

Amino acids, ammonia and exercise in man

Citation for published version (APA):

van Hall, G. (1996). Amino acids, ammonia and exercise in man. [Maastricht: Universiteit Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/1996

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

SUMMARY

It is generally accepted that amino acids are not very important as a fuel during exercise. However, they deserve attention as they might have an important regulatory role in skeletal muscle metabolism both at rest and during exercise. Therefore, in this thesis amino acid metabolism in general and its regulatory roles in muscle and whole body metabolism have been studied during prolonged exercise in man.

Ammonia is continuously released from the active muscle during exercise. The ammonia can either originate from net adenine nucleotide breakdown to IMP, as during very high intensity exercise, or from net deamination of amino acids. In **chapter 2** it was clearly shown that during prolonged one leg knee-extensor exercise ammonia production exceeded by far the breakdown of adenine nucleotides to IMP. This implies that during this type of exercise ammonia has to be derived from net deamination of amino acids. A low pre-exercise muscle glycogen content had no effect on ammonia production nor on plasma and muscle amino acids as suggested in previous studies during two legged exercise first with a normal and then with a reduced muscle glycogen content. Further research is needed to identify the reaction(s) responsible for ammonia production and deamination of amino acids. The TCA-cycle plays an important role in the tremendous increase in energy production to meet the energy demands of exercise. It is suggested that an increase in the carbon flux through the TCA-cycle is important to increase ATP production going from rest to exercise. This increase can mechanistically be achieved by an increase in the activity of α -ketoglutarate dehydrogenase regulation or an increase in the concentration of the TCA-cycle intermediates. A large glutamate consumption and alanine production was observed during the early phase of exercise indicating that the alanine aminotransferase reaction was very active. This reaction leads to the formation of α -ketoglutarate, a TCA-cycle intermediate. It is concluded that this reaction is very important for the acute increase in TCA-cycle intermediates going from rest to exercise.

The branched-chain amino acids (BCAA) - leucine, valine and isoleucine - are three of the nine essential amino acids in mammals and primarily degraded in skeletal muscle. Exercise increases the branched-chain α -keto acid dehydrogenase (BCKADH) activity. This enzyme catalyses the rate limiting step in BCAA degradation. An increase in BCAA degradation during exercise has been suggested to play a role in mechanisms of muscle fatigue. We, therefore, studied the activity of this enzyme during exercise with a normal and low muscle glycogen content and BCAA supplementation (**chapter 3**). At rest muscle glycogen content did not affect BCKADH activity but BCAA ingestion, causing an increased muscle BCAA uptake and intra-muscular concentration, resulted in a 3-fold increase in BCKADH activity. Prolonged exercise with a low pre-exercise muscle glycogen content increased the exercise induced activation of BCKADH, whereas BCKADH activity was higher with BCAA ingestion. However, BCAA ingestion appeared not to augment the exercise

induced BCKADH activation. Therefore, it is concluded that the mechanism of activation caused by low pre-exercise muscle glycogen content and BCAA ingestion is different. An increase in the concentration of muscle free ADP and branched-chain α -keto acids appear to be the most important mechanism of BCKADH activation.

The two most important enzymes determining the rate of glycogenolysis are glycogen phosphorylase and phosphofructokinase. Glycogen phosphorylase activity depends on the concentration of muscle AMP, IMP, P_i and glycogen. Whereas phosphofructokinase activity is thought to be influenced by the muscle energy charge, and the concentrations of AMP, fructose-biphosphate, adrenaline, ammonia and pH. Most of our knowledge on these factors originate from studies using high intensity exercise. In **chapter 4** we investigated whether some of these factors are also involved in the regulation of glycogen breakdown during prolonged moderate intensity one legged exercise. In contrast to observation made during high intensity exercise adrenaline and ammonia do not appear to be involved in the regulation of the rate of glycogen breakdown during prolonged moderate intensity exercise. Muscle glycogen, as a substrate enhanced its own utilization, and muscle P_i appeared to play a role in the control of the rate of muscle glycogen breakdown both at high and moderate exercise intensity.

