

# Alkol İçen Kişilerde Eritrosit İçi 2,3-Bifosfogliserat (2,3-BPG) ve ATP Seviyelerinin Tayini

EVALUATION OF 2,3 BIPHOSPHOGUSERAT AND ATP LEVELS OF ERYTHROCYTES IN ALCOHOL CONSUMERS

Hüseyin VURAL\*, İdris AKKUŞ\*, Abdurrahim KOÇYİĞİT\*, Süleyman ALICI", Osman ÇAĞLAYAN\*, Bilal DURMUŞ\*

\* Dr.Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD,

\*\* Dr.Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahiliye ABD, KONYA

## ÖZET

Bu çalışmada, alkol içen kişilerde eritrosit içi A TP ve 2,3-BPG seviyeleri tayin edilerek alkolün eritrosit metabolizması üzerindeki etkileri araştırıldı. Çalışma, en az üç yıldan beri haftada en az bir defa alkol alan ve halen de almaya devam eden herhangi bir klinik şikayeti ve bulgusu olmayan 24-62 (ortalama 38) yaşları arasında 46 alkolik şahıs ile hayatı boyunca hiç alkol kullanmamış 25-56 (ortalama 36) yaşları arasında 32 sağlıklı erkek şahıs üzerinde gerçekleştirildi. Alkol grubuna ait A TP ve 2,3-BPG seviyeleri kontrol grubuna göre istatistikî açıdan önemli derecede ( $p<0.05$ ) düşük bulundu. Bu azalmanın alkolün glikoliz hızını yavaşlatmasından kaynaklandığı ve bunun da doku oksijenasyonu ile eritrositlerin diğer fonksiyonlarında bozulmaya sebep olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Alkol, Eritrosit, ATP, 2,3-BPG

T Klin Tıp Bilimleri 1995, 15: 354-356

Eritrositler yapıları, metabolizmaları ve fonksiyonları yönünden diğer vücut hücrelerinden farklı özelliktedirler. Olgun insan eritrositleri diğer hücrelerdekine aksine nükleus, mitokondri ve ribozom gibi organellere sahip değildirler (1,2). Bu sebeple olgun eritrositlerde aerobik glikoliz oluşmaz. Eritrositler ihtiyaçlarını anaerobik glikoliz yolundan sağlarlar (3,4).

Kan glukozu, hücre zarını kolayca geçerek eritrosit içine girer ve bu giriş ortamdaki glukoz konsantrasyonuna çok az bağlıdır. Glukoz eritrosit içinde anaerobik reaksiyonlar dizisi sonunda laktik aside dönüşür (3,5). Anaerobik glikoliz sonucunda ATP kazancı

Geliş Tarihi: 29.05.1995

Yazışma Adresi: Dr.idris AKKUŞ

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyokimya ABD, KONYA

## SUMMARY

In the present study, erythrocyte ATP and 2,3-BPG levels of alcohol consumers were investigated in order to determine the effects of alcohol on erythrocyte metabolism. Alcohol consumers were consisted of 46 cases aged between 24-62 (mean 38) years. They had been drinking for at least three years and once a week. Controls were consisted of 32 healthy subjects between the same range of age. Erythrocyte A TP and 2,3-BPG levels of the drinkers were significantly lower than those of controls. Those reductions were thought to results from the inhibition of glycolysis by alcohol which results in an impairment in tissue oxygenation and normal erythrocyte functions.

Key Words: Alcohol, Erythrocyte, ATP, 2,3-BPG

T Klin J Med Sci 1995, 15: 354-356

fazla olmamakla birlikte eritrositlerin enerji ihtiyacı için yeterlidir (5).

Glikolitik yol eritrositlerde ATP temininden başka 2,3 bifosfogliserat (2,3-BPG) sentezi için de kullanılır. 2,3-BPG eritrositteki glikolitik yolda önemli bir yan ürün olup, oksijenin hemoglobinden dokulara salıverilmesinde etkilidir (1,3,5). Difosfogliserat mutaz enzimi 1,3-BPG'ı 2,3-BPG'a çevirir. 2,3-BPG, 2,3-BPG fosfataz enziminin katalize ettiği reaksiyonla 3 fosfogliserata hidrolizlenir (1,2). Bu iki basamaklı reaksiyon dizisine "Rapoport Luebering yolu" denmektedir. Bu yolun çok önemli iki fonksiyonundan birincisi, yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin ATP'a dönüşümünü engellemek, diğeri de 2,3-BPG üretmektir (4,6,7).

