

Erzurum ve Çevresinde Sigara İçen ve İçmeyen Sağlam Şahıslarda Eritrosit İçi 2,3-Difosfogliserat (2,3-DPG) Seviyeleri

RED CELL 2,3-DIPHOSPHOGLYCERATE (2,3-DPG) LEVELS OF SMOKING AND NON-SMOKING SUBJECTS IN ERZURUM

Doç.Dr. İdris AKKUŞ* Doç.Dr. Nuri BAKAN**,
Araş.Görv. Ahmet ÇİĞLİ***, Doç.Dr. Y.Nuri ŞAHİN**

*S.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya ABD. **A.Ü. Tıp Fakültesi biyokimya ABD, ***S.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya ABD

ÖZET

Bu çalışmada, 25-51 yaşları arasında sigara ve alkol kullanmayan, klinik hiçbir şikâyeti ve bulgusu olmayan toplam 64 (41 erkek, 23 kadın) sağlam şahısla 28-58 yaşları arasında, günde en az bir paket sigara içen ve alkol kullanmayan 35 sağlam şahsın (erkek) venöz kanında hemoglobin (Hb), hematokrit (Htc) ve eritrosit içi 2,3-difosfogliserat (2,3-DPG) seviyeleri tayin edildi.

Nedicede, sağlam kadınlarda eritrosit içi 2,3-DPG seviyesi sağlam erkekleri/ikinden daha yüksek bulundu. Sigara içen ve içmeyen sağlam erkeklerin 2,3-DPG seviyeleri arasında herhangi bir fark tesbit edilemediği halde sigara içen şahıslarda Hb ve Htc değerleri sigara içmeyenlere göre önemli derecede yüksek bulundu.

Bulgularımız literatür değerleri ışığında tartışıldı.

Anahtar Kelimeler: 2,3-difosfogliserat, Sigara içme, Hipoksi

T Klin Araştırma, 1991, 9:24-28

2,3-DPG eritrositlerde glikolitik yolda teşekkül eden önemli bir üründür (1,2). 2,3-DGP'ın teşekkül ettiği iki basamaklı reaksiyon dizisine Rapoport-Luebering yolu denir (3,4). Bu yolun fat bileşiklerinin ATP'ye dönüşümünü engellemek, ikincisi ise 2,3-DPG üretmeklemdir (3).

Geliş Tarihi: 2.2.1989

Kabul Tarihi: 4.7.1989

Yazışma Adresi: Doç.Dr. İdris AKKUŞ
S.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya ABD.
KONYA

SUMMARY

In this study, hemoglobin (Hb), hematocrit (Htc) and red cell 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) levels of 64 non-smoking healthy subjects (41 men, 23 women) aged between 25-51 years and 35 smoking healthy men who smoked one or more packs of cigarette per day and aged between 25-58 years were determined on venous blood samples. Subjects had no clinical problems, no one had donated blood during 5 months prior to study and no one was drinker.

Intraerythrocytic 2,3-DPG levels of healthy non-smoking women were significantly higher than that of non-smoking men while there was no difference between 2,3-DPG values of smoking and non-smoking men.

Hb and Htc values of smoking men were increased compared to that of non-smoking men.

Key Words: Hypoxia, 2,3-diphosphoglycerate, Cigarette smoking

Turk J Resc Med Sci, 1991, 9:24-28

2,3-DPG, oksijenin taşınmasında ve dokulara salıverilmesinde düzenleyici bir role sahiptir (1,2,3). Her ne kadar hemoglobinin oksijen afinitesi üzerine birçok organik ve inorganik fosfatların etkisi varsa da insan eritrositlerinde sadece 2,3-DPG ve ATP miktarı hemoglobinin oksijen afinitesini etkileyebilecek seviyededir (1,3,5). 2,3-DPG miktarı ise ATP'inkinden çok daha fazladır (1).

