

# **B I O K E M I**

Vejledning til biokemiøvelse i organkursus 5 på 5. semester  
(2. udgave forår 2003)

## **REGULATORISKE MEKANISMER I ENERGISTOFSKIFTET**

1. Målinger af metabolitter i muskelbiopsier fra rotter.
2. Non-invasive  $^{31}\text{P}$ -NMR spektroskopiske målinger af ATP omsætning i muskler på forsøgspersoner.

Bjørn Quistorff, Susanne Johannessen

Institut for Medicinsk Biokemi & Genetik  
Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet  
Panum Institutet  
Københavns Universitet

## INDHOLD

Øvelsens opbygning og formål	3
1. dag: måling af metabolitkoncentrationer i biopsier fra muskelvæv.	4
2. dag: NMR spektroskopiske målinger	14
Rapport	17
Appendix 1	
Beregningsvejledning for NMR data	19
Appendix 2	
Oversigtsartikel: $^{31}\text{P}$ magnetic resonance spectroscopy <i>in vivo</i> in a medical context	22

## ØVELSENS OPBYGNING OG INDHOLD

Øvelsen belyser energistofskiftet i muskler, og demonstrerer samtidig nogle teknikker, der er generelt anvendelige ved stofskifteundersøgelser *in vivo*. Det ene af øvelsens momenter (måling af metabolitkoncentrationer i væv) udføres på rotter, mens det andet, phosphor-kernemagnetisk-resonans-spektroskopi ( $^{31}\text{P}$ MRS) udføres med de studerende som forsøgspersoner. NMR undersøgelsesmetoden anvendes i udstrakt grad på hospitalerne (hvor den betegnes magnetisk resonans, (MR)). Såfremt nogle simple sikkerhedsforskrifter overholdes, er det en målemetode helt uden bivirkninger eller helbredsrisici.

Øvelsen strækker sig over 2 øvelsesdage à hhv. 4 og 3 timer. Den ene dag udføres metabolitmålinger på muskelbiopsier, den anden dag udføres NMR spektroskopiske målinger. Herudover er der 2 x 1 times forberedelse, hvor øvelsens principper og formål gennemgås samt 1 times efterbehandling af de opnåede data. Hvert hold á 24 studerende opdeles i 2 grupper á 12 studenter. Til hver gruppe er knyttet én lærer.

Rapporten afleveres senest 1 uge efter efterbehandlingstimen. Den enkelte gruppe må gerne aflevere én samlet rapport.

## 1. dag: MÅLING AF METABOLITKONCENTRATIONER I MUSKELVÆVSBIOPSIER.

### Baggrund og teori:

Den levende tilstand er karakteriseret ved et konstant energiforbrug til opretholdelse af iongradienter og elektriske potentialer over membraner. Hertil kommer en række cellulære funktioner såsom muskelkontraktion, fordøjelses- og sekretionsprocesser samt syntese af makromolekyler, f.eks. proteiner og glycogen. Alle disse processer betjener sig af ATP som energikilde. ATP leverer den nødvendige energi ved spaltning af den terminale syreanhydridbinding under dannelse af ADP og uorganisk fosfat,  $P_i$ . I muskler, hjerte og hjerne findes desuden den energirige forbindelse fosfocreatin, PCr, som i en reaktion katalyseret af creatinkinase, CK, kan fosforylere ADP til ATP under samtidig dannelse af creatin, Cr:



Aktiviteten af creatinkinase er høj, specielt i skeletmuskler, og processen antages at være i eller nær ligevægt under fysiologiske omstændigheder. Derved kommer fosfocreatin til at fungere som en "energibuffer" under muskelarbejde. Et kortvarigt (sekunder), hårdt muskelarbejde bliver hovedsageligt udført med PCr som energikilde. I hvile er PCr koncentrationen så høj som 20-30 mM, svarende til en fri energi på ca. 1.5 kJ/kg muskel.

De enkelte vævs iltforbrug via oxidativ fosforylering reguleres svarende til behovet for ATP. På isolerede mitochondrier kan det vises, at ADP koncentrationen er den afgørende regulator af iltforbrugets størrelse, dvs. spaltningshastigheden af ATP til ADP styrer iltforbruget. I det intakte væv er forholdene imidlertid mere komplicerede og på visse punkter endnu ikke fuldt afklarede. ADP synes dog at være den væsentligste regulator for iltforbruget i skeletmuskulatur (steady-state aerobt arbejde), hvorimod koncentrationen af uorganisk fosfat i leveren spiller en langt større rolle end ADP. For hjertet tyder den nyeste forskning, primært baseret på anvendelse af *in vivo* NMR spektroskopisk teknik, på at tilbuddet af reduktionsækvivalenter (NADH) til respirationskæden er den væsentligste regulerende faktor for dette vævs iltforbrug.

Det er derfor vigtigt at kunne måle metabolitkoncentrationer *in vivo* nøjagtigt, specielt koncentrationen af de ovenfor omtalte energirige fosfatforbindelser og uorganisk fosfat. Imidlertid vil selv kortvarig hypoxi medføre betydelige ændringer i koncentrationen af disse stoffer, og man må derfor tage særlige forholdsregler for at opnå måleresultater, som afspejler den "sande" *in vivo* situation og ikke er ændret af prøveudtagningen og den efterfølgende prøvebehandling. Klipper man f.eks. et stykke lever ud og lader det ligge ved stuetemperatur, vil koncentrationen af ATP falde ca. 50% indenfor 20-30 sekunder. Det drejer sig derfor om at få inaktiveret de enzymatiske processer som forbruger ATP så hurtigt som muligt efter at vævsprøven (biopsien) er udtaget. En meget anvendt metode hertil er lynfrysning af den udtagne biopsi med efterfølgende syre- eller basefældning af proteiner og deraf følgende inaktivering af metaboliske processer samt ekstraktion af lavmolekylære, syre- eller baseopløselige metabolitter.

Vi har i denne øvelse valgt at demonstrere måling af ATP, ADP, AMP og PCr målt på muskelbiopsier udtaget fra rotte.

## FREMGANGSMÅDE

Laboranten udfører biopsitagningen som demonstration for hele holdet.

Studenterne vejer og ekstraherer de frosne biopsier som beskrevet i vejledningen med følgende arbejdsfordeling:

Gruppe 1 arbejder med biopsierne "0-min" og "5 min"

Gruppe 2 med biopsierne "2-min" og "15 min".

Hver gruppe opdeles i 6 delhold (hold A-F) á 2 studenter. Hvert delhold måler på alle 4 biopsier.

Delhold A, C og E måler på ADP/AMP

Delhold B, D og F måler på ATP/PCr

Målingerne af ADP/AMP og ATP/PCr foregår på Shimadzu spektrofotometrene. To delhold arbejder ved samme instrument og koordinerer målingerne (forklares af lærer eller laborant). Læs den fremlagte instruktion for instrumenterne før målingerne begyndes.

### Biopsiudtagning, vejning og ekstraktion

Biopsiudtagningen udføres af laboranten som demonstration for hele holdet, mens vejning og ekstraktionen udføres af studenterne.

Forsøgene udføres på Wistar rotter, hvor der tages biopsier (vævsprøver) fra muskel (begge m. quadriceps femoris).

