

Slutrapport H1047041 ¹³C-bikarbonatmetoden - en non-invasiv, snabb och enkel metod för korrekt bestämning av energiförbrukning hos häst

Projektets huvudmål och delmål

Projektets huvudsyften var att validera ¹³C-bikarbonatmetoden gentemot indirekt kalorimetri (IK), som är energimetabolismens gyllene standard, samt att värdera olika fodermedels och foderstaters inverkan på energiförbrukning, prestations-förmåga och hälsa hos häst. ¹³C-bikarbonatmetoden användes främst för att bestämma energiförbrukning hos häst under normala levnadsbetingelser men också vid olika nivåer av fysisk belastning. Metoden användes dessutom för att bestämma energibehov för underhåll hos lättfödda respektive normal- till svårödda hästraser. Dessutom karaktäriseras fysiologiska och metaboliska effekter såsom fodrets smältbarhet, dess passagetid genom tarmkanalen, magtömningshastighet, pH i caecum, produktion av kortkedjade fettsyror (SCFA) samt koncentration av metaboliska hormoner och metaboliter vid användning av fodermedel och foderstater som förväntas ha hälsomässigt positiva egenskaper. Inverkan av standardiserad träning på plasmakoncentration av SCFA, laktat, metaboliska hormoner och andra relevanta metaboliter undersöktes även.

Projektet var uppdelat i tre delprojekt, och det experimentella arbetet har i allt väsentligt genomförts enligt plan. Projektperioden förlängdes med 6 månader till och med den 15 juli 2014, eftersom det vid utgången av 2013 återstod en del analys- och bearbetningsarbete samt färdigställande av publikationer. Det senare pågår fortfarande, och förväntas generera två till tre vetenskapliga artiklar utöver dem som framgår av publikationslistan nedan.

Experiment 1: Validering av en non-invasiv ¹³C-bikarbonat tracer teknik för bestämning av energiförbrukning hos ponnyer gentemot indirekt kalorimetri.

I försök1 validerades ¹³C-bikarbonatmetoden (¹³C-BT) gentemot mätningar genomförda i respirations-kammare med indirekt kalorimetri. De isotop-utskiljningskurvor, som erhållits vid användande av ¹³C-BT-metoden, har bearbetats med hjälp av ett avancerat modelleringsprogram, SAAM (Simulation, Analysis and Modeling Software). I försökets andra år användes en stor del av tiden till att ställa upp korrekta modeller, så att data kunde analyseras på mest möjligt korrekta sätt, och detta arbete implementerades under försökets tredje år. Vid mätning i respirationskamrarna är det möjligt att bestämma den respiratoriska kvoten som är kvoten mellan volym producerad koldioxid och förbrukat syre ($RQ = CO_2/O_2$). Dessutom kan man beräkna en "recovery factor" (RF) för ¹³C i utandningsluft, vilken anger hur stor del av den givna isotopen som återfångas i utandningsluften. Bägge dessa faktorer är väsentliga för beräkningen av energiförbrukningen. Försöket genomfördes med 4 Shetlandsponnyer, utfodrade med enbart hö till deras estimerade underhållsbehov. Ponnyerna tillfördes antingen isotopen med hjälp av en oral dos (dvs. fullständigt non-invasiv teknik) eller via en intravenös (IV) injektion. Två delförsök ingick, där det ena genomfördes när ponnyerna gick i stallet i sina boxar, och den andra delen när de mättes i respirationskamrarna samtidigt som de mättes med ¹³C-BT-metoden. Det kunde konkluderas att det inte var någon skillnad mellan de två metoderna för mätning av energiförbrukning, och att oral og IV tillförsel av $NaH^{13}CO_3$ gav samma resultat, men att excretionskurvorna var något jämnare, och därmed mera lättmodellerade, när isotopen gavs IV. Det påvisades också att ¹³C-BT-metoden var tillräckligt känslig för att kunna påvisa individuella skillnader i energiförbrukning mellan de 4 ponnyer som ingick i försöket. Resultaten från mätningar utförda i stallet skilde sig inte signifikant från dem utförda i respirationskamrarna, men det var en tendens till högre värden från mätningarna i stallet, vilket förklaras av att hästarna hade större yta att röra sig på i stallet. Baserat på resultaten från delprojekt 1 har målet att validera ¹³C-BT metoden gentemot IK uppnåtts. En vetenskaplig artikel har publicerats i Livestock Science (se publikationslista).