Eritrositlerde Hb molekülü sayısı kadar 2,3-DPG molekülü bulunmaktadır (6,7). Her ikisinin de eritrosit içi konsantrasyonu yaklaşık

5mM kadardır (7). 2,3-DPG oksijenini bırakmış hemoglobine bağlanarak bunun oksijene olan afinitesini azaltır. Oksijen yetersizliğinin olduğu durumlarda daha fazla 2,3-DPG sentzlenerek hemoglobine bağlanır, böylece, daha fazla miktarda oksijen serbest bırakılarak dokulara gitmesi sağlanır (2,3).

Fötüsta bulunan hemoglobin (HbF) değişik bir beta zinciri taşıdığı için bunun 2,3-DPG'a olan afinitesi azdır. Bu yüzden HbF daha çok oksijen bağlar ve annenin kanından fötüsün kanına bol oksijen geçmesini sağlar (3,8,9,10,11).

Sigara içenlerde karbonmonoksitin kronik etkisi sonucu doku hipoksisi meydana geldiği tesbit edilmiştir (12). Karbon monoksit (CO) hemoglobin ile sıkı bir bağ kurar ve bir defa bağlandımı artık ayrılmaz. Zira, hem CO'nun hemoglobine olan afinitesi çok fazladır hem de CO hemoglobine oksijenin bağlandığı yere bağlanır. Bu yüzden CO bağlı olan hemoglobin oksijen taşıyamaz. Dolayısı ile sigara tiryakilerinde hemoglobinin oksijen taşıma kapasitesinin %20 kadar azaldığı kaydedilmiştir (8). Ayrıca, tiryakilerde oksijen-hemoglobin ayrışma eğrisi de sola kaymıştır (13). Aynı şahıslarda ATP ise düşüktür (12).

Bizim bu çalışmadaki amacımız, hem yüksek rakımlı (deniz seviyesinden 1850 m) olduğundan dolayı hipoksi bakımından özellik arz edebilen bölgemiz için antihipoksik bir madde olan 2,3-DPG'ın normal değerlerini tayin etmek hem de hipoksiye sebep olduğu bilinen sigaranın 2,3-DPG üzerine olan etkilerini tesbit etmektir.

MATERYAL VE METOD

Çalışmamızda 25-51 yaşları arasında (ortalama 33) hiçbir klinik şikayeti ve bulgusu olmayan, sigara ve alkol kullanmayan 64 (41 erkek, 23 kadın) sağlam şahsın venöz kanında hemoglobin, hematokrit ve eritrosit içi 2,3-DPG seviyeleri tayin edildi. Bu şahıslardan sabah 8.00-10.00 saatleri arasında 4 ml. kadar venöz açlık kanı alınarak analiz edildi. Bu kanlardan dephal Hb ve Htc tayini yapıldıktan sonra 2,3-DPG tayini için 1.0 ml'si 3 ml soğuk TCA' ilave edildi. Birkaç saniye kuvvetle çalkalandıktan sonra 5-10 dakika kadar buzlu suda bekletildi. Sonra 3000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen berrak süpernatant derin dondurucuya konularak çalışma gününe kadar saklandı. Bu numunelerden en geç iki hafta içinde 2,3-DPG tayini yapıldı.

2,3-DPG Tayini

2,3-DPG tayin metodunun prensibi şöyledir:

2,3-DPG, 3-fosfogliserat ve inorganik fosfora 2,3-DPG fosfataz katalizörlüğünde hidrolize olmaktadır. 3-fosfogliserat (3-PGA), 3-fosfogliserat kinaz katalizörlüğünde ATP ile reaksiyona girerek 1,3-DPG ve ADP oluşmaktadır. 1,3-DPG, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GADP) mevcudiyetinde NADH'ın NAD'ye oksitlemekte ve kendisi de G-3-P'a indirgenmektedir. NADH'ın 340 nm'deki absorbanısında meydana gelen azalma 2,3-DPG miktarı ile orantılıdır.

Dondurularak saklanan proteinsiz süpernatantlar çalışma günü oda ısısına getirildi. Sonra 2,3-DPG seviyesi ticari kit (Sigma) kullanılarak aşağıdaki şekilde tayin edildi:

1- Spektrofotometrenin küvetine 1.0 ml NADH çözeltisi, 0.04 ml ATP çözeltisi ve 0.1 ml süpernatant ilave edildi. Yavaşça karıştırıldı.

