

PROJEKT NR: 044703035  
SLUTREDOVISNING TILL STIFTELSEN LANTBRUKSFORSKNING

## Är brist på fett en begränsande faktor för glykogenuppbyggnaden i muskulaturen hos tävlingshästar efter hårt arbete?

Johan Bröjer  
Birgitta Essén-Gustavsson

Institutionen för kliniska vetenskaper  
Sverige Lantbruksuniversitet



## BAKGRUND

Glykogen är det huvudsakliga energisubstratet i muskulaturen under intensivt arbete men substratet används även vid lättare arbetsformer (Lindholm och Saltin 1974, Valberg 1986, Schuback et al. 1998). Fullständig återuppbyggnad av glykogen hos travhästen kan ta upp till mer än 72 timmar (Hyppää et al. 1997, Lacombe et al. 2004). Studier på både människa (Karlsson och Saltin 1971) och på häst (Lacombe et al. 1999) har visat att glykogenkoncentrationen i skelettmuskulaturen har betydelse för prestationen. Om glykogenkoncentrationen är låg sker dessutom en ökad proteinkatabolism i muskulaturen, vilket kan bidra till utvecklande av stress och överträning (Lemon 1987). Att det sker en optimal resyntes av glykogen inför träning och tävling är således av största betydelse för hästens prestation och träningsframgångar. Vålfyllda glykogennivåer i muskulaturen är sannolikt extra viktiga hos den unga tränande hästen, vilken har lägre oxidativ kapacitet i muskulaturen och därmed sannolikt måste utnyttja anaerob glykogenolys i högre grad än den äldre hästen i träning. Försök på rullmatta har visat att intensivt arbete efter en kraftig glykogensänkning i muskulaturen ger upphov till en försämrad anaerob men inte aerob metabolism (Lacombe et al. 1999). I en nyligen gjord studie visades också att minskad tillgång på glykogen minskar kapaciteten för högintensivt arbete (Lacombe et al. 2001). Hästar som sänkte sina glykogennivåer efter ett arbete och som sen fick en glukosinfusion hade en snabbare resyntes av glykogen efter arbete och kunde också springa längre på rullmattan. Dessa studier visar hur viktigt det är att snabbt kunna resyntetisera glykogen och få vålfyllda glykogendepåer så att prestationsförmågan blir optimal vid intensivt arbete.

Jämfört med människa är återbildningshastighet för glykogen i muskulaturen efter intensivt arbete långsam hos häst. Återbildningshastigheten av glykogen i muskulaturen hos människa kan forceras genom extra tillförsel av lättlösliga kolhydrater. Människa kan dessutom, till skillnad mot hästen, höja sina glykogennivåer till extra höga nivåer efter en kraftig glykogensänkning, så kallad superkompensering. Hos häst verkar extra tillförsel av kolhydrater ha mycket begränsade effekter på resyntesen av glykogen efter arbete (Snow et al. 1987, Davie et al. 1994). Hos häst finns det dessutom fysiologiskt begränsande faktorer med allt för höga kolhydratgivor då sådana kan resultera i gastrointestinala störningar och fång. Med tanke på hästens långsamma återbildning av glykogen efter intensivt arbete och den fysiologiska begränsningen som finns i alltför höga kraftfodergivor så har försök tidigare utförts i syfte att påskynda resyntesen av glykogen. Dessa metoder omfattar bland annat tillförsel av extra glukoslösning per oralt och tillförsel av glykogenprekursor propionsyra (Pösös och Hyppää 1999). Ingen av dessa metoder har emellertid kunnat påskynda återuppbyggnaden av glykogen hos häst. Resynteshastigheten av glykogen efter arbete hos häst kan emellertid höjas kraftigt genom tillförsel av höga doser intravenöst glukos efter arbete (Davie et al. 1995).

Förutom glykogen är fett ett viktigt energisubstrat för muskeln både i vila och under arbete. Fett är tillgängligt för muskulaturen från både den cirkulerande poolen (fettsyror (NEFA), triglycerider (TG)) och från poolen inne i muskelfibern (intramuskulära triglycerider, IMTG). Studier på både människa och häst har visat att triglyceriderna i muskulaturen utnyttjas i samband med uthållighetsarbete och submaximalt arbete (Essén 1977, Essén et al. 1977, Essén-Gustavsson et al. 1984, Essén-Gustavsson och Jensen-Waern 2002). På människa har man visat att triglycerider i muskulaturen även användes i samband med korta intensiva arbeten såsom styrketräning (Essén-Gustavsson och Tesch 1990). Ju högre triglyceridinhålllet var i vila hos personerna ju större nedgång skedde under arbetet. Om triglyceriderna utnyttjas som substrat hos hästar i samband med kort intensivt arbete är inte studerat.

