

## **Slutrapport Stiftelsen Hästforskning projektnummer H1147029**

### **Sambandet mellan rubbningar aminosyrametabolismen och utvecklandet av insulinresistens vid diabetes typ 2-liknande tillstånd hos häst**

#### **Mål med studien**

Förändringar i aminosyrametabolismen finns beskrivet vid sepsis hos människa och i samband med metabolt syndrom. Insulinresistens förekommer vid bägge dessa tillstånd och innebär att insulinets målorgan (skelettmuskulatur, fettväv och lever) inte svarar effektivt på insulin. Insulinresistens förknippas främst med störningar i kolhydratmetabolismen men involverar störningar i proteinmetabolismen. Det finns tydliga tecken på att aminosyrametabolismen har en nära koppling till insulinkänsligheten samt glukos/fettmetabolismen, där man sett att individer med insulinresistens har förhöjda nivåer av de grenade- (valin, isoleucin, leucin) och aromatiska aminosyrorna (phenylalanin samt tyrosin) i blodet (Felig et al 1969, Caballero et al. 1988, Marchesini et al. 2000, Huffman et al. 2009, Newgard 2009, Tai et al. 2010, Kamaura et al. 2010). Orsaken till att man ser förhöjda nivåer av dessa aminosyror i samband med insulinresistens är inte klarlagd men tidigare trodde man att detta var relaterat till en ökad nedbrytning av protein, något man sett hos både insulinresistenta människor och i djurmodeller (Luzi et al. 1996, Wang et al. 2009). Senare tids forskning på möss och människor har dock indikerat att individer med insulinresistens har en minskad nedbrytning av grenade aminosyror (Branched Chain Amino Acids, BCAA) i framförallt i fettväven vilket ger stegrade nivåer av grenade aminosyror som i sin tur påverkar insulinsignaleringen via olika insulinreceptorer med insulinresistens som följd (Herman et al. 2010, Xiao et al. 2011, Suryawan et al. 1998, She et al. 2007). De grenade aminosyrorna verkar också ha en betydande roll för insulinsignaleringen genom att modulera insulinets effekter (Newgard et al. 2009). Man har också sett att aminosyranivåerna är förhöjda hos individer som senare utvecklar diabetes typ II vilket gör att de sannolikt kan användas som markörer för att bedöma risken att individer drabbas av insulinresistens och diabetes typ II (Wang et al. 2011, McCormack et al. 2013).

I vilken utsträckning aminosyrametabolismen är påverkad hos hästar med insulinresistens och typ II diabetes liknande förändringar är inte känt. Den experimentella modell vi utvecklat har möjliggjort för oss att studera det tidiga skedet i utvecklandet av diabetes typ 2-liknande tillstånd (insulinresistens) hos häst och kopplingen till aminosyrametabolismen. Resultaten från dessa undersökningar ger oss möjlighet att undersöka vilken roll aminosyrametabolismen

har för utvecklandet av insulinresistens hos häst.

### **Syfte med studien**

Hos människa finns det tecken på att aminosyrametabolismen har en koppling till utvecklandet av insulinresistens. Den experimentella modell vi tidigare utvecklat har gjort att vi kan studera det tidiga skedet i utvecklandet av insulinresistens och diabetes typ 2-liknande tillstånd hos häst och på så sätt undersöka om vi har liknande förändringar i aminosyrametabolismen hos häst som man ser hos människa. Resultaten från dessa undersökningar ger oss möjlighet att undersöka vilken roll aminosyrametabolismen och då framförallt BCAA har för utvecklandet av insulinresistens hos häst.

### **Material och metoder**

#### ***Hästar***

8 varmblodiga travare som ägdes av institutionen för kliniska vetenskaper, SLU, och som inte uppvisade kliniska symptom på sjukdom användes i studien.

#### ***Försöksdesign***

Prospektiv, experimentell studie.

#### ***Försöksutförande***

Vid dagen för infusionen lades venkatetrar i höger respektive vänster halsven för kontinuerlig infusion av endotoxiner respektive blodprovstagning. Hästen fick sedan vila i boxen i ca 30 minuter efter instrumentering, därefter togs alla 0-prover (blodprover, mikrodialys, fysiologiska parametrar). Därefter gavs en kontinuerlig infusion av endotoxin (E.coli 055:B55) i en dos av 84 ng/kg/timme (total dos 500ng/kg kroppsvikt utspädd i 1000 ml koksalt) under 6 timmar med hjälp av en infusionspump.