2- Bu karışımın üzerine 0.008 ml fosfogüserat mutaz enzim karışımı ilave edildi. Alt-üst edilerek karıştırıldı. Oda ısısında 5 dakika bekletildikten sonra LKB ultraspec-II spektrofotometresinde su körüne karşı 340 mm'deki absorbanısı ölçüldü. Bu değer başlangıç absorbanısı olarak kaydedildi (A₁).

3- Yukarıdaki karışıma 0.04 ml fosfoglikolik asit çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı. 37°C de 15 dakika inkübe edildi.

4- 340 nm'de tekrar absorbanısı okundu ve bu değer son absorban (A₂) değeri olarak kaydedildi. Numunelerin 2,3-DPG seviyeleri aşağıdaki şekilde hesaplandı.

I. Total kanın ml'si cinsinden:

$$2,3\text{-DPG (}\mu\text{mol/ml total kan)} = A_d \times 7.7$$

$$A_d = \text{Düzeltilmiş absorban} = A_A - 0.03$$

$$A_A = A_1 - A_2$$

II. Htc'ye göre:

$$2,3\text{-DPG (}\mu\text{mol/ml)} = \frac{\text{Total kan 2,3-DPG seviyesi}}{\text{HtF}(\%)} \times 100$$

III. Hb'c göre:

$$2,3\text{-DPG (}\mu\text{mol/gr. Hb)} = \frac{\text{Total kan 2,3-DPG seviyesi}}{\text{Hb (gr/dl)}} \times 100$$

Bulgular "istatistiki olarak kantitatif ortalamaların incelenmesi" metodu ile değerlendirildi.

Tablo 1. Sigara İçmeyen Sağlam Erkek ve Kadın Gruplarına ait Bulgular ve "t" Testi Sonuçları

Parametre	Vak'a		X	± S D	t	Önemlilik Derecesi
	Sayısı	Grup				
Hb	41	Erkek	15.7	0.85	6.5	p< 0.001
	23.	Kadın	14.15	0.95		
Htc	41	Erkek	46.95	1.6	7.78	p< 0.001
	23	Kadın	42.6	2.4		
2,3-DPG ((µmol/ml total kan)	41	Erkek	2.12	0.17	1.09	p < 0.05
	23	Kadın	2.17	0.18		
2,3-DPG (p.mol/gr.Hb)	41	Erkek	13.58	1.43	3.7	p<0.01
	23	Kadın	15.23	1.84		
2,3-DPG (u.mol/Htc)	41	Erkek	4.53	0.43	4.68	p<0.01
	23	Kadın	5.16	0.55		

Tablo 2. Sigara İçen Sağlam Erkeklerle Sigara İçmeyen Sağlam Erkeklerle ait Bulgular ve "t" Testi Sonuçları

Parametre	Vak'a		X	± S D	t	Önemlilik Derecesi
	Sayısı	Grup				
Hb	41	Sigara içmeyen	15.7	0.85	3.24	p<0.01
	35	Sigara içen	16.2	1.0		
Htc	41	sigara içmeyen	46.95	1.6	5.95	p< 0.001
	35	Sigara içen	49.45	2.0		
2,3-DPG (µmol/ml total kan)	41	Sigara içmeyen	2.12	0.17	1.84	p>0.05
	35	Sigara içen	2.17	0.18		
2,3-DPG (µmol/gr.Hb)	41	Sigara içmeyen	13.58	1.43	0.13	p>0.05
	35	Sigara içen	13.45	0.13		
2,3-DPG (µmol/Htc)	41	Sigara içmeyen	4.53	0.45	1.13	p>0.05
	35	Sigara içen	4.41	0.47		

BULGULAR

Sigara içmeyen sağlam erkek ve kadın gruplarına ait bulgular toplu halde Tablo 1'de, sigara içen sağlam erkeklerle sigara içmeyen sağlam erkeklere ait bulgular Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1'de görüldüğü gibi sigara içmeyen sağlam erkeklerle sağlam kadınlara ait değerler arasında yapılan "t" testinde Hb, Htc ve Htc cinsin-

den hesaplanan 2,3-DPG değerleri arasında istatistikî yönden önemli farklar bulunmuştur.