Inom ramen för experiment 1 har en kompletterande studie genomförts som del i ett MSc-arbete. Här har inverkan av tidpunkt för utfodring relativt tillförsel av $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ dos studerats, och resultaten med ^{13}C -BT-metoden värderats gentemot resultat funna med IK. Försöket genomfördes för att värdera inflytandet av intag och metabolisering av foder på koldioxidproduktionen och därmed energiförbrukningen. Försöket genomfördes liksom det tidigare med 4 Shetlandsponnyer som mättes med ^{13}C -BT, given antingen som oral eller IV dos, samtidigt som de mättes i respirationskammarna med IK. Ponnyerna fodrades med hö antingen 3 timmar före (-3), samtidigt med (0) eller 3 timmar efter (+3) ingivandet av isotopen. Också i detta försök erhöles utmärkt överensstämmelse mellan ^{13}C -BT och IK, och det var heller ingen skillnad mellan oral eller IV tillförsel av isotopen. Däremot erhöles signifikant lägre energiförbrukningsvärden för -3 (350 $\text{kJ/kg}^{0.75}$ per dag) än för de två övriga utfodringstidpunkterna (425-450 $\text{kJ/kg}^{0.75}$ per dag), vilka inte skilde sig signifikant åt. Dessa resultat visar att intag och bearbetning av foder i digestionskanalen har ett påtagligt inflytande på energiförbrukningen, och att ^{13}C -BT-metoden är tillräckligt känslig för att fånga upp sådana skillnader. För att erhålla jämförbara resultat mellan olika mätillfällen är det därför viktigt att utfodringstidpunkten standardiseras i förhållande till ingivandet av isotopen. Vid tidpunkten -3 var inflytandet från metaboliska processer minst, och kan därför rekommenderas om man önskar minimera inflytandet av utfodring. Resultaten har presenterats i en MSc-avhandling (se publikationslistan), och en vetenskaplig artikel baserad på resultaten av denna studie finns tillgänglig online i Animal (se publikationslista).

Sammantaget har resultaten från experiment 1 visat att ^{13}C -BT-metoden ger säkra estimat av energiförbrukningen hos hästar i vila och under de utfodringsförhållanden som rått i försöken. Det visades att RQ inte påverkades av de försöksbetingelser som gällde här. Däremot berodde RF av om djuren fick oral eller IV dos, vilket troligen förklaras av att ponnyerna fick tas ut kort ur respirationskammarna när de gavs IV dosen. Även tidpunkten för fodring påverkade RF vid IV dos, så att högre RF erhöles vid fodring +3. Detta understryker att det är viktigt att undersökningar genomförs under väl standardiserade former, och att man använder korrekta estimat för RQ och RF när man beräknar energiförbrukningen.

Experiment 2: Energiförbrukning hos hästar i standardiserat arbete: inverkan av diet samt validering av ^{13}C -BT gentemot Cosmed K4

Den djurexperimentella delen av detta delprojekt genomfördes under 2011, och under 2012, 2013 och de första månaderna 2014 har en stor mängd kemiska analyser och databehandling av resultaten genomförts. Provmaterial från delprojektet har analyserats i Danmark, Norge och Australien, vilket varit ganska logistiskt krävande. I detta delprojekt undersöktes effekten af fyra dieter: 1) enbart hö 2) hö + korn 3) hö + melasserad sockerbetsnitsel (Betfor) samt 4) hö +korn + Betfor i en 4x4 Latin square design. Dieternas sammansättning hade gjorts så att de skulle vara isoenergetiska, men antingen ha ett högt innehåll av olöslig fiber (1: hö), olöslig fiber och stärkelse (2: hö + korn) olöslig och löslig fiber (3: Betfor) samt olöslig och löslig fiber och stärkelse (4: hö+korn+Betfor). Kolhydratfraktionen hos såväl dieter som faeces analyserades med dietary fibre metoden, som ger en mycket detaljerad uppdelning av de olika kolhydratfraktioner som ingår. Som försöksdjur användes 4 caecum-fistulerade hästar av Norsk kallblodstravare. Flera delundersökningar har ingått, nämligen 1) ^{13}C -BT för bestämning av inflytande av dietens sammansättning på hästarnas energiförbrukning i vila. I nästa delförsök undersöktes med samma dieter 2) Inverkan av dietens sammansättning på hästens prestation. Hästarna tränades under försöket och en standardiserad träningstest genomfördes med mätning av energiförbrukningen i arbete med ^{13}C -BT-metoden. Det togs även blodprover före morgonutfodringen (0), omedelbart före respektive efter och 9 timmar efter avslutad träning för analys av SCFA, laktat, metaboliska hormoner och andra metaboliter. I ytterligare ett försöksled undersöktes 3) dietens inverkan på miljö i grovtarmen och i faeces samt metabolisk respons på de olika dieterna. I delförsök 4) undersöktes dietens inflytande på fodrets smältbarhet, magtömningshastigheten och fodrets passagehastighet genom digestionskanalen. Delförsök 5) syftade till att utvärdera användbarheten av Cosmed K4 som är ett system för bestämning av energiförbrukning med hjälp av maskteknik.

