

Effekt av foderstatens proteininnehåll på koncentrationen av glykogen och aminosyror i muskulaturen efter ett simulerat travlopp

Bakgrund

Det är väl känt att framförallt kolhydrater i form av glykogen i muskel och lever samt glukos i blodet är det viktigaste substratet för energiomsättningen i samband med hårt arbete. Studier på travhästar visar att ju högre arbetsintensitet ju större är nedbrytningen av glykogen (Valberg, 1986, Valberg et al., 1989). Proteinets betydelse för energiproduktionen anses vara relativt liten men om glykogenförråden töms får protein nedbrytningen en allt större betydelse för arbetet (Lemon och Mullen, 1980). Detta är speciellt intressant hos hästar eftersom det kan ta ända upp till 72 timmar innan glykogennivåerna i muskulaturen är återinlagrade efter ett hårt arbete (Snow et al, 1987, Hyppä et al, 1997, Bröjer et al., 2006). Hos tävlingshästen kan därför proteinomsättningen i samband med upprepade tränings och tävlingspass komma att ha stor betydelse för energifrisättningen.

Omsättningen av protein och aminosyror i muskulaturen är av stor betydelse och har en viktig funktion t.ex. att producera alanin som substrat för glukosproduktion i levern, att producera alfa-ketoglutarat som substrat för citronsyrecykeln eller att producera glutamin till immunförsvarets celler. Dessutom måste fria aminosyror finnas tillgängliga i muskulaturen för syntes av olika proteiner.

Träning och tävling vid upprepade tillfällen dagarna efter varandra kan för den tävlande hästen innebära att kroppens förråd av kolhydrater kontinuerligt minskas om inte detta kompenseras med rätt utfodring och tid till återhämtning. Energibehovet hos högpresterande hästar kan vara svårt att tillgodose med vallfoder av normal kvalitet och därför förbättras foderstaten oftast genom att ge ett spannmålsbaserat kraftfoder. Det positiva med att även ge kraftfoder är att det är energirikt men det negativa är att hästar ibland kan få problem såsom korsförlamning, fång, kolik och beteendestörningar. Man frågar sig därför vad som händer om kraftfodret istället ersätts med ett ökat intag av vallfoder. Ett tidigt skördat vallfoder är ofta proteinrikt vilket innebär att den vuxna hästens proteinbehov lätt kan överskridas. Ett överskott av protein hanterar kroppen genom att deaminera aminosyrorna i levern vilket resulterar i ammoniak som hos häst till stor del görs om till urea och utsöndras med urinen. Detta skapar en acidotisk belastning eftersom ureasyntesen frisätter vätejoner. Ureasyntesen och dess exkretion är energikrävande processer som kan konkurrera med de andra energibehov som finns hos den högpresterande hästen.

Syftet med detta projekt var att studera hur olika utfodring (varierat proteinintag) påverkar aminosyremetabolism och glykogenolysen vid intensiva arbeten som motsvarar ett travlopp som kräver en mycket hög energiomsättning i muskulaturen.

Material och metoder

Försöket utfördes på Wången där 6 hästar i tävlingskondition utfodrades med olika proteinintag. Två vallfoderdieter med olika protein innehåll jämfördes. Den ena dieten innehöll rekommenderat dagligt intag (RP) och den andra 160 % av rekommenderat dagligt intag (HP) av protein. Dessa två foderstater hade samma energi- och proteininnehåll (11.1 MJ ME/kg DM) bestående av 1=HP) endast energirikt gräshösilage (50 % ts) eller 2=RP) ca 50 % energirikt gräshösilage (50 % ts) och 50 % havre. De olika foderstaterna gavs till hästarna i 23 dagar i en crossover studie. I slutet av varje foderstat fick hästarna utföra två simulerade travlopp, ett på rullmatta och ett på travbana. Testet på rullmattan startade med en uppvärmningsperiod på plan matta (5 minuter skritt (1.8 m/s), 3 minuter trav (9 m/s), 45 sekunder trav (11 m/s) och 4 minuters