Den bedøvede rotte anbringes på "operationsbordet" og lårmusklen blottes, idet man sørger for ikke at klippe store blodkar over. Musklen klippes fri, og en del af muskelen ("muskel-0") fryses så hurtigt som muligt ved presning mellem to aluminium blokke, kølet i flydende kvælstof til  $-196^{\circ}\text{C}$  (freeze-clamping). Det frosne væv anbringes i flydende kvælstof i en isolerende flamingoskumbakke. Proceduren gentages efter 2, 5 og 15 min ("muskel-2", "muskel-5" og "muskel-15"). Studenterne overtager herefter det videre arbejde.

De frosne vævsstykker vejes på en grovvægt (2 decimaler), idet man forinden har tareret den lille flamingoskumbakke, som de frosne vævsstykker anbringes i under vejningen. Efter vejningen lægges vævsstykkerne øjeblikkeligt tilbage i flydende kvælstof.

Næste trin er syreekstraktion af vævet med det formål at fælde proteiner (stoppe enzymatiske processer) og ekstrahere metabolitter fra vævet.

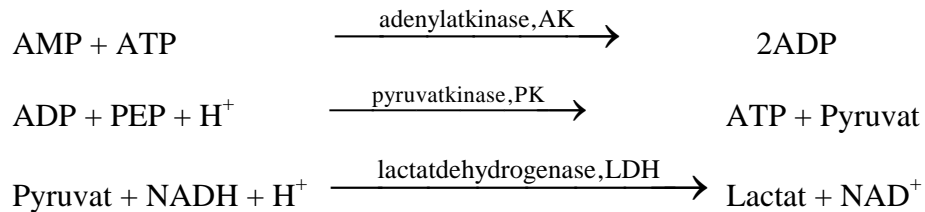
Inden ekstraktionen påbegyndes afpipetteres den beregnede mængde 2M perchlorsyre (PCA) i mærkede centrifugeglas (50 ml plastrør), således at der opnås et 10% ekstrakt, f.eks. 1 gram væv plus 9 ml PCA. Glassene holdes på is.

Vævsstykket pulveriseres i en porcelænsmorter, som ligeledes er kølet i flydende kvælstof. Ved brug af ske og tragt (kølet i flydende kvælstof) overføres vævspulveret så hurtigt som muligt til centrifugeglasset med iskold 2M PCA. Centrifugeglasset er anbragt i isbakke under denne proces. Vævspulveret homogeniseres straks med UltraThurax RXT25 ved 16-20.000 rpm i 3 x 20 sekunder med 15 sekunders pause. Under hele homogeniseringen holdes centrifugeglasset i isvand. Homogenatet centrifugeres herefter ved 4°C, 10 000 rpm i 10 min i Beckman centrifuge. Prøverne fra begge grupper skal med i samme centrifugering.

Efter centrifugering afpipetteres 6.00 ml supernatant i mærket 50 ml centrifugeglas, anbragt på is. PCA-ekstraktet neutraliseres ved tilsætning af 7.80 ml iskold 1.33 M KOH med 0.05 M TEA. Bland grundigt på Vortex-mixer og kontrollér med pH-papir at pH er ca. 7. Hvis dette ikke er tilfældet, skal der neutraliseres yderligere. Notér volumen af det i alt tilsatte PCA og/eller KOH. Glassene henstår herefter på is i 5 min før de centrifugeres ved 4°C, 10 000 rpm i 10 min i Beckman centrifuge. Begge grupper centrifugerer samtidigt. Der udtages 12 x 1 ml supernatant i udleverede, mærkede 3 ml plastrør, som anbringes på isbakke. Hvert delhold får ét glas af hvert vævsekstrakt.

**Metabolitmålinger:**ADP/AMP ASSAY

**Princip:** Følgende reaktioner indgår i assayet



Reaktionsblandingen indeholder LDH før start af målingerne. Ved efterfølgende tilsætning af PK måles ADP, og endelig ved tilsætning af AK måles AMP.

Fremgangsmåde:

I 6 semimikrocuvetter afpipetteres følgende:

800  $\mu\text{l}$  assay-mix\*

300  $\mu\text{l}$  prøve (hhv. muskel-0, muskel-2, muskel-5, muskel-15, standard (0.1/0.1 mM ADP/AMP) og blind (destilleret vand))

Cuvetterne anbringes i spektrofotometeret og indholdet blandes med dem fremlagte omrører (se den fremlagte vejledning!).

Absorbansen  $A_1$  aflæses for alle cuvetter, herefter tilsættes

10  $\mu\text{l}$  PK, 0.5 mg/ml

Der omrøres igen og efter 20 min henstand i stativ ved

stuetemperatur aflæses absorbansen  $A_2$ . Herefter tilsættes

10  $\mu\text{l}$  AK, 0.25 mg/ml

Der omrøres igen og efter 30 min henstand i stativ ved

stuetemperatur aflæses Absorbansen  $A_3$ .

\* Assay-mix, som er fremstillet af laboranten, indeholder en blanding af reaktanter som angivet i reagenslisten. Fordelen ved at anvende en assay-mix er, at man undgår at skulle afpipettere de

enkelte komponenter hver gang i hver enkelt cuvette.

Beregninger:

Udregning af ADP og AMP koncentrationerne sker på basis af de målte absorbansdifferencer ( $A_1 - A_2$ ) og ( $A_2 - A_3$ ), korrigeret for blindcuvettens absorbansdifferencer.

Absorptionskoefficienten for NADH er  $6300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

De fundne koncentrationer korrigeres herefter for de i forbindelse med vævsekstraktionen foretagne fortyndinger.

Reagenser:

Assay-mix med

100 mM Triethanolamin buffer, pH 7.6

75 mM KCl

20 mM  $\text{MgSO}_4$

1 mM Phosphoenolpyruvat

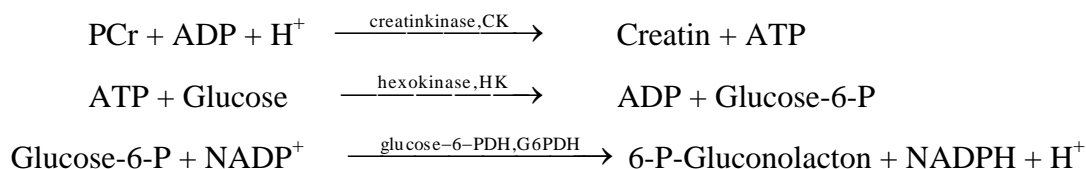
0.22 mM NADH

0.05 mM ATP

1 U/ml Lactatdehydrogenase

ATP/PHOSPHOCREATIN ASSAY

**Princip:** Følgende reaktioner indgår i assayet



Reaktionsblandingen indeholder G6PDH før start af målingerne. Ved efterfølgende tilsætning af HK måles ATP, og endelig ved tilsætning af CK måles phosphocreatin (PCr).

Fremgangsmåde:

NB! Inden afpipettering fortyndes 0.5 ml af hvert muskelekstrakt 1:1 med vand.