Prolonged exercise inevitably leads to fatigue. Traditionally fatigue mechanisms have focused on events in skeletal muscle. However, more recently it is suggested that fatigue during prolonged exercise may be caused by increased serotonergic activity in the brain, referred to as central fatigue. An increased oxidation of BCAA and displacement of tryptophan from albumin during prolonged exercise leads to an increased tryptophan/BCAA ratio. This increased ratio would lead to an enhanced transport of tryptophan across the blood-brain barrier, since tryptophan and BCAA compete for entry to the brain by the same amino acid transporter. An increased tryptophan concentration in the brain would lead to an increase in the neurotransmitter serotonin. According to this hypothesis BCAA ingestion during prolonged exercise may delay central fatigue and tryptophan ingestion would lead to premature central fatigue. In **chapter 5** we clearly showed that BCAA nor tryptophan ingestion, which would lead to early central fatigue according to the hypothesis, had an effect on the time to exhaustion during sustained high intensity exercise. Furthermore, estimation of the rate of tryptophan uptake to the brain showed that BCAA ingestion had only a marginal effect on the rate of tryptophan transport to the brain compared to the exercise induced changes in tryptophan concentration. From these results we conclude that manipulation of tryptophan supply to the brain either has no additional effect upon serotonergic activity during prolonged exhaustive exercise or that manipulation of serotonergic activity functionally does not contribute to mechanisms of fatigue.

Glutamine is produced in skeletal muscle in considerable amounts at rest and during exercise. The biochemical pathways that contribute to glutamine production are only partly known. Sir Hans Krebs suggested that muscle glycogen and glucose are carbon-chain precursors for glutamine production. We, therefore, investigated whether carbohydrate supplementation during intense exercise leading to glycogen depletion influences plasma glutamine concentration. The data of **chapter 6** showed

that carbohydrate ingestion had neither an effect on the plasma glutamine concentration nor on the plasma concentration of other amino acids. After 2 to 3 hours of recovery the plasma glutamine concentration decreased with 22% compared to the concentration at the moment of fatigue. Glutamine is an important fuel for cells of the immune system and the gut mucosa. Such decrease in plasma glutamine, therefore, could potentially impair immune function. A decrease of 10-25% is also observed for most of the other amino acids. The reason for this decrease is not clear but might be a result of an increased protein synthesis or an increase in amino acid clearance by other organs such as the gut and liver. Carbohydrate ingestion during exercise did not prevent the fall in the plasma concentration of glutamine and the other amino acids during recovery and, therefore, is not a useful tool to maintain the plasma glutamine and other amino acid concentration.

The maintenance of a post-exercise glutamine concentration might also be important for an optimal glycogen resynthesis rate, as it has been suggested that glutamine stimulates glycogen resynthesis potentially via activation of glycogen phosphorylase. However, in **chapter 7** we clearly showed that glutamine ingestion, causing a 2-fold increase of the plasma glutamine concentration, did not affect the rate of muscle glycogen resynthesis nor glycogen synthase activity during recovery from exercise leading to glycogen depletion when ample carbohydrates were available. On the other hand glycogen resynthesis rates tended to be higher after ingestion of a mixture of carbohydrates and protein hydrolysate. This increase was probably mediated by an increased plasma insulin concentration.

In **chapter 8** we estimated net muscle protein degradation during prolonged one leg knee-extensor exercise with the arterio-venous amino acid balance method at rest and during exercise with a normal and low muscle glycogen content leg. The data indicated that prolonged one leg knee-extensor exercise lead to a massive increase in net muscle protein degradation and that a low pre-exercise muscle glycogen content leads to a further increase. The functionality of this protein breakdown might be provision of protein derived carbon for the synthesis of TCA-cycle intermediates and glutamine and release of gluconeogenic precursor amino acids for kidney and liver. The results obtained in this study, however, cannot directly be extrapolated to whole body dynamic exercise as workload and oxygen consumption per kg of muscle is much higher during one leg knee-extensor exercise.

