



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska Vetenskaper

Glukos och leucin som potentiellt hjälpmedel i återuppbyggandet av muskelglykogen efter hårt arbete hos travhästar

Caroline Bränngård

Uppsala

2010

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:44*

Glukos och leucin som potentiellt hjälpmedel i återuppbyggandet av muskelglykogen efter hårt arbete hos travhästar

Caroline Bränngård

Handledare: Johan Bröjer, Institutionen för Kliniska Vetenskaper

Examinator: Bernt Jones, Institutionen för Kliniska Vetenskaper

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2010
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska Vetenskaper
Kurskod: EXO239, Nivå X, 30hp*

*Häst, muskelglykogen, glykogen, glukos, insulin, leucin
Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:44*

Glucose and leucin as potential aids in resynthesis of muscle glycogen after intense exercise in Standardbred trotters

ABSTRACT

The aim of the project was to study the effect of oral administration of glucose and leucin on the resynthesis of muscle glycogen after intense exercise in Standardbred trotters.

In a crossover design, 11 Standardbred trotters performed a standardized exercise test on two occasions in order to deplete muscle glycogen. The exercise test comprised a warm up period, 7 repeated bouts of exercise on an uphill 500 m slope, and a recovery period. After the exercise test horses received: 1) a solution of glucose and leucine via a nasogastric tube at 0 minutes and at 240 minutes post exercise and a single bout of glucose at 120 minutes post exercise or 2) water (placebo) at 0, 120 and 240 minutes. Blood samples for measurement of glucose and insulin concentrations were collected at rest, when the horses returned to the stables directly after exercise and throughout the 6 hour recovery phase. During the first recovery hour, samples were collected every 15 minutes and then every 30 minutes over the next 5 hours. Muscle biopsies were taken at rest prior to exercise, within 15 minutes after exercise and at 3, 6, and 24 hour after exercise.

Horses that received glucose and leucin had elevated concentrations of serum glucose and plasma insulin compared to the placebo group during the 6 hour recovery period. However, there were no statistically significant differences in glycogen resynthesis between the glucose and leucine group compared to the placebo group during the 24 hour post exercise period. The results from this study show that the rate of muscle glycogen resynthesis is not enhanced by oral administration of glucose and leucine after intense exercise in horses.

Glukos och leucin som potentiellt hjälpmedel i återuppbyggandet av muskelglykogen efter hårt arbete hos travhästar

SAMMANFATTNING

Syftet med studien var att undersöka effekten av glukos och leucin som potentiellt hjälpmedel i återuppbyggandet av muskelglykogen hos travhästar efter arbete.

11 hästar genomförde under två tillfällen ett standardiserat arbetstest för att åstadkomma en markant sänkning av glykogenkoncentrationen i muskulaturen. Testet bestod av uppvärmning och därefter 7 backintervaller i en 500 meter lång backe följt av långsam trav över 2000 m. Efter arbetspasset började återhämtningsfasen och hästarna gavs då: 1) en lösning av glukos och leucin per os via en nässvalgssond vid tiden 0 minuter samt vid 240 minuter och enbart glukos vid 120 minuter eller 2) vatten (placebo) vid 0, 120 och 240 minuter.

Blodprover för att mäta glukos- och insulinnivåer togs vid vila innan arbetspasset, direkt då hästarna anlände till stallet efter arbetspasset samt med jämna mellanrum över de 6 timmar som följde efter träningspassets slut. Under den första timmen efter arbetspasset togs blodprover var 15:e minut och därefter var 30:e minut över de nästföljande 5 timmarna. Muskelbiopsier togs vid vila innan träning, inom 15 minuter efter arbetets slut samt vid 3, 6 och 24 timmar efter arbetstestets slut.

De hästar som fick glukos och leucin hade förhöjda nivåer av insulin och glukos i blodet jämfört med de som fick vatten (placebo) under återhämtningsfasens första 6 timmar. Dock fanns ingen statistisk skillnad gällande resyntes av muskelglykogen mellan de två grupperna 24 timmar efter arbetspassets slut. Resultaten från denna studie visar att återuppbyggandet av muskelglykogen ej påskyndas vid tillförsel av glukos och leucin peroralt till travhästar efter ett intensivt arbetspass.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

INLEDNING.....	4
Bakgrund.....	6
<i>Relativt sett långsam resyntes.....</i>	<i>7</i>
<i>Fysiologiska skillnader.....</i>	<i>8</i>
<i>Energi från kolhydratmetabolism.....</i>	<i>8</i>
<i>Glukos som substrat och blodparameter.....</i>	<i>10</i>
<i>Administrationssätt spelar roll.....</i>	<i>10</i>
<i>Glukostransportörer.....</i>	<i>11</i>
<i>Aminosyror som hjälpämnen.....</i>	<i>11</i>
<i>Fett i dieten.....</i>	<i>12</i>
<i>Steroider för att öka resyntes av glykogen.....</i>	<i>13</i>
<i>Per oral giva att föredra.....</i>	<i>13</i>
MATERIAL OCH METODER.....	14
Hästar.....	14
Utförande och arbetspass.....	14
Återhämtning.....	15
Blodprover.....	15
Muskelbiopsier.....	15
Analys.....	15
<i>Blodproverna.....</i>	<i>15</i>
<i>Muskelglykogen.....</i>	<i>15</i>
<i>Statistik.....</i>	<i>16</i>
RESULTAT.....	16
Glukos och insulinkoncentrationer.....	16

Muskelglykogen.....	18
DISKUSSION.....	19
TACK TILL.....	21
LITTERATURFÖRTECKNING.....	22

INLEDNING

Precis som en toppresterande idrottsman måste även hästen ha välfyllda ”bränslelager” i muskulaturen för att kunna prestera maximalt under tävling. Som drivmedel i skelettmuskulatur används framför allt glukos, som lagras i musklerna som glykogen (Bjälje et al. 1998).

I ett flertal studier på människa har man visat att höga nivåer av glykogen ökar prestationen i uthållighetslopp samtidigt som låga nivåer försämrar prestationen (Bergström et al. 1967; Hawley et al. 1997; Jacobs et al. 1999). Detsamma gäller för hästar även om antalet genomförda studier är betydligt färre än hos människa (Lacombe et al. 1999; 2001).

Vad de studier som genomförts på häst visat är att de har en långsam återuppbyggnad av glykogen jämfört med människa och andra arter. Detta gör att hästen behöver en relativt sett lång återhämningsperiod innan de kan utföra en ny ansträngning. Försök har gjorts där man tillfört glukos per os eller iv i syfte att påskynda glykogensyntesen; dock utan att kunna påverka resynteshastigheten nämnvärt vid per oral tillförsel. I denna studie var hypotesen att genom att tillsätta aminosyran leucin kunna öka insulinfrisättningen och därmed öka upptaget av glukos i skelettmuskulaturen vid per oral giva av glukos.

Bakgrund

Det är sedan länge känt att intag av lättillgängliga kolhydrater hos människa före och under träning ger ökad prestation (Jacobs et al. 1999). Kolhydraterna omvandlas till bland annat glukos, som tas upp i blodet och lagras i skelettmuskulatur som glykogen. Glykogenet utgör därefter en viktig energidepå, som kan nyttjas som muskelns drivmedel efter att ha brutits ner till glukos (Bjälje et al. 1998).

