

## **VI. Zusammenfassung**

In der vorliegenden Studie wurde unter standardisierten Bedingungen überprüft, welchen Einfluß ein intensives Training unter Zugbelastung bei jungen Pferden auf die belastungsbedingten Veränderungen in der Energiebereitstellung unter besonderer Berücksichtigung der Aminosäurehomöostase ausübt.

Dabei interessierten sowohl die direkten und kurzfristigen Reaktionen auf die Belastung als auch die trainingsbedingten Änderungen.

Daneben waren außerdem die Effekte einer oralen Tryptophangabe im Hinblick auf die metabolischen Parameter des Energiestoffwechsels von Interesse.

Insgesamt 5 Pferde (3 Wallache und 2 Stuten, Alter 2 Jahre) nahmen an der Untersuchung teil, die aus folgenden drei Abschnitten bestand:

### **I. Training bei zweijährigen Trabern unter Zugbelastung auf dem Laufband mit Stufentest und Dauerbelastung**

Dieser viermonatige Versuchsabschnitt bestand aus drei 32-tägigen Trainingsperioden. In zweitägigem Rhythmus absolvierten die Pferde eine 60minütige **Dauerbelastung**. Zu Beginn, nach der ersten Trainingsperiode sowie am Ende des gesamten Trainings wurde ein beprobter **Stufentest** durchgeführt, der sich aus 6 Geschwindigkeitsstufen von jeweils fünfminütiger Dauer zusammensetzte. Die Geschwindigkeit begann in der ersten Stufe mit 1,38 m/s und wurde von Stufe zu Stufe um 0,56 m/s gesteigert, so dass die Pferde in der sechsten Stufe eine Geschwindigkeit von 4,18 m/s zu absolvieren hatten.

Alle Belastungen wurden bei einer Steigung von 6 % sowie einer konstanten Zuglast von 40 kg durchgeführt.

### **II. Effekte einer oralen Tryptophangabe auf die Leistungsfähigkeit im Leistungstest**

Im Anschluß an das viermonatige Training wurde ein **Leistungstest** mit und ohne Tryptophansupplementation (50 g) durchgeführt, um die Wirkung des Tryptophans auf eine vorzeitige Ermüdung zu prüfen. Die aus alternierenden Schritt- und Trabphasen zusammengesetzte Belastung wurde mit einer Zuglast von 40 kg und einer Steigung von 6 % solange durchgeführt, bis die Pferde die Laufbandarbeit nicht mehr freiwillig absolvierten.

### **III. Ermittlung der postprandialen Kinetik einer oralen Tryptophangabe**

Nach oraler Tryptophanverabreichung (50 g) wurden über einen Zeitraum von zwölf Stunden Blutproben in 60minütigem Abstand entnommen. Nach sieben Tagen erfolgte ein Kontrolldurchgang.

Neben der Ermittlung der Herzfrequenz wurden zu definierten Zeitpunkten Blutproben entnommen, die Parameter waren: **Laktat, Glukose, freie Fettsäuren, Aminosäuren (Leucin, Isoleucin, Valin, Alanin, Tryptophan).**

*Folgende Ergebnisse wurden erzielt:*

#### **Zu I.: Stufenteste (ST) und Dauerbelastungen (DB)**

1. Die durchschnittlichen **Herzfrequenzen** für die gesamten Stufenteste bzw. Dauerbelastungen lagen bei 163 bzw. 118 Schlägen/min, es wurden Maximalwerte von 211 Schlägen/min erreicht. Zu allen Zeitpunkten des 3. Stufentestes lagen die Herzfrequenzen signifikant unter denen des 1. und 2. Stufentestes. Auch bei den Dauerbelastungen konnte eine deutliche Herzfrequenzabnahme um 21 % von 134 auf 111 Schlägen/min im Versuchszeitraum beobachtet werden.
2. Die maximale **Laktatkonzentration** im Vollblut betrug 10,1 mmol/l während der Stufenteste sowie 1,7 mmol/l während der Dauerbelastungen. Zwischen dem ersten und dem zweiten Stufentest konnte gegen Belastungsende mit der Abnahme der Laktatkonzentration von 7,3 auf 4,9 mmol/l ein signifikanter Trainingseffekt nachgewiesen werden. In den Dauerbelastungen nahm die Laktatkonzentration im Trainingsverlauf ebenfalls signifikant von 1,5 mmol/l (DB 1) auf 0,7 mmol/l (DB 4) ab.
3. Die Plasmakonzentration der **Glukose** stieg während der Stufenteste mit zunehmender Laufgeschwindigkeit signifikant von 3,9 auf maximal 7,7 mmol/l an. In den Dauerbelastungen nahmen die Glukosekonzentrationen zu Trainingsbeginn signifikant, am Trainingsende nur moderat (n. s.) von 3,6 auf maximal 4,6 mmol/l zu.