I ett nyligen utfört försök på människa har forskarna visat att efter intensivt arbete då glykogendepåerna har tömts svarar lipider för en stor del av energimetabolismen under återhämtningsfasen (Kiens och Richter 1998). Samtidigt är resyntesen av glykogen mycket högt prioriterad. Hyppää och Pösö (1997) har visat att efter intensivt arbete hos häst då glykogendepåerna reducerats kraftigt är plasmakoncentrationen av triglycerider och fettsyror sänkta i upp till 24 timmar efter arbete. Resultaten indikerar att det hos häst finns mindre mängd fettsyror tillgängliga för energimetabolismen i muskulaturen under återhämtningsfasen. Informationen från försöket är dock begränsad då inga analyser utfördes på fettinnehållet i muskulaturen.

Resultat från det nyligen utförda försöket på Wången (Bröjer et al. 2006), där vi studerade återuppbyggnaden av glykogen efter hårt arbete hos häst, visar på en lågprioriterad uppbyggnad av glykogen efter arbete. Tio hästar utförde intervallarbete i backe omfattande 7 intervaller om 500 m och de var individuellt anpassat till varje hästs träningsstatus. Intervallarbetets upplägg var överensstämmande med hur dessa hästar tränas regelbundet. Under försöket utfodrades hästarna sin normala diet. Resultaten från försöket visar att samtliga hästar fick en markant glykogensänkning i muskulaturen. Återbildningen av muskelglykogen hos hästarna var emellertid långsam och 72 timmar efter arbetet hade hästarna kommit upp i den glykogennivå som fanns i muskulaturen innan intervallarbetet. Resultaten indikerade att hästarna istället för att bygga upp glykogen i musklerna under de första timmarna fortsatte att bryta ner glykogen trots att de vilade i stallet. Detta talar starkt för att hästarna har använt glykogen för sin basala energimetabolism istället för att bygga upp energidepåerna i musklerna i form av glykogen. Detta indikerar att det glukos som tagits upp av muskelcellerna, under den tidiga återhämtningsfasen, istället har använts för energiproduktion i cellen. Det är således sannolikt att minskad energitillgång på IMTG för muskelmetabolism skulle kunna leda till ökad förbränning av kolhydrater i muskelcellerna under återhämtningsperioden efter hårt arbete hos häst.

Mot bakgrund av det ovan sagda är vår hypotes att glukos i muskulaturen under hästens återhämtning efter intensivt arbete framförallt används för energiproduktion i muskelcellen på grund av brist på fett såsom triglycerider och fria fettsyror i blod och intramuskulära triglycerider. Hastigheten på resyntesen av glykogen är bland annat reglerad av tillgängligheten av glukos. Flera studier har visat på en koppling mellan metabolismen av fett och kolhydrater och det är sannolikt att tillgången på fett är en viktig faktor för optimal återuppbyggnad av glykogen.

Resyntesen av glykogen hos häst är troligen för långsam för att den skall vara optimal med tanke på hur många gånger travhästen tränas per vecka. Tyvärr kan resyntesen av glykogen inte ökas genom att tillföra mer kolhydrater till tävlingshästen, vilken redan står på höga kraftfodergivor. Våra tidigare försök indikerar att glykogenuppbyggnaden efter arbete inte prioriteras i den grad som skulle kunna vara möjligt på grund av för låg tillgång till IMTG. Syftet med studien är därför att studera hur fettmetabolismen regleras under den tidiga återhämtningsfasen då glykogenuppbyggnaden är låg. För detta ändamål har vi använt material från ett tidigare utfört försök på Wången, vilket medfört att vi både haft tillgång till en praktisk och verklig träningsituation och till väldokumenterade data på glykogenmetabolismen under återhämtningsfasen. På så sätt har forskningsinformation kunnat kopplas samman på ett unikt och effektivt sätt men även satts in i ett praktiskt sammanhang. Är vår hypotes korrekt, att glykogenuppbyggnaden är långsam hos häst på grund av brist på fett i muskulaturen under

återhämtningsfasen, finns möjlighet att genom utfodring försöka korrigera denna. Det är viktigt att försöka optimera resyntesen av glykogen i muskulaturen hos hästar, som regelbundet tränas med intervallarbete eftersom träningspassen ofta sker 2 – 3 gånger per vecka. Vi vill därför besvara följande frågeställningar:

1. Är muskulaturens fettdepåer tömda efter intensivt arbete?
2. Finns triglycerider och fria fettsyror tillgängliga i blodet?
3. Hur ser muskulaturens fettdepåer ut i återhämtningsfasen?