2,3-BPG, oksijenin hemoglobin tarafından taşınmasında ve dokulara salıverilmesinde düzenleyici bir role sahiptir. 2,3-BPG, oksijen hemoglobine bağlanarak bunun oksijene olan afinitesini azaltır. Oksijen yetersiz-

ligi **durumunda** daha fazla 2,3-BPG sentezlenerek hemoglobine **bağlanır**. Bu sayede daha fazla miktarda oksijenin **serbest bırakılarak dokulara gitmesi** sağlanmış olur (5,8).

**Etanol, günümüzde en çok kullanılan toksik maddedir** (9). Endüstride **bir çözücü olarak kullanılması** dışında insan tarafından **alkollü** içecekler içinde yoğun bir **şekilde tüketilmektedir** (10). **Bütün alkollü içeceklerde değişik konsantrasyonlarda bulunan etil alkol çeşitli meyvelerin ve nişastanın fermentasyonu sonucu elde edilebildiği gibi etilenden kimyasal yollarla da önemli miktarda üretilmektedir** (11).

**Alkolün çeşitli sağlık ve sosyal problemlere sebep olduğuna dair çok sayıda yayın mevcuttur** (12-14). Ancak **günümüzde alkol alışkanlığı hala önemini korumaktadır**. **Keyif verici ve sakinleştirici olarak kullanılan etil alkolün tüketimi stresli şehir hayatı, yoğun mesailer ve çeşitli psikolojik sebeplere bağlı olarak gün geçtikçe artmaktadır**.

**Çalışmamızda, eritrosit içi ATP ve 2,3-BPG seviyeleri tayin edilerek alkolün eritrosit metabolizması üzerindeki etkileri araştırıldı**.

#### MATERYEL VE METOD

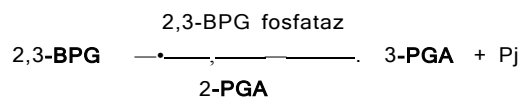
Bu çalışma, en az üç yıldan beri haftada en az bir defa alkol alan ve halen de almaya devam eden herhangi bir klinik şikayeti ve bulgusu olmayan 24-62 (ortalama 38) yaşları arasında 46 alkolik şahıs ile hayatı boyunca hiç alkol kullanmamış 25-56 (ortalama 36) yaşları arasında 32 sağlıklı erkek **şahıs** üzerinde gerçekleştirildi. Andrade ve ark (15)'nin sınıflandırmasına göre alkol grubundan 11 kişi hafif **içici** (günde ortalama <30 gr alkol alanlar), 12 kişi orta derecede **içici** (30-70 gr alkol alanlar) ve 23 kişi ağır **içici** (>70 gr alkol alanlar) idi.

Vakalardan 10-12 **saatlik** açlıktan sonra sabah 8.00-10.00 saatleri arasında 5 ml venöz kan alınarak heparinli tüpe aktarıldı.

#### 2,3-BPG Analizi

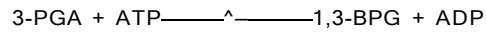
2,3-BPG analizi Sigma firmasından temin edilen ticari kitle gerçekleştirildi (16). Çalışmada eritrosit paketi hazırlama yerine doğrudan tam kan kullanıldı. Alınan heparinli kanın 1 ml'si %8'lik 3 ml soğuk TCA çözeltisine ilave edildi. Birkaç saniye çalkalandı. Buzlu suda **5 dakika** bekletildi. 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant ayrıldı ve çalışma gününe kadar derin dondurucuda saklandı. En geç bir ay içinde çalışıldı.

2,3-BPG'nin tayin prensibi şu şekildedir; 2,3-BPG, 3-fosfogliseric asid ve fosfat (P<sub>i</sub>)'a 2,3-BPG fosfataz katalizörlüğünde hidroliz olmaktadır. 2-fosfogliseric asid (2-PGA) ise bir stimülatör olarak kullanılmaktadır.



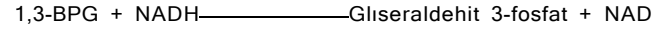
3-PGA, 3-fosfogliseric kınaz (3-PGK) katalizörlüğünde ATP ile reaksiyona girerek 1,3-BPG ve ADP oluşmaktadır.