SAMENVATTING

Er wordt in het algemeen aangenomen dat aminozuren geen belangrijke bijdrage leveren aan de energiebehoefte van de actieve spier tijdens inspanning. De aminozuren verdienen echter onze aandacht omdat ze mogelijk een belangrijke rol spelen in de regulatie van spiermetabolisme zowel in rust als tijdens inspanning. In dit proefschrift wordt dan ook gekeken naar het aminozuurmetabolisme in het algemeen en naar de rol die aminozuren spelen in de regulatie van spier- en heel lichaamsmetabolisme tijdens duurinspanning in de mens.

Ammoniak wordt voortdurend vrijgemaakt door de actieve spier tijdens inspanning. De ammoniak kan afkomstig zijn van de netto afbraak van adenine nucleotiden tot IMP. Dit is het geval tijdens inspanning van zeer hoge intensiteit. Daarnaast kan ammoniak ook afkomstig zijn van netto deaminering van aminozuren. In **hoofdstuk 2** is gevonden dat de ammoniakproductie tijdens eenbeens duurinspanning vele malen hoger is dan de adenine nucleotide afbraak tot IMP. Dit betekent dat tijdens deze vorm van duurinspanning, waarbij met het onderbeen een schoppende voorwaartse beweging wordt gemaakt en voornamelijk de m. quadriceps wordt gebruikt, netto deaminering van aminozuren de belangrijkste bron van ammoniakproductie moet zijn. De reacties die betrokken zijn bij deaminering van aminozuren tijdens duurinspanning zijn nog niet geïdentificeerd. Een lage spierglycogeenconcentratie voor het begin van de inspanning beïnvloedde de ammoniakproductie niet, dit in tegenstelling tot eerdere suggesties gedaan in de literatuur. Spiercontractie leidt tot een sterk verhoogde energiebehoefte van de spiercel. Dit impliceert dat gaande van rust naar inspanning de energiegeneratie via de citroenzuurcyclus sterk moet toenemen. Een toename van de koolstof-flux in de citroenzuurcyclus is nodig om de ATP productie te doen toenemen. Deze toename wordt mechanistisch bereikt oa door een toename van de activiteit van α -ketoglutarate dehydrogenase via allosterische regulatie. Een andere mogelijkheid is een toename van de substraatconcentratie (dwz de concentratie van de citroenzuurcyclus-intermediären. Aan het begin van de inspanningsperiode werd een aanzienlijke glutamaatconsumptie en alanineproductie waargenomen hetgeen duidt op een zeer actieve alanine aminotransferase reactie. Deze reactie leidt tot de formatie van α -ketoglutarate, een citroenzuurcyclus-intermediair. Geconcludeerd wordt dat de alanine aminotransferase reactie van groot belang is voor een acute toename van citroenzuurcyclus-intermediären concentratie.

De vertakte keten aminozuren (BCAA) - leucine, valine en isoleucine - zijn drie van de negen essentiële aminozuren in zoogdieren en worden voornamelijk afgebroken in de skeletspier. Inspanning verhoogt de activiteit van het vertakte keten α -ketozuur dehydrogenase (BCKADH), het enzym dat de snelheidsbepalende stap katalyseert in de afbraak van de BCAA. Er is gesuggereerd dat de toename in de BCAA afbraak tijdens inspanning een rol speelt in mechanismen van spiervermoeidheid. Vandaar dat we de activiteit van het BCKADH hebben bestudeerd in rust en tijdens inspanning met een normale en een lage