4. Das Ausgangsniveau der **freien Fettsäuren** zeigte sich sowohl in den Stufentesten als auch in den Dauerbelastungen stark divergierend (Min. 57,2  $\mu\text{mol/l}$ , Max. 493,4  $\mu\text{mol/l}$ ). Während die FFS-Konzentration im Plasma zu Trainingsbeginn (1. ST) noch um 95 % auf 457  $\mu\text{mol/l}$  anstieg, erhöhte sich die FFS-Konzentration am Ende des Trainings (3. ST) - allerdings bei deutlich höherem Ausgangsniveau - lediglich um 9 % auf 499  $\mu\text{mol/l}$ . Bei den Dauerbelastungen unterschieden sich die FFS-Konzentrationen zu Belastungsbeginn und Belastungsende jeweils deutlich ( $p < 0,01$ ). Im Trainingsverlauf nahm sowohl das Konzentrationsniveau der FFS als auch der Konzentrationsanstieg innerhalb einer Dauerbelastung signifikant ab. Die FFS-konzentrationsdifferenz gegen Trainingsende betrug zum Vergleichszeitpunkt „Belastungsbeginn“ 354  $\mu\text{mol/l}$  sowie zu „Belastungsende“ 812  $\mu\text{mol/l}$ .
5. Während sich die Ausgangskonzentrationen der **verzweigt-kettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin (BCAA)** bei den einzelnen Stufentests auf unterschiedlichem Niveau (388-463  $\mu\text{mol/l}$ ) befanden, verlief der Anstieg bis auf maximal 576  $\mu\text{mol/l}$  bei allen drei Durchgängen parallel. Auch in den Dauerbelastungen kam es mit Ausnahme der 4. Dauerbelastung zu einem statistisch abzusichernden Anstieg.
6. Im Verlauf der Stufentests kam es zu einer Erhöhung der **Alanin**-Konzentration von rund 146  $\mu\text{mol/l}$  auf rund 337  $\mu\text{mol/l}$ , bei den Dauerbelastungen war ein Konzentrationsanstieg nicht statistisch abzusichern.
7. Vor Belastungsbeginn lag die **Tryptophan**-Konzentration in den Stufentests zwischen 31,34 und 41,41  $\mu\text{mol/l}$ , während der Belastung konnten ähnlich wie in den Dauerbelastungen keine statistisch abzusichernden Veränderungen beobachtet werden. Im 3. Stufentest lag das Niveau der Tryptophankonzentration zu allen Zeitpunkten deutlich über dem des 1. und 2. Stufentestes. Mit Zunahme der Trainingsdauer (DB 3, DB 4) lag auch in den Dauerbelastungen das Konzentrationsniveau des Tryptophans im Plasma sowohl in Ruhe als auch während der Belastung über dem Niveau vom Trainingsbeginn.

