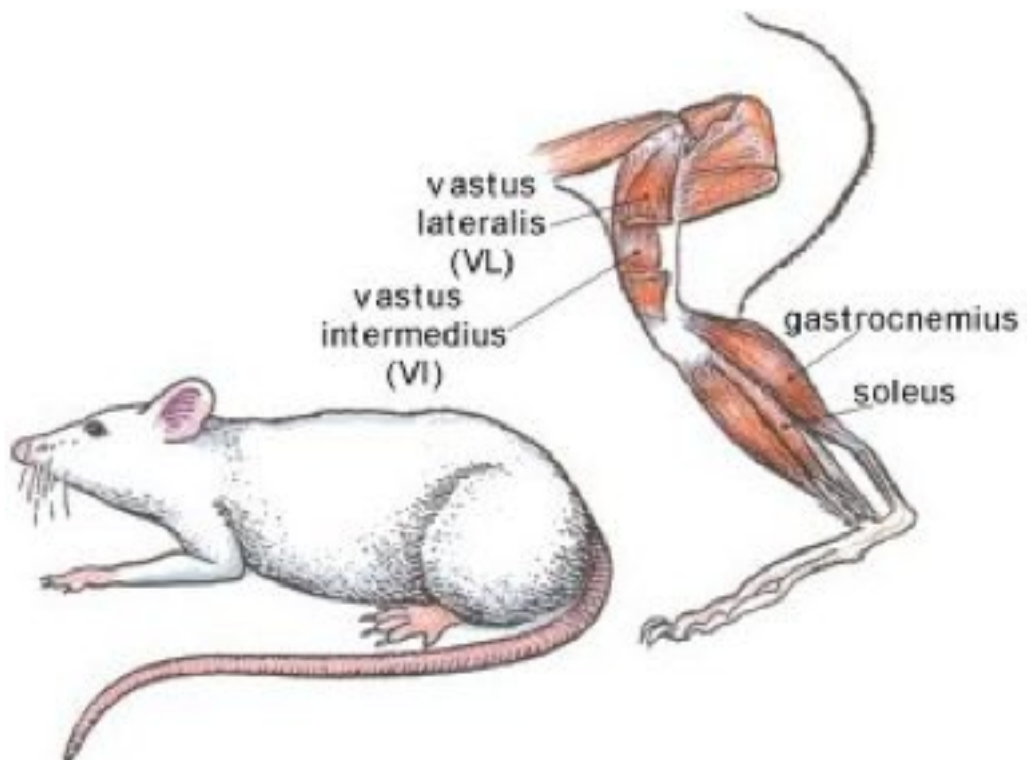


Regulatoriske mekanismer i energistofskiftet

Matilda Lantz og Elif Bayram

Hold 408



Regulatoriske mekanismer i energistofskiftet

Resultatskemaer:

Biopsi	Muskel-0	Muskel-1	Muskel-2	Muskel-3
Vægt [g]	1,32	1,82	1,35	1,58
PCA tilsat [ml]	12,42	16,40	12,15	14,25
PCA supernatant udtaget [ml]	6	6	6	6
KOH+PCA til neutralisering [ml]	8	7,9	8,1	7,95
Vævskoncentration [g/ml]	0,041	0,043	0,043	0,043

Udregningseksempel for udregning af vævskoncentration for biopsi muskel-0:

$$M = \frac{\text{vægt}}{\text{PCA tilsat} + \text{muskelvolumen}} \cdot \frac{\text{PCA supernatant udtaget}}{\text{PCA supernatant udtaget} + (\text{KOH} + \text{PCA til neutralisering})} \Leftrightarrow$$

$$M_0 = \frac{1,32 \text{ g}}{12,42 \text{ ml} + 1,32 \text{ ml}} \cdot \frac{6 \text{ ml}}{6 \text{ ml} + 8 \text{ ml}} = 0,041 \frac{\text{g}}{\text{ml}}$$

Tilsvarende udregning er lavet for de resterende biopsier.