I 6 semimikrocuvetter afpipetteres:

650  $\mu\text{l}$  Tris-buffer, 50 mM, pH 8.1

25  $\mu\text{l}$  DTE (dithioerythritol), 20 mM

25  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$ , 40 mM

25  $\mu\text{l}$  Glucose, 40 mM

25  $\mu\text{l}$   $\text{NADP}^+$ , 20 mM

250  $\mu\text{l}$  prøve (hhv. fortyndet muskel-0, muskel-2, muskel-5, muskel-15, standard (0.2/0.2 mM ATP/PCr), og blind (destilleret vand))

10  $\mu\text{l}$  G6PDH, 0.025 mg/ml

Cuvetterne anbringes i spektrofotometeret og indholdet blandes med dem fremlagte omrører (se den fremlagte vejledning!).

Absorbansen  $A_1$  aflæses for alle cuvetter, og der tilsættes

10  $\mu\text{l}$  Hexokinase, 0.2 mg/ml

Der omrøres igen og efter 15 min henstand i stativ ved stuetemperatur aflæses

Absorbansen  $A_2$ . Herefter tilsættes

50  $\mu\text{l}$  Creatinkinase (1 mg/ml)/ADP (10 mM)

Der omrøres igen, og efter 30 min henstand i stativ ved stuetemperatur aflæses Absorbansen  $A_3$ .

Beregninger:

Udregning af ATP og PCr koncentrationerne sker på basis af de målte absorbansdifferencer ( $A_2 - A_1$ ) og ( $A_3 - A_2$ ), korrigeret for blindværdiens absorbansdifferencer.

Den molære absorptionskoefficient for NADPH er  $6300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

De fundne koncentrationer korrigeres herefter for de i forbindelse med vævsekstraktionen foretagne fortyndinger.

### Resultatskemaer

Følgende skema anvendes til resultatoptegning under forsøget:

Biopsi	Muskel-0	Muskel-2	Muskel-5	Muskel-15
Vægt, g				
ml PCA				
ml KOH til 6.00 ml sup.				
Fortyndings- faktorer				

	Muskel-0	Muskel-2	Muskel 5	Muskel-15	Standard	Blind
<b>ATP-PCr</b>						
A <sub>1</sub>						
A <sub>2</sub>						
A <sub>3</sub>						
A <sub>2</sub> -A <sub>1</sub>						
A <sub>3</sub> -A <sub>2</sub>						
(A <sub>2</sub> -A <sub>1</sub> )-blind*						
(A <sub>3</sub> -A <sub>2</sub> )-blind*						
<b>ADP-AMP</b>						
A <sub>1</sub>						
A <sub>2</sub>						
A <sub>3</sub>						
A <sub>1</sub> -A <sub>2</sub>						
A <sub>2</sub> -A <sub>3</sub>						
(A <sub>1</sub> -A <sub>2</sub> )-blind*						
(A <sub>2</sub> -A <sub>3</sub> )-blind*						

\* hhv. (A<sub>2</sub>-A<sub>1</sub>), (A<sub>3</sub>-A<sub>2</sub>), (A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>) og (A<sub>2</sub>-A<sub>3</sub>) for blindprøven.

**RESULTATSKEMA, In vivo metabolitter**

Delhold\_\_\_\_\_

Målte metabolitkoncentrationer,  $\mu\text{mol/g}$  våd vægt.

	Muskel 0 min	Muskel 2 min	Muskel 5 min	Muskel 15 min
ATP				
PCr				
ADP				
AMP				

**REFERENCER**

Dawson, M.J. (1982) Quantitative analysis of metabolite levels in normal human subjects by <sup>31</sup>P-MRS. *Biosci. Rep.* 2, 727-733.

Hems, D.A. & Brosnan, J.T. (1970) Effects of ischemia on content of metabolites in rat liver and kidney. *Biochem. J.* 120, 105-111.

Kiviluoma, K.T. et al. (1988) Acetate-induced changes in cardiac energy metabolism and hemodynamics in the rat. *Basic Res. Cardiol.* 83, 431-444.

Lowry, O.H. & Passonneau, J.V. (1972) *A Flexible System of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York.

Quistorff, B., Poulsen, H. & Chance, B. (1980) Simple technique for freeze-clamping. *Anal. Biochem.* 108, 237-256.

## 2. dag: NMR spektroskopiske målinger:

Øvelsen belyser en række regulationsmekanismer i energistofskiftet og viser specielt koblingen mellem muskelkontraktion og ATP omsætning, hvor ATP dannelsen sker på 3 måder: ved PCr nedbrydning, ved glycogen (og glucose) nedbrydning til pyruvat eller lactat og ved komplet oxidation af glucose til CO<sub>2</sub> og H<sub>2</sub>O. Der henvises i øvrigt til lærebogen for en uddybende beskrivelse af energistofskiftet.

### Baggrund, teori:

Den NMR spektroskopiske metode udnytter det forhold, at visse atomkerner i et stærkt magnetfelt kan bringes til at absorbere radiofrekvens (RF) energi ved en specifik bølgelængde (den såkaldte resonansfrekvens). For at en atomkerne skal kunne absorbere RF energi er det nødvendigt at den besidder et magnetisk spin. Det udelukker kerner hvor både massetal og atom nr er et lige tal (f.eks. <sup>12</sup>C og <sup>16</sup>O). De biologisk vigtige kerner, som har et NMR signal, er <sup>1</sup>H, (protonen), <sup>13</sup>C, <sup>19</sup>F, <sup>17</sup>O og <sup>31</sup>P. Ved et magnetfelt på 2.35 Tesla (svarende til 23500 Gauss; Jordens magnetfelt er ved jordoverfladen ca 0.5 Gauss) er resonansfrekvenserne for ovennævnte kerner henholdsvis 100, 25.1, 94.1, 13.6 og 40.5 MHz.

I øvelsen vil målingerne i en magnet med en styrke på 2.9 Tesla og der måles på fosfor (<sup>31</sup>P, så man kan se fosforholdige metabolitter som ATP, PCr og Pi). Målefrekvensen for <sup>31</sup>P ved 2.9 Tesla er 49.3 MHz .

I praksis placerer forsøgspersonen sin arm eller sit ben i magneten. Målingen foregår ved at der anbringes en antenne (både sender og modtager) på muskeloverfladen og ved at sende et RF signal med frekvensen 49.3 MHz vil alle fosforkerner i området omkring antennen absorbere RF energi. I løbet af nogle sekunder relaxerer kernerne tilbage til ligevægt og udsender herved et signal svarende til den absorberede RF. Dette signal opfanges i antennen, forstærkes og omformes, således at man kan se signalets enkelte frekvens komponenter, som vist nedenfor i *Fig. 1*.