Efter en genomförd tävling är det viktigt att snabbt fylla på glykogendepåerna så att musklerna kan återhämta sig. Detta är speciellt viktigt för individer som ska genomföra flera tävlingar under samma dag eller tävla under ett antal dagar i följd utan att minska prestationsförmågan. I hästvärlden är exempel på sådana utmaningar Elitloppet för travhästar där individerna går kvallopp och finallopp under samma dag. Även i en fälttävlan för ridhästar ställs höga krav då hästarna ska prestera på topp under tre dagar i följd. Inom forskningen har man under kontrollerade former låtit ett antal hästar gå intensiva arbetspass tre dagar i följd för att mäta bland annat prestationsförlusten. Man kunde då se en minskning av prestationskapaciteten med 26-28% under dag tre hos hästarna, som en följd av den successiva tömningen av glykogendepåerna (Lacombe et al. 2001).

Davie et al. (1996) kunde efter en studie visa att en minskning av glykogendepåerna med 22% hos 6 varmbloodhästar ej gav försämrad prestation medan Topliff et al. (1985) visade motsatsen då han utförde en studie där depåerna tömdes med 41%.

Relativt sett långsam resyntes

För människan tar det 24 timmar att återställa glykogenlagret medan det hos häst har visat sig ta ända upp till 72 timmar (Casey et al. 1995; Snow et al. 1987; Davie et al. 1994; Hyypä et al. 1997; Lacombe et al. 2004). Normal glykogenkoncentration i en hästmuskel är 130-140 mmol/kg våtvikt (ww) och hos människa 80-100 mmol/kg våtvikt (ww) (Bergström et al. 1967; Essén-Gustavsson et al. 1989; Harris et al. 1987; Snow et al. 1982). Hästen har alltså relativt stor lagringskapacitet då det gäller glykogen. Problemet rör snarare synteshastigheten vad gäller effektiv återhämtning och det är denna fysiologiska skillnad mot andra arter som rönt störst intresse bland forskare.

Vissa studier har visat att hästar uppskattningsvis lagrar upp glykogen fyra gånger långsammare än vad människan gör (Snow et al. 1987; Hyypä et al. 1997; Costill et al. 1981; Ivy.1998).

Det är uppenbart att den långsamma resyntesen av glykogen hos häst blir ett problem vid prestation flera gånger samma dag eller under flera dagar i följd då hästen under denna tid ej hinner återhämta sig. Konsekvensen blir en försämrad prestation, uttröttning och en ökad risk för skador då proteinnedbrytning blir ett sista alternativ när glykogendepåerna är tömda (Lemon 1987).

Hyypä et al. (1997) använde 6 travhästar för att undersöka förändringar hos ett antal metaboliter i plasma efter tre träningspass där hästarna gavs en timmes vila mellan passen. Intensiteten ökade efter varje pass och under det tredje passet fick hästarna gå för fullt. Försöken upprepades efter 3 dagar. Genom en intravenös kateter togs efter varje pass blodprover med 5 minuters mellanrum under en timmes tid. Då det tredje passet var genomfört fortsatte man med provtagningen i upp till 72 timmar efter passets avslutande. Muskelbiopsier togs från gluteusmuskeln för analys av glykogeninnehåll. Man mätte plasmakoncentration av glukos, glycerol, triglycerider och icke-estriifierade fettsyror. Vid tidsintervallet 2 – 72 timmar efter arbetspassen var värdena av glycerol och fria fettsyror lägre än vilovärdena före arbetspassen. Koncentrationerna av triglycerider i plasma låg lägre mellan 2 och 24 timmar efter träning jämfört med koncentrationen före arbete. Glukosnivån återgick till normalvärde redan en timme efter att träningen avslutats. Vid mätning av resynteshastigheten av glykogen fann man att glykogenet fortsatte att brytas ner upp till 4 timmar efter träningspassens avslutande. I studien framkom det tydligt att hästar har en långsam glykogenupplagring och det kan ta ända upp till 3 dagar eller mer innan hästen är fullständigt återhämtad. Vidare

spekulerades det i att de låga nivåerna av fettmetaboliter i blodet kunde göra att glukos användes till oxidativ förbränning istället för att gå in i glykogenproduktion (Hyypä et al. 1997).

Fysiologiska skillnader

Det finns flertalet viktiga fysiologiska skillnader mellan häst och människa, som gör det svårt att direkt applicera den forskning som gjorts på humansidan på hästar. Hästar har relativt sett en större muskelmassa, vilket är mer energikrävande. Att ha fyra ben engagerar 70-80% av muskelmassan istället för 30-40% om man bara har två ben. Jämfört med människa har hästen större kapacitet för aerobförbränning, effektivare syrebärande kapacitet på kapillärbäddsnivå och en större hjärtminutvolym (Wagner 1995). Detta är nödvändigt då hästen vid samma träningsintensitet som människa gör sig av med två gånger så mycket energi (Romijn et al. 1993; Roberts et al. 1996; Geor et al. 2000).

Inte bara mängden muskler spelar roll utan även sammansättning av olika typer av fibrer har betydelse för hästens uthållighet. Olika muskelfibrer har olika kapacitet att lagra glykogen och studier har visat att ett högt innehåll av typ I-fibrer ger en bättre uthållighet i distansritter, vilket är hästvärldens motsvarighet till maratontävlingar. Långvarig belastning visade sig ge en nästan fullständig tömning av glykogendepåerna i typ I-fibrer (Gottlieb et al. 1989). Denna fibertyp har bättre oxidativ kapacitet än typ II-fibrer, som är den fibertyp där glykogenet töms snabbare vid måttlig till intensiv belastning (Essén. 1984; Gottlieb et al. 1988).

Jämfört med människa har häst en mer homogen fördelning av muskelfibrerna. Relativt sett överväger typ II-fibrerna i de stora ”motor-musklerna” medan en maratonlöpare har övervägande typ I-fibrer i motsvarande muskler. Enligt Essén et al. (1997) består gluteusmuskeln hos häst till 70-80% av typ II-fibrer och endast 20-30% av långsamma typ I-fibrer. Ju mer vältränad en häst är desto större mängd ”snabba” typ II-fibrer kommer den att ha. Dessa hästar blir väldigt beroende av en väl fungerande glykolys och laktatproduktion för att undvika uttröttnings vid intensiva arbeten. Muskelnas sammansättning av olika fibrer samt rekryteringsmönstret hos dessa kan vara en förklaring till varför hästar snabbt tömmer sina glykogendepåer och bygger upp dem mer långsamt än vad människa gör (José- Cunilleras 2003).

Energi från kolhydratmetabolism

Både hästen och människan är enkelmagade men hästen är till skillnad från människan grovtarmsjäsa. Den lättillgängliga delen i fodret som lösliga kolhydrater, fetter och proteiner absorberas i tunntarmen medan grövre fibrer och cellulosa jäses i grovtarm och

blindtarm av mikroorganismer. I grovtarmen sker en nedbrytning av dessa fibrer till flyktiga fettsyror som acetat, butyrat och propionat. Av de flyktiga fettsyrorna omvandlas framförallt propionat till glukos som efter absorption från grovtarmen lagras i kroppen i lever och skelettmuskulatur som glykogen. Vid en mycket fiberrik diet innehållande hö eller ensilage får hästen ungefär 75% av sin energi från jäsningsprocessen i grovtarmen (Björnhag 2000)

Hästen förlitar sig i större grad på energi från kolhydratmetabolismen än vad människan gör (Romijn et al. 1993; Roberts et al. 1996; Geor et al. 2000). De har trots detta sämre kapacitet att bryta ner kolhydrater än vad människa har eftersom hästar saknar enzymet amylas i saliven. Jämfört med gris och nötkreatur så har hästar bara 6% resp 10% av dessa arters förmåga att producera amylas i pancreas. Trots att flödet från pancreas är tre gånger högre hos häst än hos nöt är koncentrationen bara en tiondel hos häst jämfört med nöt. Detta gör att hästar är väldigt känsliga för ingestion av stora mängder stärkelserik föda över kort tid (Alexander et al. 1958; Comline et al. 1969; Walker et al. 1994; Potter et al. 1992).