I delförsök 1) gavs en oral dos av $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ (2 mg/kg kroppsvikt; uppblandat i en sockerlösning) omedelbart före morgonutfodringen, och utandningsprover insamlades i breath bags innan dosen gavs (baseline) och med frekventa intervall under den första timmen efter det att isotopen gavs och därefter med längre intervall fram till 6 timmar efter dosering. Resultaten modellerades i SAAM på samma sätt som beskrivits ovan, och RQ och RF värden estimerades utifrån erfarenheterna i experiment 1. Det erhöles inga skillnader mellan dieter, men det genomsnittliga erhållna värdet för hästarnas energiförbrukning ($825 \text{ kJ/kg}^{0.75}$ per dag) var högre än vad som erhållits i andra undersökningar. Detta kan möjligen ha berott på överestimering på grund av att inte hela dosen svalts. Det konkluderades att IV injektion skulle gett större säkerhet för att hela dosen verkligen upptagits, och dessutom gett excretionskurvor som varit lättare att modellera.

I delförsök 2 genomfördes ^{13}C -BT bestämning av energibehov hos hästar på samma dieter som ovan men under genomförande av en standardiserad träningstest. Hästarna gavs isotopdosen oralt, en timme för träning, vilket motsvarade 3 timmar efter utfodring. Prover av utandningsluft togs som beskrivits ovan, en gång just innan träningen började, en gång under träning på löpbandet, en gång alldeles efter avslutad träning, efter att hästarna skrittats på löpbandet, och därefter på fasta intervaller intill 6 timmar efter att dosen gavs. Under den första timmen, medan hästarna vilade, hade ^{13}C -excretionskurvan samma form som i de tidigare undersökningarna, men när träningen började sjönk värdena till basalnivå, för att senare stiga lite och ligga något över basalvärden fram till 5 timmar efter att dosen getts. Det visade sig att kurvor av denna form inte gick att modellera så att tillförlitliga resultat kunde uppnås. Det konkluderades därför, och för att det på andra djurslag visats att RF stiger vid fysiskt arbete, att ^{13}C -BT-metoden inte lämpade sig för att bestämma energiförbrukning under fysiskt arbete under de förhållanden som rått i detta försök. Avseende hästarnas prestation och metaboliska respons sågs för de flesta parametrar ett starkt inflytande av provtagningstidpunkt, men färre parametrar var beroende av diet. Laktat, triglycerider, fria fettsyror och betahydroxybutyrat samt propionsyra i plasma steg alla signifikant från före till efter träning, men nivån för stigningen i laktat var inte sådan att hästarnas laktattröskel hade överstigits. De övriga stigningarna reflekterade huvudsakligen fettmobilisering som en effekt av träningen.

I delförsök 3 mättes pH i caecum och faeces omedelbart före utfodring och därefter varje timme till 9 timmar efter utfodring, och prover av caecuminnehåll och faeces togs ut för analys av kortkedjade fettsyror (SCFA). Det togs även ut blodprover vid samma tidpunkter som caecum och faecesprover för analys av SCFA, metaboliska hormoner och metaboliter. Här kunde tydliga dietrelaterade skillnader på miljön i både grovtarm och faeces dokumenteras, både avseende pH och koncentration av SCFA. De stärkelsrika dieterna (hø+korn; hø+korn+Betfor) förorsakade, som förväntat, större fluktuationer i pH än de fiberrika dieterna (hø; hø+Betfor). Emellertid sjönk inte pH lika mycket för hø+korn+Betfor dieten som för hø+korn dieten, trots att foderrationerna innehöll samma mängd korn. För såväl acetat som propionat i caecuminnehåll, men ej för totalmängden SCFA erhöles signifikanta skillnader. De högsta nivåerna av acetat erhöles på de fiberrika dieterna (hö; hö+Betfor) medan koncentrationen av propionat som förväntat var högst på de dieter där stärkelse ingick (korn; korn+Betfor). De mätningar som gjordes på faecesprover tydde på att pH och nivåerna av SCFA inte är helt representativa för nivåerna i caecum. Plasmakoncentrationerna av SCFA visade ett något annorlunda mönster än i caecum: de högsta koncentrationerna av total SCFA och acetat fanns hos hästar på de fiberrika dieterna, men propionat-koncentrationerna var ej signifikant påverkade av dieten. Av de hormonkoncentrationer som mättes (insulin, cortisol, leptin, ghrelin, IGF-1) var det endast insulin som var signifikant påverkad av dieten med högst värden på de stärkelse-innehållande dieterna. För insulin sågs också en signifikant stigning efter fodring, och värdena sjönk därefter tillbaka mot fastevärdet. Dessa resultat presenteras i en artikel som sänts in till Animal Feed Science and Technology för publicering.