spierglycogeenconcentratie en orale BCAA inneming (**hoofdstuk 3**). De spierglycogeenconcentratie had geen invloed op de BCKADH activiteit in rust maar BCAA inneming resulteerde in een drievoudige toename van de BCKADH activiteit. Een verlaagde spierglycogeenconcentratie tijdens duurinspanning leidde tot een verhoging van de door inspanning veroorzaakte toename in de BCKADH activiteit. BCAA inneming lijkt niet te leiden tot een verhoging van de door inspanning geïnduceerde toename in de BCKADH activiteit. De effecten van inspanning en BCAA inneming waren additief. Vandaar dat we kunnen concluderen dat het mechanisme van activatie veroorzaakt door de spierglycogeenconcentratie en BCAA inneming waarschijnlijk verschuivend is. Een toename van de mitochondriale vrije ADP of vertakte keten α -ketozuur concentratie wordt als het meest waarschijnlijke activeringsmechanisme beschouwd.

De twee belangrijkste enzymen die betrokken zijn bij de regulatie van de afbraaksnelheid van spierglycogeen zijn glycogeenfosforylase en fosfofructokinase. Glycogeenfosforylase activiteit wordt ondermeer gereguleerd door de spierconcentratie van AMP, IMP, anorganisch fosfaat en glycogeen. De regulatie van fosfofructokinase is complex en lijkt te worden beïnvloed door de energy charge van de spiercel en de concentratie van AMP, fructose-bifosfaat, ammoniak, adrenaline en de zuurgraad in de spiercel. Onze kennis van deze factoren, betrokken bij de regulatie van de afbraaksnelheid van spierglycogeen, is voornamelijk gebaseerd op waarnemingen gedaan tijdens onderzoek met inspanning van hoge intensiteit. In **hoofdstuk 4** onderzoeken we of dezelfde factoren ook betrokken zijn bij spierglycogeenafbraak tijdens duurinspanning van gemiddelde intensiteit. Adrenaline en ammoniak blijken niet betrokken te zijn bij de regulatie van de glycogeenafbraak tijdens eenbeensinspanning van gemiddelde intensiteit. Echter spierglycogeen, als substraat versnelt het eigen gebruik, en spier anorganisch fosfaat lijkt tijdens zowel hoog als gemiddelde inspanningsintensiteit een rol te spelen bij de regulatie van de afbraaksnelheid van spierglycogeen.

Duurinspanning leidt onvermijdelijk tot vermoeidheid. Traditioneel worden de mechanismen van spierversmoeidheid toegeschreven aan processen die zich afspelen in de skeletspier. Meer recent is echter gesuggereerd dat duurinspanning leidt tot een toename van de serotoninerge activiteit in de hersenen en dat dit leidt tot het ontstaan van centrale vermoeidheid. Een toename in de verbranding van de BCAA en verdringing van tryptofaan van albumine ten gevolge van inspanning leidt tot een toename in de tryptofaan/BCAA ratio in het bloed. Het primaire mechanisme voor een toename van de serotoninerge activiteit is dat de vrije vetzuurconcentratie bij inspanning stijgt en tryptofaan verdringt van binding aan albumine. Dit leidt tot een stijging van de vrije tryptofaan concentratie tijdens inspanning. Daarnaast zou een toename in de verbranding van BCAA tot een daling van de BCAA concentratie leiden en de tryptofaan/BCAA ratio nog verder doen toenemen. Deze toename zou leiden tot een verhoogd vervoer van tryptofaan over de bloed-hersen barrière omdat tryptofaan en de BCAA in competitie zijn met elkaar om vervoerd te worden met dezelfde aminozuurtransporter. Verhoging van de tryptofaan concentratie in de hersenen zou leiden tot een toename in de concentratie van de neurotransmitter serotonine. Volgens deze hypothese zal BCAA inneming tijdens duurinspanning

leiden tot een vertraging van de centrale vermoeidheid en tryptofaan inneming tot een versnelde centrale vermoeidheid. In **hoofdstuk 5** hebben we duidelijk aangetoond dat tijdens zware duurinspanning BCAA noch tryptofaan inneming enig effect hebben op de tijd tot uitputting. Uit de berekende snelheid van tryptofaan vervoer over de bloed-hersens barrière blijkt dat BCAA inneming slechts een geringe invloed heeft op de tryptofaan opname door de hersenen vergeleken bij de inspanning gerelateerde verhoging van de tryptofaan concentratie. Deze resultaten leiden tot de conclusies dat ingestie van BCAA of tryptofaan geen extra effect heeft op de serotoninerge activiteit tijdens duurinspanning of dat de manipulatie van de serotoninerge activiteit niet bijdraagt tot de mechanismen van vermoeidheid.

