

Tadeusz STUDZIŃSKI, Anna GŁUSZAK,
Andrzej CZARNECKI

**Zmiany stężenia 2,3-dwufosfoglicerynianu (2,3-DPG) w erytrocytach
krów w czasie ciąży**

Изменение концентрации 2,3-дифосфоглицерина (2,3-DPG) в эритроцитах
коровы в период беременности

2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) Changes in Erythrocytes of Cows During Pregnancy

Erytrocyty ssaków tworzą unikalną grupę komórek zdolnych do syntezy 2,3-DPG, którego stężenia równają się stężeniom molarnym hemoglobiny (1, 4, 9, 11, 25). 2,3-DPG zwiększa dyfuzję tlenu z erytrocytów do mitochondriów komórkowych tkanek na skutek wzrostu gradientu prężności tego gazu i zwiększa uwalnianie tlenu z hemoglobiny (1, 2). Wzrost stężenia 2,3-DPG w erytrocytach wykazano w hipoksjach u ludzi i zwierząt (21, 24, 26, 29), metabolicznej adaptacji postnatalnej prosiąt, cieląt i jagniąt (4, 9, 25), po stosowaniu niektórych hormonów (3, 10, 27) oraz w ciąży u kobiet (18, 19, 20).

Ciąża charakteryzuje się zmianami koncentracji hemoglobiny we krwi (6, 15, 18) oraz zmianami hormonalnymi (3, 5, 16, 17, 30), którym towarzyszy wzrost zapotrzebowania na tlen rozwijającego się płodu (14), jak również wzrost zawartości 2,3-DPG w erytrocytach (18, 19). W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono danych o wpływie ciąży na zawartość 2,3-DPG w erytrocytach bydła, co skłoniło nas do podjęcia badań nad tym składnikiem krwinek czerwonych u krów w czasie ciąży.

MATERIAŁ I METODY

Oznaczanie 2,3-DPG przeprowadzono na 155 krowach rasy nizinnej czarno-białej w okresie od 1 do 9 miesiąca ciąży i 20 krowach tej samej rasy w okresie od kilku dni do 2 miesięcy po porodzie. Grupa kontrolna liczyła 40 krów rzeźnych, u których badaniem poubojowym nie stwierdzono ciąży. Ponadto oznaczono zawartość 2,3-DPG w erytrocytach 20 płodów. Wiek badanych płodów przypadła na ostatni trymestr życia prenatalnego.

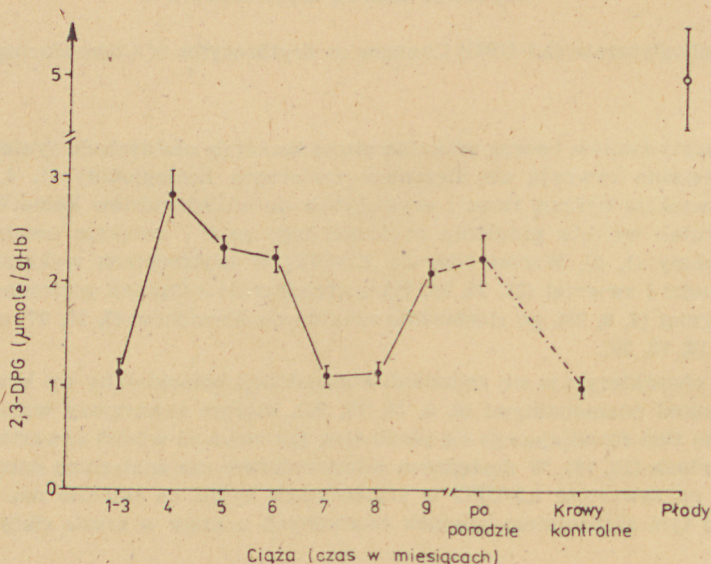
Krew do badań od krów ciężarnych pobierano z żyły jarzmowej w odstępach miesięcznych, dokonując pierwszego badania w połowie 1 miesiąca ciąży. Krew

plodową otrzymywano po przecięciu naczyń pępowinowych płodów, pochodzących z materiału rzeźnego (krowy z nierozpoznaną ciążą, skierowane na ubój).