Tablo 2'den görüldüğü gibi, sigara içen sağlam erkeklerle sigara içmeyen sağlam erkeklere ait bulgular arasında sadece Hb ve Htc değerleri bakımından önemli fark bulunmuştur.

TARTIŞMA

Çalışmamızda, 2,3-DPG tayini için total kan bekletilmeden deproteinize edilerek kullanıldı. Ancak, gerektiğinde hapaninli tüplere alınan kanın da kullanılabilmesi kaydedilmiştir (14,15). EDTA ve ACD (Asit-sitrat-dekstroz)'un 2,3-DPG tayininde antikoagulan olarak kullanılmalarının uygun olmadığı ve EDTA'nın 2,3-DPG seviyesini %15 kadar azalttığı tesbit edilmiştir (16,17).

2,3-DPG tayininde araştırmacıların hemen hiçbiri lökositleri ayırarak saf eritrosit paketi elde etme çihetine gitmemiştir. Zira, lökosit içi 2,3-DPG miktarının total kandakinin ancak %3'ü kadar olduğu kaydedilmiştir (18). Ayrıca, saf eritrosit paketi hazırlamak için yapılan yıkama işlemlerinin 2,3-DPG miktarını azalttığı ve bu maddenin plazmada ihmal edilecek seviyede az veya hiç bulunmadığı tesbit edilmiştir (19). Dolayısıyla biz de bu çalışmamızda 2,3-DPG tayini için doğrudan total kan kullandık. Bu şekilde deneysel işlemler azaltılarak metodun daha pratik ve klinik uygulamalarda kullanılabilir hale getirilmesi düşünülmüştür.

Sigara içmeyen sağlam şahıslara ait bulgularımız Tablo 3'te diğer araştırmacıların bulguları ile karşılaştırılmıştır.

Tablo 3. Sigara İçmeyen Sağlam Şahıslarda Tesbit Ettiğimiz 2,3-DPG Seviyelerinin Literatür Değerleri ile Karşılaştırılması

Referanslar	Grup	2,3-DPG (u.mol/Htc)
Nygaard ve Rörth (20)	Kadın	4.09 ± 0.32 (3.84-4)
	• Erkek	3.81 ± 0.62 (3.0-4.4)
Arturson ve arkadaşları (21)	Kadın	5.08 ± 0.49
	Erkek	4.67 ± 0.35
Woodson ve arkadaşları	Kadın	5.3 ± 0.4
	Erkek	4.8 ± 0.3
Torrance ve arkadaşları (19)	Kadın	—
	Erkek	5.48 ± 0.27
Bizim Bulgularımız	Kadın	5.16 ± 0.55
	Erkek	4.53 ± 0.45 (3.67-5.45)

Tablo 3'ten görüldüğü gibi, sigara içmeyen sağlam şahıslara ait bulgularımız, Nygard ve Rörth'ün bulguları hariç, diğerleri ile genelde uygunluk halindedir. Herne kadar araştırmacıların hiçbirisi çalıştıkları bölgenin rakımını vermemişler ise de, aralarında önemli bir rakım farkının olmadığı kanaatindeyiz. Zira 2,3-DPG'nin yüksek rakımla birlikte önemli miktarda arttığı tesbit edilmiştir (17,18,23). Nygaard ve Rörth'ün bulgularının diğerlerinden farklı olması rakım farkından dolayı olabilir.

Çalışmamızda bölgemize ait değerleri deniz seviyesindeki değerlerle mukayese etmek imkânı bulamadık. Hernekadar 2,3-DPG miktarının deniz seviyesinden itibaren 2500-2700 metrede artmaya başladığı kaydedilmiş (13) ise de, bundan daha düşük olan rakımlarda (1550 m) da 2,3-DPG miktarının deniz seviyesinden daha yüksek olduğu tesbit edilmiştir (19,24).