Då människan får en snabbare återhämtning av sina glykogendepåer genom att inta lättillgängliga kolhydrater i anslutning till träning och tävling (Bergström et al. 1967) har man gjort flertalet undersökningar med önskan att se samma resultat hos häst (Lawrence et al. 1995; José-Cunilleras et al. 2005). Dock har effekten av stora intag av lättillgängliga kolhydrater varit omtvistad och studierna har ibland visat motstridiga resultat.

Lawrence et al. (1995) visade att om man utfodrar ett mål lättlösliga kolhydrater innan ett arbetspass kan man påverka glykogenomsättningen att bli högre jämfört med om man inte utfodrar alls. Resultatet blev ett annat för José-Cunilleras och medarbetare (2005), som i en liknande studie inte såg någon effekt alls.

José-Cunilleras et al. (2005) lät 7 hästar gå hårda arbetspass på en rullmatta under tre dagar i följd. Därefter delades de in i tre grupper där en grupp gavs 2 kilo krossade majs-korn 15 minuter samt 4 timmar efter träning. Den andra gruppen fick en blandning av alfa-alfa hö och gräs vid samma tidpunkter. Den tredje gruppen gavs inget foder alls. Under försöket mättes nivåer av glukos, laktos och insulin i blodet för att avgöra hur väl hästar tar upp kolhydrater genom tarmen och vilken effekt det kan ha på resyntesen av glykogen. Trots att glukosomsättningen i blodet ökade 2-3 gånger vid intag av 2 kg majs efter träning kunde man inte se effekt på glykogensynteshastigheten i skelettmuskulaturen.

Glukos som substrat och blodparameter

En av de viktigaste källorna till energi för växter och djur är kolhydraten glukos. Det är en enkel sockerart som fungerar som byggsten i bland annat stärkelse, cellulosa och glykogen. Eftersom det är en precursor till glykogen har man inom forskning använt glukos som substrat och blodparameter för att undersöka glykogenomsättningen hos häst. Det finns två administrationssätt; genom intravenös giva eller per oral giva.

Lacombe et al. (2001) gav glukosinfusion direkt i blodet efter hård ansträngning till ett antal hästar. En kontrollgrupp som utförde likvärdigt arbete gavs natriumklorid istället för glukos. Hos de hästar som gavs glukos såg man en ökning av tiden de orkade springa innan utmattning samt en snabbare sänkning av blodlaktatnivåerna till normalnivå jämfört med kontrollgruppen.

Då ett antal hästar utförde måttligt till intensivt arbete på rullmatta och gavs 2 gram glukos intravenöst i minuten såg man en förlängning med 14% av tiden till utmattning jämfört med kontrollgruppen (Farris et al. 1995).

Administrationssätt spelar roll

Sammantaget verkar det som att glykogensynteshastigheten är svår att påverka i positiv riktning då man administrerar glukos per os.

Att administrationsmetoden spelar roll såg Geor och medarbetare (2006) då de jämförde effekten av att ge glukos per os och intravenöst. Vid en total giva av 3 gram per kilo kroppsvikt per os sågs hyperglykemi och hyperinsulinemi men resynteshastigheten för glykogen var oförändrad jämfört med placebo. Dock fann man att motsvarande mängd intravenöst påverkade resyntesen av glykogen positivt.

I en annan studie gav man 3 gram glukos per kilo kroppsvikt per os till 4 hästar direkt efter ansträngning. Inte heller här påverkade man resynteshastigheten nämnvärt (Davie et al. 2006).

I en tidigare studie av Geor et al. (2000) mättes effekten av intravenös giva av glukos på 6 hästar som utförde ett lågintensivt arbete på rullmatta. En av frågeställningarna var om man genom negativ feedbackmekanism kunde hämma den endogena glukosproduktionen i levern. Detta skulle i sådana fall kunna ge en lägre koncentration av glukos i blodet och en mindre mängd tillgängligt substrat för glykogeninlagring i musklerna. Resultatet blev endast en partiell hämning av glykogenolysen i levern. Däremot

fann man att glukosgivan gav en inte lika kraftig minskning av den oxidativa kolhydratförbränningen men resyntesen av glykogen påverkades inte.

Glukostransportörer

Förutom god tillgång på substrat i blodet finns det andra faktorer som påverkar glykogenesen. Ett hastighetsbegränsande steg är tillgången på insulin, som reglerar intransporten av glukosmolekylen i muskelcellen (Trakatellis et al. 1968) Det finns minst 5 olika glukostransportörer, GLUT-1 till GLUT-5, som sitter i cellmembranet. Av dessa är det framför allt GLUT-4, som ökar upptaget av glukosmolekyler vid hyperinsulinemi i skelettmuskulaturen (Champe et al. 1987). På människa och råttor har man sett att en ökning av insulin i blodet efter träning stimulerar mekanismerna för transport av glukos in i cellen samt aktiviteten av enzymet glykogensyntas (Christ-Roberts et al. 2004; Conlee et al. 1978). Glykogensyntas är ett nyckelenzym, som är nödvändigt för att förlänga glukosmolekylen så att glykogen kan bildas (Champe et al. 1987).

Pratt et al. (2006) lät 8 hästar genomföra ett intensivt arbetsprov för att undersöka insulinkänslighet och aktivitet av glykogensyntas i skelettmuskulaturen efter ett träningspass. Man undersökte även det totala innehållet av GLUT-4 i gluteusmuskulaturen efter träning. Man fann ingen ökning av insulinkänsligheten hos hästarna, som man gjorde hos människa och råttor i tidigare nämnd forskning. Den totala glykogensyntasaktiviteten var även den oförändrad och uttrycket av GLUT-4 hade inte påverkats.

José-Cunilleras et al. (2005) tittade specifikt på uttrycket av GLUT-4 transportörer i en studie där man kunde kvantifiera GLUT-4 gener med hjälp av realtids-PCR. Man försökte öka genuttrycket genom en kolhydratrik diet och träning, men det gick inte att bevisa att någon ökning förekom. Lacombe et al. (2003) genomförde ett liknande försök där man genom träning fick en ökad insulinfrisättning, som resulterade i ett ökat uttryck av GLUT-4. Man gav även hästarna glukos intravenöst efter fysisk ansträngning varefter man såg en ökning av insulin i blodet. Den förhöjda insulinnivån gav ett ökat uttryck av glukostransportörer, vilket i sin tur resulterade i en förhöjd glykogensyntes.

Aminosyror som hjälpämnen

Forskning har även gjorts där man undersökt möjligheten att påverka insulinnivån i blodet genom att tillföra ett "hjälpämne". Kuhara et al. (1991) utförde ett försök där man studerade insöndringen av insulin, glukagon och tillväxthormon på 6 kastrerade baggar efter tillförsel

av 17 olika aminosyror. I denna studie var leucin den mest potenta aminosyran att öka insulininsöndringen från pankreas.