skritt (1.8 m/s)) varefter hästarna travade i 3 minuter och 15 sekunder (10 m/s (total 1950 m)) med en 5 % lutning av mattan och sedan fick hästarna en nedvärmningsperiod i 1 minut på plan matta (9.5 m/s). Det simulerade travloppet på banan innehöll en uppvärmningsperiod i långsamt trav 4000 m (6.3-6.7 m/s), snabbare trav 2080 m (10.7-10.9 m/s) och 10 minuters skritt varefter själva loppet kördes över 1600 m (11.3-11.5 m/s, på en tid omkring 2 min och 20 sekunder) och sen över 480 meter fick hästarna springa så fort de kunde (omkring 14 m/s på 34 sekunder). Muskelbiopsier från m.gluteus togs i vila innan hästarna utförde det simulerade testet på rullmattan och 15 minuter efter testet var avslutat togs återigen biopsier liksom efter 90 minuters återhämtning efter arbetet. Blodprov togs i vila från jugularvenen samt omedelbart efter testet liksom efter 15 och 90 minuter i återhämtningsfasen efter arbetet.

Muskelproverna frystorkades och ren muskelvävnad fripreparerades under ett mikroskop. En del av muskelvävnaden vägdes för analys av glykogen och en del av provet vägdes för aminosyraanalys. Koncentrationen av glykogen analyserades med hjälp av fluorimetrisk teknik (Lowry och Passonneau, 1973). Koncentrationen av fria aminosyror i muskel och serum analyserades på TCA-extract med HPLC- metodik (Pfeifer et al. 1983).

Statistik

Muskeldata och serumdata analyserades med hjälp av ANOVA och parat t-test. Signifikanta skillnader är då $P < 0,05$. Resultaten presenteras som medelvärden \pm standard deviation (SD).

Resultat

Analyserna på muskelbiopsierna visade att det fanns signifikanta fodereffekter. Hästarna med det högre råproteinintaget hade högre koncentrationer av glykogen och grenade aminosyror ((leucin, valin, isoleucin) i muskulaturen. När hästarna utförde det simulerade travloppet på rullmattan så skedde på båda foderstaterna en likartad nedbrytning av glykogen i muskulaturen liksom sänkning av glutamat och aspartat koncentrationerna (tabell 1). I återhämtningsfasen efter arbetet vid 90 minuter var koncentrationen av glykogen, glutamat och aspartat fortfarande lägre jämfört med innan arbetet. Alanin koncentrationen i muskulaturen ökade efter arbetet men var vid 90 minuters återhämtning tillbaka till koncentrationerna som sågs innan arbetet (tabell 1). Inga skillnader sågs i koncentrationen av grenade aminosyror, tyrosin, glutamin och glycin i samband med arbetet men phenylalanin hade ökat lite efter arbetet.

Tabell 1. Koncentrationen (mmol/kg) av glykogen, glutamat, aspartat, alanin, grenade aminosyror och phenylalanin i muskel (m.gluteus) före och efter ett arbete på rullmatta (simulerat travlopp) samt 90 minuter efter arbetet. RP = rekommenderat proteinintag, HP = 160% av RP. a = $p < 0,05$ mellan vila och arbete, b = $p < 0,05$ mellan vila och 90 minuter efter arbete

	Glykogen	Glykogen	Glutamat	Glutamat	Aspartat	Aspartat
	RP	HP	RP	HP	RP	HP
vila	552 ^{ab} (57)	630 ^a (76)	8,2 ^{ab} (1,7)	7,9 ^{ab} (1,5)	1,0 ^a (0,2)	1,0 ^{ab} (0,4)
efter arbete	445 (56)	501 (80)	3,8 (1,6)	2,9 (0,8)	0,6 (0,2)	0,5 (0,1)
90 min efter arbete	423 (53)	536 (60)	4,7 (1,2)	4,1 (1,2)	0,8 (0,4)	0,6 (0,1)

	Alanin	Alanin	Grenade aminosyror	Grenade aminosyror	Phenyl-alanin	Phenyl-alanin
	RP	HP	RP	HP	RP	HP
vila	4,2 ^a (1,6)	2,8 ^a (0,4)	1,71 (0,36)	1,83 (0,23)	0,27 ^{ab} (0,06)	0,27 ^b (0,03)
efter arbete	6,4 (1,5)	6,0 (1,6)	1,81 (0,28)	2,00 (0,30)	0,31 (0,04)	0,32 (0,02)
90 min efter arbete	4,0 (1,3)	4,0 (1,1)	1,64 (0,36)	2,00 (0,29)	0,35 (0,05)	0,34 (0,05)