Yoshino ve arkadaşları (23) ile Lenfant ve arkadaşlarının (18) bulguları da buy yöndedir. Yoshino ve arkadaşları (23), yüksek rakımlarda oksipürinlerin metabolik adaptasyonu sağladığını, 2,3-DPG'nin ise hipoksiye karşı dokulara oksijen girişini arttırmak üzere derhal yükseldiğini tesbit etmişlerdir.

Yine Tablo 3'ten görüldüğü gibi, hem bizim çalışmamızda, hem de diğer araştırmacıların çalışmalarında kadınlara ait 2,3-DPG seviyeleri erkeklerinkinden daha yüksek bulunmuştur. Bunun, kadınlarda Hb miktarının düşük olmasına bağlı olduğuna inanılmaktadır. Nitekim, Hb seviyesi düşük olan anemik hastalarda da 2,3-DPG seviyesi normal şahıslara göre oldukça yüksektir (19).

Bizim çalışmamızda ve diğer araştırmacıların (12,25,26) çalışmalarında sigara içen şahıslara ait Hb ve Htc değerleri sigara içmeyenlere göre önemli derecede yüksek bulunduğu halde her iki gurubun 2,3-DPG seviyeleri arasında herhangi bir fark tesbit edilememiştir.

Sigara dumanının hipoksi yaptığı anlaşılmış olmasına rağmen (12,26,27) antihipoksik bir madde olan 2,3-DPG'nin niçin artmadığı tam olarak izah edilememiştir. Anacak, sigara dumanının bir glikoliz enzimi olan gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenazı inhibe ettiği kaydedilmiş (28) ve CCh'nin glikolizi 1,3-DPG çevresinde inhibe ettiği tesbit edilmiştir (29). Sigara dumanı bu etkisi ile

glikolizi yavaşlatabilir veya özellikle 2,3-DPG'nin teşekkül ettiği reaksiyon dizisini inhibe edebilir. Bu da eritrositlerin antihipoksik regülasyon mekanizmasını bozacaktır ki Sagon ve arkadaşları (12) da aynı kanaattedirler.

Öte yandan, sigara içenlerde Hb ve Htc değerlerinin artması da sigaranın hipoksik etkisine bir cevap olarak kabul edilmiştir (12,25). Halbuki Htc yerine 2,3-DPG'nin artması organizma için daha faydalıdır.

Netice olarak, rakım farkından dolayı oluşabilen hipoksik etkinin tam olarak anlaşılabilmesi için farklı rakıma sahip bölgeler arasında 2,3-DPG seviyeleri bakımından mukayeseli çalışmaların yapılmasının faydalı olacağı kanaatindeyiz.

Ayrıca, sigara dumanının glikoliz ve bilhassa 2,3-DPG üzerine olan etkisinin enzimatik seviyede araştırılması faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Bhagavan NV: *Biochemistry*, 2. Bas., Philadelphia, JB Lippincott Company, 1979, s.183:407-471, 718-721
2. Danishefsky I: *Biochemistry for Medical Sciences*, 1. Baskı, Boston, Little Brown and Company, 1980, S.184:286-8,335-6,467-8
3. Harper HA, Rodwell VW ve Mayes PA: *Review of Physiological Chemistry*, Lebanon, Lange Medical Publications, 1979, s.210-2
4. Ditzel J: *Changes in Red Cell Oxygen Release Copacity in Diabetes Mellitus*, *Federation Proc.* 1979, 38:2484-8
5. Agar NS, Harley JD, Gruca MA ve Roberts J: *Erythrocyte 2,3-DPG'in anemic Sheep*, *Expenientia*, 1977,33:275-7
6. Benesch R ve Benesch RE: *Intracellular Organic Phosphates as Reulators of Oxygen Release by Hemoglobin*, *Nature* 1969, 221:618-622
7. Luque J, Driedench D ve Grisollia S: *Binding of 2,3-DPG to Oxyhemoglobin*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1969,36:1019-23
8. Noyan A: *Fizyoloji Ders Kitabı*, 2. Baskı, Ankara Meteksan Tesisleri, 1980, s.323-336,445-446
9. Arturson G, Garby L ve Robert M: *Determination of the Oxygen Affinity of Human Blood in vivo and under Standard Conditions*, *Scan. J Clin. Lab. Invest.* 1974, 34:15-18
10. Gılman JG: *Red Cells of Newborn Rats Have Low Bisphosphoglyceromutase and High Pyruvate Kinase Activities in Association with low 2,3-bisphosphoglycerate*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981, 98:1057-62