## **MATERIAL OCH METODER**

### **Hästar**

Tio varmlodiga travhästar i tävlingskondition, sex valacker (ålder 6 – 12 år, vikt 476 – 514 kg) och fyra ston (ålder 6 – 8 år, vikt 466 till 542 kg) från Trav- och galoppkolan, Wången användes i studien. Samtliga hästar hade varit i regelbunden träning under flera månader innan försöket påbörjades. Hästarna utfodrades med sin vanliga diet, vilken bestod av hösilage (10 – 13 kg; ts 64%), krossat korn (0,5 – 2 kg), betför (0,2 – 0,8 kg) och kraft sport (1 – 4 kg). Det dagliga intaget av metaboliserbar energi var  $0,217 \pm 0.008$  MJ/kg kroppsvikt. Hösilage utfodrades fyra gånger per dag (kl 06.00, 12.00, 17.00 och 21.00). Kraftfoder utfodrades samtidigt som hösilage med undantag för 12.00 utfodringen.

### **Studieupplägg**

Hästarna genomförde ett normalt träningsarbete parvis baserat på deras träningskondition bestående av uppvärmning, intervallträning och en återhämtningsperiod. Under uppvärmningen joggades hästarna 4000 m på en flack travbana. Därefter genomförde hästarna ett intensivarbete bestående av sju 500 m intervaller i backe med hastigheten 9 m/s. Mellan intervallerna skrittades hästarna nedför backen tillbaka till utgångsplatsen. Backen hade en stigning på 24 meter per 500 m. Under återhämtningsfasen joggades hästarna 2000 m på en travbana. Hjärtfrekvensen mättes med en pulsmätare. Under de tre efterföljande dagarna vilade hästarna i box med undantag av två tillfällen per dag då de motionerades i skrittmaskin, 1 timma på morgonen samt 40 minuter på eftermiddagen.

### **Muskelbiopsier**

Muskelbiopsier togs vid ett djup av 6 cm från höger och vänster *M. gluteus medius* (Lindholm och Piehl 1974). Biopsierna togs under vila strax före träningsarbetet startade, omedelbart efter arbete och 1, 4, 8, 24, 48 och 72 timmar efter arbete. Biopsierna frystes omedelbart i flytande kväve och förvarades i -80°C tills vidare analys. Innan analys frystorkades biopsierna och dissekerades fria från synligt blod, bindväv och fett.

### **Blodprover**

Blodprover i hepariniserade rör och i blodprovsvrör utan tillsats togs från *vena jugularis* med hjälp av ett vacutainersystem. Proverna togs samtidigt som muskelbiopsierna samt även omedelbart efter sista intervallen på backkrönet. Blodproverna förvarades på is tills de centrifugerades. Plasma och serum frystes efter centrifugering i - 80°C.

### **Muskelmetaboliter**

Muskelglykogen analyserades i enlighet med metoden beskriven av Bröjer et al. (2002) och den syralösliga och icke syralösliga glykogenfraktionen summerades för att erhålla muskelbiopsierna totala glykogeninnehåll. Triglycerider extraherades med hjälp av metanol och kloroform. Efter hydrolys analyserades glyceroldelen i triglyceriderna (Chernick 1969).

### **Plasma laktat, glukos, fria fettsyror och serum insulin**

För bestämning av plasmalaktat användes en laktatanalysator (Analox GM-7). Plasmaglukos analyserades med en automatisk analysutrustning (Konelab 30). Fria fettsyror kvantifierades i plasma med en enzymatisk colorimetrisk analysmetod (NEFA C test kit; Wako). Koncentrationen av seruminsulin analyserades med hjälp av radioimmunoassay (Coat-A-Count Insulin). Värdena för plasmalaktat och seruminsulin kommer från den tidigare Wångenstudien.

### **Statistik**

ANOVA (one-way repeated-measures) användes för att analysera skillnader i muskel- och plasmametaboliter samt skillnader i seruminsulin mellan provtagninstidpunkterna. När så indikerat användes en Tukey post hoc test för att jämföra specifika medelvärden. Skillnader ansågs som signifikanta vid  $P < 0,05$ . Samtliga kalkyleringar utfördes i programvaran Sigma Stat® software 7. Resultaten presenteras som medelvärden  $\pm$  standard deviation (SD).