## Zu II.: Leistungsteste

1. Die **Laktatkonzentrationen** im Plasma wiesen am Ende der Trabphase I mit  $3,9 \pm 0,5$  mmol/l während des tryptophansupplementierten Durchgangs tendentiell niedrigere Werte auf als im Kontrolldurchgang mit  $4,6 \pm 0,5$ .
2. Die **Herzfrequenzen** lagen im tryptophansupplementierten Leistungstest durchschnittlich bis zu 10 Schlägen/min und somit signifikant unter denen des Kontrolldurchgangs (Kontrolle max. 167 Schläge/min, Trp max. 159 Schläge/min).
3. Das Anfangsniveau der **freien Fettsäuren** im Plasma lag im tryptophansupplementierten Durchgang mit  $799,33 \pm 126,62$   $\mu\text{mol/l}$  hochsignifikant über der FFS-Konzentration des Kontrolldurchganges mit  $224 \pm 37$   $\mu\text{mol/l}$ . Der signifikante Anstieg beider Durchgänge war in der Schrittphase I und Trabphase I identisch. Gegen Ende der 2. Schrittphase sank die FFS-Konzentration nach Tryptophangabe ab, die Konzentration lag am Ende der Schrittphase II signifikant unter den Werten des Kontrolldurchganges. Weitere Behandlungseffekte konnten statistisch nicht abgesichert werden.
4. Die Ausgangskonzentrationen der **verzweigt-kettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin (BCAA)** befanden sich mit 492  $\mu\text{mol/l}$  im Kontrolldurchgang bzw. 480  $\mu\text{mol/l}$  im Tryptophandurchgang auf einem ähnlichen Niveau, Behandlungseffekte traten nicht auf.
5. Sowohl im Kontroll- als auch im Tryptophandurchgang stieg die **Alaninkonzentration** signifikant an. Mit 395,4  $\mu\text{mol/l}$  lag das Maximum 30  $\mu\text{mol/l}$  über den Kontrollwerten, das erreichte Minimum war mit 188,9  $\mu\text{mol/l}$  um 25  $\mu\text{mol/l}$  geringer als im Kontrolldurchgang, ein Behandlungseffekt war nicht nachweisbar.
6. Die **Tryptophankonzentration** lag im Tryptophandurchgang mit im Mittel 537  $\mu\text{mol/l}$  zu allen Zeitpunkten hochsignifikant über dem Niveau der Tryptophankonzentration mit durchschnittlich 60  $\mu\text{mol/l}$ . Weder im Kontroll- noch im Tryptophandurchgang ließen sich innerhalb eines Konzentrationsanstiegs statistisch abzusichernde Unterschiede ermitteln. Zu allen Zeitpunkten lagen deutliche ( $p < 0,001$ ) Behandlungseffekte vor.

### **Zu III.: Postprandiale Kinetik einer oralen Tryptophangabe (50 g per NSS)**

1. Im Kontrolldurchgang kam es 2 bis 3 Stunden nach der Fütterung von 1 kg Kraftfutter zu einem signifikanten **Glukoseanstieg** von 4,4 auf 5,1 mmol/l, der im tryptophansupplementierten Durchgang ausblieb. Anschließend (>4 Stunden nach Tryptophangabe) wurden keine weiteren Unterschiede in der Glukosekonzentration zwischen dem Kontroll- und tryptophansupplementierten Durchgang beobachtet.
2. Die Konzentration der **freien Fettsäuren** lag zum Fütterungszeitpunkt im Kontroll- und tryptophansupplementierten Durchgang mit 202,4  $\mu\text{mol/l}$  bzw. 99,7  $\mu\text{mol/l}$  auf sehr unterschiedlichen Niveaus. Es traten weder Zeit- noch Behandlungseffekte auf.
3. Die durchschnittlichen **Leucinkonzentrationen** betragen im Kontroll- bzw. Tryptophandurchgang 113  $\mu\text{mol/l}$  bzw. 119  $\mu\text{mol/l}$ . Der Konzentrationsverlauf verhielt sich ab vier Stunden nach der Fütterung gleichartig. Während im Kontrolldurchgang kein signifikanter Zeiteffekt messbar war, konnten im tryptophansupplementierten Durchgang sowohl zwei, drei und vier Stunden nach der Fütterung statistische Unterschiede beobachtet werden. Der **Isoleucinkonzentrationsverlauf** verhielt sich ab vier Stunden nach der Fütterung in beiden Durchgängen gleichartig, doch das Niveau lag im Tryptophandurchgang mit im Mittel 75  $\mu\text{mol/l}$  5  $\mu\text{mol/l}$  über dem Niveau des Kontrolldurchgangs. Im Gegensatz zur Kontrolle unterschied sich die Isoleucinkonzentration zwei bzw. drei Stunden nach Tryptophangabe und Fütterung deutlich von der Anfangskonzentration. Die **Valinkonzentration** wies im Kontroll- bzw. Tryptophantest mit im Durchschnitt 220  $\mu\text{mol/l}$  bzw. 216  $\mu\text{mol/l}$  ähnliche Werte auf. Anders als im Kontrolldurchgang unterschied sich zwei Stunden nach Fütterung und Tryptophangabe die Valinkonzentration deutlich vom Ausgangswert. Statistisch war zwei Stunden nach Fütterung und Tryptophangabe ein signifikanter Behandlungseffekt nachweisbar.
4. Im Gegensatz zum Kontrolldurchgang zeigten sich im Tryptophandurchgang Schwankungen der **Alaninkonzentration** zwischen 149  $\mu\text{mol/l}$  zwei Stunden und 274  $\mu\text{mol/l}$  acht Stunden nach Fütterung und Tryptophanapplikation. Statistisch abzusichernde Behandlungseffekte traten sowohl zwei und drei als auch acht, neun und zehn Stunden nach Tryptophanverabreichung auf.