#### 3-PGK



1,3-BPG, gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz (GAPD) katalizörlüğünde gliseraldehid 3-fosfata (G-3-P) indirgenirken NADH'da NAD'ye oksitlenmektedir.

#### GAPD

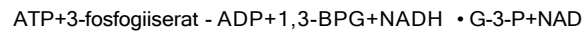


NADH'ın 340 nm'deki absorpsiyonunda meydana gelen azalmadan faydalanarak 2,3-BPG seviyesi ölçülebilir. Reaksiyon sonunda oluşan NAD miktarı, 2,3-BPG miktarı ile orantılıdır.

#### ATP Analizi

ATP analizi de Sigma firmasında temin edilen ticari kit ile gerçekleştirildi (17). Alınan heparinli kanın 1 ml'si %12'lik 1 ml soğuk TCA çözeltisine **ilave** edildi. 1 dakika kadar çalkalandı. 5 dakika buzlu suda bekletildikten sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatantı ayrıldı. Bekletilmeden süpernatanda ATP çalışıldı.

ATP'in tayin prensibi şu şekildedir: ATP, fosfogliseric kınaz (PGK) katalizörlüğünde 3-fosfogliseric ile reaksiyona girerek ATP e 1,3-BPG sentezlenir. 1,3-BPG, gliseraldehid 3-fosfata dönüşür. Bu arada NADH'dan NAD sentezlenir. NADH miktarında meydana gelen azalma ATP miktarı **ile** orantılıdır.



Bulgular student-t test ile değerlendirildi.

#### BULGULAR

Her iki gruba ait bulgular Tablo 1'de verilmiştir. Tablo 1'den de görüldüğü gibi alkol grubuna ait ATP ve 2,3-BPG seviyeleri kontrol grubuna göre istatistik açıdan önemli derecede (p<0.05) düşük bulunmuştur.

#### TARTIŞMA

2,3-BPG ve ATP tayininde kullanılan antikoagülanın önemli olduğu ve bu hususta en iyi antikoagülanın heparin olduğu kaydedilmiştir (17,18). Biz de bu çalışmamızda antikoagülan olarak heparin kullandık.

Tayinlerde lökosit ayırma ve eritrosit paketi hazırlama yoluna gidilmeden doğrudan tam kan kullanıldı ki hemen bütün araştırmacılar da aynı metodu uygulamışlardır (16,17,19). Çünkü lökosit içi 2,3-BPG miktarının, tam kandakinin %3'ü kadar olduğu bildirilmiştir (19-21). Ayrıca, lökosit sayısı eritrosit sayısından çok az olduğundan, eritrosit paketi yerine tam kan kullanılarak deneysel işlemlerin azaltılması ve böylece metodların klinik uygulamalarda kullanılabilir hale getirilmesi amaçlanmıştır.

Tablo 1. Alkol grubu ile kontrol grubuna ait bulguların karşılaştırılması

Parametre	Kontrol grubu (n-32)	Alkol grubu (n-46)	t	p
ATP	64.75±6.90	59.64±9.72	2.52	p<0.05
2,3-BPG	2.20±0.39	1.97±0.48	2.34	p<0.05

Alkol içenlerde eritrosit içi 2,3-BPG ve ATP düzeylerinin düşük olması glikoliz hızının yavaşlaması ile izah edilebilir. Kanaatimize göre bunun en önemli sebebi glikolizin yürümesi için gerekli olan fosfat ve magnezyum seviyelerinin düşük olmasıdır. Alkoliklerde kan fosfat ve magnezyum düzeylerinin düşük olduğu birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur (22-24). Magnezyum glikoliz yolundaki başta heksokinaz olmak üzere, kinaz enzimlerinin aktivatörüdür. Fosfat ise glikoliz ara ürünlerinden 1,3-BPG'nin sentezi için gereklidir.

Öte yandan alkol glukoneogenezi de inhıbe eder. Özellikle açlık durumunda kan şekerinin azalması glikoliz hızını da düşürmüş olabilir.

Eritrositlerin tek enerji kaynağı glikolizdir. Dolayısıyla glikolizin yavaşlaması eritrositlerin ömrünü kısacaktır. ATP eksikliğinde eritrositteki birçok fonksiyon yerine getirilemez. Ayrıca, ATP eksikliğinde eritrosit zarının daha sert ve kırılğan olduğu bunun da hemolize yol açtığı kaydedilmiştir (25).