Oznaczanie 2,3-DPG we krwi przeprowadzano 3 godz. po jej pobraniu. Stężenie 2,3-DPG w erytrocytach oznaczano według metody Dyce i Bessmana (8), wartość hematokrytową — mikrometodą, a zawartość hemoglobiny we krwi metodą Drabkina (7). Wyniki badań poddano analizie statystycznej wg testu Studenta.

WYNIKI

W okresie trzech pierwszych miesięcy ciąży stężenie 2,3-DPG w erytrocytach krów wynosiło średnio $1,10 \mu\text{mol/gHb}$ i nie różniło się istotnie od stężenia stwierdzonego u krów grupy kontrolnej (tab. 1 i ryc. 1). W 4 miesiącu ciąży stężenie 2,3-DPG wzrosło do średniej wartości $2,86 \mu\text{mol/gHb}$, wskazując tylko nieznaczne zmniejszenie do $2,33 \mu\text{mol/gHb}$ w 5 miesiącu i $2,25 \mu\text{mol/gHb}$ w 6 miesiącu ciąży. Porównanie koncen-



Ryc. 1. Stężenie 2,3-dwufosfoglicerynianu (2,3-DPG) w erytrocytach płodów oraz krów w czasie ciąży i w pierwszym tygodniu po porodzie. Wartości wyrażają średnie oraz błędy standardowe średnich

2,3-DPG concentration in the erythrocytes of foetuses, pregnant cows and cows during one week after delivery. Mean values and standard errors

tracji 2,3-DPG w erytrocytach krów ciężarnych w 4, 5 i 6 miesiącu ciąży z koncentracją u krów kontrolnych wykazało wyższe i statystycznie istotne wartości u krów ciężarnych ($p < 0,001$). W 7 i 8 miesiącu ciąży nastąpiło zmniejszenie zawartości 2,3-DPG w erytrocytach do średnich

Tab. 1. Stężenie 2,3-DPG w erytrocytach, wartość hematokrytowa (Ht) i zawartość hemoglobiny (Hb) we krwi płodów oraz krów w czasie ciąży i po porodzie. Wartości wyrażają średnie i błędy standardowe średnich
 Erythrocytic 2,3-DPG concentration, haematocrit value (Ht) and haemoglobin content (Hb) in blood of foetuses of pregnant cows and 1—7 days after delivery. Mean values and standar errors

Czas trwania ciąży (miesiące)	1—3	4	5	6	7	8	9	1—7 dni po porodzie	Krowy kontrolne	Płody
Liczba zwierząt (n)	19	12	25	23	18	19	12	11	40	20
2,3-DPG (μmol/gHb)	1,10 ±0,15	2,86* ±0,23	2,33* ±0,13	2,25* ±0,11	1,12 ±0,10	1,16 ±0,09	2,11* ±0,19	2,18* ±0,27	1,13 ±0,07	4,98 ±0,45
Hb (g/dl)	12,4 ±0,6	12,1 ±0,6	12,7 ±0,5	12,3 ±0,5	12,8 ±0,5	12,8 ±0,4	13,9* ±0,4	11,7 ±0,4	12,3 ±0,6	12,8 ±1,2
Ht (l/l)	0,355 ±0,008	0,350 ±0,005	0,360 ±0,009	0,350 ±0,007	0,360 ±0,006	0,360 ±0,007	0,385* ±0,008	0,350 ±0,009	0,350 ±0,014	0,410 ±0,020

* Różnice statystycznie istotne ($p < 0,01$).

wartości 1,12 i 1,16 $\mu\text{mol/gHb}$ (tab. 1 i ryc. 1). Natomiast w 9 miesiącu ciąży wystąpił ponowny wzrost koncentracji 2,3-DPG do średniej wartości 2,11 $\mu\text{mol/gHb}$. Wzrost ten był statystycznie znamienny w porównaniu z wartościami kontrolnymi ($p < 0,001$) oraz z wartościami stwierdzonymi w 8 miesiącu ciąży ($p < 0,01$).