Nio ridhästar fick efter 1½ timmes träning på en rullmatta inta antingen en isoton elektrolyt-lösning med glukos, en isoton elektrolytlösning med tillsats av aminosyran leucin och glukos eller isoton elektrolytlösning med tillsats av propionsyra och glukos. Propionsyra är en precursor i glukoneogenesen och omvandlas enkelt till glukos. Innan arbetspasset togs vilovärden för alla tre grupper och det fanns ingen statistiskt påvisbar skillnad vad gäller glykogeninnehållet i muskulaturen. Det högsta insulinsvaret fick man av kombinationen elektrolytlösning, leucin och glukos. Det verkade som att denna grupp hade det högsta upptaget av glukos i muskelcellerna då nivån av blodglukoset sjönk snabbast i denna grupp efter giva. Dock hade detta ingen påverkan på resynteshastigheten av glykogen och 22,5 timmar efter träningspasset såg man ingen skillnad mellan någon av grupperna avseende glykogeninnehåll i gluteusmuskulaturen. (Pösö et al. 1999).

En forskargrupp undersökte om man efter hård ansträngning kunde öka resyntesen av glykogen hos häst genom att ge acetat tillsammans med hö eller kraftfoder. Tanken var att acetat i muskeln omvandlas till acetyl CoA för att gå in i citronsyrcykeln och där generera energi. Acetat är ett av de viktigaste substraten vid oxidativ förbränning och genom att tillgodose citronsyrcykeln med detta substrat antog man att blodglukos i högre grad skulle vara tillgängligt för glykogensyntes. Ansträngningen, som skulle simulera en tredagars fälttävlan, gav en 21% respektive 17% tömning av hästarnas muskelglykogendepåer. Den en gruppen fick därefter en acetatlösning per os via sond följt av högiva samt kraftfoder. Kontrollgruppen gavs enbart hö och kraftfoder. Enligt de blodprover som gjordes kunde man se ett väldigt effektivt upptag av acetatet i muskulaturen och följaktligen fick man en höjning av glykogensyntesen som kvarstod i upp till 4 timmar efter acetatgivan. Under dessa 4 timmar såg man en tredubbel höjning av synteshastigheten. Dessvärre kunde man efter 24 timmar inte se någon skillnad mellan de två grupperna gällande resynteshastighet av glykogen (Waller et al. 2009).

Fett i dieten

Man har även undersökt om tillskott av fetter i dieten har betydelse för glykogenesen i muskelcellerna. I en studie fick ett antal hästar under tre veckor tillskott av extra fett i den normala dieten. Jämfört med kontrollgruppen hade dessa hästar en större glykogendepå innan arbetspass och snabbare glykolys under passet (Oldham et al. 1989). Hyypä et al. (1999) utfodrade hästar med en diet som innehöll 5% fett men såg ingen effekt på varken glykolysen eller glykogenesen. Den tidigare studien gav hästarna fett enligt vikt medan den senare utfodrade så att varje individ erhöll samma mängd

kalorier. Utförandet av olika studier har troligtvis en stor inverkan och bör tas i beaktande när man ska dra slutsatser.

Steroider för att öka resyntes av glykogen

2000 gjorde Hyypä ytterligare ett försök där ett antal hästar behandlades med den anabola steroiden nandrolone under två veckors tid. De fick därefter genomföra ett arbetstest då man mätte bland annat glykogeninnehållet i muskulaturen. Innan man påbörjade nandrolonebehandlingen fick varje häst utföra ett arbetstest för att kunna vara sin egen kontroll senare under försöket. Hos människa ger nandrolone ökad proteinsyntes och ett ökat innehåll av typ II fibrer muskelcellerna. Det har även visat kunna öka diametern i typ I fibrer. Hypotesen var att liknande effekt skulle kunna ses hos häst efter giva av nandrolone. I försöket kunde man se att glykogeninnehållet i muskulaturen återställdes snabbare efter behandlingen med anabola steroider än det gjorde innan behandling. Nivåerna av blodglukos hos kontrollgruppen och de som behandlades med steroider visade ingen signifikant skillnad mellan grupperna under försöksperioden. Däremot sågs en kvarstående höjning av hormonet kortisol hos den steroidbehandlade gruppen. Detta skulle kunna indikera att en gynnsam hormonell miljö ger en snabbare resyntes av glykogen och inte nödvändigtvis enbart substrattillgången av glukos. Effekten av nandrolonebehandling gör att en individ sannolikt kan träna mer frekvent utan att riskera överträning och utmattning. Dock är det olagligt att ge tävlande hästar anabola steroider. (Hyypä. 2000).

Per oral giva att föredra

Den långsamma resyntesen av glykogen har således angripits från olika vinklar och på olika nivåer för att öka förståelsen av detta problem. Då giva av glukos via infusion i blodet givit effekt i ett antal studier kan man tänka att detta borde vara ett alternativ att använda då man vill förkorta återhämtningsperioden hos hårt arbetande hästar. Denna administrering lämpar sig dock inte för vanliga tränare och hästmänniskor då injektioner av denna typ dels kräver veterinär närvaro och dels klassas som doping. För att underlätta återhämtningen hos tävlingshästar med hjälp av tillskott av exempelvis glukos och en aminosyra måste man alltså kunna administrera denna per os för att det ska fungera i praktiken.

MATERIAL OCH METODER

Hästar

Försöken utfördes med hjälp av travskolan vid riksanläggningen Wången, som tillhandahöll 11 vamblodiga travhästar (sex valacker och fem ston i åldrarna 4 till 9 år, vikt 406-500 kg) för studien. Var och en av hästarna var kliniskt friska och i så pass god kondition att de kunde genomföra ett tävlingslopp. Hästarna stod på en standardiserad foderstat med början minst 3 veckor innan försöken startade till dess att försöken var helt genomförda. Utfodring skedde 4 gånger per dag och bestod av grovfoder (hösilage), ett kommersiellt kraftfoder samt mineraltillskott. Skötsel och träning gjordes under hela perioden av ordinarie skötare och tränare vid Wångens travskola.

Utförande och arbetspass

Vid två tillfällen med 5 veckors mellanrum utförde hästarna ett hårt arbetspass med avsikt att åstadkomma en uttalad glykogensänkning i muskulaturen. Designad som en randomiserad crossover studie blev hästarna lottade att vid de olika försökstillfällena antingen få en giva glukos blandat med leucin eller enbart vatten som placebo. De blev därigenom sina egna kontroller.

Hästarna delades in i par och utförde arbetspassen två och två. Först värmdes de upp i långsam trav över 4000 meter och fick sedan gå 7 st backintervaller på vardera 500 meter i 9 km/h tempo. De blev mellan varje intervall skrittade nedför backen. Som avslutning travades hästarna långsamt i 2000 meter på en bana.

Femton minuter efter avslutat arbete fick den ena hästen en giva av glukos (1g/kg i 10% vattenlösning) och leucin (0,1g/kg) per os via nässvalgssond. Den andra hästen fick enbart ljummet vatten i motsvarande mängd (placebo). Alla hästarna fick behålla sina sonder under 4 timmar för att underlätta behandlingarna och för att minska stressen.

Ytterligare glukos (1g/kg i 10% vattenlösning) gavs efter 2 och 4 timmar medans leucin (0,1g/kg) gavs vid endast ett ytterligare tillfälle (4 timmar). Hästarna som lottats för placebo sondades med korresponderande volymer rent vatten efter 2 och 4 timmar. Hästarna hade ej tillgång till vatten eller foder under denna tid.

Återhämtning

Dagen efter det första träningspasset skrittades hästarna i skrittmaskin samt vilade. Detta fortsatte i 3 dagar innan de återgick till det normala schemat av träning på nivå av en tävlande travhäst.