5. Die durchschnittliche **Tryptophan**konzentration lag bis einschließlich sechs Stunden nach der Tryptophansupplementation um ein Zehnfaches über den konstanten Konzentrationen des Kontrolldurchgangs von im Mittel 49  $\mu\text{mol/l}$ . Während der gesamten Messzeit unterschieden sich der Kontroll- und Tryptophandurchgang hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) voneinander.

Der Hauptanteil des Energiebedarfs wird unter Belastungsbedingungen über den oxidativen Metabolismus der Kohlenhydrate und Fette gedeckt, aber mit dem Fortschreiten der Untersuchungen auf dem Gebiet der Stoffwechselphysiologie sollte auch den Aminosäuren in ihrem Nutzen als Substrat für die Skelettmuskulatur sowie in ihrem Mitwirken in der Ätiologie der zentralen Ermüdung eine größere Rolle zugesprochen werden.

Die Verabreichung von Tryptophan vor einer standardisierten Belastung mit der Zuglast von 40 kg und Geschwindigkeiten bis zu 4,18 m/s weist im Hinblick auf die Leistungsfähigkeit beim Pferd keine wesentlichen Effekte auf, lediglich die Herzfrequenz zeigte sich beeinflussbar und ließ sich nach Tryptophansupplementation minimieren. Ein durch Tryptophangaben verursachtes vorzeitiges Erreichen eines Ermüdungszustandes konnte im Unterschied zum Menschen und zu Ratten beim Pferd nicht forciert werden.

Elke Watermülder: Effects of training on energy metabolism in consideration of the amino acid homoeostasis after standardised draught work in young trotters

## **VII. Summary**

The aim of this study was to investigate the influence of intensive draught work training on changes in energy metabolism in consideration of the amino acid homoeostasis under standardised conditions in young trotters. Both the direct changes and the changes caused by training as well as the effects due to orally applied tryptophan have been of interest.

Five Standardbred horses (three geldings and two mares, age two years) were used in this study which consisted of the following three parts:

### **I. Draught loaded training on a treadmill with standardised exercise test (SET) and endurance exercise**

This four month training program consisted of three training periods, 32 days each. Every second day the horses did 60 minutes of **long-term exercise (LTE)**. At the beginning, after the first training period as well as at the end of the training program, a **standardised exercise test (SET)** consisting of six steps of five minutes duration each was done. The velocity at the first step was 1.38 m/s, each consecutive step was increased by 0.56 m/s, so the SET finished with a velocity of 4.18 m/s.

All SETs and LTEs took place on a treadmill at a 6 % gradient with a draught load of 40 kg.

### **II. Effects of an oral tryptophan supplementation on performance**

A **performance test (PT)** with and without supplementation of 50 g tryptophan was done following four months of training to prove the efficiency of tryptophan to cause an earlier fatigue. The horses performed several intervals of draught loaded exercise (40 kg) consisting of walking and trotting periods on a treadmill at a 6 % gradient until they were unwilling to continue.