Resultaten av detta delförsök gav upphov till idén att genomföra ett mindre försök, där effekten av i vilken ordning hö och korn utfodrades, samt effekten av den mängd korn som utfodrades i en enskild måltid undersöktes med avseende på inverkan på pH-profilen i grovtarmen. Resultaten av detta extra försök presenterades på en konferens i Portugal 2012.

I delförsök 4 mättes fodrets passagehastighet genom digestionskanalen med hjälp av en inert markör, ytterbium, som en del av högivan märkts med. Dessutom mättes fodrets skenbara smältbarhet. Resultaten visade att de två fiberrika dieterna (hö; hö+Betfor) hade en snabbare passagehastighet genom digestionskanalen än de två dieterna med korn (hö+korn+Betfor; hö+korn). Detta avspeglar bland annat att intaget av torrsubstans och kostfiber var högre på de fiberrika dieterna än på de stärkelserika, eftersom alla dieter sammansatts så att de skulle vara iso-energetiska. Smältbarheten hos dieternas totala kostfiber och icke stärkelse polysackarider skilde sig inte åt, men för icke cellulosa polysackarider var det en tendens till högre smältbarhet hos dieter som innehöll Betfor (löslig fiber). Likaledes var smältbarheten hos de enskilda komponenterna glukos, galaktos och arabinos signifikant högre i dieter med Betfor än i övriga, och det var även en tendens till högre smältbarhet hos uronsyror i dessa dieter. Detta visade att den lösliga fibern har en högre smältbarhet än icke löslig fiber, och därmed kan utgöra en god energikälla för häst. Resultaten från denna delstudie är publicerade i *Animal* (se publikationslista). I detta försöksled ingick även en studie av magtömningshastigheten, vilken genomfördes med två ¹³C-märkta markörer, en för vätskefasen (¹³C-acetat) och en för den solida fasen (¹³C-oktansyra). Förloppen mättes med hjälp av breath test, enligt samma provtagningsmetodik som för ¹³C-BT. Resultaten var emellertid tämligen varierande, och det konkluderades att metodiken måste utvecklas ytterligare innan den kan ge tillförlitliga resultat.

Den utrustning, Cosmed K4, som användes i delförsök 5 var vid försöksstarten nyansskaffad till UMB, och de första undersökningarna genomfördes under korta tidsförlopp på hästar i vila. De hade huvudsakligen karaktär av testning och inkörning av tekniken. Det visade sig att tekniken inte var lämplig för användning för hästar på löpband, eftersom utrustningen har känsliga delar som kan förstöras om hästen slår med huvudet. Visst vidare arbete med att utveckla tekniken till användning på hästar under fältförhållanden har genomförts, men dessa resultat är ännu inte färdigbearbetade.

De prover på caecuminnehåll (delförsök 3) och faeces (delförsök 4) som togs ut genererade ett ytterligare projekt som ledde till ett MSc-arbete vid NMBU. Proverna användes för att bestämma hur dieten påverkar mikrobiota i caecum och faeces i det korta perspektiv som provtagnings-tidpunkterna tillät. Mikrobiota karaktäriserades med modern avancerad mikrobiologisk teknik, och resultaten har presenterats i en MSc-avhandling, och en vetenskaplig artikel undergår för närvarande revision i *FEMS Microbiology Ecology* (se publikationslista) och ytterligare en är under utarbetande.