Blodprover

Blodprover togs genom en permanentkanyl i hästens jugularven. Blod för analys av glukos överfördes till serumrör och blod för analys av insulin överfördes till lithiumheparinrör. Tidpunkten för provtagningarna var innan arbetspasset, direkt efter avslutat arbete, vid den första sondningen och därefter var 15:e minut under den första timmen följt av var 30:e minut under de efterföljande 5 timmarna. Direkt efter varje blodprovstagning ställdes provrören på is och centrifugerades sedan inom 15 minuter. Plasma och serum frystes därefter i -80 grader Celsius i väntan på analys med avseende på glukos samt insulin.

Muskelbiopsier

För att analysera glykogeninnehållet i muskulaturen togs standardiserade muskelbiopsier från hästarnas gluteusmuskulatur. (Essén-Gustavsson et al. 1984; Bröjer et al. 2002).

Den första muskelbiopsin togs innan arbetspassets början och den andra togs omedelbart efter arbetets slut. Sedan upprepades biopsitagningen under återhämtningsfasen vid 3 timmar, 6 timmar samt 24 timmar efter ansträngningens slut. Biopsierna frystes ned i flytande kväve direkt efter provtagningen och förvarades därefter i -80 grader.

Analyser

Blodproverna

För bestämning av s-glukos användes en automatisk analysutrustning (Konelab 30). Plasma insulin analyserades i duplikat med ett kommersiellt ELISA-kit (Merckodia AB), som tagits fram specifikt för att mäta koncentrationen av hästinsulin.

Muskelglykogen

Analysen av glykogen i muskelbiopsierna skedde enligt Lowry och Passoneau, (1973). De frystorkade muskelproverna kokades i 2 timmar i HCl för att frigöra glykosidenheterna från glukosmolekylerna. Dessa mättes sedan fluorometriskt genom mätning av mängden bildat NADPH.

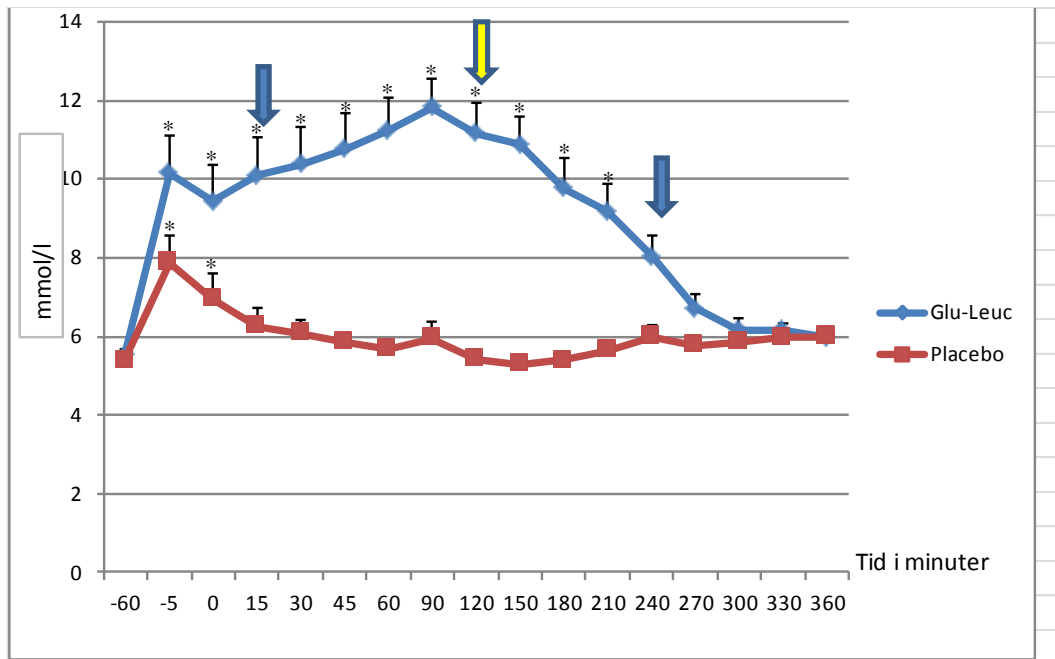
Statistik

För att kontrollera resultatens signifikans gjordes en tvåvägs och en envägsanova (upprepade mätningar på samma individ) för de två olika behandlingarna (glukos + leucine respektive placebo). Vid ett signifikant F värde utfördes ett Tukey-Kramer test. Vid $p < 0,05$ ansågs skillnaderna som signifikanta.

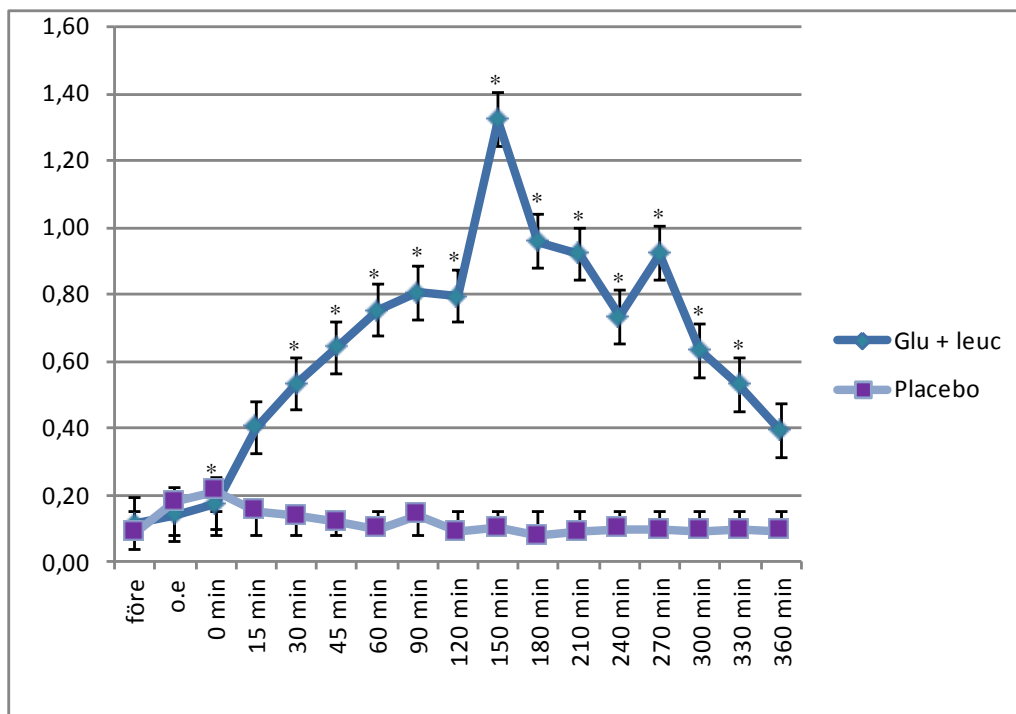
RESULTAT

Glukos och insulinkoncentrationer

Medelvärdet för serumkoncentrationen av glukos direkt efter arbetspasset var förhöjd jämfört med före arbetet i både gruppen som fick glukos + leucin per os (10,2 mmol/l) och i placebogruppen (7,9 mmol/l). Serumkoncentrationen av glukos var sedan signifikant förhöjd jämfört med vilovärdet före arbete under 240 minuter i gruppen som fick glukos + leucin medan det sjönk till en vilovärdesnivå redan vid 15 minuter efter den första sondningen i placebogruppen. Trots ytterligare glukos och leucingiva vid 240 minuter så resulterade detta inte i en förhöjning av glukoskoncentrationen jämfört med serumkoncentrationen före arbete i glukos + leucingruppen (figur 1). Insulinkoncentrationen i plasman ökade 30 minuter efter den initiala glukos- och leucingivan från 0,17 $\mu\text{l/l}$ till 0,53 $\mu\text{l/l}$. Efter den andra givan av glukos och leucin vid 120 minuter ökade plasmainsulin från i medeltal på 0,79 $\mu\text{l/l}$ till 1,32 $\mu\text{l/l}$ under en 30 minuters period. Därefter sjönk nivåerna till 0,92 $\mu\text{l/l}$ i samband med den sista glukos- och leucingivan, som gavs efter 240 minuter. Därefter sjönk seruminsulinkoncentrationerna ytterligare och vid 360 minuter efter den första sondningen var det ingen skillnad i insulinkoncentrationen jämfört med koncentrationen före arbete (figur 2).