11. Tomita S: Modulation of the Oxygen Iiquilibria of Human Fetal and Abuld Hemoglobins by 2,3-Diphosphoglyceric Acid. The *J* of Biol. Chemistry, 1981,256:9495-9500
12. Sagone A, Lawrence T ve Balcerzak SP: Effect of Smoking on Tissue Oxygen Supply, *Blood* 1973, 41:845-851
13. Smith JR ve Landan SA: Smokers Polycythemis, *N Eng. J Med.* 1978,928:6-10
14. Rorth M Dependency on Acid-Base Status of Blood of Oxyhemoglobin Dissociation and 2,3-Diphosphoglycerate Level in Human Erythrocytes, *Scan. J Clin. Lab. Invest* 1970,26:4346
15. Encson A ve De Verdier CH: A Modified Method for the Determination of 2,3-Diphosphoglyceric Acid, Quantitative Enzymatic Determination, *SIGMA Diagnostics, Procedure N0.35-UV*
17. Purcell Y ve Brozovic B: An Improved Automated Method for the measurement of Red Cell 2,3-DPG, *J Clin. Path* 1976,29:1064-7
18. Lenfant C, Torrance J, English E, Finch CA, Rrcynafarje C, Ramos J ve Fajra J: Effect of Altitude on Oxygen Binding by Nemoglobin and on Organic Phosphate Levels, *The J Clin. Invest* 1968,47:2652-6 **A**
19. Torrance J, Jacobbs P, Restpedo A, Eschbach J, Ixnfant C ve Finch A: Intraerythrocytic Adaptation to Anemia, *The N Eng. J Med*, 1970, 283:165-9
20. Nygaard SF ve Rorth M: An enzymatic Assay of 2,3-Diphosphoglycerate in Blood, *Scand. .1 Clin. Lab. Invest.* 1969, 24:399-403
21. Arturson G, Garby L. Robert M ve Zaar B: Oxygen Af-finity of Whole Blood in Vivo and Under Standart Conditions in Subjects with Diabetes Mellitus, *Scand. J Clin. I Jib. Invest.* 1974, 34:19-22
22. Woodson RD, Torrance JD. Shappel SD ve Lenfant C: The effect of Cardisc Disease on Hemoglobin-Oxygen Binding. *J Clin. Invest* 1970, 49:1349-56
23. Yoshino M, Hayashi R, Katsumoto Y, Mon S ve Mitarai G: Blood Oxyapurines and Erythrocyte 2,3-DPG levels at high Altitude Hypoxia, *Life Sciences* 1980,27:1265-9
24. Khraisha S: Compatitive Study of Blood 2,3-DPG of School Students of Both Sexes at Ammon (Jordan) and Dead Sea Level, *Trop. Geogr. Med.* 1985, 37:345-7
25. Helman N ve Rubenstein I.S: The Effects of Age, Sex and Smoking on Erythrocytes and Leukocytes, *Am. J of Clin. Path.* 1975, 63:35-44
26. Bureau MA. Shapott D. Berthiaume Y et al: Maternal Cigarattc Smoking and fetal Oxygen Transport: A Study of P50, 2,3-DPG, total hemoglobin hematocrit and Type I hemoglobin in Fetal blood. *Pediatrics* 1983, 27:22-26
27. Sagone AL ve Balcerzak SP: Smoking as a Cause of Erythrocytosis, *Annals of Internal Medicine* 1975,82:512-5
28. Stedman RL: The Chemical Composition of Tobacco and Tobacco smoke. *Chcm. Rev.* 1968. 68:153-207
29. Zborowska S, Danuta T ve Klassen GA: Carbon Dioxide Mediated Glycolysis II., *Respir. Physiol* 1973,19:162-175