2,3-BPG doku oksijenasyonu için hayati öneme sahiptir (8). Bulgularımız, alkoliklerde doku oksijenasyonunun da yetersiz olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, bulgularımız alkolün hem eritrositlere hem de oksijen bakımından diğer dokulara önemli derecede zarar verdiğini göstermektedir.

#### KAYNAKLAR

- Noyan A. Fizyoloji, 6. baskı. Ankara: Meteksan, 1989: 669.
- Bhagavan NV. Biochemistry, 2. baskı. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1979: 198, 721.
- Campbell PN, Smith AD. Biochemistry illustrated, 2<sup>nd</sup> ed. London: Churchill Livingstone, 1988: 186.
- Mayes PA. Glycolysis and the oxidation of pyruvate. In: Harper PA, Rodwell VW, Mayes PA. Review of physiological chemistry. Beirut: Lange Medical Publication, 1990: 199:163-7.
- Danishesky I. Biochemistry of medical sciences. Boston: Little Brown and Company, 1978:184, 468.
- Rawn JD. Biochemistry, Neil Patterson Publishers North Carolina 1989; 621.
- Ditzel J. Changes in red cell oxygen release capacity in diabetes mellitus, Federation Proc 1979; 38:2484-88.
- Agar NS, Harley JD, Gruca MA, Roberts J. Erythrocyte 2,3-BPG in anemic sheep. Experientia 1977; 33:275-7.
- Victor M, Adams RD. Alcohol, in: Petersdorf et al. Harrison's principles of internal medicine, 12<sup>th</sup> ed. International edition. Africa: McGraw-Hill Book Company, 1991: 2148.
- Andrews LS, Synder R. Toxic effects of solvents and vapors. In: Admur MO et al. Toxicology the basic science of posions, 4<sup>th</sup> ed. Newyork: Pergamon Press, 1991: 681-722.
- Wright F, Marks V. Alcohol. In: Cohen RD, Lewis B, Alberti GMM, Denmann AM. The metabolic and moiekuler basis ot acquired disease. London: WB Saunders Company, 1990: 602-24.
- Diehl AM. Alcoholic liver disease. Med Clin N Am 1989; 73:386-93.
- Lieber SC, Garra A, Leo MA, Mah KM, Worner T. Alcohol and cancer. Hepatology 1986; 6(5):1005-19.
- Dinsmore WW, McMaster B, Callender ME, Buchanan KD, Love AG. Trace elements and alcohol. The Science of Total Enviroment 1985; 42:109-19.
- Andrade PJ, Escolar JL, Valdivielso P, Gonzales P. Apo-protein distribution in plasma HDL subtractions in alcohol consumers. Drug and Alcohol Dependence 1990; 26:161-8.
- 2,3-diphosphoglycenc acid. Quantitative enzymatic determination. Sigma Diagnostics, Procedure No: 35-UV.
- 5' Adenosine Triphosphate. Quantitative enzymatic determination. Sigma Diagnostics, Procedure No: 366-UV.
- Purcell Y, Brozovic B. An improved automated method for the measurement of red cell 2,3-BPG. J Clin Path 1976; 29(12): 1064-67.
- Ericson A, Verdier CH. A modified method for the determination of 2,3-BPG in erythrocytes. Scand J Clin Lab Invest 1979; 29:85-90.
- Lenfant C, Torrance J, English E et al. Effect of altitude on oxygen binding by hemoglobin and organic phosphate levels, J Clin Invest 1968; 47:52-6.
- Karatzky MS. Blood studies in untreated patients with acute asthma. Am Rev Res Disease 1975; 112:607-13.
- Knochell JP. Hypophosphatemia in the alcoholic. Arch Intern Med 1980; 140:613-5.
- Larsson L, Rebel K, Sorbo BO. Severe hypophosphatemia, A hospital survey. Acta Med Scand 1983; 214:221-3.
- Flora SJS, Kumar D, Sachan SRS, Gupta D. Combined exposure to lead and ethanol on tissue concentration of essential metals and some biochemical indices in rat. Biol Trace Element Res 1991;28:157-64.
- Isselbacher KJ. Metabolic and hepatic effects of alcohol. N Engl J Med 1977; 17:612-6.