#### ***Provtagning***

Blodprover för analys av glukos samt insulin samt BCAA togs. För att få normalvärden togs blodprover kl 08, 11, 14, 17 samt kl 20 dagen före infusionen. Vid dagen för infusionen togs blodprover omedelbart före infusionen start, varje timme under infusionen och upp till 6 timmar efter infusionens slut. Därefter togs blodprover varannan timme i ytterligare 6 timmar. Under de resterande 60 timmarna togs blodprover var tredje timme. Totalt togs 40

blodprover/häst.

## **Analyser**

Blodproverna analyserades med avseende på koncentrationen av BCAA i plasma med hjälp av en modifierad HPLC teknik. Glukos koncentrationerna analyserades med fluorometrisk teknik samt insulin med ELISA-teknik vid institutionen för klinisk kemi respektive Metabolism labbet vid institutionen för kliniska vetenskaper.

## **Resultat**

### Glukos samt insulin

Hästarna utvecklade en kraftig men snabbt övergående hyperglykemi och hyperinsulinemi under endotoxininfusionen. Ytterligare en insulinstegring skedde vid 16 till 24 timmar efter endotoxininfusionens start, men denna stegring var mindre uttalad. Glukoskoncentrationen var stabil under hela perioden efter endotoxininfusionens slut.

Hästarnas insulinkänslighet utvärderades genom kalkylering av RISQI (reciprocal of the square root of insulin) (Treiber et al. 2005). Efter endotoxininfusionens slut utvecklade hästarna en insulinresistens som sedan kvarstod under 30 timmar.

### Aminosyror i plasma och muskel

Samtliga hästar visade en kraftig sänkning av nivåerna av de grenade aminosyrorerna valin, isoleucin samt leucin under själva endotoxininfusionen. Efter endotoxininfusionens slut noterades en gradvis stegring av plasmakoncentrationerna av BCAA och dessa låg signifikant till över basnivåerna ca 24 timmar efter infusionens slut och fortsatte stiga även efter detta. Nivåerna av BCAA i muskel följde i stort sett plasma nivåerna.

## **Diskussion**

Resultaten från denna studie visar att vi får en kraftig sänkning av de grenade aminosyrorerna under endotoxininfusionen, något som sannolikt är relaterat till en ökad förbrukning av dessa aminosyror till följd av det kraftiga inflammatoriska svaret. Efter endotoxininfusionen skedde en gradvis och signifikant stegring av BCAA till nivåer över de vi registrerat dygnet innan infusionen. Det faktum att detta sammanföll med den tidpunkt då hästarna utvecklade insulinresistens antyder att det kan finnas ett samband mellan stegringen i BCAA och uppkomsten av insulinresistens, vilket överensstämmer med resultat från tidigare studier på

människa och möss (Felig et al 1969, Caballero et al. 1988, Marchesini et al. 2000, Huffman et al. 2009, Newgard 2009, Tai et al. 2010, Kamaura et al. 2010). Den exakta mekanismen bakom denna koppling är inte fastställd men stegrade nivåer av BCAA i fettväv har visat sig påverka flera olika receptorer i insulinsignaleringsystemet och anses vara en faktor som bidrar till uppkomsten av insulinresistens (Xiao et al. 2011). Huruvida detta är fallet på häst är inte känt då det fram till nu inte finns någon studie där man undersökt aminosyrametabolismen hos hästar med insulinresistens. Vidare studier på hästar med Ekvint Metabolt Syndrom (EMS) och konstaterad insulinresistens är nödvändiga för att se om dessa hästar har förhöjda nivåer av BCAA i plasma för att därefter kunna studera mäta nivåerna av BCAA i fettväv samt deras påverkan på insulinsignaleringsystemet.

Det faktum att hästarna utfodrades i samband med det att infusionen avslutades kan också ha bidragit till stegringen av plasma BCAA efter infusionens slut. Det förklarar dock inte det faktum att nivåerna steg över basalnivåerna och fortsatte stiga 24 timmar efter det att infusionen avslutats. Det skulle också kunna reflektera en ökad syntes av andra aminosyror från levern eller muskulaturen då det är känt att bland annat leucin stimulerar proteinsyntesen, det faktum att aminosyranivåerna i muskulaturen följde nivåerna i plasma talar dock emot detta.