ATP-PCr	Muskel - 0	Muskel - 1	Muskel - 2	Muskel - 3	Standard	Blind
A1	0,226	0,240	0,221	0,219	0,191	0,179
A2	0,456	0,404	0,376	0,431	0,528	0,184
A3	1,130	0,607	0,568	0,789	0,863	0,228
$\Delta n_{\text{NADPH}}(1)$	0,038	0,027	0,025	0,035	0,055	0,001
$\Delta n_{\text{NADPH}}(2)$	0,118	0,038	0,0356	0,064	0,061	0,009

ADP-AMP	Muskel - 0	Muskel - 1	Muskel - 2	Muskel - 3	Standard	Blind
A1	1,066	1,072	1,053	1,071	1,058	1,058
A2	0,988	0,936	0,947	0,953	0,837	1,050
A3	0,981	0,930	0,931	0,932	0,489	1,046
$\Delta n_{\text{NADPH}}(1)$	0,012	0,022	0,017	0,019	0,037	-0,0003
$\Delta n_{\text{NADPH}}(2)$	-0,00032	-0,00042	0,00134	0,0022	0,0605	-0,00095

Spørgsmål:

1: hvor mange μmol af de 4 forskellige metabolitter forventes det at man genfinder i standardprøverne.

$$\text{ATP} - \text{PCr} : 125 \mu\text{L} \cdot 0,4 \cdot 10^{-3} \text{ M} = 0,05 \mu\text{mol}$$

$$\text{ADP} - \text{AMP} : 300 \mu\text{L} \cdot 0,1 \cdot 10^{-3} \text{ M} = 0,03 \mu\text{mol}$$

2: hvor meget afviger det målte indhold i standardprøverne i forhold til det forventede.

Afvigelsen for de enkelte metabolitter:

$$\text{ATP} = \text{standard} - \text{blind} = 0,0549\mu\text{mol} - 0,001\mu\text{mol} = 0,054\mu\text{mol}$$

$$\text{ATP - afvigelse} = \frac{0,054\mu\text{mol} - 0,05}{0,05} = 7,54\%$$

$$\text{PCr} = \text{standard} - \text{blind} = 0,061\mu\text{mol} - 0,009\mu\text{mol} = 0,052\mu\text{mol}$$

$$\text{PCr - afvigelse} = \frac{0,052\mu\text{mol} - 0,05}{0,05} = 4,3\%$$

$$\text{ADP} = \text{standard} - \text{blind} = 0,037\mu\text{mol} - -0,0003\mu\text{mol} = 0,0375\mu\text{mol}$$

$$\text{ADP - afvigelse} = \frac{0,0375\mu\text{mol} - 0,03}{0,03} = 25,09\%$$

$$\text{AMP} = \text{standard} - \text{blind} = \frac{0,0605\mu\text{mol} - -0,00095\mu\text{mol}}{2} = 0,0307\mu\text{mol}$$

$$\text{AMP - afvigelse} = \frac{0,0307\mu\text{mol} - 0,03}{0,03} = 2,5\%$$

3: Hvilken betydning vil man forvente en sådan forurening har på målingerne?

Myokinase laver $2 \text{ ADO} \rightarrow \text{AMP} + \text{ATP}$, den vil således danne ATP uden PCr tilstede (når [ADP] er høj, da den har en lavere affinitet for ADP), vi får således en høj ATP, der kan ses som en høj blindværdi i $\Delta n_{\text{NADPH}}(2)$ der er meget højere end $\Delta n_{\text{NADPH}}(1)$ (i vores tilfælde 9 gange).

Dette korrigerer vi får når trækker blindprøven fra.

4: Ses denne effekt på resultaterne?

Se spørgsmål 3.

Resultatskema, in vivo metabolitter

	Muskel-0	Muskel-1	Muskel-2	Muskel-3
ATP	7,09	4,79	4,58	6,25
PCr	21,21	5,33	5,01	10,3
ADP	0,997	1,74	1,35	1,50
AMP	0,0256	0,0207	0,09	0,12

Udregningseksempler for Muskel-0 for ATP, PCr, ADP og AMP, tilsvarende udregninger er lavet for resten.