W okresie pierwszych 7 dni po porodzie stężenie 2,3-DPG w erytrocytach utrzymywało się na średnim poziomie 2,18 $\mu\text{mol/gHb}$ i było również wyższe od wartości kontrolnych ($p < 0,001$). Stężenie 2,3-DPG w erytrocytach krów po upływie 7 dni od porodu osiągnęło wartości nie różniące się istotnie od wartości stwierdzonych u krów kontrolnych (tab. 1 i ryc. 1). Erytrocyty płodów wykazywały najwyższe koncentracje 2,3-DPG, których średnia wartość wynosiła 4,98 $\mu\text{mol/gHb}$ i różniła się istotnie od stężeń stwierdzonych u krów kontrolnych i u krów we wszystkich miesiącach ciąży ($p < 0,001$).

Zawartość hemoglobiny we krwi krów ciężarnych utrzymywała się na względnie stałym poziomie przez cały okres ciąży (zakres wahań średnich od 12,1 do 12,8 g%), z wyjątkiem 9 miesiąca ciąży, kiedy wzrosła do 13,9 g%. Wzrost zawartości hemoglobiny we krwi w 9 miesiącu ciąży wykazywał cechy statystycznej znamienności ($p < 0,001$) w porównaniu z wartościami stwierdzonymi u krów kontrolnych oraz wartościami u krów w okresie od 1 do 8 miesiąca ciąży włącznie (tab. 1). Cechy statystycznej znamienności wykazywał również poporodowy spadek zawartości hemoglobiny we krwi, gdy porównano go z wartościami krów kontrolnych i krów w okresie od 1 do 8 miesiąca ciąży włącznie ($p < 0,001$). Wartość hematokrytowa nie ulegała istotnym zmianom w czasie 8 miesięcy ciąży, wahając się w granicach 0,35—0,36 (tab. 1). W 9 miesiącu ciąży wartość ta wzrosła do 0,38, a zmniejszała się po porodzie do 0,35. Wzrost wartości hematokrytowej w 9 miesiącu ciąży był statystycznie znamienny w porównaniu z wartościami krów kontrolnych oraz wartościami w czasie od 1 do 8 miesiąca ciąży ($p < 0,05$).

Wartości hematokrytowe były najwyższe u płodów (średnio 0,41) i różniły się istotnie pod względem statystycznym ($p < 0,001$) od wartości stwierdzonych zarówno u krów w okresie ciąży, jak również i krów kontrolnych. Średnia zawartość hemoglobiny we krwi badanych płodów wynosiła 12,8 g% i nie różniła się istotnie od średnich wartości u krów ciężarnych i kontrolnych.

OMÓWIENIE

Otrzymane wyniki wskazują na zmiany stężenia 2,3-DPG w erytrocytach krów, manifestujące się występowaniem dwu faz. Pierwsza pojawia się w 4 miesiącu ciąży i charakteryzuje się podwojeniem koncentracji

2,3-DPG w porównaniu z wartościami obserwowanymi w trzech pierwszych miesiącach ciąży oraz wartościami stwierdzonymi u krów kontrolnych. Faza ta trwa jeszcze przez 5 i 6 miesiąc ciąży, po czym stężenie 2,3-DPG obniża się do około $1,0 \mu\text{mol/gHb}$ (wartości typowe dla krów kontrolnych) i nie zmienia się w czasie 8 miesiąca ciąży. Druga faza wzrostu stężenia 2,3-DPG pojawia się w 9 miesiącu i trwa przez okres jednego tygodnia po porodzie. Pierwszą fazę można nazwać pierwotną, a drugą wtórną lub przedporodową.

Stężenie 2,3-DPG w erytrocytach krów jest małe. Ten składnik erytrocytów, poza okresem adaptacji postnatalnej, nie miał większego znaczenia czynnościowego u tego gatunku przeżuwaczy (25).