Inga skillnader sågs mellan foderstaterna vad gäller koncentrationen i serum av glutamat, alanin, grenade aminosyror, glutamin, tyrosin, phenylalanin och glycin men alla ökade efter arbetet och var efter 90 minuters återhämtning tillbaka till nivåerna som observerades innan arbetet (tabell 2).

Tabell 2. Koncentrationen (umol/l) av glutamat, alanin, grenade aminosyror, glutamin, tyrosin och phenylalanin i serum före och efter ett arbete på rullmatta (simulerat travlopp) samt 15 och 90 minuter efter arbetet. RP = rekommenderat proteinintag, HP = 160% av RP.
a = p <0.05 mellan vila och arbete, b = p <0.05 mellan vila och 90 minuter efter arbete

	Glutamat	Glutamat	Alanin	Alanin	Grenade aminosyror	Grenade aminosyror
	RP	HP	RP	HP	RP	HP
vila	46 ^a (11)	45 ^a (10)	154 ^a (70)	174 ^a (74)	229 ^a (166)	260 ^a (100)
efter arbete	88 (18)	73 (15)	377 (93)	364 (70)	457 (245)	422 (168)
15 min efter arbete	56 (21)	58 (10)	275 (122)	336 (41)	322 (196)	396 (161)
90 min efter arbete	43 (15)	38 (7)	199 (69)	242 (27)	222 (116)	277 (129)

	Glutamin	Glutamin	Tyrosin	Tyrosin	Phenyl-alanin	Phenyl-alanin
	RP	HP	RP	HP	RP	HP
vila	121 ^a (45)	145 ^a (51)	31 ^a (6)	47 ^a (20)	34 ^a (10)	45 ^a (7)
efter arbete	226 (58)	199 (39)	61 (13)	61 (12)	75 (14)	69 (16)
15 min efter arbete	130 (44)	150 (35)	43 (10)	58 (16)	59 (22)	63 (6)
90 min efter arbete	116 (27)	114 (38)	41 (6)	53 (15)	51 (19)	55 (8)

Inga skillnader mellan foderstaterna sågs i prestationsförmågan när hästarna fick utföra det simulerade travloppet på banan.

Diskussion

Resultaten från detta projekt visar att det fanns signifikanta fodereffekter som visar på högre nivåer av glykogen och grenade aminosyror i muskulaturen när hästarna fick foderstaten med det högre proteinintaget. Detta kan inte anses som negativt eftersom både glykogen och grenade aminosyror är viktiga substrat som användes vid arbete. Tillgängligheten av grenade aminosyror har visats ha betydelse för energiomsättningen i samband med arbete hos människa. En sänkning av grenade aminosyror i muskulaturen har noterats i samband med uthållighetsarbete när glykogennivåerna är reducerade (Blomstrand et al, 1995). Från studier på människa vet man också att supplementering av grenade aminosyror före ett arbete resulterar i en hämning av proteindegradationen p.g.a. ökade aminosyrenivåer i blodet (Blomstrand och Newsholme, 1992, McLean et al, 1994) En annan studie visade att ökningen i kreatinkinase i blod som sågs flera dagar efter ett intensivt arbete var lägre vid supplementering med grenade aminosyror (Coombes et al, 2000). I samband med uthållighetsarbete hos häst (distansritter) har man också visat på sänkningar av grenade aminosyror (Trottier et al, 2002, Essen-Gustavsson och Jensen-Waern, 2002, Bergero et al, 2005). Det är troligt att tillgängligheten av grenade aminosyror är av betydelse framförallt i samband med uthållighetsarbete eftersom inga förändringar sågs på någon av foderstaterna i samband med det korta intensiva arbetet i detta projekt.