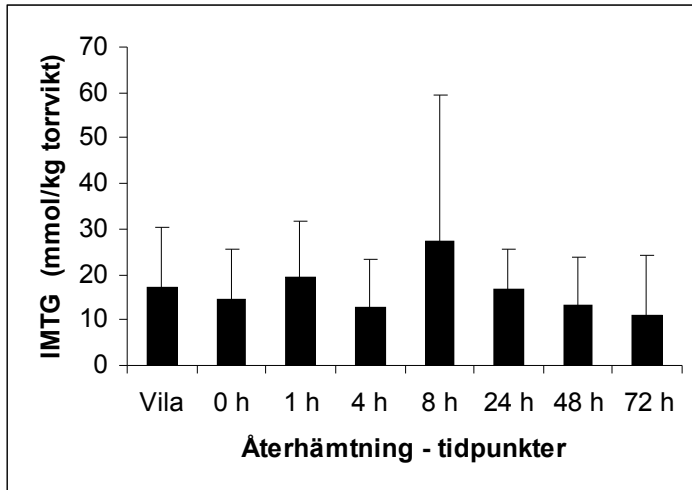
## **RESULTAT**

### **Hjärtfrekvens och träningsförutsättningar**

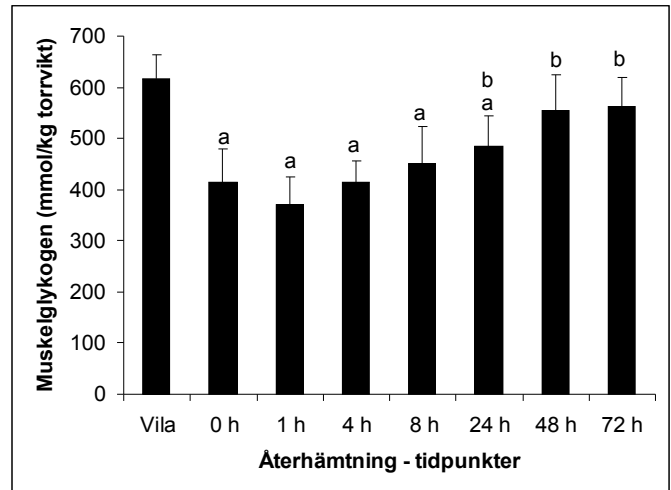
Träningen utfördes under februari månad med goda väder- och banförhållanden. Försöken utfördes mellan klockan 9.00 till 12.00. Fyra hästar utförde intervallarbetet under dag ett och sex hästar genomförde sitt arbetspass under dag två. Vädret var mulet med en utomhustemperatur på  $-6^{\circ}\text{C}$  under dag ett och med klar himmel och en utomhustemperatur på  $-7^{\circ}\text{C}$  dag två. Hastigheten under intervallarbetet sattes till 9 m/s men varierade något beroende på deras träningsstatus för att det skulle erhålla en hjärtfrekvens mellan 210 och 220 slag per minut efter varje avslutad intervall i backen. En häst uteslöts från studien då han tappade en sko och enbart kunde fullfölja 6 intervaller. Medelhjärtfrekvensen efter varje intervall var 1)  $216 \pm 15$ , 2)  $220 \pm 12$ , 3)  $221 \pm 9$ , 4)  $216 \pm 13$ , 5)  $215 \pm 11$ , 6)  $217 \pm 8$  and 7)  $214 \pm 7$ .

### **Muskeltriglycerider och glycogen**

Medelinnehållet av IMTG i vila var  $17,2 \pm 13,2$  mmol/kg torrsvikt (figur 1). Nivån av IMTG var sedan oförändrad omedelbart efter att träningspasset avslutats och under den resterande 72 timmar långa återhämtningsperioden. Det intensiva arbetet orsakade däremot en markant glykogensänkning i muskulaturen ( $\Delta 200 \pm 75$  mmol/kg torrsvikt) (figur 2). Under den första återhämtningstimmen skedde sedan en ytterligare minskning av muskulaturens glykogeninnehåll hos 7 av 9 hästar. Muskulaturens glykogeninnehåll ökade därefter och efter 48 timmar var glykogenkoncentrationen på samma nivå som före det intensiva träningspasset.