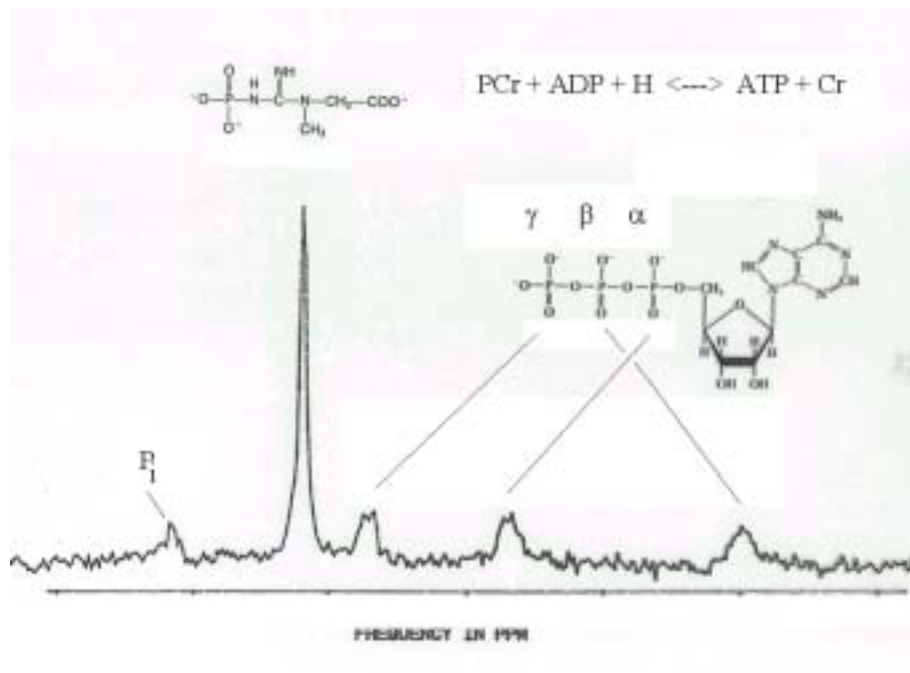
Alle fosforatomer har naturligvis nøjagtig samme resonansfrekvens, men da de hver især er placeret i forskellige molekulære strukturer vil intramolekulære forhold, såsom elektronkonfigurationen i molekylet, bevirke at det enkelte fosforatom reelt udsættes for lidt forskellige magnetfelter. Da resonansfrekvensen er proportional med magnetfeltstyrke, vil fosforatomerne have tilsvarende små forskelle i resonansfrekvens og et stof som ATP vil af denne grund vise tre og ikke kun én fosfor-resonanser (se *Fig. 1* nedenfor).

Denne effekt kaldes *chemical shift* og er basis for at NMR teknikken kan anvendes til med stor præcision at identificere forskellige kemiske strukturer. Når man afbilder et spektrum af en prøve vil enheden på x-aksen være frekvens. Som vist nedenfor vil de tre fosforatomer i ATP ( $\alpha$ ,  $\beta$  og  $\gamma$ ) være separeret med ca 5 ppm for ( $\alpha$ - $\gamma$ ) og ca 8 ppm for ( $\alpha$  -  $\beta$ ).

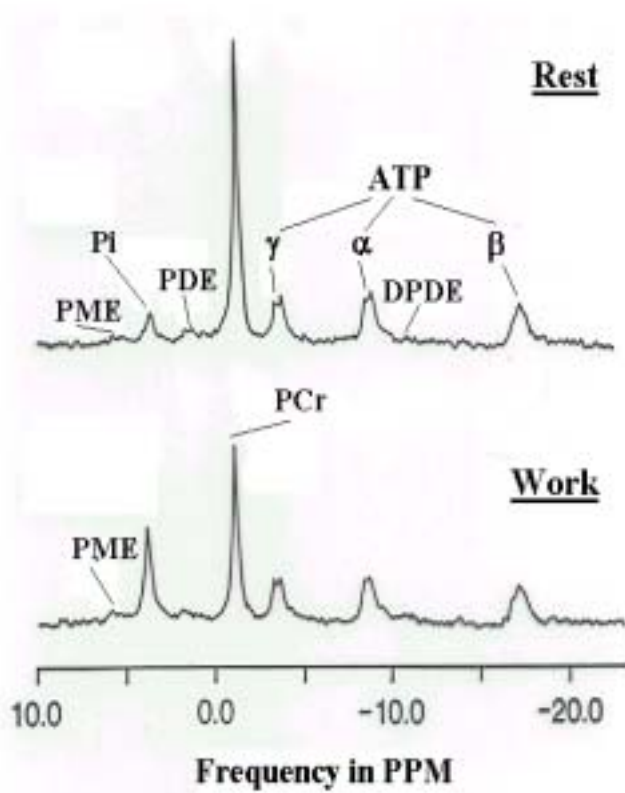
Ppm står for parts per million og angives i forhold til centerfrekvensen for optagelsen af spektret (her 50 MHz), d.v.s. 1 ppm = 50 Hz.

Figur 1:  $^{31}\text{P}$ MRS spektrum af human skeletmuskulatur,

A: i hvile



B: I hvile og under submaximal kontraktion.



Som det fremgår af figurerne observeres i et muskelspektrum *in vivo* signaler fra følgende komponenter, nævnt fra venstre mod højre i spektret: Fosfomonoestre (PME, såsom AMP, IMP, glucose-6-P og lignende), uorganisk fosfat, en stor PCr top, samt tre toppe for ATP svarende til de tre fosforatomer i ATP molekylet.

I Fig. 1B ses de forandringer, som sker når muskelen arbejder. Der ses en stor stigning i  $P_i$  og et tilsvarende fald i PCr, mens ATP signalet er uændret. Herudover ses en lille stigning i PME, svarende til en stigning i specielt glucose-6-P koncentrationen.

### Det praktiske NMR eksperiment, fremgangsmåde:

Ved dette eksperiment ønsker vi at bestemme den maximale ATP omsætning i muskelen både ved aerobe og ved anaerobe processer. Aerob ATP produktion sker ved oxidativ fosforylering i mitochondrierne mens anaerob ATP produktion foregår dels fra PCr ( $\text{PCr} + \text{ADP} \rightarrow \text{Cr} + \text{ATP}$ ) dels ved glycogenolyse til lactat ( $\text{glycogen} + 3 \text{ADP} + 3 \text{P}_i \rightarrow 2 \text{lactat} + 3 \text{ATP}$ ).

Der udføres en maximal kontraktion med to muskelgrupper, dels underarmens flexorgruppe, dels tibialis anterior under optagelse af NMR spektra for hver 10 sek. Samtidig registreres kontraktionskraft. Kontraktionen afsluttes efter 60 sek og restitutionprocessen i muskelen følges over 10 min.

Detaljerne omkring selve målingen gives der instruktion om i forbindelse med øvelsen. Den ene gruppe udfører spektroskopi mens den anden bliver instrueret i hvordan spektrene fortolkes og hvordan selve beregningerne af ATP omsætning kan gennemføres.

### Udregninger til NMR-øvelsen:

I øvelsen er opnået følgende resultater, som skal anvendes ved rapportudarbejdelsen:

1. Et hvilespektrum
2. Et plot over udviklingen af PCr koncentrationen som funktion af tiden under forsøget, d.v.s. under hvile (konstant), arbejde (faldende) og restitution (stigende til hvile niveau).
3. Herudover anvendes bestemmelsen af  $V_{O_2 \text{ max}}$  fra fysiologiøvelsen i OK5.

Ad 1.

Udregn følgende parametre (for detaljer se appendix 1)

- a) PCr/ ATP ratio i hvile (arealerne af PCr og  $\gamma$ -ATP resonanserne er anført på spektret).
- b) [PCr] i hvile.
- c) Intracellulært pH i hvile.
- d) Den fri ADP koncentration i hvile.