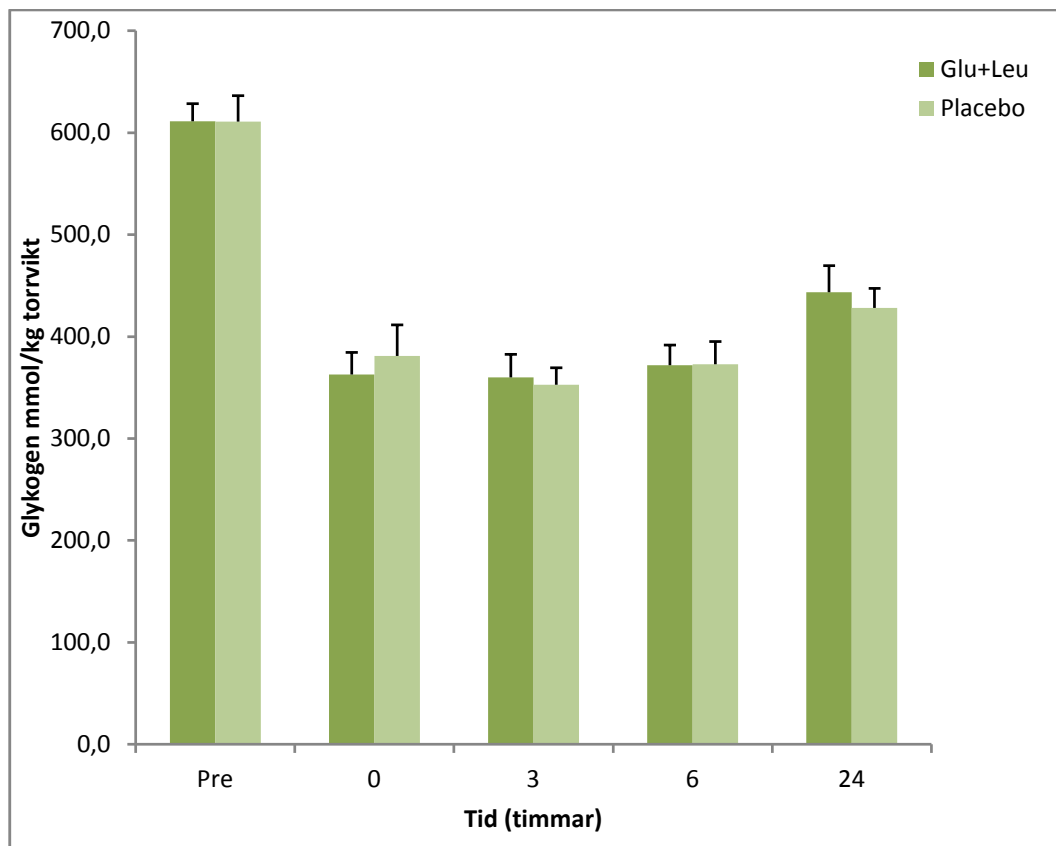
Figur 1: Hästarnas serumkoncentration av glukos före och efter arbetspasset. De blå pilarna visar tidpunkten för giva av glukos + leucin. Den gula pilen visar giva av enbart glukos. *Signifikant skilt från vilokoncentrationen före arbete inom respektive grupp (leucin+glukos respektive placebo).



Figur 2: Hästarnas plasmakoncentration av insulin före och efter arbete. *Signifikant skilt från vilokoncentrationen före arbete inom respektive grupp (leucin+glukos respektive placebo).

Muskelglykogen

Innan arbetspasset var medelvärdet för muskelglykogen 611 mmol/kg torrsvikt i glukos + leucingruppen och 611 mmol/kg torrsvikt i placebogruppen. Efter träningen sjönk koncentrationen av muskelglykogen till 362 mmol/kg torrsvikt respektive 381 mmol/kg torrsvikt. Efter 24 timmar var medelvärdet av muskelglykogen 443 mmol/kg torrsvikt i glukos + leucingruppen. Placebogruppens medelvärde var 428 mmol/kg torrsvikt. Ingen signifikant skillnad i koncentrationen av muskelglykogen kunde ses mellan de två grupperna vid 3, 6 och 24 timmar efter arbetspassets slut (figur 3).



Figur 3: Glykogeninnehållet i gluteusmuskeln före och efter arbete. Efter 24 timmar kunde ingen signifikant skillnad ses mellan de två grupperna

DISKUSSION

Trots att hästarna, som gavs glukos och leucin under de första 6 timmarna av återhämtningsfasen, hade högre serum- och plasmakoncentrationer av glukos respektive insulin jämfört med placebogrupperna verkar detta ej ha påverkat glykogenresynteshastigheten i positiv riktning.

Efter den andra givan av glukos och leucin kunde man se en kraftig förhöjning av plasma insulinet då medelvärdet under 30 minuter höjdes från 0,79 $\mu\text{l/l}$ till 1,32 $\mu\text{l/l}$. Även strax efter den andra givan av glukos fick man en höjning från 0,73 $\mu\text{l/l}$ till 0,92 $\mu\text{l/l}$. Glukos och leucinsondningen har givit upphov till höga serumglukos- och plasmainsulinkoncentrationer vid de två första sondningarna men inte tillräckligt höga nivåer för att påverka glykogensyntesen.

Tidigare studier, där man försökt påskynda synteshastigheten av muskelglykogen, visar entydigt på svårigheten att vid peroral giva av glukos eller lättsmälta kolhydrater åstadkomma önskvärd effekt (Geor et al. 2006; Lawrence et al. 1995; José-Cunilleras et al. 2005). Orsaken till detta är oklar men det verkar som problemet snarare ligger på cellulär nivå än att det orsakas av begränsad substrattillgång då bland annat denna studie visar att glykogensyntesen ej påverkas trots hyperglykemi och hyperinsulinemi.

Studier finns som tyder på att hästar har lägre insulinkänslighet än andra arter och detta skulle kunna förklara varför hästarna trots förhöjda nivåer av plasmainsulin och glukos inte förmådde syntetisera muskelglykogen i högre utsträckning (Pratt 2005).

Om muskelcellerna ej svarar adekvat på de höjda insulinnivåerna, ökar ej uttrycket av GLUT-4 och transporten av glukos in i cellen blir ineffektiv. Även glykogensyntas, nödvändigt för att konstruera glykogenmolekyler, är insulinberoende (Champe et al. 1987)

Geor et al. (2006) utförde en liknande studie där man efter ett hårt träningspass jämförde hästar som fick glukos antingen intravenöst eller peroralt. Man fann att vid peroral giva kunde man ej påverka glykogensynteshastigheten och spekulerade kring möjligheten att intravenös giva skulle aktivera enzymet glykogensyntas i högre grad än vad som sker vid peroralgiva. En orsak skulle kunna vara att hyperinsulinemin ej blir tillräcklig vid peroral giva på grund av till exempel det svinn som blir via gastrointestinala celler och metabolisering i levern innan utträde i blodcirkulationen.

