

Regulatoriske mekanismer i energistofskiftet

Del A

Formål:

Måling af metabolitkonc. i biopsier fra muskelvæv (rotter).

Fremgangsmåde: se øvelsesvejledning

Vi målte på ATP og PCr. Herudover var der andre der målte på AMP og ADP.

Teori:

Den arbejdende muskel kan få energi på tre måder: via direkte fosforylering, anaerob glykolyse og oxidativ metabolisme. I denne rapport vil vi se nærmere på den direkte fosforylering.

ATP findes i en koncentration på 5-6 mmol/kg i muskel. ATP indeholder 2 energirige bindinger. ATP spaltes under arbejde først til ADP og videre til AMP. (se Bilag 1)

Under hård arbejde omdannes ATP til ADP og P i løbet af 2-4 sek.

PCr er en energirig forbindelse, som findes hjerte, hjerne og muskler.

Phosphocreatin er tilstede i musklen i koncentration på 20 mmol/kg. Under arbejde når konc af ATP falder og konc af ADP stiger vil PCR+ ADP blive omdannet til creatin og ATP. Gendannelsen katalyseres af creatinkinase under forbrug af ATP.

Resultater:

Resultatskema 1:

Biopsi	Muskel 0	Muskel 1	Muskel 2	Muskel 3
Vægt i g	1.52	0.79	1.0	1.20
ml PCA tilsat	13.68	7.11	9.0	10.8

Resultatskema 2:

ml PCA supernatant udtaget	6.0	6.0	6.0	6.0
ml KOH + PCA, neutralisering	7.8 + 0.3	8.475	7.8 + 0.4	7.85
Vævskonc. i g/ml	0.04255	0.04145	0.04225	0.04332
Vævskonc. i g	0.005319	0.005181	0.005281	0.005415

Udregninger resultatskema 2:

Udregning af vævskonc. i g/ml:

Muskelvægt/ PCA + muskelvægt = 0.1 (herved fås en 10% opløsning) →

0.1 * 6 ml supernatant = 0.6 g →

0.6 / (6 ml supernatant + ml neutralisering) = g/ml

Vævskonc. g

g/ml * 0.125 ml

Resultatskema 3:

ATP-PCr	Muskel 0	Muskel 1	Muskel 2	Muskel 3	Standard	Blind
A ₁	0.232	0.229	0.261	0.252	0.189	0.180
A ₂	0.482	0.438	0.486	0.345	0.504	0.179
A ₃	1.304	0.679	0.797	0.874	0.849	0.258
(A ₂ - A ₁)-blind (μmol)	0.03717	0.0341	0.03672	0.01533	0.05118	0
(A ₃ - A ₂)-blind (μmol)	0.1305	0.02957	0.04184	0.07775	0.04776	0

Udregninger resultatskema 3:

ATP(A₂ - A₁)-blind : se beregningsark n_{ATP}

PCr(A₃ - A₂)-blind : se beregningsark n_{PCr}

Resultatskema 4:

	Muskel 0	Muskel 1	Muskel 2	Muskel 3
ATP	6.9882 μmol /g	6.5817 μmol/g	6.9532 μmol/g	2.8310 μmol/g
PCr	24.5347 μmol/g	5.7074 μmol/g	7.9227 μmol/g	8.8199 μmol/g
ADP	0.83 μmol/g	1.36 μmol/g	1.71 μmol/g	0.96 μmol/g
AMP	0.1 μmol/g	0.1 μmol/g	0.17 μmol/g	0.195 μmol/g

Referencetabel:

	0 min	60 min	120 min	240 min
ATP	7.43	6.78	5.51	2.37
PCr	17.57	10.77	10.90	4.95
ADP	0.73	0.92	1.00	0.87
AMP	0.08	0.11	0.18	0.15

Udregninger resultatskema 4:

Udregning af ATP μmol/g : ATP(A₂ - A₁)-blind / vævskonc. g

Udregning af PCr μmol/g : PCr(A₃ - A₂)-blind / vævskonc. g

Diskussion:

I vores forsøg har muskelen ikke været i arbejde, men er udelukkende udsat for hypoxi. Dette medfører at processerne går meget langsommere, hvorfor vi regner timer og ikke sekunder før ændringer indtræffer.

PCr

Vi forventer at mængden af PCr i muskelen falder drastisk med tiden, da PCr er det energirige stof der forbruges hurtigst i vævene.

I vores forsøg falder PCr fra 0 til 1 time(fra 24.53 μmol/g til 5.71 μmol/g). Dette stemmer overens med teorien, men faldet er meget drastisk i forhold til referencetabellen. (Hvorfor?)