Ad 2)

Udregn

- a) Den fri ADP koncentration til tidspunktet hvor muskelarbejdet ophører.
- b) Den maximale aerobe ATP syntesehastighed,  $V_{\text{Max}}$  ( $\mu\text{mol ATP/g s}$ ), ud fra PCr koncentrationens forløbet i restitutionfasen under antagelse af Michaelis-Menten kinetik, hvor  $v$  = den initiale værdi af  $d \text{PCr}/dt$  (anført på PCr plottet) og  $K_m = 23 \mu\text{M}$ .
- c) Konstruer en graf over sammenhængen mellem den NMR bestemte og den 'cykel-

ergometer' bestemte  $V_{\max}$  (for sidstnævnte se nedenfor). Grafen konstrueres på basis af alle holdets data.

Ad 3)

Omregn alle resultater til  $\mu\text{mol ATP produktion/ gram aktiv muskelmasse / s}$   
Den aktive muskelmasse under ergometer-cykellarbejde antages at være 15% af kropsvægten.

### Rapport:

Der udarbejdes en samlet rapport for de to del-øvelser, metabolitmålinger og NMR bestemmelse af ATP turnover, hvor de opnåede resultater beskrives, set i forhold til de opstillede mål for øvelsen. Hver gruppe må gerne aflevere én samlet rapport.

Øvelsen om metabolitmålinger på muskelbiopsier havde følgende mål:

1. At demonstrere en meget anvendt metode til at skaffe information om metabolitkoncentrationer i det levende væv.
2. At illustrere de faktisk forekommende koncentrationer af de centrale metabolitter i energistofskiftet.
3. At vise effekten af hypoxi i en muskel i hvile.

NMR-øvelsen havde følgende mål:

1. At lære hvordan man med en simpel  $^{31}\text{P}$ PMRS måling bliver i stand til at kvantitere både aerob og anaerob ATP turnover i musklen, i.e. aerob og anaerob  $V_{\max}$ , udtrykt som  $\mu\text{mol ATP omsat per sek. per g muskel}$ .
2. At måle intracellulær pH i en muskel i hvile og under arbejde.
3. At sammenholde ekstraktmålinger og NMR målinger udtrykt som PCr/ATP ratio.
4. At sammenholde de NMR spektroskopiske resultater med de resultater I har opnået under fysiologiøvelsen umiddelbart inden. I fysiologiøvelsen målte I den maximale energiomsætning i musklerne under ergometercykling i form af den maximale iltoptagelse (l ilt per min per person). Her i NMR øvelsen måler I den maximale energiomsætning i musklerne i form af ATP omsætningen ( $\mu\text{mol ATP omsat per sek per g muskel}$ ). Målet er derfor at omsætte de fysiologiske iltoptagelsesmålinger til ATP omsætning i samme enhed som udregnet ved NMR øvelsen ( $\mu\text{mol ATP/g s}$ ).

I rapporten diskuteres resultaterne i relation til de opstillede mål, f.eks.

- Den anvendte metodes betydning for at opnå metabolitmålinger, som repræsenterer "sande" *in vivo* koncentrationer, herunder at sammenholde biopsi og NMR målingerne.
- Effekten af hypoxi på en hvilende muskel.
- Muskel pH under arbejde

- Phosphocreatins rolle i musklens energistofskifte.
- Den maximale aerobe og anaerobe ATP syntesekapacitet, herunder at sammenholde resultaterne fra fysiologiøvelsen med de her opnåede resultater.

Rapporten afleveres til gruppelærerne senest 1 uge efter resultatbehandlingstimen, underskrevet af alle bidragydere.

## Appendix 1:

## Panum NMR Center, nov. 2002

Calculation instruction for the  $^{31}\text{P}$ -NMR lab course on 5. semester concerning muscle energy metabolism1) Intracellular pH

$$\text{pH} = 6.75 + \log \left( \frac{\delta - 3.27}{5.69 - \delta} \right)$$

where  $\delta$  = chemical shift (in ppm) btw.  $\text{P}_i$  and PCr

2) Free [ADP] from the creatine kinase (CK) reaction

Assumptions:

$$K_{\text{eq}} = 1.66 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$$

$[\text{ATP}_{\text{rest}}] \equiv 5.5 \text{ mM}$ , equal to the peak area of the  $\gamma$ -ATP peak.

$$[\text{PCr}_{\text{rest}}] = (\text{PCr/ATP area-ratio} \times 5.5) \text{ mM}$$

$$[\text{Cr}_{\text{rest}}] \equiv 0.2 [\text{PCr}_{\text{rest}}] \text{ mM}$$

$[\text{PCr}_t] = \text{PCr conc. at time } t$ .

$$\Delta\text{PCr} = [\text{PCr}_{\text{rest}}] - [\text{PCr}_t]$$

$$[\text{Cr}_t] = [\text{Cr}_{\text{rest}}] + \Delta\text{PCr}$$

$$[\text{ADP}_{\text{rest}}] = (\text{Cr}_{\text{rest}} \bullet \text{ATP}) / (\text{PCr}_{\text{rest}} \bullet 10^{-\text{pH}_{\text{rest}}} \bullet K_{\text{eq}})$$

$$[\text{ADP}_t] = \frac{\left( \frac{\text{PCr}_t}{\text{ATP}_t} \cdot 5.5 \cdot 10^{-3} \cdot 0.2 + \frac{\Delta\text{PCr}}{\text{ATP}_t} \cdot 5.5 \cdot 10^{-3} \right) \cdot 5.5 \cdot 10^{-3} \cdot 10^6}{\frac{\text{PCr}_t}{\text{ATP}_t} \cdot 5.5 \cdot 10^{-3} \cdot 10^{-\text{pH}} \cdot 1.66 \cdot 10^9}$$

$$= \frac{(0.2 \cdot \text{PCr}_t + \Delta\text{PCr}) \cdot 5.5}{\text{PCr}_t \cdot 10^{-\text{pH}} \cdot 1.66 \cdot 10^6} \text{ (}\mu\text{M)}$$

### 3) Anaerobic ATP turnover

is calculated from pH and PCr changes as:

$$\Delta\text{ATP} = -\Delta\text{PCr} - \frac{3}{2} \cdot (\beta \cdot \Delta\text{pH} + k \cdot \Delta\text{PCr})$$

where  $\Delta\text{PCr}$  is  $(\text{PCr}_r - \text{PCr}_t \text{ per sec})$  converted to concentration as explained above. The units become  $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1} = \text{mM} \cdot \text{sec}^{-1}$

The buffer capacity,  $\beta$ , is estimated as

$$\beta = [\text{P}_i] + 15 \quad (\text{Slykes} = \mu\text{mol H}^+ / \text{pH})$$

where  $[\text{P}_i] = 5.5 \times$  the peak area ratio  $(\text{P}_i/\text{ATP}_{\text{rest}})$ , (mM)

$$\text{and } k = \frac{1}{(1 + 10^{(\text{pH} - 6.75)})}; \quad (\text{pK}_A \text{ for P}_i = 6.75)$$

### 4) Aerobic $V_{\text{max}}$ (Maximal rate of aerobic ATP synthesis)

is calculated from the initial rate of PCr resynthesis,  $v$ , ( $\text{mM} \cdot \text{sec}^{-1}$ ), assuming Michaelis-Menten kinetics, where  $[\text{ADP}]$  is the regulatory component, with

$$K_{m(\text{ADP})} = 23 \mu\text{M}$$

$$v = \frac{V_{\text{max}} \cdot [\text{ADP}]}{K_m + [\text{ADP}]},$$

$$V_{\text{max}} = \frac{v \cdot (K_m + [\text{ADP}])}{[\text{ADP}]} \quad (\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1})$$

(Note on the calculation procedure:

The time course of PCr recovery is fitted to the monoexponential function:

$$y(t) = a \cdot (1 - \exp(-b \cdot t)) + c$$

where  $y = (a + c)$  is the asymptote ( $a + c = \text{PCr}_{\text{rest}}$  when PCr is

fully recovered ),  $t$  is the time,  $b$  is the time constant of the function, and  $c$  the initial value of  $y(t)$ , i.e. the end-exercise PCr concentration.