**Figur 1.** Koncentrationen av intramuskulära triglycerider före arbete, omedelbart efter arbete och under en 72 h lång återhämtningsperiod. Mätvärdena visas som medelvärdet  $\pm$  SD; n = 9 muskelbiopsier per tidpunkt.



**Figur 2.** Koncentrationen av muskelglykogen före arbete, omedelbart efter arbete och under en 72 h lång återhämtningsperiod. Mätvärdena visas som  $\pm$  medelvärdet  $\pm$  SD; n = 9 muskelbiopsier per tidpunkt. <sup>a</sup>signifikant skild från vila; <sup>b</sup>signifikant skild under återhämtningsper. från 0 h ( $P < 0,05$ ).

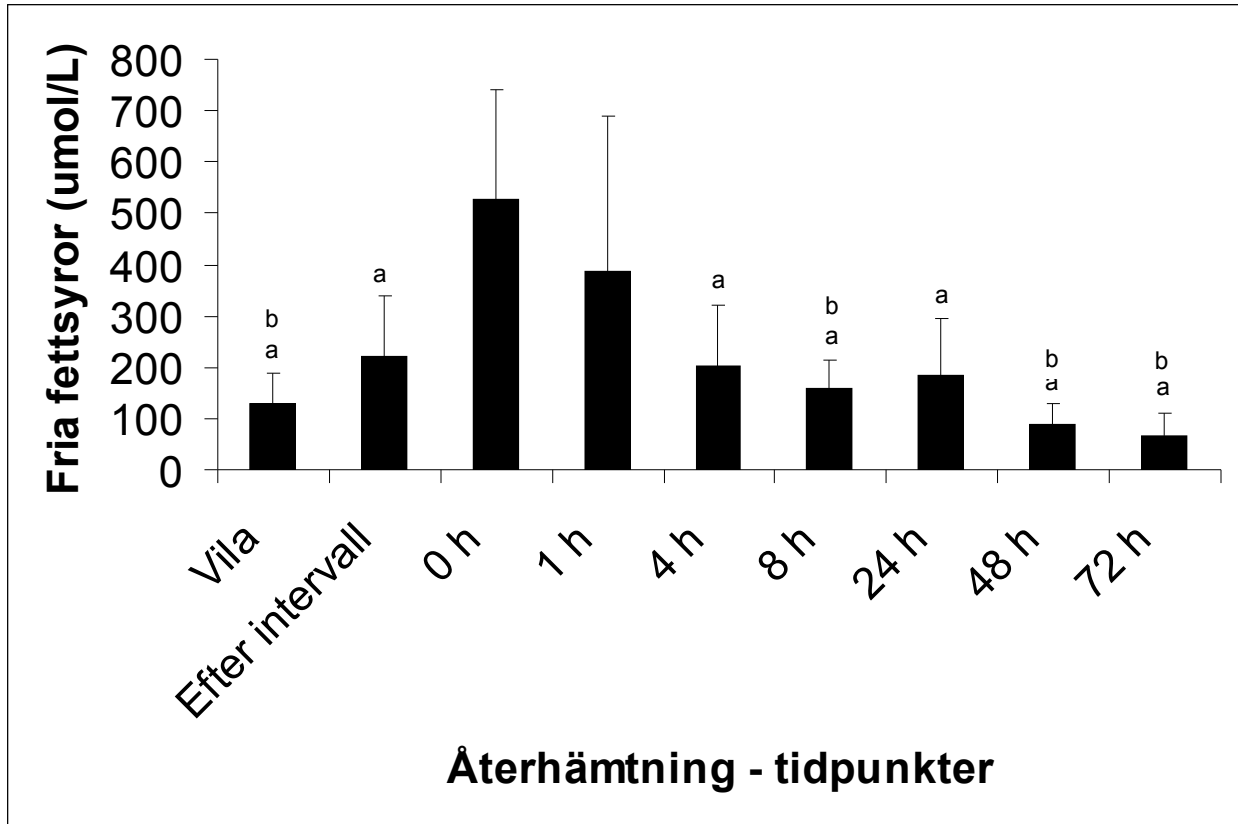
### Plasma laktat, glukos, fria fettsyror och serum insulin

Omedelbart efter sista intervallen i backe observerades en ökning av plasmalaktat ( $\Delta 14,8 \pm 2,5$  mmol/l) och plasmaglukos ( $\Delta 2,5 \pm 1,3$  mmol/l) (tabell 1). Plasmalaktatnivåerna återgick till vilovärdena då återhämtningsperioden började medan plasmaglukosnivåerna återgick till vilovärdena efter 1 återhämtningstimma. Värdena för seruminsulin ökade signifikant efter arbete ( $\Delta 7,6 \pm 6,8$  mIU/l) och minskade sedan för att nå vilovärdena efter 1 återhämtningstimma. Plasma NEFA ökade signifikant efter arbete ( $\Delta 400 \pm 202$   $\mu$ mol/l) och återgick till vilovärdena efter 4 timmars återhämtning (figur 3).