Efterfølgende (fra det 120 min) stiger PCr-mængden. Udfra referencetabellen kan vi se at dette også er tilfældet for målinger ved det 120 min, dog fortsætter stigningen ikke i referencetabellen, som den gør i vores forsøg. Ingen af delene har vi nogen fornuftig forklaring på, bortset fra fejl i forsøgsgangen.

ATP

Da muskelen ikke tilføres ilt og derfor ikke kan danne nyt ATP, forventer vi at ATP falder med tiden (se graf i teori).

Vores resultater viser et fald i ATP, som forventet, fra 6,988 $\mu\text{mol/g}$ til 2.831 $\mu\text{mol/g}$. Dog er muskel 2 lidt for høj - den stiger faktisk i forhold til muskel 1. Det er dog så lille at vi vil se bort fra det.

ADP

ADP forventes først at stige og siden at falde, fordi der først dannes ADP ud fra ATP og senere ATP og AMP ud fra 2 ADP.



Vores resultater er som forventet.

AMP

Grundet ovenstående sammenhæng imellem ATP, ADP og AMP forventer vi at AMP konc. stiger, startende fra nær nul.

Vores resultater er som vi forventede, dog undres vi over, at man i referencetabellen til tiden 240 min ser et fald i AMP. Dette stemmer ikke overens med den tegnede graf fra forelæsning, hvilket vi ikke forstår. (Hvorfor?)

Del BFormål:

Koblingen imellem muskelkontraktion og ATP-omsætningen vist ved hjælp af NMR-spektroskopiske målinger.

Teori:

Læs om NMR-spektroskopi i øvelsesvejledning.

Udregninger:

AD1

a) PCr/ATP ratio i hvile:

Til beregning bruges de på bilag 1 beregnede arealer (areal under graf) for PCr og ATP-g:

$$\text{For arm: } 10119(\text{PCr}) / 2509(\text{ATPg}) = \underline{4.033}$$

$$\text{For ben: } 5563(\text{PCr}) / 872(\text{ATPg}) = \underline{6.380}$$

b) [PCr] i hvile:

Til beregning af denne konc. bruges det faktum at [ATP] i hvile er 5,5 mM

$$\text{For arm: } 5,5 \text{ mM} * 4.033 = \underline{22.182 \text{ mM}}$$

$$\text{For ben: } 5,5 \text{ mM} * 6.380 = \underline{35.088 \text{ mM}}$$

c) Intracellulært pH i hvile:

Til udregning af pH aflæses P_i 's frekvens på Bilag 1 og indsættes i formel 1 appendix 1.

$$\text{For arm: } \text{pH} = 6.75 + \log (4.85 - 3.27) / (5.69 - 4.85) = \underline{7.024}$$

$$\text{For ben: } \text{pH} = 6.75 + \log (4.89 - 3.27) / (5.69 - 4.85) = \underline{6.890}$$

d) Den fri ADP konc. i hvile:

$$\text{For arm: } [ADP_i] = ((22.182 * 10^{-3} \mu\text{M} * 0.2) * 5.5 * 10^{-3} \mu\text{M}) / (22.182 * 10^{-3} \mu\text{M} * 10^{-7.024} * 1.66 * 10^9) = \underline{7.003 \mu\text{M}}$$

$$\text{For ben: } [ADP_i] = ((35.088 * 10^{-3} \mu\text{M} * 0.2) * 5.5 * 10^{-3} \mu\text{M}) / (35.088 * 10^{-3} \mu\text{M} * 10^{-6.890} * 1.66 * 10^9) = \underline{5.144 \mu\text{M}}$$

AD2

a) [ADP] ved arbejde :

$$\text{For arm: } [ADP_i] = ((0.2 * 22.128 + (22.2 - 11.5)) * 5.5) / (11.5 * 10^{-7.024} * 1.66 * 10^6) = \underline{46.09 \mu\text{M}}$$

$$\text{For ben: } [ADP_i] = ((0.2 * 35.1 + (35.1 - 27.9)) * 5.5) / (27.9 * 10^{-6.890} * 1.66 * 10^6) = \underline{13.108 \mu\text{M}}$$

b) V max:

$$\text{For arm: } (0.101 * (23 + 46.09)) / 46.09 = \underline{0.151 \mu\text{M/g/sek}}$$

$$\text{For ben: } (0.115 * (23 + 13.108)) / 13.108 = \underline{0.317 \mu\text{M/g/sek}}$$