The initial rate of PCr recovery is obtained as  $dy/dt$  for  $t=0$ , by differentiation of  $y(t)$ , i.e.  $dy/dt = - a \cdot \exp(-b \cdot t) \cdot (-b) + 0 = a \cdot b \cdot \exp(-b \cdot t) = a \cdot b$  for  $t = 0$ ).

## Appendix 2:

### **<sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy in vivo in a medical context**

Bjørn Quistorff, Department of Medical Biochemistry and Genetics, The Medical School, University of Copenhagen. Panum Institute, 3 Blegdamsvej, 2200 Copenhagen, Denmark..

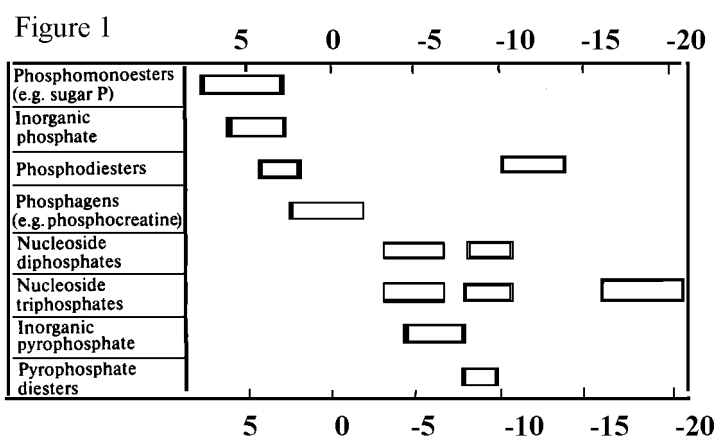
(‘From Magnetic resonance materials in physics, biology and medicine’ vol. 14(2), Syllabus ESMRMB 2002, 33-37, 2002.)

The phosphorous spectrum of living systems is usually quite simple compared to for example natural abundance <sup>13</sup>C spectra. This is due to the fact that the majority of phosphorous compounds in living cells are present in concentrations, which are normally below the detection level of in vivo spectroscopy. In addition several phosphorous compounds will display very broad lines because of restricted mobility of the large molecular structures in which they are incorporated. Such compounds, as for example phospholipids in bio-membranes, will therefore be NMR invisible. Several introductory texts to NMR spectroscopy are available. The one by Gadian is recommended for this course (1).

#### The resonances of the in vivo <sup>31</sup>P-spectrum.

Phosphocreatine (PCr) is the largest peak in tissues like heart, brain and in particular in skeletal muscle, where the concentration is 25-30 mM in the resting state. For that reason PCr is often assigned 0 ppm in the <sup>31</sup>P-spectrum. Otherwise 80% phosphoric acid is used to define 0 ppm which puts PCr at 1.2 ppm. In liver, however, there is no PCr since the enzyme creatine kinase is not expressed in this organ. Thus in the liver the  $\gamma$ -ATP peak at -5 ppm may be used as the chemical shift reference. The following resonances may be observed in living tissues as shown schematically in Figure 1 (modified from (1)):

Phosphomono esters (like glucose-6-P, AMP and IMP), inorganic phosphate, phospho-dieters (like glycerol-phosphoryl-cholin or glycerol-phosphorol-serine), pyrophosphate, di- and tri-nucleotides (primarily ADP and



ATP) and di-phospho-diester (like NAD and NADP). In the liver the 0-6 ppm region may be particularly crowded and assignment can be complicated. For example the resonances of  $P_i$ , glucose-1-P and ribose-1-P may coincide depending upon pH (2). Normally, however, this is not a problem, since the concentration of these two sugar-phosphates are quite low. Another complication is that the shift of all the phosphomonoesters change with pH as discussed below, while phosphodiester do not change shift in the physiological range of pH.

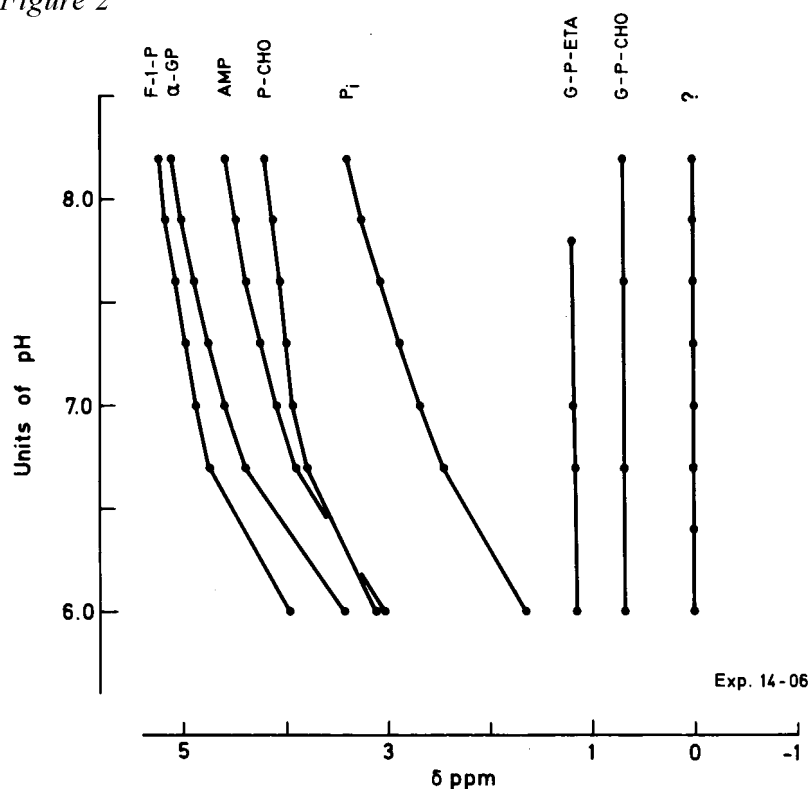
### Effects of pH.

