma sonucu Hb'nin  $o_2$ 'e affinitesi azalır ve dokulara  $O_2$  girişi artar. Mİ geçirenlerde 2,3-DPG artışı  $O_2$  yetersizliğinde adaptasyonu sağlayacak en uygun yoldur (23).

Sonuç olarak, Mİ geçirenlerde eritrosit için 2,3-DPG tayininin doku hipoksisinin faydalı bir göstergesi olarak kullanılabileceği kanaatine varıldı.

## KAYNAKLAR

1. Noyan A. Fizioloji. 6 baskı. Ankara: Meteksan, 1989:669.
2. Bhagavan NV. Biochemistry, 2. baskı, Philadelphia: JB Lippincott Company, 1979:198, 721.
3. Campbell PN, Smith AD. Biochemistry illustrated. Second edition, London: Churchill Livingstone, 1988:186.
4. Mayes PA. Glycolysis and the oxidation of pyruvate. In: Harper PA, Rodwell WV, Mayes PA. Review of physiological chemistry. Beirut: Lange Medical Publications 1990: 199:163-7.
5. Danishefsky I: Biochemistry of medical sciences. Boston: Little Brown and Company, 1978:184,468.
6. Harper PA, Rodwell WV, Mayes PA. Review of physiological chemistry. Beirut: Lange Medical Publication, 1979:210-12.
7. Martin DW. The chemistry of respiration. In: Harper PA, Rodwell WV, Martin DW, Mayes PA. Review of physiological chemistry. Beirut: Lange Medical Publications, 1979: 169-90.
8. Agar NS, Harley JD, Cruca MA, Roberts J. Erythrocyt 2,3-DPG in anemic sheep. *Experientia* 1977; 33(2):275-77.
9. Yoshino M, Hayash R, Katsumoto Y, Mori S, Mitarai G. Blood oxypurines and erythrocyte 2,3-DPG levels at high altitude hypoxia. *Sciences* 1980; 27:1265-69.
10. Guyton AC. Integrated dynamics of the circulation and body fluids. In: Sodeman WA, Sodeman TM. Pathologic physiology. 7th ed. Philadelphia: Saunders Company, 1985:207.
11. Gökhan N, Çavuşoğlu H. Tıbbi fizioloji (türkçe çeviri). 1 baskı, İstanbul: Merck Yayıncılık, 1986:349,1354.
12. Nalbantgil i. İskemik kalp hastalığı. Menteş NK: İç hastalıklarında temel bilgiler. İzmir: Menteş Kitabevi, 1979: 1578.
13. 2,3-Diphosphoglyceric Acid. Quantitative enzymatic determination. Sigma Diagnostics, Procedure No: 35-UV.
14. Ş' Adenosine Triphosphate: Quantitative enzymatic determination. Sigma Diagnostics, Procedure No: 366-UV.
15. Purcell Y, Brozovic B. An improved automated method for the measurement of red cell 2,3-DPG. *J Clin Path* 1976; 29(12): 1064-67.
16. Ericson A, Verdier CH. A modified method for the determination of 2,3-DPG In erythrocytes. *Scant J Clin Lab Invest* 1979, 29:85-90.
17. Lenfant C, Torrance J, English E, et al. Effect of altitude on oxygen binding by hemoglobin and organic phosphate levels. *J Clin Invest* 1968; 47(26):52-6.
18. Karatzky MS. Blood studies in untreated patients with acute asthma. *Am Rev Res Disease* 1975; 112:607-13.
19. Keitt AS. Reduced nicotinamide adenin dinucleotide-linked analysis of 2,3-Diphosphoglyceric acid. *Spectrophotometric and Fluometric Procedures: J Lab Clin Med* 1971; 71(3): 470-75.
20. Donagh PF, Laks H, Chaudry H, Baue AE. Improved myocardial recovery from ischemia. *Arch Surg* 1984; 119: 1379-84.
21. Robinson LA, Braimbridge MV, Hearse DJ. Enhanced myocardial protection with high-energy phosphates in St. Thomas' hospital cardioplegic solution, synergism of adenosine triphosphate and creatine phosphate. *J Thorac Cardiovascular Surg*: London, 1987; 93:415-27.
22. Harmsen E, De Tombe PP, De Jong JW, Achterberg PW. Enhanced ATP and GTP synthesis from hypoxanthine or inosine after myocardial ischemia. *The American Physiological Societ*, 1984: 37-43.
23. Kedziora H, Lao A, Golinski A, Cieslinska D, Kedziora J, Tkaczewski W. Myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1981; 40:359-64.
24. Işık K. Acil kalp hastalıklarında teşhis ve tedavi, İstanbul: 1986:46.