Wyniki naszych badań wskazują zarówno na wpływ ciąży na stężenie 2,3-DPG u krów, jak również na istnienie pewnego podobieństwa do zmian stężenia 2,3-DPG stwierdzonych w erytrocytach kobiet w czasie ciąży (19). McCulloch i Kelly (19) stwierdzili u kobiet także dwie fazy wzrostu stężenia 2,3-DPG, z których pierwsza pojawiła się między 21 a 24, zaś druga między 33 a 37 tygodniem ciąży. Wprawdzie porównania między gatunkami tak odległymi oraz formułowanie wniosków muszą być dokonywane z wielką ostrożnością, to jednak ze względu na zbliżony czas trwania ciąży oraz obecność dwu faz wzrostu, pojawiających się w podobnych okresach trwania ciąży, porównanie takie wydaje się nie tylko uzasadnione, ale i konieczne. Brak badań nad stężeniem 2,3-DPG u innych gatunków zwierząt w czasie ciąży nie pozwala na jakiegokolwiek uogólnienia i klasyfikacje, jak również na sugestie w odniesieniu do mechanizmu i znaczenia fizjologicznego takich zmian. Próba wyjaśnienia mechanizmu zmian stężenia 2,3-DPG w czasie ciąży u kobiet stanem anemii, uwarunkowanej niedoborami żelaza, którym towarzyszy zwykle zmniejszenie wysycenia żelazem transferyny z równoczesnym obniżeniem stężenia ferrytyny nie dały pozytywnych wyników (19). McCulloch i Kelly (19) nie wykazali także zależności dwu faz wzrostu stężenia 2,3-DPG w ciąży u kobiet od aktywności kinazy pirogronianowej i dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej.

Postulowane uprzednio pełnienie przez 2,3-DPG funkcji ogniwa w dodatnim sprzężeniu zwrotnym między stymulatorami przemian energetycznych a tymi przemianami (22, 27) i zwiększone oddawanie tlenu, powodowane tym składnikiem erytrocytów (4, 9, 23), uzasadnia również przypuszczenie o takiej właśnie roli 2,3-DPG w czasie ciąży u krów i kobiet. Hormonem powodującym wzrost zużycia tlenu, dzięki pełnieniu funkcji koenzymu w reakcji transhydrogenacji, jest estradiol (12, 13), którego maksymalne wydzielanie obserwuje się zarówno u kobiet, jak i krów pod koniec drugiego trymestru oraz w ostatnim miesiącu ciąży (16, 17, 22). Na możliwość stymulacji syntezy 2,3-DPG w erytrocytach krów ciężar-

nych przez estrogeny wskazują także wyniki nie publikowanych badań własnych, w których podawanie dwuetylostilbestrolu owcom nieciężarnym powodowało podwojenie stężenia 2,3-DPG w erytrocytach.

Możliwość takiego wpływu estrogenów u krów powinna być potwierdzona eksperymentalnie, przy uwzględnieniu równoczesnych oznaczeń hormonów odpowiedzialnych za utrzymanie ciąży, stężeń 2,3-DPG w erytrocytach oraz przemian energetycznych organizmu matki.

WNIOSKI

1. Ciąża u krów charakteryzuje się fazowymi zmianami 2,3-DPG w erytrocytach. Pierwsza faza wzrostu wewnątrzkrwinkowego 2,3-DPG pojawia się w 4 miesiącu ciąży i trwa przez 5 i 6 miesiąc oraz cechuje się podwojeniem koncentracji 2,3-DPG (z 1,10 $\mu\text{mol/gHb}$ do 2,25 $\mu\text{mol/gHb}$). Druga faza wzrostu występuje w 9 miesiącu ciąży oraz trwa przez okres jednego tygodnia po porodzie i cechuje się wzrostem stężenia 2,3-DPG do wartości 2,11 $\mu\text{mol/gHb}$.

2. Erytrocyty płodów bydlęcych ostatniego trymestru życia prenatalnego wykazują najwyższe stężenia 2,3-DPG (średnio 4,98 $\mu\text{mol/gHb}$).