The pH effects on the chemical shift observed in the  $^{31}P$ -spectrum are due to different degree of protonation of the phosphorous atoms. Thus there is a shift difference of about 2.4 ppm between  $H_2PO_4^-$  and  $HPO_4^{2-}$ , allowing pH to be determined by the equation

$$pH = pK_A + \log [(\sigma - \sigma_1) / (\sigma_2 - \sigma)] \quad \text{eq. 1}$$

where  $\sigma$  is the observed chemical shift of the  $P_i$  peak while  $\sigma_1$  and  $\sigma_2$  represents the shifts of the  $HPO_4^{2-}$  and  $H_2PO_4^-$  species, respectively. Based on titration studies of tissue extracts the  $pK_A$  is assumed to be 6.75 while  $\sigma_1$  and  $\sigma_2$  was determined to 3.27 and 5.69, respectively (3). Since these values are dependent upon ionic strength and in particular on the free  $Mg^{2+}$  concentration which may

Figure 2



cange with different physiological condition, it may be argued that  $Mg^{2+}$  should be accounted for in the equation. A detailed account on this procedure has been given by (4). Since the  $pK_A$  of different phosphorous species (e.g. AMP and P-cholin) may be different, pH changes in the organ during the experiment may complicate the interpretation of the spectrum considerably as illustrated in Figure 2 showing that some resonances

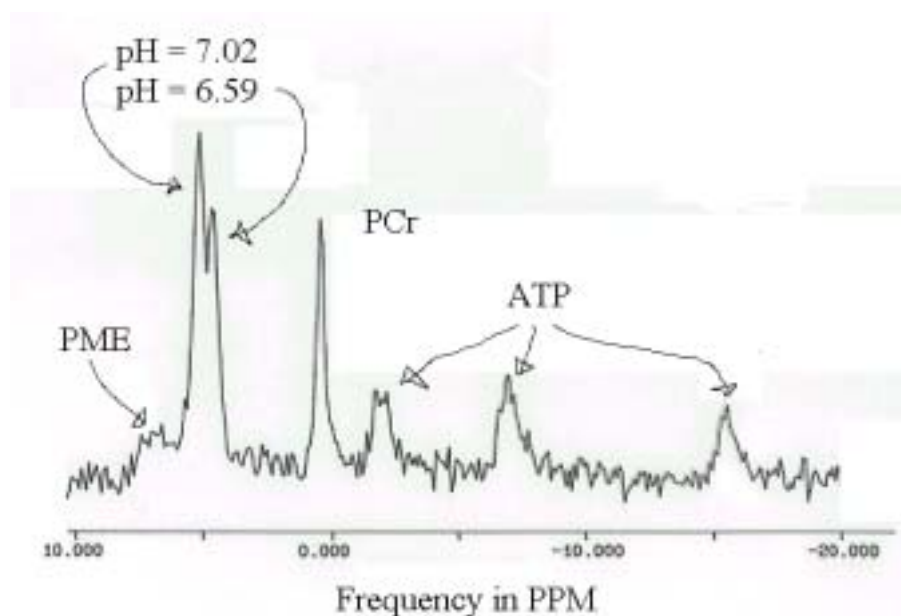
in the PME region may even switch place as pH changes (2). A further complication arises from the

fact that intra- and various extracellular compartments under physiological conditions have different pH (see below).

Examples of some application of  $^{31}\text{P}$ MRS in medical research.

#### 1. Evaluation of fiber type composition in human skeletal muscle.

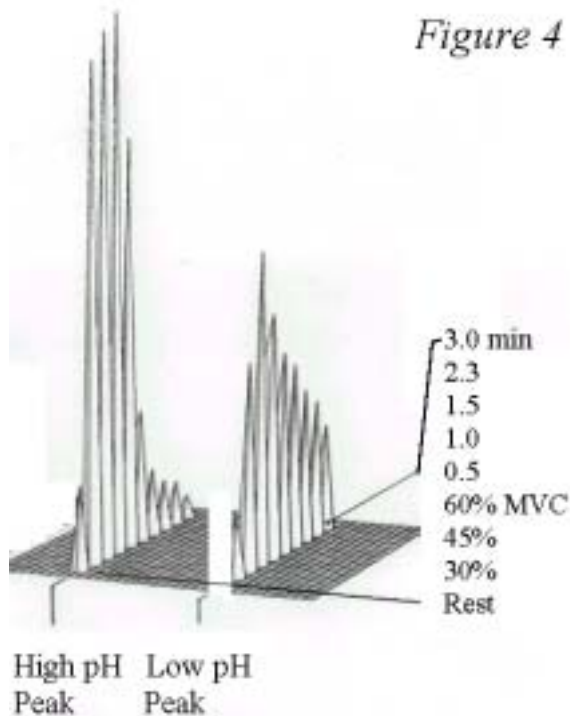
Skeletal muscle contains two main fiber types, the so called fast twitch ('white') and slow twitch ('red') fibers. The fast fibers have a higher glycolytic potential, i.e. greater capacity to generate ATP from glycogen during high intensity contraction, while the slow fibers have more mitochondria and a higher potential for oxidative ATP generation. In order to investigate fiber composition a muscle biopsy is normally taken and the fiber of different types counted after suitable staining (5). It was however observed that during intense muscle exercise two or three peaks within the  $\text{P}_i$ -region appeared (e.g. 3,6) as illustrated in *Figure 3*. Based on the kinetics and size of these peaks during



*Figure 3.  $^{31}\text{P}$ MRS spectrum of the human gastrocnemius muscle during intense dynamic exercise. pH was calculated according to (4).*

suitable exercise protocols it was concluded that the more acidic peak reflected the fast fibers of the muscle group observed, while the less acidic peak reflected the slow fibers (6,7). Such data are shown in *Figure 4*. The acidic  $\text{P}_i$  component had a much slower recovery and in particular the pH recovery of this component was much slower in agreement with the known behaviour of fast twitch fibers (7). As an

additional test of the  $\text{P}_i$  peak assignment the subjects were partly curarized, a procedure known to primarily paralyse the fast fibers (8). This experiment indeed confirmed that on curarized subjects the 'high pH' component corresponding to the slow twitch fibers was much smaller than the 'low pH' component. Finally, muscle biopsies were taken in the same location as the MRS data was sampled and subsequently tested for fibertype composition. The data confirmed that a high percentage of slow (type 1) fibers as determined histochemically correlated strongly with the size of the 'high-pH'



component determined by NMR during exercise (8).

## 2. Energy turnover during muscle contraction.

Energy turnover in skeletal muscle may be studied in detail by  $^{31}\text{P}$ MRS. During ischaemic conditions the absolute ATP turnover may be obtained, while during aerobic conditions usually the lack of knowledge of the actual oxygen consumption complicate the quantitative evaluation. During anaerobic conditions the sole source of ATP generation for muscle contraction is hydrolysis of PCr and anaerobic glycogenolysis. While the first parameter may be followed directly from the PCr peak in the spectrum, the rate of

glycogenolysis may be estimated indirectly from the acidification of the muscle since it can be assumed that no lactate leaves the muscle during ischaemic conditions. The calculation, however, requires knowledge of the buffer capacity. The equation usually used for the estimation of ATP turnover is:

$$\Delta\text{ATP} = -\Delta\text{PCr} - 3/2[\beta \cdot \Delta\text{pH} + k \cdot \Delta\text{PCr}] \quad \text{eq. 2 (9)}$$

where  $\beta$  is the buffer capacity (Slykes), and  $k$  is the proportionality factor providing the contribution from the creatine kinase reaction to  $\text{H}^+$  generation, estimated as

$$k = 1/[1 + 10^{(\text{pH}-6.75)}] \quad \text{eq 3 (9)}$$

It may be argued that since the free magnesium concentration may change during heavy exercise the  $\text{pK}_A$  of the CK reaction will also change and should be taken into the calculation (4,15). Applying equation 2 we, and several other groups, have estimated ATP turnover in skeletal muscle with different types of exercise protocols in normal and diseased muscle (e.g. 10,11,12).