### **III. Postprandial kinetics of orally applied tryptophan (via nasogastric tube)**

After supplementation of 50 g tryptophan, blood samples were taken every 60 minutes over 12 hours. A control was done seven days later.

At defined times **heart rate** was measured and blood samples for determination of **lactate, glucose, free fatty acids, and amino acids (leucine, isoleucine, valine, alanine, tryptophan)** were collected.

*The following results were obtained:*

#### **To I: Standardised exercise test (SET) and long-term exercise (LTE)**

1. The average **heart rate** (beats per minute, bpm) in the SETs and LTEs reached 163 bpm, respectively 118 bpm, with a maximum of 211 bpm. Compared with the first and the second SET, heart rate was lower during the third SET each time. Likewise, in the LTEs a 21 % decrease (134 bpm to 111 bpm) could be seen during the study.
2. The maximum **blood lactate** concentration in SET reached 10.1 mmol/l, whereas in LTE it reached 1.7 mmol/l. A significant effect of training could be seen at the end of exercise between the first and the second SET when lactate concentration lowered from 7.3 to 4.9 mmol/l. In addition, lactate concentration in LTE was regulated down from 1.5 (LTE 1) to 0.7 mmol/l (LTE 4) as well.
3. In the SETs **plasma glucose** concentration significantly rose from 3.9 to a maximum of 7.7 mmol/l with increasing velocity. In contrast to that, plasma glucose concentrations in LTEs increased only moderately (n. s.) from 3.6 to a maximum of 4.6 mmol/l at the end of training, at the beginning of training there were significant increases.
4. Both in SETs and LTEs the **free fatty acid (FFA)** concentration showed significant alterations (min. 57.2  $\mu\text{mol/l}$ , max. 493.4  $\mu\text{mol/l}$ ). Whereas the FFA concentration showed an increase of only 9 % up to 499  $\mu\text{mol/l}$  at the end of training (SET 3) - though with a higher starting-level - at the beginning of training the FFA concentration rose by about 95 % up to 457  $\mu\text{mol/l}$ . In LTE the FFA concentration



was significantly different between the start and end of training ( $p < 0,01$ ). Both during the whole training period and during the LTE itself the FFA concentration level as well as its increase dropped significantly. The difference in FFA concentration at the end of training was 354  $\mu\text{mol/l}$  at the beginning of work load and 812  $\mu\text{mol/l}$  for the end of work load.

5. Although the **branched chain amino acid (BCAA: leucine, isoleucine, valine)** concentration of all SETs had a different level at the start (388-463  $\mu\text{mol/l}$ ) there was an equal increase up to a maximum of 576  $\mu\text{mol/l}$  in each of the three SETs. Except for the 4<sup>th</sup> LTE, all BCAA concentrations showed a significant increase in the LTEs.
6. Before starting SET plasma **alanine** concentration was 146  $\mu\text{mol/l}$ . During SET it reached values of about 337  $\mu\text{mol/l}$ . There was no significant increase in alanine concentration in the LTEs.
7. Before starting exercise plasma **tryptophan** concentration showed values of 31.34 to 41,41  $\mu\text{mol/l}$ ; similar to LTEs in SETs, significant changes of alanine concentration were missing. At SET 3 tryptophan concentrations clearly exceeded those of SET 1 and SET 2. Compared with the tryptophan level before training both at rest and during exercise the concentration level of tryptophan increased with training progress (LTE 3 and LTE 4)

## To II.: Performance test (PT)

1. After tryptophan application plasma **lactate** concentration tended to be lower ( $3.9 \pm 0.5$  mmol/l) than in the control group ( $4.6 \pm 0.5$  mmol/l) at the end of trotting period I.
2. In horses given tryptophan **heart rate** (159 bpm) was significantly lower by an average of 10 bpm than in the control group (167 bpm).
3. At the beginning of exercise plasma **FFA** concentration after tryptophan supplementation reached values of  $799.33 \pm 126.62$   $\mu\text{mol/l}$ , whereas in the control group FFA concentration was about 224.37  $\mu\text{mol/l}$ . There was an equally significant increase during walking period I and trotting period I in both trials. At the end of walking period II plasma FFA concentration was reduced in horses given tryptophan,

the concentration was significantly lower than in the trial without tryptophan. Further effects due to tryptophan application could not be seen.