AD3

a) Iltforbrug pr. min pr. kg aktiv muskelmasse

$$\text{For arm: } (0.151 \mu\text{M/g/sek} * 60 \text{ sek} * 18000 \text{ g} * 22.4 \text{ mol O}_2 / \text{L}) / 5 * 10^6 = \underline{0.732 \text{ L O}_2 / \text{min}}$$

$$\text{For ben: } (0.317 \mu\text{M/g/sek} * 60 \text{ sek} * 14500 \text{ g} * 22.4 \text{ mol O}_2 / \text{L}) / 5 * 10^6 = \underline{12.435 \text{ L O}_2 / \text{min}}$$

Diskussion af resultater:**1. Sammenligning af PCr/ATP ratio:**

Muskel 0	3.51		
Muskel 1	0.87	Arm (NMR)	4.033
Muskel 2	1.14	Ben (NMR)	6.380
Muskel 3	3.12		

Det ses tydeligt at PCr/ATP ratio er størst ved NMR målingen. Dette skyldes at der i denne måling går ud fra at alt O₂ bruges til at regenerere PCr. Dette er nærmere 70 % i virkeligheden, hvorfor ration er forhøjet.

I metabolitmålingen burde PCr/ATP ratioen fortsætte med at falde. Dette er dog ikke tilfældet, da resultaterne ikke er som forventet jvf. (Diskussion af metabolitresultater).

I NMR-målingen viser det sig at PCr/ATP ratioen er størst for benets vedkommende. Det kan enten skyldes, at NMR målingerne for armet og benet er taget på to forskellige personer. Forsøgspersonen med benet kan måske have opbygget et større PCr/creatin-lager via træning.

En anden grund kan ligeledes være, at benet indeholder mere PCr end armen, måske pga. fiberfordelingen (flest hvide fibre).

2. Se bilag 1 for graf

Effekten af iskæmi (mangel på O₂) på en muskel er, at PCr og ATP forbruges uden at det kan gendannes.

Ved iskæmi ophobes metaboliske produkter. Under arbejde især lactat, dette sænker PH. Ved blodforsyningen ikke kommer igen dør vævet. Der er forskel på hvor længe de forskellige væv kan klare sig uden ilt. Skeletmuskulatur kan klare sig i flere timer i hvile. Dette ser vi i vores forsøg hvor musklen stadig efter 3 timer indeholder ATP (bilag 1). Myokardiet kan kun klare sig et par timer før det løber tør for ATP.

3. Hvorledes musklens PH ændres under arbejde

Ved arbejde dannes lactat via den anaerobe glycolyse når den tilstedeværende PCr og ATP er opbrugt.

Lactat-dannelsen bevirker at PH falder. Dette ses i vores resultater under NMR øvelsen, hvor PH falder for henholdsvis arm og ben falder med 0,344 og 0,38.

4. PCr rolle i musklerne stofskifte

Ifølge Medical biochemistry af Meisenberg og Simmons vil den tilstedeværende 5-6mmol ATP blive forbrugt de første få sekunder. I takt faldet af ATP og stigningen i ADP sættes nedbrydningen af PCr i gang. Denne proces forløber 6-20 sekunder, hvorefter musklen går over til anaerob glycolyse.

Vi havde forstået, gennem forelæsningerne, at der kun var PCr til få sekunder, hvorefter den anaerobe glycolyse sætter ind. Dette lader ikke til at stemme overens med hvad der står i bogen. Vi vil derfor gerne have en kommentar til hvad der er det rigtige.

PCr mængden i musklerne kan øges ved træning eller ved indtagelse af creatin-tilskud. Dette bruges især ved sports-præstationer af kort varighed som fx sprint.

5. Den maksimale aerobe og anaerobe ATP-syntese-kapacitet

Den maksimale aerobe ATP syntese kapacitet er for armen $0,151\mu\text{M/g/sek}$ og for benet $0,317\mu\text{M/g/sek}$.

Den anaerobe ATP syntese kapacitet for arm er $(2,52\text{ mM/sek} / 18000\text{ g.}) * 10^3 = 0,14\ \mu\text{M/g/sek}$.

Den anaerobe ATP syntese kapacitet for benet er $(21,12\text{ mM/sek} / 14500\text{ g.}) * 10^3 = 1,45\mu\text{M/g/sek}$.

Resultaterne for benet stemmer fint overens med hvad vi forventer, da den anaerobe syntesehastighed er langt større end den aerobe. Vi undres over ikke at se det samme mønster for armen.