Aerobic ATP turn over in muscle cannot be evaluated directly as mentioned above. However, making the following assumptions it is possible to obtain a measure of the maximal aerobic ATP turn over capacity of a muscle by a simple in-magnet exercise protocol: During dynamic exercise the PCr concentration makes excursions down and up with each contraction and subsequent recovery and it may be argued that the rate at which the PCr recovers between contractions can be taken as a

measure of the maximal mitochondrial ATP turnover rate (10). This argument assumes that ATP production during initial recovery is used only for PCr resynthesis and that glycolytic ATP generation is negligible. The first assumption is of course incorrect, since certainly reuptake of calcium in the sarcoplasmic reticulum in recovery and also other processes in the resting muscle cell are energy consuming. The second assumption is probably correct since several studies have shown that glycolysis turns on and off with contraction (13, and references therein). With these reservations, however, the estimation of aerobic  $V_{\max}$  may be carried out as follows: The initial PCr recovery rate,  $v$ , is obtained by fitting the PCr recovery time course to a monoexponential and calculating the first derivative at time 0. Since ADP can be assumed to be the controlling chemical for muscle respiration the free ADP concentration at time 0 is calculated, assuming CK equilibrium and an equilibrium constant of  $1.66 \cdot 10^{10}$  (14). Here again it may be argued that since free magnesium can change during exercise the actual magnesium concentration should be taken into account, modifying the CK equilibrium constant (15,16). Assuming Michaelis-Menten kinetics for the oxidative phosphorylation with ADP as the main controller,  $V_{\max}$  may be calculated as:

$$V_{\max} = v (K_m + \text{ADP})/\text{ADP} \quad \text{eq. 4}$$

We have applied these calculations to three groups of young healthy males who were either long term sprint- or endurance trained while the third group was age matched untrained subjects. As shown in Table 1 the two trained groups had similar  $V_{\max}$  of about 0.75 mmol ATP per sec per kg muscle, which was, however, almost 2 fold higher than the untrained control group. Furthermore it was obvious that the sprint trained subjects possessed a much higher capacity for anaerobic glycogenolysis, while the rate of PCr hydrolysis was only slightly (albeit significantly) higher than the two other groups.

*Table 1* PCr hydrolysis and glycogenolytic ATP production ('Glyc. ATP') during 30 sec max contraction of the gastrocnemius muscle. Data are given as mmol ATP equivalents per kg muscle over the 30 sec max contraction.  $V_{\max}$  was calculated as described in the text and are given as mmol ATP per kg muscle per sec. Mean $\pm$  SEM are given, n=6. (Data taken from (17)).

	Untrained	Sprint-trained	Endurance-trained
PCr hydrolysis	9.9 $\pm$ 1.3*	13.5 $\pm$ 0.4	8.3 $\pm$ 1.1 *
Glyc. ATP	17.6 $\pm$ 2.9*	40.4 $\pm$ 1.9	14.4 $\pm$ 2.1 *
Aerobic $V_{\max}$	0.33 $\pm$ 0.07 <sup>#</sup>	0.74 $\pm$ 0.07	0.73 $\pm$ 0.10

\* significantly different from ST

# significantly different from ST and ET

### References:

1. Gadian,DG, NMR and its application to living systems. Oxford University Press, 2.ed.,Oxford 1995.
2. Quistorff,B, Pedersen,EJ, McCully,K & Chance,B.: Metabolic effects of alcohol studied by <sup>31</sup>P-MRS in rat and human. In: NMR spectroscopy in drug research (Eds. Jarozewsky et al.) pp. 549-68. Munksgaard, Copenhagen 1988.
3. Taylor,D, Bore,P., Styles,P, Gadian,D. and Radda,G. Bioenergetics of intact human muscle. A <sup>31</sup>P-MRS study. Mol.Biol.Med. 1: 77-94, 1983.
4. Iotti S, Frassinetti C, Alderighi L, Sabatini A, Vacca A, Barbiroli B. In vivo (<sup>31</sup>P)-MRS assessment of cytosolic [Mg(2+)] in the human skeletal muscle in different metabolic conditions. Magn.Res. Imaging 18: 607-14, 2000.
5. Saltin,B. and Gollnick,PL. Skeletal muscle adaptability. In Handbook of Physiology; Skeletal Muscle. Am. Physiol. Sci. , sect. 10, chapt. 19, 1983.
6. Park, JH, Brown, CR, Mcully,K, Cohen,M, Haselgrove,J and Chance,B. Functional pools of oxidative and glycolytic fibers in human muscle observed by <sup>31</sup>P-MRS during exercise. Proc.Natl.Acad. Sci. 84: 8976-87, 1987.
7. Mizuno, M., Secher, N. H., and Quistorff, B.: <sup>31</sup>P-MRS, rsEMG, and histochemical fibertypes of human wrist flexor muscles. J.Appl. Physiol., 76: 531-38, 1994.
8. Mizuno, M., Horn, A., Secher, N. H., and Quistorff, B.: Exercise-induced <sup>31</sup>P-nmr metabolic response of human wrist flexor muscles during partial neuromuscular blockade. Am. J. Physiol., 267, R408-14, 1994.
9. Kemp, GJ and Radda,GK Magn.Res. Quaterly 10: 43-63, 1994.
10. Blei,ML, Conley,KE, and Kushmeric,MJ Separate measures of ATP utilization and recovery in human skeletal muscle. J. Physiol. 465: 203-22, 1993..
11. Ratkevicius,A., Mizuno,M, Povilonis,E and Quistorff,B. Energy metabolism of the gastrocnemius and soleus muscles during isometric voluntary and electrically induced contractions in man. J. Physiol. 507: 593-602, 1998.
12. Vissing,J., Gansted,U. and Quistorff,B. Exercise intolerance mitochondrial Myopathy is not related to lactic acidosis. Ann.Neurol. 49: 672-6, 2001.
13. Quistorff,B., Johansen,L. and Sahlin,K. Absence of PCr resynthesis in human calf muscle during ischaemic recovery. Biochem J. 291: 681-6, 1993.
14. Lawson, R.J and Veech, RL, Effects of pH and free Mg<sup>2+</sup> on the Keq of the creatine kinase reaction and other phosphate hydrolyses and phosphate transfer reactions.

J. Biol. Chem. 254: 6528-37, 1979.

15. Iotti, S., Sabatini, A., Vacca, A. and Frassinetti, C. Magn. Res. Materials Phys. Biol. Med. 14, 147-9. 2002.

16. Kushmeric, M.J., Multiple equilibria of H<sup>+</sup> and Mg with ATP, PCr, ADP and Pi in muscle bioenergetics. Am. J. Physiol. 272: C1739-47, 1997.

17. Johansen, L. and Quistorff, B. <sup>31</sup>P MRS characterization of sprint and endurance trained athletes. Intn. J. Sports Med. In Press.