**Tabell 1.** Plasmalaktat, glukos och seruminsulin före träning, direkt efter sista intervallen i backe och under återhämtningens första 4 timmar.

	Vila	Efter intervall	0 h	1 h	4 h
Laktat	0,5 $\pm$ 0,2	15,3 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>	2,0 $\pm$ 0,8	0,9 $\pm$ 0,3	ND
Glukos	5,6 $\pm$ 0,3	8,1 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>	6,9 $\pm$ 1,2 <sup>b</sup>	5,4 $\pm$ 0,4	5,4 $\pm$ 0,2
Insulin	7,0 $\pm$ 3,6	6,4 $\pm$ 2,9	14,6 $\pm$ 8,9 <sup>c</sup>	8,4 $\pm$ 1,9	7,1 $\pm$ 2,7

Plasmalaktat, glukos (mmol/l) och seruminsulin (mIU/l) före träning (vila), direkt efter sista intervallen i backe (efter intervall) och under återhämtningsfasen (1 – 4 timmar) redovisade som medelvärdet  $\pm$  SD. <sup>a</sup>Signifikant skild från vila och under 1 – 4 timmars återhämtning. <sup>b</sup>Signifikant skild från vila, efter intervall och återhämtning 1 – 4 timmar. <sup>c</sup>Signifikant skild från vila, efter intervall och vid 4 timmars återhämtning



**Figur 3.** Koncentrationen av fria fettsyror (NEFA) i plasma före träning (vila), direkt efter sista intervallen i backe (efter intervall), omedelbart efter arbete (0 h) samt under en 72 timmar lång återhämtningsperiod. Mätvärdena visas som medelvärde  $\pm$  SD; n = 9 muskelbiopsier per tidpunkt. <sup>a</sup>signifikant skillnad från 0 h; <sup>b</sup>signifikant skillnad från återhämtning 1 h (P<0,05).

## DISKUSSION

Det huvudsakliga fyndet från den här studien var att intermittent intensivt arbete orsakar en nedbrytning av muskelglykogen men inte av IMTG. Under återhämtningsfasens 72 timmar sker ingen förbrukning av IMTG för energiproduktion i muskelcellerna och återuppbyggnaden av glykogen i hästmuskeln är en mycket långsam process. Under den första återhämtningstimman är NEFA förhöjd i plasma, vilket potentiellt skulle kunna skapa förutsättningar för en förändring från kolhydrat- till fettförbränning i muskelcellen och på så sätt prioritera att glukos används för glykogenuppbyggnad och inte för energiproduktion. Trots dessa förutsättningar minskar glykogeninnehållet i skelettmuskulaturen hos 7 av 9 hästar under den första återhämtningstimman, vilket talar för att hästen använder glukosmolekylerna i glykogen för muskelcellens basala energiproduktion istället för NEFA eller IMTG.

Efter arbete sker den huvudsakliga syntesen av muskelglykogen från blodglukos och i mindre utsträckning från laktat (Bangsbo et al. 1997). Glykogensyntas är det hastighetsbegränsande enzymet för glykogenproduktion i muskelcellen och det regleras av koncentrationerna av glukos-6-fosfat, insulin och muskelglykogen. Uptaget av glukos till muskelcellen kontrolleras huvudsakligen av insulinaktiverade glukotransporter (GLUT-4), vilka även aktiveras av arbete (Lacombe et al. 2003). Plasmaglukos och seruminsulin steg direkt efter arbete hos hästarna i studien men återgick snabbt under återhämtningsperioden till vilovärdena. Det är möjligt att

glukos och insulinökningen varit för kortvarig för att ge ett tillräckligt potent svar för glykogenuppbyggnad i muskulaturen hos studiens hästar. Tidigare försök hos häst med att öka glykogenuppbyggnaden efter arbete genom att stimulera insulinfrisättningen med hjälp av leucin har emellertid inte varit framgångsrik (Pösö och Hyypä 1999). Vid detta försök erhöles en signifikant insulinökning hos hästarna under den tidiga återhämtningsperioden men trots detta ökade inte glykogeninnehållet i muskulaturen mer än hos kontrollhästarna. Det är således tydligt att andra faktorer än insulin begränsar glykogenuppbyggnaden hos häst.