Glykogen är ett viktigt substrat för energiomsättningen både vid intensiva korta arbeten liksom vid uthållighetsarbete vilket visats i flera studier på både människa och häst (Karlsson och Saltin, 1971, Valberg et al., 1989, Essen-Gustavsson och Jensen-Waern, 2002, Essen-Gustavsson och Blomstrand, 2002). En kraftig glykogensänkning sågs också efter arbetet i detta projekt oavsett foderstat.

De aromatiska aminosyrorna, tyrosin och phenylalanin, kan varken bildas eller brytas ned i skelettmuskeln. De används därför ofta som mått på proteinnedbrytning i muskeln. En ökning i nivån av dessa aminosyror tyder på att en förlust av muskelprotein har ägt rum. Denna förlust kan delvis förklaras av en minskad syntes av protein under själva arbetet, men eventuellt också av en ökad nedbrytning. Efter ett standardiserat långvarigt cykelarbete på människa ökar koncentrationerna av tyrosin och phenylalanin med 25-30% (Essén-Gustavsson och Blomstrand, 2002). En studie på distanshästar visade också att en proteindegradation ägt rum i samband med långvarigt arbete samt i återhämningsperioden eftersom ökningar sågs i både phenylalanin och tyrosin (Essen-Gustavsson och Jensen-Waern, 2002). När arbetet däremot är kortvarigt men intensivt som i detta projekt ses inga större förändringar i tyrosin men en liten ökning i phenylalanin. Detta kan vara tecken på att det skett en liten proteindegradation under arbetet och överensstämmer med resultaten från en tidigare studie där hästar fick utföra ett maximalt arbete på en rullmatta (Pösö et al., 1991). Den studien visade också att det sker en ökning av alanin i muskeln och en sänkning av glutamat vilket väl överensstämmer med resultaten i detta projekt.

Ökningen av alanin anses vara relaterad till sänkningen i glutamat eftersom glutamat tillsammans med pyruvat som bildats i glykolysen kan ge upphov till alanin och alfa-ketoglutarat. Alanin kan användas för glukosproduktion i levern och alfa-ketoglutarat kan användas som substrat i citronsyrecykeln. Glutamin som är ett viktigt substrat för immunförsvarets celler kan också bildas från glutamat men inga förändringar i muskulaturen sågs på någon foderstat i samband med arbetet. Dessa resultat är också i god överensstämmelse med tidigare resultat när det gäller

kortvarigt maximalt arbete (Pösö et al., 1991). Däremot sågs ökning av glutamin i muskel i samband med ett submaximalt arbete (Pösö et al., 1991).

Likartade öknings i alanin och glutamin koncentrationer i serum sågs på båda foderstaterna i samband med arbetet och detta är i god överensstämmelse med en tidigare studie där man tittat på olika utfodring och påverkan på några aminosyror i blod i samband med intensivt arbete (Miller och Lawrence, 1988). Här fick hästarna antingen en hög proteindiet eller en kontroll diet och när hästarna sprang på ett lutat rullband i 15 min ökade alanin och glutaminnivåerna i plasma oavsett diet men urea-N var högre hos de hästar som fick hög protein diet.

När det gäller proteinnivåers inverkan på vätske- och syrabasbalansen (vattenintag, urin- och plasmavolym, kroppsvikt, pH-mätningar) finns resultat redovisade från de hästar som ingick i detta projekt (Connysson et al., 2006). Dessa resultat visar att när hästarna fick högproteindieten så hade de signifikant högre vattenintag (20.8 ± 0.4 vs 16.4 ± 0.4 L/day), urinvolymer (11.5 ± 0.4 vs 10.6 ± 0.2 L/day), plasma ureanivåer (6.4 ± 0.2 vs 5.6 ± 0.2 mmol/l) och lägre pH i urinen (7.03 ± 0.02 vs 7.46 ± 0.04) jämfört med den andra dieten som innehöll mindre protein. Det fanns inga skillnader i kroppsvikt mellan dieterna och inte heller sågs några skillnader i andningsfrekvens, hjärtfrekvens, plasma protein och laktatkoncentrationer, blod pH och HCO_3 . Dessa tidigare data liksom de som redovisats här vad gäller aminosyror och glykogennivåer i muskel visar att hästar kan tolerera ett överskott av protein (>50% av behovet) i samband med ett hårt arbete.