### **Konklusion**

Studien indikerar att de grenade aminosyrorna bidrar till utvecklandet av insulinresistens även hos häst. Framtida studier på hästar med EMS och konstaterad insulinresistens är nödvändiga för att se om dessa hästar har förhöjda nivåer av BCAA i plasma för att därefter kunna studera mäta nivåerna av BCAA i fettväv samt deras påverkan på insulinsignaleringsystemet. Det är också tänkbart att man i framtiden kan använda nivåerna av BCAA som en prognostisk markör för att bedöma risken för utvecklande av insulinresistens.

### **Referenser**

Caballero B, Finer N, Wurtman RJ (1988) Plasma amino acids and insulin levels in obesity: response to carbohydrate intake and tryptophan supplements. *Metabolism*, 37, 7, 672-676.

Felig P, Marliss E, Cahill GF Jr (1969) Plasma amino acid levels and insulin secretion in obesity. *N Engl J Med* 281, 15, 811-816.

Herman MA, She P, Peroni OD, Lynch CJ, Kahn BB (2010) Adipose tissue branched chain amino acid (BCAA) metabolism modulates circulating BCAA levels. *J Biol Chem.* 285, 15, 11348-11356

Huffman KM, Shah SH, Stevens RD, Bain JR, Muehlbauer M, Slentz CA, Tanner CJ, Kuchibhatla M, Houmard JA, Newgard CB, Kraus WE (2009) Relationships between circulating metabolic intermediates and insulin action in overweight to obese, inactive men and women. *Diabetes Care.* 32, 9, 1678-1683

Kamaura, M, Nishijima; K, Takahashi, M., Ando, T., Mizushima; s., Tochikubo, O. (2010) Lifestyle modification in metabolic syndrome and associated changes in plasma amino acid profiles. *Circulation Journal* 74, 2434-2440.

McCormack SE, Shaham O, McCarthy MA, Deik AA, Wang TJ, Gerszten RE, Clish CB, Mootha VK, Grinspoon SK, Fleischman A (2013) Circulating branched-chain amino acid concentrations are associated with obesity and future insulin resistance in children and adolescents. *Pediatr Obes.*, 8, 1, 52-61

Marchesini G, Bianchi G, Rossi B, Muggeo M, Bonora E (2000) Effects of hyperglycaemia and hyperinsulinaemia on plasma amino acid levels in obese subjects with normal glucose tolerance. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 24, 5, 552-558.

Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, Haqq AM, Shah SH, Arlotto M, Slentz CA, Rochon J, Gallup D, Ilkayeva O, Wenner BR, Yancy WS Jr, Eisenson H, Musante G, Surwit RS, Millington DS, Butler MD, Svetkey LP (2009) A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab* 9, 4, 311-326

Luzi L, Castellino P, De Fronzo RA. (1996) Insulin and hyperaminoacidemia regulate by a different mechanism leucine turnover and oxidation in obesity. *Am j Physiol.* 270, 273-281.

She P, Reid TM, Bronson SK, Vary TC, Hajnal A, Lynch CJ, Hutson SM (2007) Disruption of BCATm in mice leads to increased energy expenditure associated with the activation of a futile protein turnover cycle. *Cell Metab.* 6, 3, 181-94.

Suryawan A, Hawes JW, Harris RA, Shimomura Y, Jenkins AE, Hutson SM (1998) A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. *Am J Clin Nutr.* 68, 1, 72-81.

Tai ES, Tan ML, Stevens RD, Low YL, Muehlbauer MJ, Goh DL, Ilkayeva OR, Wenner BR, Bain JR, Lee JJ, Lim SC, Khoo CM, Shah SH, Newgard CB (2010) Insulin resistance is associated with a metabolic profile of altered protein metabolism in Chinese and Asian-Indian men. *Diabetologia.* 53, 4, 757-767

Treiber KH, Kronfeld DS, Hess TM, Boston RC, Harris PA (2005) Use of proxies and reference quintiles obtained from minimal model analysis for determination of insulin sensitivity and pancreatic beta-cell responsiveness in horses. *Am J Vet Res.* 66, 12, 2114-21.

Xiao F, Huang Z, Li H, Yu J, Wang C, Chen S, Meng Q, Cheng Y, Gao X, Li J, Liu Y, Guo F (2011) Leucine deprivation increases hepatic insulin sensitivity via Gcn/mTOR/S6K1 and AMPK pathways. *Diabetes* 60, 746-756.

Wang X, Hu Z, Hu J, Du J, Mith WE (2006) Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: Activation of the ubiquitin-proteasome pathway by defects in muscle cell signaling. *Endocrinology* 147, 4160-4168.