Substrattillgången för glykogenuppbyggnad i form av glukos skulle kunna vara en begränsande faktor för hästens långsamma resyntes av glykogen efter arbete. En diet med lättlösliga kolhydrater eller peroral tillförsel av glukos har emellertid inte visats sig påskynda resyntesen av muskelglykogen hos häst under de 24 första timmarna efter arbete (Davie et al. 1994). Däremot har intravenös tillförsel av glukos visat sig öka resyntesen av muskelglykogen. En sannolik förklaring till detta är att hästen har en sämre förmåga att digerera stärkelse i tunntarmen jämfört med övriga djurslag pga begränsad frisättning av amylas (Comline et al. 1969). Hästen är en grovtarmsförjäsare och endast en del av stärkelsen bryts ner och tas upp som glukos i tunntarmen medan övrig del av de lättlösliga kolhydraterna förjäses i caecum och grovtarm till bland annat propionsyra. Extra tillförsel av glukosprekursorer propionsyra under återhämtningsperioden har emellertid inte kunnat påvisas ge någon ökad glykogensynteshastighet under det första dygnet efter arbete (Pösö och Hyypä 1999).

Persisterande glykogenolys under återhämtningsperiodens fyra första timmar har tidigare rapporterats hos varmblodiga travhästar efter upprepade episoder av intensivt arbete (Hyypä et al. 1997). I likhet med den studien tyder våra resultat på att glykogen i muskulaturen fortsätter att brytas ner under den tidiga återhämtningen efter intensivt arbete i backe istället för att resyntetiseras. Vi har tidigare spekulerat i (Bröjer et al. 2006) att fett skulle kunna vara en begränsande faktor för både den persisterande glykogenolysen och den långsamma resyntesen av muskelglykogen hos häst. Hyypä och medarbetare (1997) fann att tillgången på fettmetaboliter i plasma (glycerol, NEFA, triglycerider) under 2 till 72 timmar efter intensivt arbete var begränsad och signifikant lägre än vilonivåerna före arbete hos varmblodiga travhästar. Vi har inte kunnat påvisa ett likartat mönster i den här studien då nivåerna av NEFA före arbete och mellan 4 och 72 timmar efter arbete var likartade i plasma. Dessutom visar våra resultat att NEFA under den första återhämtningstimman var förhöjda och att IMTG nivåerna under återhämtningsperioden var oförändrade jämfört med vilovärdena innan arbete. Insulin och glukoskoncentrationerna sjönk även snabbt efter arbete, vilket teoretiskt skulle innebära att deras antilipolytiska effekt och hämningen på fettoxideringen reducerats. Det borde således teoretiskt funnits möjligheter för hästarna att i likhet med människa kunna skifta från kolhydratförbränning till fettoxidering under återhämtningsperioden och på så sätt spara glukos till glykogenuppbyggnaden. Tillgången på fett verkar således inte vara en begränsande faktor för glykogenuppbyggnaden hos häst, vilket även stöds av utfodringsförsök efter arbete där extra tillförsel av fett till hästar inte visats sig ge någon ökad glykogensyntes under det första dygnet efter arbete (Hyypä et al. 1999). Snarare är det så att IMTG och NEFA finns tillgängliga för fettoxidering efter arbete men att dessa substrat i låg grad utnyttjas för energiproduktion under återhämtningsfasen av muskelfibern. Orsaken till detta är okänd.

## **PUBLIKATIONER**



Resultaten av forskningen bearbetas just nu i manuskriptform. När manuskriptet är klart kommer det att skickas till Equine veterinary journal där det kommer att framgå att finansiell medverkan har skett från Stiftelsen Lantbruksforskning.

## REFERENSER

Bangsbo, J., Madsen, K., Kiens, B. & Richter, E.A. (1997) Muscle glycogen synthesis in recovery from intense exercise in humans. *Am. J. Physiol.* 273, E416-E424.

Bröjer, J., Holm, S., Jonasson, R., Hedenström, U., & Essén-Gustavsson, B. (2006) Synthesis of proglycogen and macroglycogen in skeletal muscle of Standardbred trotters after intermittent exercise. *Equine Vet. J. Suppl.* 36, 335-9.

Chernick, S.S. (1969) Determination of glycerol in acyl glycerols. *Meth. Enzymology.* 14, 627-630.