Experiment 3. Energiförbrukning hos hästar av olika ras och under olika grad av arbetsbelastning

Syftet med denna del av undersökningen var att mäta energiförbrukningen hos hästar av olika ras, representerande såväl lättfödda som normal- till svårfödda raser, med hjälp av ¹³C-BT-metoden under fältförhållanden. Detta innebar att utandningsprover insamlades med hjälp av en mask med ventil i breath bags, före administration av isotopen (2 prover), därefter med frekventa intervall den första timmen och sedan med längre intervall till 6 timmar efter isotopadministration (12 prover). Förhållandet mellan ¹³C/¹²C i påsarna med luftprover analyserades med en infraröd spektrometer (IRIS). Detta experiment inleddes med en pilotstudie, där isotopen ingavs oralt i en sockerlösning. Pilotstudien ingick i det MSc projekt som omtalats under Expt. 1 (se också publikationslistan). Hästarna fodrades minst tre timmar innan isotopen gavs, baserat på erfarenheterna från Expt. 1. Det användes 9 varmblodshästar och 9 Islandshästar. Hästarna var privatägda, och stod uppstallade under sina normala stallförhållanden, vilket kunde innebära att det var mer eller mindre

lugn och ro i omgivningen under mätningarna. Utsöndringen av isotop i utandningsluften steg snabbt efter intag av isotopen, men excretionskurvorna återgick inte alltid i ideal form till basalnivån. Det misstänktes att det förekom att inte hela isotopdosen svaldes, eftersom det kan vara svårt att administrera dosen tillräckligt långt bak i munnen för att säkra att den sväljs. Resultaten visade dock på signifikant skilda värden för hästarnas energiförbrukning, extrapolerad till värden per kg metabolisk vikt per dag: Islandshästarnas estimerade energiförbrukning var $641 \text{ kJ/kg}^{0.75}$ per dag och varmbloodshästarnas var $929 \text{ kJ/kg}^{0.75}$ per dag. Dessa resultat tyder på rasskillnader, men bägge värdena är tämligen höga, vilket kan bero överestimering på grund av förlust av isotop. Därför drogs slutsatsen att IV administration av isotopen är en bättre metod för att säkra att all isotop kommer in i cirkulationen. Resultaten har presenterats i en MSc-avhandling (se publikationslista), och det övervägs om vissa kompletteringar av studien ska göras och att det därefter ska utarbetas en artikel för publikation i vetenskaplig tidskrift med referee-ordning.

Huvudstudien i Expt. 3 planlades mot bakgrund av resultaten från experiment 1 och 2 samt ovanstående pilotförsök. Således gavs isotopen IV (500 mg/häst) och hästarna fodrades inte senare än 3 timmar innan isotopen gavs. På grund av misslyckandet med att använda ^{13}C -BT-metoden under pågående arbete (Expt. 2, delstudie 2) modifierades upplägget så att mätningarna skedde på hästar i vila, men att alla hästar genomgick först ett 4 veckors träningsprogram, och därefter ytterligare 4 veckors hårdare träning som inkluderade intervallträning. Under träningen gick hästarna försedda med pulsmätare så att arbetsbelastningen kunde bedömas och styras. Mätningar med ^{13}C -BT-metoden skedde vid försöksstarten, när den första träningsperioden var genomförd och vid avslutningen av den andra träningsperioden. I studien ingick 4 Islandshästar, 4 sportponnyer och 4 varmbloodshästar. Också i denna studie hade Islandshästarna signifikant lägre energiförbrukning ($519 \text{ kJ/kg}^{0.75}$ per dag) än sportponnyerna ($748 \text{ kJ/kg}^{0.75}$ per dag) och varmbloodshästarna ($754 \text{ kJ/kg}^{0.75}$ per dag). Det var inga skillnader mellan mätningar utförda i de tre olika perioderna, vilket innebar att träningen inte påverkat hästarnas energiförbrukning i vila. Resultaten från denna studie bekräftar att Islandshästarna kan betraktas som "easy keepers", och alltså har ett lägre energibehov än de andra raserna i undersökningen. Sportponnyerna däremot, kan inte betecknas som "easy keepers" eftersom deras energiförbrukning var lika stor som varmbloodshästarnas. Studien bekräftade också att ^{13}C -BT-metoden kan användas för att estimerar energiförbrukning hos hästar under fältförhållanden, förutsatt att undersökningarna genomförs så som beskrivits här. Resultaten har presenterats vid ett internationellt symposium, och utarbetande av en vetenskaplig artikel pågår.