Då insulinkänsligheten skulle kunna vara en begränsande faktor är det intressant att konstatera att insulinsvaret i denna studie var större än de värden Geor et al. (2006) presenterade. Detta leder till att man, även om effekten på glykogenresyntesen var obefintlig, ser en indikation på att leucinet kan ha haft en insulinhöjande effekt. Detta

överensstämmer med forskning gjord av bland annat Kuhara et al. (1991).

Waller et al. (2009) fick i en studie där man tillförde acetat per oralt efter hård träning en höjning av glykogensyntesen i upp till 4 timmar efter giva. Teorin var att acetat, som är ett viktigt substrat vid oxidativ förbränning, skulle "spara" glukos så att detta skulle kunna användas till glykogensyntes istället. Synteshastigheten av glykogenet ökade trefaldigt under dessa fyra timmar.

Hästar verkar trots möjlighet att gå över till metabolism av fett vid återhämtning gärna välja oxidativ förbränning av glukos för sin energiförsörjning (Hyyppä et al. 1997). Först vid längre uthållighetstävlingar använder hästen sig av fettmetabolism som primär energikälla (Geor et al. 2000; José-Cunilleras et al. 2002). Att framförallt använda sig av kolhydratmetaboliter som bränslekälla vid återhämtning minskar substrattillgången för glykogenesen och skulle potentiellt kunna bidra till en förlångsammad återhämtning efter träning.

För framtida forskning är det av yttersta vikt att få större insikt i mekanismerna bakom hästarnas insulinsvar och hur man eventuellt skulle kunna påverka det. I ett andra skede borde man undersöka hur man ytterligare kan höja insulinnivåerna i blodet efter träning.

Eventuellt kan man försöka ge leucin i ett tidigare skede för att snabbt få ett kraftigt insulinsvar efter träning. En möjlighet vore att ge leucin och glukos innan träning. En begränsning finns dock i per oral giva av glukos och kanske också leucin och det är hästens känsliga mag-tarmsystem, som kan reagera vid för stora givor av framförallt glukos. En av hästarna fick under studien koliksymtom, vilket kan ha orsakats av glukos + leucinet.

Intressant att notera i denna studie var den stora spridningen bland mätvärdena gällande framförallt insulinkoncentrationerna i plasma. Under ett hårt träningspass påverkas troligen upptaget av glukos via tarmen negativt, vilket skulle kunna förklara skillnaden i de uppmätta insulinvärdena mellan de olika individerna.

Ytterligare kan man kombinera acetat, leucin och glukos för att få maximal effekt av insulinet och glukostillgängligheten.

Sammanfattningsvis visade denna studie att leucin tillsammans med glukos kan ha en potentiell insulinhöjande effekt trots att denna höjning ej var tillräcklig för att påverka resynteshastigheten av muskelglykogen. Ytterligare studier krävs för att utreda framförallt mekanismen bakom hästarnas okänslighet för insulin.

TACK

Tack till Johan Bröjer, min handledare, för säker guidning genom EEF-arbetet och för att du gav mig en liten inblick i statistikens värld och gjorde så att jag förstod.

Tack Katarina Nostell, biträdande handledare och labassistenterna för all hjälp under blodprovstagningen.

Tack Birgitta Essén-Gustavsson för att du tentavaktade så att jag kunde vara med under båda försöken.

Slutligen ett stort tack till Riksanläggningen Wången med veterinär Ulf Hedenström, hästar och personal för otrolig service, tålamod och hängivenhet under våra försök.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Alexander, F., Chowdhury, A.K. 1958. Enzymes in the Ileal Juice of the Horse. *Nature*. 181: 190.
- Jacobs, K.A., Sherman, W.M. 1999. The efficiency of carbohydrate supplementation and chronic high-carbohydrate diets for improving endurance performance. *International Journal of sport nutrition* 9: 92-115.
- Bjålie, J.G., Haug, E., Sand, O., Sjaastad, Ö.V. 1998. Menneskekroppen. Universitetsforlaget AS, Oslo. 196-197.
- Bergström, J., Hermansen, L., Hultman, E., Saltin, B. 1967. Diet, muscle glycogen and physical performance. *Acta Physiologica Scandinavica* 71: 140-150.
- Björnhag, G. 2000. Växtätarna, kompendium i fodersmältningsorganens funktion hos de växtätande husdjuren. Institutionen för djurfysiologi, SLU, Uppsala. 8:21-28.
- Bröjer, J., Jonasson, R., Schuback, K., Essén-Gustavsson, B. 2002. Pro- and makroglycogenolysis in skeletal muscle during maximal treadmill exercise. *Equine Veterinary Journal*. 34: 205-208.
- 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 Veterinary Journal*. 36: 335-339.
- Casey, A., Short, A.H., Hultman, E. 1995. Glycogen resynthesis in human muscle fibre types following exercise-induced glycogen depletion. *Journal of Physiology, London*. 483: 265-271.
- Champe, P.C., Harvey, R.A. 1987. Biochemistry 2nd edition. *Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, US*. 88.
- Christ-Roberts, C.Y., Mandarino, L.J. 2004. Glycogen synthase: key effect of exercise on insulin action. 32: 90-94.
- Comline, R.S., Hall, L.W., Hickson, J.C.D., Murillo, A., Walker, R.G. 1969. Pancreatic secretion in the horse. *Journal of Physiology, London*. 204: 10-11.
- Conlee, R.K., Hickson, R.C., Winder, W.W., Hagberg, J.M., Holloszy, J.O. 1978. Regulation of glycogen resynthesis in muscles of rats following exercise. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 235: 145-150.
- Costill, D.L., Sherman, W.M., Fink, W.J., Maresh, C., Witten, M., Miller, J.M. (1981) The role of dietary carbohydrates in muscle glycogen resynthesis after strenuous running. *American journal of Clinical Nutrition*. 34:1831-1836)