PISMIENNICTWO

1. Benesch R., Benesch R. E.: The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **26**, 162, 1967.
2. Benesch R., Benesch R. E.: Intracellular organic phosphates as regulators of oxygen release by hemoglobin. *Nature* **221**, 618, 1969.
3. Bönnig D., Meier U., Skipka W., Külpmann W. R., Meurer K. A.: Some evidence for aldosterone action on 2,3-diphosphoglycerate level in human red cells. *Metabolism* **25**, 9, 1976.
4. Czarnecki A.: Zmiany stężenia 2,3-dwufosfoglicerynianu (2,3-DPG) w krwinkach czerwonych jagniąt w okresie postnatalnym. Praca doktorska, Wyd. Wet. AR, Lublin 1984.
5. Doreau M.: Influence de la prise alimentaire sur les variations de differents constituants plasmatiques chez la vache en fin de gestation et en debut de lactation. *Ann. Rech. Vet.* **14**, 39, 1983.
6. Doxey D. L.: *Haematology of the Ox in Comparative Clinical Haematology*. Ed. by Archer R. K., Jeffcott L. B., Lehmann H. Blackwell. Scientific Publications, Oxford, 215, 1977.
7. Drabkin D. L.: Spectrophotometric studies. The crystallographic and optical properties of the hemoglobins of man in comparison with those of other species. *J. Biol. Chem.* **164**, 703, 1946.
8. Dyce B. J., Bessman S. P.: A rapid nonenzymatic assay for 2,3-DPG in multiple specimens of blood. *Arch. Environ. Health.* **27**, 112, 1973.
9. Głuszak A.: Effect of 2,3-diphosphoglycerate on haemoglobin affinity to

- oxygen in fetal and early postnatal period of life in pigs. *Acta Physiol. Pol.* 30, 507, 1979.
10. Gorshein D., Gardner F. H., Tyree W., Oski F., Delivoria-Papadopoulos M.: Effect of hyperoxia and androgen on red cell 2,3-diphosphoglycerate and oxygen affinity. *Acta Haemat.* 55, 306, 1976.
 11. Grimes A. J.: Human red cell metabolism. Backwell Scientific Publications, Oxford 1980.
 12. Harper H. A., Rodwell V. M., Mayes P. A.: *Zarys chemii fizjologicznej*. PZWL, Warszawa 1983.
 13. Huckabee W. E., Crenshaw C., Curet L. B., Barron D. H.: The effect of the exogenous oestrogen on the blood flow and oxygen consumption of the nonpregnant ewe. *Quart. J. Exp. Physiol.* 55, 16, 1970.
 14. Huckabee W. E., Metcalfe J., Prystowsky H., Barron D. H.: Blood flow and oxygen consumption of the pregnant uterus. *Am. J. Physiol.* 200, 274, 1961.
 15. Kappel L. C., Ingraham L. H., Morgan E. B., Babcock D. K.: Plasma copper concentration and packed cell volume and their relationship to fertility and milk production in Holsten cows. *Am. J. Vet. Res.* 45, 346, 1984.
 16. Kuss E.: Determination of total estrogens in pregnancy urine by spectrophotometry (Kober-Ittrich-Procedure) in methods of hormone analysis. Ed. by H. Breuer, D. Hamel, H. L. Krüskemper. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1976.
 17. Larsen A. L., Engstrom A. W.: The determination of estrogen and progesterone metabolites in urine in pregnancy by gas chromatography. *Am. J. Clin. Path.* 46, 352, 1966.
 18. MacDonald R. G., MacDonald H. N.: Erythrocyte 2,3-diphosphoglycerate and associate haematological parameters during the menstrual cycle and pregnancy. *Br. J. Obstet. Gynaec.* 84, 427, 1977.
 19. McCulloch J. C., Kelly A. M.: Investigation of pregnancy-related changes in red cell 2,3-diphosphoglycerate. *Clin. Chim. Acta* 98, 235, 1979.
 20. MacLennan A. H., Emerson P. M., Hunter D. J. S., Darley J. H.: Tissue oxygenation and red cell 2,3-diphosphoglycerate in normal and abnormal pregnancy. *Br. J. Obstet. Gynaec.* 83, 378, 1976.
 21. O'Dea J. D., Agar N. S.: Gluthathione and 2,3-diphosphoglycerate in the blood of hypoxic ruminants. *Res. Vet. Sci.* 29, 153, 1980.
 22. Robertson H. A., King G. J.: Conjugated estrogens in fetal and maternal fluids of the cow throughout pregnancy. *J. Reprod. Fert.* 55, 453, 1979.
 23. Studziński T.: The postnatal changes in minimal metabolic rate in the pig. *J. Physiol.* 24, 305, 1972.
 24. Studziński T., Głuszak A., Owczarski K.: Effect of anaemia on the 2,3-diphosphoglycerate content of equine erythrocytes. *Acta Physiol. Pol.* 29, 335, 1978.
 25. Studziński T., Czarnecki A.: Postnatal changes in 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) content of calf erythrocytes. *Acta Physiol. Pol.* 31, 357, 1980.
 26. Studziński T., Czarnecki A., Głuszak A.: Effect of acute post-haemorrhagic anaemia on the level of 2,3-diphosphoglycerate in the erythrocytes of sheep. *Acta Physiol. Pol.* 31, 365, 1980.
 27. Studziński T., Czarnecki A., Głuszak A.: Thyroxine effect on 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) level in sheep erythrocytes. *Acta Physiol. Pol.* 33, 129, 1982.
 28. Thompson F. N., van Kampen M., Culver D. H.: Effect of pred-