$$\text{ATP} = \frac{\Delta n_{\text{NADPH}}(1) - \text{blind}}{v_{\text{ævs}} \cdot v_{\text{sk}} \cdot \text{koncentration}} = \frac{0,038\mu\text{mol} - 0,001\mu\text{mol}}{0,125\text{ml} \cdot 0,041\text{g/ml}} = 7,09 \frac{\mu\text{mol}}{\text{g}}$$

$$PCr = \frac{\Delta n_{NADPH}(2) - blind}{v \text{ ævsvolumen} \cdot v \text{ ævskoncentration}} = \frac{0,118 \mu\text{mol} - 0,009 \mu\text{mol}}{0,125 \text{ ml} \cdot 0,041 \text{ g/ml}} = 21,21 \frac{\mu\text{mol}}{\text{g}}$$

$$ADP = \frac{\Delta n_{NADPH}(1) - blind}{v \text{ ævsvolumen} \cdot v \text{ ævskoncentration}} = \frac{0,012 \mu\text{mol} - -0,0003 \mu\text{mol}}{0,3 \text{ ml} \cdot 0,041 \text{ g/ml}} = 0,997 \frac{\mu\text{mol}}{\text{g}}$$

$$AMP = \frac{\left(\frac{\Delta n_{NADPH}(2) - blind}{2} \right)}{v \text{ ævsvolumen} \cdot v \text{ ævskoncentration}} = \frac{\left(\frac{-0,00032 \mu\text{mol} - -0,00095 \mu\text{mol}}{2} \right)}{0,3 \text{ ml} \cdot 0,041 \text{ g/ml}} = 0,0256 \frac{\mu\text{mol}}{\text{g}}$$

NMR:

- 1: refererer til Elif finger
- 2: refererer til Christian finger
- 3: refererer til Christian Ben
- 4: referer til Asger ben
- 5: referer til Rune ben
- 6: referer til Morten finger

Udregningseksempler for alle udregninger (Elifs finger):

a) PCr/ATP ratio i hvile: $ratio = \frac{PCr}{ATP - g} = \frac{15549}{3880} = 4,007$

b) [PCr] i hvile: her sættes [ATP] til 5,5 mM:
 $[PCr] = ratio \cdot [ATP] = 4,007 \cdot 5,5 \text{ mM} = 22,04 \text{ mM}$

c) Intracellulær pH i hvile: $pH = 6,75 + \log \frac{\delta - 3,27}{5,69 - \delta} = \frac{4,83 - 3,27}{5,69 - 4,83} = 7,009$

d) Den fri [ADP] i hvile:

$$[ADP]_{hvile} = \frac{[Cr_{hvile}] \cdot [ATP]}{[PCr_{hvile}] \cdot 10^{-pH} \cdot K_{eq}} = \frac{(0,2 \cdot 22,04 \text{ mM}) \cdot 5,5 \text{ mM}}{22,04 \text{ mM} \cdot 10^{-7,009} \cdot 1,66 \cdot 10^9 / M} = 0,0068 \text{ mM}$$

e) Den fri [ADP] til tidspunktet hvor muskelarbejdet ophører:

$$[ADP]_{hvile} = \frac{[Cr_{hvile}] \cdot [ATP]}{[PCr_{hvile}] \cdot 10^{-pH} \cdot K_{eq}} = \frac{16,35 \text{ mM} \cdot 5,5 \text{ mM}}{10,1 \text{ mM} \cdot 10^{-6,69} \cdot 1,66 \cdot 10^9 / M} = 0,026 \text{ mM}$$

f) Den maksimale aerobe ATP syntesehastighed Vmax:

$$V_{\max} = \frac{v \cdot (K_m + [ADP])}{[ADP]} = \frac{0,151 \frac{\text{mM}}{\text{s}} \cdot (23 \mu\text{M} + 0,026 \cdot 10^3 \mu\text{M})}{0,026 \cdot 10^3 \mu\text{M}} = 0,28 \frac{\text{mM}}{\text{s}} = 0,28 \frac{\mu\text{mol}}{\text{g} \cdot \text{s}}$$

g) Vmax omregnet til liter Oxygen forbrug per min per kg aktiv muskelmasse:

$$V_{\max} = \left(\frac{V_{\max} \cdot 60 \frac{\text{s}}{\text{min}} \cdot 1 \frac{\text{l}}{\text{kg}}}{6 \frac{ATP}{O_2}} \right) \cdot R = \left(\frac{0,28 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol} \cdot ATP}{\text{l} \cdot \text{s}} \cdot 60 \frac{\text{s}}{\text{min}} \cdot 1 \frac{\text{l}}{\text{kg}}}{6 \frac{ATP}{O_2}} \right) \cdot 24 \frac{\text{l}}{\text{mol}} = 67,97 \cdot 10^{-3} \frac{\text{l} \cdot O_2}{\text{min kg}}$$