Sammanfattande konklusioner ^{13}C -BT-metoden

Projektets huvudmålsättning, att validera ^{13}C -BT-metoden gentemot indirekt kalorimetri (IK), har uppnåtts. Vi hade genomgående en utmärkt överensstämmelse mellan mätningar gjorda med ^{13}C -BT och IK. En förutsättning för att beräkningarna ska ge korrekta resultat är att man har bestämt (IK) eller har realistiska estimat för RQ och RF. Med de dieter som normalt används till häst förväntas inte RQ påverkas betydligt av dieten. De värden vi funnit för RF var också i god överensstämmelse med litteraturen, och kan anses brukbara. Ambitionen att använda metoden som fullständigt non-invasiv, dvs. med oral dosering av isotopen, har genomförts, men det är av avgörande betydelse för resultatens kvalitet och tillförlitlighet att hela dosen sväljs. Det har även visat sig att excretionskurvorna efter oral tillförsel ibland blir mindre jämna än vid IV tillförsel, och därmed mera komplicerade att modellera. Med det avancerade modelleringsprogram vi haft tillgängligt har det varit möjligt, om än ibland svårt, för hästar i vila, men om metoden ska kunna användas rutinemässigt i fält är det önskvärt att kurvorna har ett jämnt förlopp så att de kan modelleras med enklare programvara eller rentav manuellt. För att uppnå jämförbara resultat mellan olika mätserier måste metoden användas på ett standardiserat sätt. Sålunda kan tidpunkten för fodring relativt ingivande av isotopen påverka resultaten. Om det gått minst tre timmar från senaste utfodring när isotopen ges är dock effekten av intag och bearbetning av foder i digestionskanalen minimal. Det har också visat sig att metoden fungerar mycket bra under fältförhållanden på hästar i vila, och att det påvisats tydliga skillnader mellan raser i

energiförbrukning. Som förväntat erhöles signifikant lägre energiförbrukning i vila hos Islandshästar än hos sportponnyer och varmbloodshästar. Dessvärre gav inte de mätningar som utfördes på hästar under arbete acceptabla resultat. Detta kan ha haft flera orsaker: tidpunkten för isotopens dosering relativt träningspasset visade sig inte vara lämplig, hästarnas andningsfrekvens har påverkats av träningen, och detta i sin tur har troligen påverkat RF. Dessutom påverkas RQ av fysisk aktivitet, och bör därmed ha ändrats av träningen. Det bedömdes inte möjligt att med tillgängliga resurser och inom den gällande tidsramen utveckla metodiken så att den kan användas även under arbete. Trots detta har erfarenheterna i projektet lett till att *¹³C-BT-metoden utvecklats så att den utgör ett enkelt och tillförlitligt verktyg för att bestämma energiförbrukning hos hästar i vila även under fältförhållanden.*

Sammanfattande konklusioner av inverkan av dietens kolhydratsammansättning på metabolisk funktion

Sammansättningen hos dieternas kolhydratfraktion påverkade tydligt den metaboliska respons som kunde mätas i plasma och caecum, och visade på hur kolhydratfraktionens sammansättning påverkade förhållandet mellan näringsupptag i tunntarmen och från grovtarmen. Utfodring med kornbaserade dieter resulterade i högre plasma glukos- och insulinkoncentrationer som ett resultat av stärkelsenedbrytning i tunntarmen medan de fiberbaserade dieterna gav högre plasma-koncentrationer av acetat från fermentering av fiber. Proportionerna mellan glukos och SCFA som energigivande substrat påverkades av sammansättningen av fodrets kolhydratfraktion på ett sätt som reflekterade de metaboliska svar som uppmätts i plasma och caecum. När korn utfodrades i kombination med Betfor påverkades inte plasma glukos och insulin eller minskades fluktuationerna i pH i caecum jämfört med när bara korn utfodrades. Fluktuationerna i pH i caecum var större för de kornbaserade dieterna än för de fiberbaserade. Intaget av fiber påverkade fodrets passagehastighet genom digestionskanalen mer än att delvis ersätta hö eller korn med Betfor, och passagehastigheten ökades med ökande fiberintag. Betfor är ett mycket fermenterbart fodermedel, vilket ledde till ett lägre intag av torrsbstans, men att torrsbstansens smältbarhet ökade när hö delvis ersattes med Betfor. Detta kan leda till mindre tarmfyllnad och förbättrad tillgänglighet av vatten från grovtarmen.

Kolhydratfraktionen i foder till hästar kan ha en mycket varierande sammansättning, och det är viktigt att öka kunskapen om konsekvenserna av olika kolhydratsammansättning för fodrets utnyttjande och hur utfodringen påverkar hälsa och prestation hos hästen. I projektet har flera tekniker utnyttjats för att belysa detta, som exempelvis mätning av fodrets passagehastighet. Om denna teknik kunde raffinerats till att mäta passagehastigheten i olika segment av digestionskanalen skulle informationsvärdet öka. Exempelvis är det önskvärt att metodiken för att mäta magtömningshastighet utvecklas så att den ger reproducerbara resultat. Den teknik som nu finns för kontinuerlig mätning av pH i caecum behöver förbättras och valideras ytterligare, men den kan på sikt ge viktiga upplysningar om pH dynamiken i grovtarmen vid differentierad utfodring. I detta projekt har flera tekniker kombinerats, och det vore för framtiden önskvärt om sådant kunde ske i större utsträckning för att öka förståelsen för hur olika fodermedel interagerar och hur och var de smälts eller fermenteras och vilken respons som kan mätas i plasma och caecum. När det gäller hästars prestation mäts idag effekterna ofta som respons på en enskild måltid, men i framtiden vore det önskvärt att studera hur dietens sammansättning och utfodringsrutiner påverkar hästens prestation över mer än en dag, dvs. i situationer som är realistiska för prestationshästar inom hoppning, dressyr eller Islandshästsport.