- nisolone treatment on selected respiratory parameters and cardiac output in prematurely delivered neonatal lambs. *Can. J. Comp. Med.* **42**, 132, 1978.
29. Torrance J., Jacobs P., Restrepo A., Lenfant C., Finch C. A.: Intraerythrocytic adaptation to anaemia. *N. Engl. J. Med.* **283**, 165, 1970.
30. Weir R. J., Paintin D. B., Brown J. J., Fraser R., Lever A. F., Robertson J.I. S., Young J.: A serial study in pregnancy of the plasma concentrations of renin, corticosteroids, electrolytes and proteins and of haematocrit and plasma volume. *J. Obstet. Gynaec. Br. Commonwealth* **78**, 590, 1971.
- Wpł. 3 III 1985 r.

РЕЗЮМЕ

В данной работе определено 2,3-DPG в эритроцитах у зародышей и взрослых коров н.ч.б. породы в период от 1 до 9 месяца беременности, а также в течении 2 первых месяцев после родов.

Самая низкая концентрация 2,3-DPG выступила в эритроцитах небеременных коров (в среднем $1,13 \mu\text{mol/gHb}$), а также у коров в первые 3 месяца беременности (в среднем $1,10 \mu\text{mol/gHb}$). В период беременности были определены две фазы роста. Первая фаза выступила между 4 и 6 месяцами беременности (рост концентрации 2,3-DPG из средней величины $1,10 \mu\text{mol/gHb}$ до $2,85 \mu\text{mol/gHb}$ (в 4 месяце) и $2,25 \mu\text{mol/gHb}$ (в 6 месяце)]. Вторая фаза выступила в 9 месяце беременности и удерживалась еще в течение первой недели после родов. Самый высокий уровень концентрации 2,3-DPG проявляли эритроциты в последнем триместре беременности (в среднем $4,98 \mu\text{mol/gHb}$).

SUMMARY

2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) was determined in erythrocytes of pregnant cows (Black and White Polish Landrace) and of foetuses during the last trimester of prenatal life. The lowest concentration of 2,3-DPG was observed in erythrocytes of non-pregnant control cows (mean value $1.13 \mu\text{mol/g Hb}$) and of pregnant cows during the first three months of pregnancy (mean value $1.10 \mu\text{mol/g Hb}$). Between 4th and 6th month of pregnancy occurred the first phase of 2,3-DPG increase to the level of 2.85 and $2.25 \mu\text{mol/g Hb}$. Between 7th and 8th months of pregnancy the control level of 2,3-DPG was reached which was followed by the second rise in the ninth month (mean value $2.11 \mu\text{mol/g Hb}$) which lasted one week after delivery. Erythrocytes of foetuses showed the highest concentrations of 2,3-DPG (mean value $4.98 \mu\text{mol/g Hb}$) from all investigated cows.