

Risultati preliminari di un nuovo integratore per cavalli sportivi: SOP GO HORSE su recupero, metabolismo muscolare e idratazione

Preliminary results on a new feed supplement for horse performance: SOP GO HORSE on recovery, muscular metabolism and hydration

Nery J.¹, Centinaio A.², Luparia P.³, Zanierato A.³, Valle E.⁴, De Innocenti P.⁴, Tosto F.⁵, Assenza A.⁵, Bergero D.^{4*}

¹Dip. Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli studi di Torino, Grugliasco (Torino); ²Clinica Veterinaria della Brughiera, Varese, Italy; ³SOP S.r.l., Varese, Italy; ⁴Fondazione Centro Internazionale del Cavallo, Cascina Rubbianetta Parco Regionale La Mandria, Druento (Torino), Italy; ⁵Dipartimento di Scienze Sperimentali e Biotecnologie Applicate, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli studi di Messina.

Domenico Bergero: domenico.bergero@unito.it

Abstract: The aim of this work was to assess the effect of supplementation with an inert material treated with the physical technology SIRIO OPERATING PROCESS[®] on the haematological parameters and on amino acid and electrolyte profiles in horses trained at an effort request of medium intensity.

Eight horses were divided into 2 homogenous groups. The study design will comprise 2 phases during which horses of group 1 will be treated with SOP GO HORSE for 60 days while the animals from group 2 will compose the control group. During phase II groups will be inverted. Results reported in the present expanded abstract include the observed variations of the assessed parameters during the first half of phase I. Blood cell count, haematochemical parameters and electrolyte profile were analysed. Haematic samples were obtained before the study begun (baseline T₀), after 40 days of treatment for blood cell count and after 30 days for haematochemical and electrolyte profiles. Statistical analyses were performed using repeated measures ANOVA or nonparametric Wilcoxon and Mann-Whitney's tests. Differences were found regarding leukocytes, monocytes, LDH plasmatic concentration, albumin, γ -globulin and plasmatic concentrations of potassium, chloride and calcium. Treating horses with SOP GO HORSE could have beneficial effects on haematic and haematochemical parameters both concerning hydration and muscle metabolism.

Riassunto: L'obiettivo di questo lavoro è stato di determinare gli effetti dell'integrazione alimentare con SOP[®] GO HORSE (un materiale inerte trattato con la tecnologia fisica SIRIO OPERATING PROCESS[®]) sui parametri ematici, il profilo ematochimico ed elettrolitico in cavalli in allenamento d'intensità media.

Otto cavalli sono stati suddivisi in due gruppi (gruppo 1 e 2). Durante la fase I, la dieta base del gruppo 1 sarà integrata con il prodotto SOP GO HORSE per 60 giorni mentre il gruppo 2 fungerà da controllo. Durante una seconda fase dello schema sperimentale i gruppi s'inverteranno. I risultati riportati in questo lavoro includono le variazioni osservate durante la prima metà della fase I di questo protocollo sperimentale. I parametri ematici ed ematochimici, e il profilo elettrolitico sono stati analizzati sui campioni ematici prelevati prima del periodo sperimentale (T₀), e a 40 (emocromo) e 30 giorni (profilo ematochimico ed elettrolitico) da T₀. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando ANOVA a misure ripetute o i test non parametrici di Wilcoxon e di Mann-Whitney. Variazioni rilevanti sono state trovate riguardo ai leucociti totali, ai monociti, all'LDH, all'albumina, alla γ -globulina e alle concentrazioni plasmatiche di potassio, cloro e calcio. Il trattamento SOP GO HORSE sembra migliorare i parametri ematici relativi allo stato di idratazione ed al metabolismo muscolare nel cavallo sportivo.

Introduzione

Recentemente sono stati sviluppati diversi studi sulla sensibilità dei microorganismi ai campi elettromagnetici della gamma dell'ELF (extremely low frequency; tra 1000 e 1500 Hz) (Cellini *et al.* 2008, del Re *et al.* 2004) con l'obiettivo, tra gli altri, di definire le alterazioni a livello cellulare relativamente all'espressione genica e all'aumentata sintesi di proteine legate allo stress cellulare. In questo senso Belyaev e Alipov (2001) hanno messo in evidenza come ciascuna specie sia sensibile ad una "finestra frequenziale" specifica.