4. The plasma **BCAA** concentrations at the beginning of exercise in the control group and in tryptophan-supplemented group showed a similar level (492  $\mu\text{mol/l}$  respectively 480  $\mu\text{mol/l}$ ), there were no effects due to tryptophan application.
5. Both in control- and tryptophan-trial plasma **alanine** concentration significantly increased. After tryptophan application the maximum alanine concentration (395.4  $\mu\text{mol/l}$ ) was 30  $\mu\text{mol/l}$  higher than in the control, the minimum reached 188.9  $\mu\text{mol/l}$  and with that it was 25  $\mu\text{mol/l}$  lower than in the control group; effects due to tryptophan application could not be seen.
6. The plasma **tryptophan** concentration after tryptophan application showed significantly higher values (537  $\mu\text{mol/l}$ ) than without tryptophan application (60  $\mu\text{mol/l}$ ). Neither in control- nor in tryptophan-trial there were differences (n. s.) in the increase of tryptophan concentration itself. Strong effects ( $p < 0.001$ ) due to tryptophan supplementation could be seen.

### **To III.: Postprandial kinetics of an orally tryptophan application (50 g via nasogastric tube)**

1. Two to three hours after being fed 1 kg concentrate plasma **glucose** concentration significantly rose from 4.4 to 5.1  $\text{mmol/l}$  in the control-trial which it did not in the tryptophan-trial. Four hours after tryptophan application there were no differences between control- and tryptophan-trial seen.
2. At time of feeding plasma **FFA** concentration of the control- and tryptophan-trial had different levels (202.4  $\mu\text{mol/l}$  respectively 99.7  $\mu\text{mol/l}$ ). Tryptophan supplementation had no significant effect.
3. The average plasma **leucine** concentration of control- and tryptophan-trial reached 113  $\mu\text{mol/l}$  respectively 119  $\mu\text{mol/l}$ . Following the fourth hour after feeding FFA concentrations developed equally. While no significant effect of time could be seen in the control-trial, in tryptophan-trial there was statistically relevant difference to be

seen at two, three, and four hours after feeding. Although the plasma **isoleucine** concentration four hours after feeding was of the same pattern in control- and tryptophan trial, the average level (75  $\mu\text{mol/l}$ ) was about 5  $\mu\text{mol/l}$  higher in the tryptophan-trial than in the control-trial. In contrast to the control-trial the plasma isoleucine concentration of the tryptophan-trial at the beginning of exercise was significantly different from the concentrations reached two and four hours after feeding and tryptophan application. Plasma **valine** concentrations in control- and tryptophan-trial were similar (220  $\mu\text{mol/l}$  respectively 216  $\mu\text{mol/l}$ ), but two hours after feeding and tryptophan application valine concentrations were different from starting concentrations only in the tryptophan-trial. This was the only significant effect due to tryptophan.

4. Whereas in the tryptophan-trial changes of plasma **alanine** concentration could be measured between two and eight hours after feeding and tryptophan application (149  $\mu\text{mol/l}$  respectively 274  $\mu\text{mol/l}$ ), there were no such changes in the control-trial. Effects due to tryptophan application could be measured two and three as well as eight, nine, and ten hours after tryptophan supplementation.
5. Within the first six hours average plasma **tryptophan** concentration was ten times higher in the tryptophan-trial than the average tryptophan concentration of the control-trial with a value of 49  $\mu\text{mol/l}$ . During the whole test there were striking differences between control- and tryptophan-trial.

The vast majority of the energy required for exercise is derived from oxidative metabolism of carbohydrates and lipids, but with advances in physiological metabolism studies it should be considered that amino acids could serve as important substrates for skeletal muscles as well since they are involved in the etiology of central fatigue; therefore they should be investigated more precisely. It appears that tryptophan supplements given before standardised exercise with a draught load of 40 kg and a velocity of up to 4.18 m/s do not affect performance in the horse, only heart rate could be minimized. In contrast to studies in humans and rats tryptophan application could not induce an earlier onset of central fatigue.