Her er efterfølgende resultater for alle:

	a)	b)	c)	d)	e)	f)	g)
1	4,007	22,041	7,009	0,007	0,026	0,28	67,97

2	4,449	24,471	7,073	0,008	0,015	0,27	64,84
3	3,795	20,872	7,024	0,007	0,052	0,33	80,27
4	3,566	19,615	7,024	0,007	0,126	0,26	62,46
5	3,502	19,261	7,056	0,008	0,239	0,37	88,39
6	3,491	19,203	7,024	0,007	0,0303	0,22	53,58

I rapporten diskuteres:

1: Den anvendte metodes indflydelse på hvorvidt de opnåede metabolitmålinger repræsenterer "sande" in vivo koncentrationer, herunder sammenholdes biopsi- og NMR målinger. Forskelle i [PCr]/[ATP] ratio og i [ADP] kommenteres.

$$\text{Rotte ratio: } \text{ratio} = \frac{[PCr]}{[ATP]} = \frac{21,21}{7,09} = 3$$

$$\text{Menneske ratio (Elif finger): } \text{ratio} = \frac{PCr}{ATP - g} = \frac{15549}{3880} = 4,007$$

Det er godt med en stor ratio, da man så kan lave meget ATP fra sin PCr, hvilket gør at man bedre kan udføre arbejdet.

[ADP]hvile rotte: 0,997 mM

[ADP]hvile menneske (Elif finger): 0,0068 mM

Der er $\frac{0,997mM}{0,0068mM} = 146,6$ ganges forskel, hvor rotten har den største konc. Af ADP i hvile.

Vi vil normalt forvente at menneskets konc. Vil være højere, men da det er ved NMR dette resultat er fundet får vi en lavere ADP værdi. Dette skyldes, at NMR kun kan måle den frie ADP, hvilket svarer til ca. 1% af al ADP i kroppen, resten er bundet i myosin.

2: Effekten af iskæmi på hvilende muskel.

PCr falder før ATP hos rotter.

ATP falder meget mellem 2 og 3 timer, ADP stiger først og falder senere, mens AMP stiger konstant (alt omdannes til AMP).

Dette kan ses på skemaet i vejledningen side 13, hvor de forventede værdier står opskrevet, men det er ikke helt de samme værdier vi har fået, hvilket blandt andet kan skyldes, at den rotte vi skulle have brugt var død, hvorfor vi brugte muskelprøver der havde stået på køl.

3: Hvorledes muskel pH ændres under og efter arbejde.

Muskels pH er i hvile 7,009, mens den ved ophørt arbejde er 6,69, dvs. først falder pH'en under arbejde og siden stiger den igen til startværdien. Dette kan vi dog ikke se, da det ville kræve at vores målinger var udført over en længere periodes arbejde.

4: Denne rolle PCr spiller i musklens energistofskifte.

PCr er det der bruges som 'buffer' for energi, men bruges hurtigt ved arbejde og bygges siden op igen. Bagefter er det glykogen lageret og glykolysen, der tager over som primær energikilde.

5: Den maksimale aerobe og anaerobe ATP syntasekapacitet.

V_{max} ATP syntese vi vælger den utrænede fra tabellen ved anaerob og får:

$$\frac{17,6 \frac{mM}{30s}}{30s} = 0,59 \frac{mM}{s}$$

V_{max} ATP ved aerob:

$$V_{\max} = 0,28 \frac{mM}{s}$$

Der er dobbelt så meget ATP ved anaerob forbrænding end ved aerob, men dette opvejes til gengæld af at der ved den anaerob kun dannes 2 ATP pr. glukose, mens der ved aerob dannes 36-38 ATP pr. glukosemolekyle, hvorfor man hurtigere vil løbe tør for energi, hvis man brugte den anaerobe forbrænding, da ens opbyggede energiresourcer ikke bliver udnyttet fuldt ud. Desuden dannes der lactat, der ikke kan nedbrydes i Muskelcellen men må ud til andre væv, for at blive nedbrudt, hvilket giver anledning til at man føler smerte (musklerne syrer til) grundet lavere pH.