- Davie, A.J., Evans, D.J., Hodgson, D.R., Rosie, R.J. 1994. The effects of an oral glucose polymer on muscle glycogen resynthesis in Standardbred horses. *Journal of Nutrition*. 124.
- Davie, A.J., Evans, D.L., Hodgson, D.R., Rose, R.J. 1996. Effects of glycogen depletion on high intensity exercise performance and glycogen utilisation rates. *Pferdeheilkunde*. 12: 482-484.
- Essén-Gustavsson, B., Karlström, K., Lindhol, A. 1984. Fibre types, enzyme activities and substrate utilisation in skeletal muscles of horses competing in endurance rides. *Equine Veterinary Journal*. 16: 197-202.
- Essén-Gustavsson, B., Mcmiken, D., Karlström, K., Lindholm, A., Persson, S.G.B. 1989. Muscular adaption of horses during intensive training and detraining. *Equine Veterinary Journal*. 21: 27-33.
- Farris, J.W., Hinchcliff, K.W., McKeever, K.H., Lamb, D.R. 1995. Glucose infusion increases maximal duration of prolonged treadmill exercise in Standardbred horses. *Equine Veterinary Journal*. 18: 357-361.
- Geor, R.J., Hinchcliff, K.W., Sams, R. A. 2000. α -adrenergic blockade augments glucose utilization in horses during graded exercise. *Journal of Applied Physiology*. 89: 1086-1098.
- Geor, R.J., Larsen, L., Waterfall, L., Stewart-Hunt, L., McCutcheon, L.J. 2006. Route of carbohydrate administration affects early post exercise muscle glycogen storage in horses. *Equine Veterinary Journal*. 36: 590-595.
- Gottlieb, M., Essén-Gustavsson, B., Lindholm, A., Persson, S.G.B. 1988. Circulatory and muscle metabolic responses to draught work compared to increasing trotting velocities. *Equine Veterinary Journal*. 20: 430-434.
- Gottlieb, M. 1989. Muscle depletion patterns during draught work in Standardbred horses. *Equine Veterinary Journal*. 21: 110-115.
- Harris, R.C., Marlin, D.J., Snow, D.H. 1987. Metabolic response to maximal exercise of 800 and 2000 m in the Thoroughbred horse. *Journal of applied Physiology*. 63: 12-19.
- Hyypä, S., Räsänen, L., Pösö, R. 1997. Resynthesis of glycogen in skeletal muscle from Standardbred trotters after repeated bouts of exercise. *American journal of veterinary research*. 58: 162-166.
- Hyypä, S., Saastamoinen, M., Pösö, A.R. 1999. Effect of a post-exercise fat-supplemented diet on muscle glycogen repletion. *Equine Veterinary Journal Supplement*. 30: 493-498.
- Hyypä, S. 2000. Effects of Nandrolone treatment on Recovery in Horses After Strenuous Physical Exercise. *Journal of Veterinary Medicine*. 48: 343-352.
- Ivy, J.L. 1998. Glycogen resynthesis after exercise: effect of carbohydrate intake. *International Journal of Sports Medicine*. 19: 142-145.
- José-Cunilleras, E., Hinchcliff, K.W., Sams, R. 2002. Glycemic index of a meal fed before exercise alters substrate use and glucose flux in exercising horses. *Journal of Applied Physiology*. 92: 117-128.

- José-Cunilleras, E., Hinchcliff, K.W. 2003. Carbohydrate metabolism in exercising horses. *Equine and Comparative Exercise Physiology*. 1:23-32.
- José-Cunilleras, E., Hayes, K.A., Toribio, R.E., Mathes, L. E., Hinchcliff, K.W. 2005. Expression of equine glucose transporter type 4 in skeletal muscle after glycogen-depleting exercise. *American Journal of Veterinary Research*. 66: 379-385.
- José-Cunilleras, E., Hinchcliff, K.W., Lacombe, V.A., Sams, R.A., Kohn, C.W., Taylor, L.E., Devor, S.T. 2005. Ingestion of starch-rich meals after exercise increases glucose kinetics but fails to enhance muscle glycogen replenishment in horses. *The Veterinary Journal*. 171: 468-477.
- Kuhara, T., Ikeda, S., Ohneda, A., Sasaki, Y. 1991. Effects of intravenous infusion of 17 aminoacids on the secretion of GH, glucagon, and insulin in sheep. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*. 260:21-26.
- Lacombe, V.A. Hinchcliff, K.W., Geor, R.J., Baskin, C.R. 2001. Muscle glycogen depletion and subsequent replenishment affect anaerobic capacity of horses. *Journal of Applied Physiology*. 91: 1782-1790.
- Lacombe, V.A., Hinchcliff, K.W., Devor, S.T. 2003. Effects of exercise and glucose administration on content of insulin-sensitive glucose transporter in equine skeletal muscle. *American Journal of Veterinary Research*. Vol 64. 12:1500-1506.
- Lacombe, V., Hinchcliff, K.W., Kohn, C.W., Devor, S.T., Taylor, L.E. 2004. Effects of feeding meals with various soluble carbohydrates content on muscle glycogen synthesis after exercise in horses. *American journal of veterinary research*. 65: 916-923.
- Lawrence, L.M., Hintz, H.F., Soderholm, L.V. 1995. Effect of time of feeding on metabolic response to exercise. *Equine Veterinary Journal*. 18: 392-395.
- Lemon, P.W.R. 1987. Protein and exercise: update 1987. *Medical Science of Sports and Exercise*. 19:179-190.
- Oldham, S.L., Potter, G.D., Evans, J.D., Smith, S.D., Taylor, T.S., Barnes, W.S. 1989. *Proceedings of the 11th Equine Nutrition and Physiology Symposium, Savoy, Illinois*. 57-62.
- Potter, G.D., Arnold, F.F., Householder, D.D., Hansen, G.H., Brown, K.M. 1992. Digestion of Starch in the Small or Large Intestine of the Horse. *Proceedings of the 1st European Conference of Horse Nutrition*. 107-111.
- Roberts, T.J., Weber, J.M., Hoppeler, H., Weibel, E.R., Taylor, C.R. 1996. Design of the oxygen and substrate pathways II. Defining the upper limits of carbohydrate and fat oxidation. *Journal of Experimental Biology*. 199:1651-1658.
- Romijn, J.A., Coyle, E.F., Sidossis, L.S., Gastaldelli, A., Horowitz, J.F., Endert, E. 1993. Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *American Journal of Physiology*. 265: 380-391.
- Pratt, S.E. 2005. Insulin sensitivity in the horse; methods for assessment and the effects of diet, exercise and physical conditioning. *PhD Dissertation, University of Guelph*.

- Pratt, S.E., Geor, R.J., Spriet, L.L., McCutcheon, L.J. 2006. Time Course of insulin sensitivity and skeletal muscle glycogen synthase activity after a single bout of exercise in horses. *Journal of Applied Physiology*. 103: 1063-1069.
- Pösö, R.A., Hyypä, S. 1999. Metabolic and hormonal changes after exercise in relation to muscle glycogen concentrations. *Equine Veterinary Journal*. 30: 332-336.
- Snow, D.H., Kerr, M.G., Nimmo, M.A., Abbott, E.M. 1982. Alterations in blood, sweat, urine and muscle composition during prolonged exercise in the horse. *Veterinary Record*. 110: 377-384.
- Snow, D.H., Harris, R.C., Harman, J.C., Marlin, D.J. 1987. Glycogen repletion following different diets. *Equine exercise physiology*, ICEEP publications, Davis, CA. 2: 701-706
- Topliff, D.R., Potter, G.D., Kreider, J.L., Dutson, T.R., Jessup, G.T. 1985. Diet manipulation, muscle glycogen metabolism and anaerobic work performance in the equine. In: *Proceedings of the 9th Equine Nutrition and Physiology Symposium*. 9:224-229.
- Trakatellis, A.C., Schwartz, G.P. 1968. Insulin- structure, synthesis and biosynthesis of the hormone. *Fortschritte der Chem Org Naturst*. 26:120-160.s
- Wagner, P.D. 1995. Determinants of VO₂max : man versus horse. *Journal of Equine veterinary sciences*. 15:398-404.
- Waller, A.P., Geor, R.J., Spriet, L.L., Heigenhauser, G.J.F., Lindinger, M.I. 2009. Oral acetate supplementation after prolonged moderate intensity exercise enhances early muscle glycogen resynthesis in horses. *Experimental Physiology*. 94.8: 888-898.
- Walker, J.A., Krehbiel, C.R., Harmon, D.L. 1994. Effects of slaframine and 4-diphenylacetoxy-N-methylpiperidinemethiodine (4DAMP) on pancreatic exocrine secretion in the bovine. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 72: 39-44.