Konklusionen från detta projekt är att en diet med ett högt proteinintag och utan kraftfoder inte har några negativa effekter på glykogenolysen och aminosyrametabolism i samband med intensivt arbete. Om detta också gäller i samband med ett uthållighetsarbete måste dock närmare undersökas.

Referenser

Bergero D, Assenza A, Schiavone A, Piccione G, Perona G, Caola G. Amino acid concentrations in blood serum of horses performing long lasting low-intensity exercise. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2005 Apr-Jun;89(3-6):146-50.

Blomstrand, E. & Newsholme, E. A. (1992) Effect of branched-chain amino acid supplementation on the exercise-induced change in aromatic amino acid concentration in human muscle. *Acta Physiol Scand* 146: 293-298.

Blomstrand E, Andersson S, Hassmén P, Ekblom B, Newsholme EA. (1995) Effect of branched-chain amino acid and carbohydrate supplementation on the exercise-induced change in plasma and muscle concentration of amino acids in human subjects. *Acta Physiol Scand*.153(2):87-96.

Brojer J, Holm S, Jonasson R, Hedenstrom U, Essen-Gustavsson B (2006) Synthesis of proglycogen and macroglycogen in skeletal muscle of standardbred trotters after intermittent exercise. *Equine Vet J Suppl*. Aug;(36):335-9.

Connysson, M. Muhonen, S. Lindberg J E, Essén-Gustavsson, B., Nyman, G., Nostell, K. and Jansson, A. (2006). Effects on exercise response, fluid and acid-base balance of protein intake from forage-only diets in Standardbred horses. *Equine Vet J. Suppl.* 36, 648-653.

Coombes, J.S, McNaughton, L.R.(2000) Effects of branched-chain amino acids supplementation on serum creatine kinase and lactate dehydrogenase after prolonged exercise. *J. Sports Med Phys. Fitness* 40: 240-246.

Essen-Gustavsson B, Jensen-Waern M. Effect of an endurance race on muscle amino acids, pro- and macroglycogen and triglycerides. *Equine Vet J Suppl*. 2002 Sep;(34):209-13.

Essen-Gustavsson B, Blomstrand E. Effect of exercise on concentrations of free amino acids in pools of type I and type II fibres in human muscle with reduced glycogen stores. *Acta Physiol Scand.* 2002 Mar;174(3):275-81.

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.

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

Lemon, P. W. & Mullin, J. P. (1980) Effect of initial muscle glycogen levels on protein catabolism during exercise. *J Appl Physiol* 48: 624-629.

Lowry, O.H. and Passoneau J.V. (1973) *A flexible System of Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York. pp 1-291.

Mac Lean, D.A., Graham, T.E. and Saltin, B. 1994. Branched-chain amino acids augment ammonia metabolism while attenuating protein breakdown during exercise. *Am. J. Physiol.* 267 (*Endocrinol. Metab.* 30): E1010-E1022.

Miller PA, Lawrence LM. The effect of dietary protein level on exercising horses. *J Anim Sci.* 1988 Sep;66(9):2185-92.

Pfeifer, R., Karol, R., Korpi, J., Burgoyne, R. and McCourt, D. 1983. Practical application of HPLC to amino acid analysis. *Am Lab* 15, 77-84.

Pösö, A.R., Essen-Gustavsson B., Lindholm A and Persson, S.G.B. (1991) Exercise-induced changes in muscle and plasma amino acid levels in the Standardbred horse In: *Equine Exercise Physiology 3*, ICEEP publications, Davis, California, pp 202-208

Trottier NL, Nielsen BD, Lang KJ, Ku PK, Schott HC. Equine endurance exercise alters serum branched-chain amino acid and alanine concentrations. *Equine Vet J Suppl.* 2002 Sep;(34):168-72.

Snow, D.H., Harris, R.C., Harman, J.C. and 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, 479-48

Valberg, S., Essen-Gustavsson, B., Lindholm, A. and Persson, S.G.B.: Blood chemistry and skeletal muscle metabolic responses during and after different speeds and durations of trotting. *Equine Vet. J.* 1989, 21(2) 92-95.