Nei cavalli sottoposti a lavori di carattere aerobio, come l'endurance, l'importanza della regolazione delle fermentazioni che hanno luogo al livello del cieco è legata non soltanto al recupero di energia, ma anche all'aumento dell'assorbimento di acqua ed elettroliti, che avviene prevalentemente al livello del cieco - colon (Frape 1994), attraverso la regolazione del pH luminale e citosolico, del co-trasporto del butirrato e del cloro, e del trasporto parallelo del NaCl (Kunzelmann e Mall, 2002). In senso lato, la selezione positiva delle popolazioni batteriche responsabili della fermentazione dei glucidi indigeriti a scapito delle popolazioni patogene (es. *Salmonella*, *Clostridia*, coliformi) sarebbe legata ad un miglior stato sanitario dell'ambiente del colon. In particolare la modulazione delle fermentazioni al livello del cieco (fermentazione glucidica e cellulosica a detrimento della proteolisi batterica), è associata ad un aumento della produzione di acidi grassi volatili (AGV). L'incremento della produzione di AGV permetterebbe di favorire il recupero di fluidi ed elettroliti, essenziali per l'attività agonistica di intensità moderata e di lunga durata. Si è quindi ipotizzato, che l'impiego dell'integratore SOP GO HORSE (costituito da materiale inerte sottoposti al trattamento fisico con SIRIO OPERATIG PROCESS®) nella dieta per equini potrebbe avere un effetto selettivo a livello della flora intestinale e di conseguenza indurre effetti benefici sullo stato di idratazione e sul metabolismo muscolare nel cavallo sottoposto ad allenamento moderato.

Materiali e Metodi

Otto cavalli sani sono stati suddivisi in 2 gruppi di 4 animali ciascuno: gruppo 1 costituito da 1 maschio intero, 1 maschio castrato e 2 femmine ($550,3 \pm 72,7$ kg PV; $17,0 \pm 5,6$ anni di età) e gruppo 2 composto da 2 maschi castrati e 2 maschi interi ($534,3 \pm 20,8$ kg PV; $13,5 \pm 7,5$ anni di età). I soggetti sono stati mantenuti al Centro Internazionale del Cavallo ed il loro stato di salute è stato monitorato basandosi sull'assenza di segni clinici.

La dieta base è stata offerta in funzione dei fabbisogni individuali ed integrata con 7 g/giorno di SOP GO HORSE. La dieta base era costituita da fioccolato misto, polpa di barbabietola e fieno di loietto. L'acqua era disponibile *ad libitum*.

I risultati riportati in questo lavoro includono le variazioni osservate durante la fase I di questo protocollo sperimentale. Il periodo di integrazione durerà 120 giorni in un schema sperimentale di tipo quadrato latino 2x2. Durante la fase I, il gruppo 1 sarà trattato con SOP GO HORSE mentre l'altro gruppo fungerà da controllo. Nella fase II i gruppi saranno invertiti per un periodo ed un dosaggio identico a quello definito per la prima fase. Durante il periodo sperimentale non sono stati somministrati altri integratori che potessero influire sui risultati di recupero, metabolismo muscolare ed idratazione.

I campioni ematici sono stati prelevati prima del periodo sperimentale (T0), al giorno 30 (T30; analisi profilo ematochimico) e al giorno 40 (emocromo). Le analisi sui campioni ematici hanno incluso: eritrociti (RBC), ematocrito (HCT), emoglobina (HGB), volume corpuscolare medio (MCV), contenuto emoglobinico globulare medio (MCH), concentrazione emoglobinica globulare media (MCHC), indice di distribuzione volumetrica eritrocitaria (RDW), leucociti (WBC), piastrine (PLT), volume piastrinico medio (MPV), indice di distribuzione volumetrica delle piastrine (PDW), piastrinocrito (PCT). Inoltre sui campioni di plasma sono stati analizzati i profili ematochimico ed elettrolitico: creatinina (CREA), azotemia (Azo), lactate dehydrogenase (LDH), creatin-fosfochinasi (CPK), proteine totali (TotProt), albumina (alb), α 1-, α 2-, β - e γ -globulina, sodio, potassio e cloro. I profili ematochimico ed elettrolitico sono stati analizzati prima e dopo ogni sessione di lavoro sia a T0 che a T30.