De skeletspier produceert glutamine in aanzienlijke hoeveelheden in rust en tijdens inspanning. De biochemische routes die een bijdrage leveren tot de glutamine productie zijn slechts ten dele bekend. Sir Hans Krebs suggereerde dat spierglycogeen en glucose koolstofvoorlopers zijn van glutamine. Daarom hebben we onderzocht of koolhydraat inneming tijdens zware inspanning, leidend tot glycogeen lediging, de plasma glutamine concentratie beïnvloedt. De resultaten uit **hoofdstuk 6** laten zien dat koolhydraat inneming tijdens inspanning geen effect heeft op de plasma glutamine- en overige aminozuurconcentraties tijdens inspanning en herstel. Na 2 tot 3 uren van herstel daalde de glutamine concentratie met 22% ten opzichte van de concentratie op het moment van uitputting. Glutamine is een belangrijke brandstof voor cellen van het immuunsysteem en de mucosa van het maagdarmkanaal. Een dergelijke daling zou derhalve kunnen leiden tot een verlaagde immuunrespons. Een daling van 10-25% in de herstelfase werd ook waargenomen in de plasma concentratie van de meeste andere aminozuren. De reden voor deze daling is niet duidelijk maar het zou veroorzaakt kunnen worden door een tijdelijke toename van de spiereiwitsynthese. Een andere mogelijkheid is een toename in de opname van aminozuren door andere organen zoals de maag en de lever. Koolhydraat inneming tijdens inspanning kan echter de daling in de plasma concentratie van glutamine en de andere aminozuren tijdens de herstelfase niet voorkomen en is dus geen goed middel om de aminozuurconcentratie op peil te houden.

Het handhaven van de glutamine concentratie na inspanning kan ook van belang zijn voor een optimale glycogeenhersynthese omdat er suggesties zijn dat glutamine de glycogeenhersynthese stimuleert mogelijk via activatie van glycogeensynthase. In **hoofdstuk 7** hebben we echter duidelijk aangetoond dat glutamine inneming niet leidt tot een toename in de snelheid van glycogeenhersynthese noch tot een hogere glycogeensynthase activiteit als er voldoende koolhydraten ter beschikking zijn. De snelheid van glycogeenhersynthese lijkt echter wel versneld te worden door inneming van een koolhydraten / eiwithydrolysaat mengsel. Deze versnelling wordt waarschijnlijk veroorzaakt door een toename in de plasma insuline concentratie.

In **hoofdstuk 8** is de netto spiereiwitafbraak berekend met behulp van de zogenaamde arterio-veneuze aminozuur balans methode in rust en tijdens langdurige eenbeensinspanning met een normale en lage spierglycogeenconcentratie. De berekeningen duiden op een aanzienlijke toename van de netto spiereiwitafbraak. Een lage spierglycogeenconcentratie leidt tot een

verdere toename van de netto spiereiwitafbraak. De functionaliteit van de toename in spiereiwitafbraak tijdens inspanning zou kunnen zijn het voorzien van koolstof afkomstig van eiwit voor de synthese van citroenzuurcyclus-intermediären en glutamine in de spier en het vrijmaken van aminozuren voor glucoseproductie in de lever en de nier. De berekende netto spiereiwitafbraak tijdens eenbeensinspanning geldt niet zondermeer voor inspanning in de praktijk, zoals fietsen en hardlopen, daar de belasting en het zuurstofverbruik per kilogram spier veel hoger is tijdens eenbeensinspanning.