Övrigt:

PhD-studerande Rasmus Bovbjerg Jensen (RBJ), Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet (KU) har genomfört det experimentella arbetet såväl i Danmark som i Norge på hästforskningsfaciliteten på Institut for Husdyr- og akvakulturfag, NMBU, och har dessutom handledt den MSc-studerande som medverkat i försök under 2013. Han har även medverkat som handledare i bachelorprojekt, och han har medverkat i undervisning på bachelor

och MSc-nivå för såväl veterinär- som animal science studerande på KU. RBJ försvarade sin PhD-avhandling den 26 juni 2014. Som planlagts baserades den på resultat som framkommit i delprojekt 1 och 2, och innehåller tre vetenskapliga artiklar, varav en publicerats i *Livestock Science*. Artikel 2 är publicerad i *Animal*, medan artikel 3 för närvarande undergår review i *Animal Feed Science and Technology*. Utöver dessa tre artiklar innehåller avhandlingen en övergripande del med en *general discussion* som på ett mycket moget sätt och med stort vetenskapligt djup bygger en syntes av de resultat som framkommit, och diskuterar dem mot relevant litteratur i övrigt. Resultaten från delprojekt 3 har delvis presenterats i en MSc-avhandling (se publikationslista), från vilken en vetenskaplig artikel är under publicering i *Animal* (finns tillgänglig online). Resultat avseende energiförbrukningen hos hästar av olika raser under vila har förmedlats som muntlig presentation vid *7th conference of the European Workshop on Equine Nutrition* i Leipzig 28 September – 2 October 2014. Utarbetande av artikel för publikation i en vetenskaplig journal med refereordning pågår.

Senior guest lecturer Dr. Peter Junghans, Leibniz Institute for Farm Animal Biology, Institute of Nutritional Physiology 'Oskar Kellner', Dummerstorf, Tyskland, har sedan hösten 2011 varit knuten till projektet och verkat som handledare i stabil isotopteknik för RBJ och andra PhD och MSc studerande. Han har också varit behjälplig med modellering av data med hjälp av modelleringsprogrammet SAAM, som nu finns tillgängligt vid avdelningen. Detta har gjort ett avancerat modelleringsarbete möjligt, vilket garanterar en hög kvalitet på analys och tolkning av ¹³C-bikarbonatdata. Peter Junghans har också deltagit i publiceringsarbetet, där hans specialkompetens avseende stabil isotopteknik och matematisk modellering är en stor tillgång. Han har dessutom utarbetat en vetenskaplig publikation som delvis är baserad på resultaten från detta projekt, och som för närvarande är återinsänd efter revision till *Isotopes in Environmental and Health Studies*.

Ekonomisk redovisning

Projektet har finansierats via medel från Norges Forskningsråd/Stiftelsen Hästforskning med totalt 2 950 000 NOK. Projektets två första år var PhD-studerande Rasmus Bovbjerg Jensen finansierad via PhD-stipendium från Köpenhamns universitet, vilket innebar ett tillskott av 1 225 000 NOK i internationella medel. Under 2013 finansierades han helt via projektmedel, och efter att projektet förlängts med 6 månader belastade 50% av hans lön projektet under perioden januari – juni 2014. Projektets egenfinansiering har utgjort 996 000 NOK. Projektet har således kunnat genomföras inom den beviljade kostnadsramen.

Publicering

Peer reviewed papers:

Jensen, R. B., D. Austbø, K. E. Bach Knudsen, and A. H. Tauson. 2014. The effect of dietary carbohydrate composition on apparent total tract digestibility, feed mean retention time, nitrogen and water balance in horses. *Animal* 8, 1788-1796.

Jensen, R.B., C. Larsson, P. Junghans and A.-H. Tauson (2015): Validation of the ¹³C-bicarbonate tracer technique for determination of CO₂ production and energy expenditure in ponies by indirect calorimetry. *Livestock Science* 173, 55-63.