Comline, R.S., Hall, L.W., Hickson, J.C.D., Murillo, A. & Walker, R.G. (1969) Pancreatic secretion in the horse. *J. of Physiol.* 204, 10P-11P.

Davie, A.J., Evans, D.L., Hodgson, D.R. and Rose, R.J. (1994) The effects of an oral glucose polymer on muscle glycogen resynthesis in Standardbred horses. *J. Nutr.* 124, 2740S-2741S.

Davie, A.J., Evans, D.L., Hodgson, D.R. and Rose, R.J. (1995) Effects of intravenous dextrose on muscle glycogen resynthesis after intense exercise. *Equine vet. J. Suppl.* 18, 195-198.

Essén-Gustavsson, B. and Jensen-Waern, M. (2002) Effect on an endurance ride on muscle amino acids, pro- and macroglycogen and triglycerids. *Equine vet. J. Suppl.* 34, 209-213.

Essén, B., Hagenfeldt, L. & Kaijser, L. (1977) Utilization of blood-borne and intramuscular substrates during continuous and intermittent exercise in man. *J. Physiol.* 265, 489-506.

Essén, B. Intramuscular substrate utilization during prolonged exercise. (1977) *The Annals of New York Academy of Sciences.* 301, 30-44

Essén-Gustavsson, B., Karlström, K. & Lindholm, A. (1984) Fibre types, enzyme activities and substrate utilization in skeletal muscles of horses competing in endurance rides. *Equine vet. J.* 16, 197-202.

Essén-Gustavsson, B. & Tesch, P.A. (1990) Glycogen and triglyceride utilization in relation to muscle metabolic characteristics in men performing heavy resistance exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 61, 5-10.

Hyypä, S., Räsänen, L. and Pösö, R. (1997) Resynthesis of glycogen in skeletal muscle from Standardbred trotters after repeated bouts of exercise. *Am. J. vet. Res.* 58, 162-166.

(10)

Hyypä, S., Saastamoinen, M. & Pösö, R. (1999) Effect of a post exercise fat-supplemented diet on muscle glycogen repletion. *Equine vet. J. Suppl.* 30, 493-498.

Karlsson, J. and Saltin, B. (1971) Diet, muscle glycogen, and endurance performance. *J. appl. Physiol.* 31, 203-206.

Kiens, B. & Richter, E.A. (1998) Utilization of skeletal muscle triacylglycerol during postexercise recovery in humans. *Am. J. Physiol.* 275, E332-337.

Lacombe, V.A., Hinchcliff, K.W., Geor, R.J. and Baskin C.R. (2001) Muscle glycogen depletion and subsequent replenishment affect anaerobic capacity of horses. *J. Appl. Physiol.* 91, 1782-1790.

Lacombe, V.A., Hinchcliff, K.W., Geor, R.J. and Lauderdale, M.A. (1999) Exercise that induces substantial muscle glycogen depletion impairs subsequent anaerobic capacity. *Equine vet. J. Suppl.* 30: 293-297.

Lacombe, V.A., Hinchcliff, K.W., Taylor, L.E. (2003) Interactions of substrate availability, exercise performance, and nutrition with muscle glycogen metabolism in horses. *JAVMA.* 223, 1576-1585.

Lemon, P.W.R. (1987) Protein and exercise: update 1987. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 19, 179-190.

Lindholm, A. & Piehl, K. (1974) Fibre composition, enzyme activity and concentrations of metabolites and electrolytes in muscles of Standardbred horses. *Acta. Vet. Scand.* 15, 287-309.

Lindholm, L. and Saltin, B. (1974) The physiological and biochemical response of standardbred horses to exercise of varying speed and duration. *Acta. Vet. Scand.* 15, 310-.

Pösö, A.R. & Hyypä, S. (1999) Metabolic and hormonal changes after exercise in relation to muscle glycogen concentrations. *Equine vet. J.* 30, 332-336.

Schuback, K. and Essén-Gustavsson, B. (1998) Muscle anaerobic response to a maximal treadmill exercise test in Standardbred trotters. *Equine vet. J.* 30, 504-510.

Snow, D.H., Harris, R.C., Harman, J.C. & Marlin, D.J. (1987) Glycogen repletion following different diets. In: *Equine Exercise Physiology 2*. Eds: J.R. Gillespie and N.E. Robinson. ICEEP Publications, Davis, California. pp 265-270.

Valberg, S. (1986) Glycogen depletion patterns in the muscle of standardbred trotters after exercise of varying intensities and durations. *Equine vet. J.* 18, 479-484.