Jensen, R.B. D. Austbø, D. Blache, K.E. Bach Knudsen, and A.-H. Tauson (2014): The metabolic response to dietary carbohydrate composition in horses. Submitted to *Animal Feed Science and Technology*.

Jensen, R. B. Kyrstein, T. D. Junghans, P. and Tauson A. H. (2015): The effect of feeding on CO₂ production and energy expenditure in ponies measured by indirect calorimetry and the ¹³C-bicarbonate technique. *Animal*, doi:10.1017/S1751731115001330

Kristoffersen, C.[†] Jensen, R.B.[†] Avershina, E. Austbø D. Tauson, A-H. and Rudi, K. (2015): Diet dependent modular dynamic interaction of the equine ceecal microbiota. Undergoing 1st revision in *FEMS Microbiology Ecology*. [†] Both authors contributed equally.

Junghans, P. Larsson, C. Jensen, R.B. and Tauson, A-H. (2015): The ¹³C bicarbonate method – An inverse end product method for measuring CO₂ production and energy expenditure. Resubmitted after 1st revision in *Isotopes in Environmental and Health Studies*.

Peer reviewed congress proceedings:

Jensen, R.B., Junghans, P. and Tauson, A.-H. (2011): The ¹³C-bicarbonate tracer technique for estimation of CO₂ production and energy expenditure in ponies. In: Book of abstracts No. 17: The 62nd Annual meeting of the European Federation of Animal Science, Norway. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, NL, p. 37.

Jensen, R.B., Austbø, D., and Tauson, A.-H. (2012): Feeding forage before or after oats affects pH profiles of the horse. In: M. Saastamoinen, M.J. Fradinho, A.S. Santos & N. Miraglia (eds.), *Forages and grazing in horse nutrition - EAAP publication No. 132*. Wageningen Academic Publishers, NL, pp. 327-330.

Jensen, R.B., Austbø, D., and Tauson, A.-H. (2012): The effect of dietary carbohydrate composition on pH profile in the horse caecum. In: *Physiology and biochemistry in animal nutrition, IX Conference of young researchers, Polen*. Warszawska Drukarnia Naukowa PAN, p. 55.

Jensen, R.B., Austbø, D., and Tauson, A.-H. (2013): Fecal and cecal pH in horses fed pelleted barley. The 6th European equine health and nutrition congress, Ghent, Belgium, p. 166.

Jensen, R.B., Næsset, J.A., Austbø, D. & Tauson, A-H. (2013). Fecal and cecal pH in horses fed hay only or hay and pelleted barley. In: P. Udén, T. Eriksson, B-O. Rustas, C.E. Müller, R. Spröndly T. Pauly & M. Emanuelson (eds.), *Proceedings of the 4th Nordic Feed Science Conference - Report 287*. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, pp. 18-21.

Jensen, R.B., Larsson, C., Junghans, P. and Tauson, A.-H. (2013): A validation study of the ¹³C-bicarbonate tracer technique for the estimation of CO₂ production and energy expenditure in ponies. EAAP publication No. 134, proceedings from The 4th EAAP international symposium on energy and protein metabolism and nutrition. September 2013, Sacramento, USA, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, NL, 243-244.

Jensen, R.B, Junghans, P. and Tauson, A.-H. (2014): Energy expenditure in horses measured with the ¹³C-bicarbonate tracer technique. In: *Facing environmental challenges, Young researcher symposium, South Africa*, p. 22.

Jensen, R.B, Junghans, P. and Tauson, A.-H. (2014): Measuring short-term energy expenditure in horses with the ¹³C-bicarbonate tracer technique. Accepted for oral presentation at the 7th conference of the European Workshop on Equine Nutrition in Leipzig 28. September – 2. October 2014.

PhD thesis:

Rasmus Bovbjerg Jensen (2014): Energy metabolism in horses – A novel method for measuring energy expenditure in horses, and the effect of dietary carbohydrate composition on nutrient utilization. PhD thesis, Department of Veterinary Clinical and Animal Sciences, University of Copenhagen.

MSc theses:

Trine Kyrstein (2014): Estimation of CO₂ production and energy expenditure by use of indirect calorimetry and the ¹³C bicarbonate tracer technique. MSc thesis, Department of Veterinary Clinical and Animal Sciences, University of Copenhagen.

Camilla Kristoffersen (2014): Diet effects on the short-term temporal dynamics of the equine hindgut microbiota. MSc thesis, Department of Chemistry, Biotechnology and Food Science, Norwegian University of Life Sciences.