L'unità statistica considerata è stata l'individuo. Le variabili sottoposte all'analisi statistica hanno incluso: RBC, HCT, HGB, MCV, MCH, MCHC, RDW, WBC, PLT, MPV, PDW, PCT, CREA, Azo, LDH, CPK, TotProt, alb, α 1-, α 2-, β - e γ -globulina, sodio, potassio e cloro. I fattori considerati sono

stati il trattamento (SOP GO HORSE vs. controllo) per tutte le variabili ed il momento del prelievo (T0 e T40 per le variabili dell'emocromo; T0 e T30, a riposo e dopo il lavoro per i parametri ematochimici). La normalità dei dati è stata analizzata tramite il test di Shapiro-Wilk. Per ogni variabile, in funzione della distribuzione dei dati, l'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'ANOVA a misure ripetute o i test non parametrici per variabili dipendenti (test di Wilcoxon e test di Mann Whitney). I risultati sono presentati come media ed errore standard della media (media \pm SEM) per i valori analizzati tramite i test parametrici, e come mediana, e primo e terzo quartile (o Box plot) per i test non parametrici.

Risultati

Le tabelle 1 e 2 presentano i valori ottenuti per i parametri dell'emocromo. Il MCV, i linfociti, e le piastrine sono risultati superiori nei campioni prelevati a T40 a confronto con quelli prelevati a T0 (P = 0,016, P = 0,002, e P = 0,012 rispettivamente). Contrariamente, i neutrofili, i monociti, gli eosinofili ed i basofili sono risultati inferiori nel prelievo ottenuto a T40 rispetto al prelievo T0 (P = 0,084, P = 0,003, P = 0,043, e P = 0,039 rispettivamente). Per quanto riguarda l'effetto del trattamento, i valori di leucociti sono risultati tendenzialmente superiori per T40 negli animali trattati con SOP GO HORSE (P = 0,096). La concentrazione di monociti è stata significativamente superiore a T0 rispetto a T40 nel gruppo trattato con SOP GO HORSE mentre questa differenza nel gruppo controllo è risultata meno rilevante (P = 0,023). Questa differenza è stata accompagnata da valori significativamente più bassi dei monociti a T0 nel gruppo controllo rispetto al gruppo trattato (P = 0,05).

Tabella 1. Risultati delle analisi dell'emocromo: RBC ($\times 10^{12}/L$), HCT (%), HGB (g/dL), MCV (fL), MCH (pg), MCHC (g/dL), RDW (%), WBC ($\times 10^9/L$), NEU (%), BASO (%), EOS (%), LYM (%) e MONO (%), PLT ($\times 10^9/L$), MPV (fL), PDW (%) in funzione del momento del prelievo e del trattamento; ANOVA a misure ripetute.

		Controllo				SOP GO HORSE				Tempo	Tempo x Trattamento
		T0		T40		T0		T40			
	N	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Sig.	Sig.
MCV	4	49,85	0,59	50,00	0,53	49,08	0,97	49,98	0,90	0,016	0,055
NEU	4	62,38	4,00	56,83	6,60	59,35	3,84	56,00	6,57	0,084	N.S.
LYM	4	27,50	4,21	35,55	6,56	25,50	5,85	34,50	6,55	0,002	N.S.
MONO	4	5,43	0,81	4,53	0,10	8,53	0,98	4,30	0,46	0,003	0,023
EOS	4	4,28	0,75	2,90	0,44	6,03	1,45	4,95	1,13	0,043	N.S.
PLT	4	128,00	20,44	169,00	26,54	84,78	13,99	146,25	22,48	0,012	N.S.

N.S. differenza non significativa.

Tabella 2. Risultati delle analisi dell'emocromo: BASO (%), in funzione del momento del prelievo e del trattamento; test non parametrici di Wilcoxon e Mann Whitney.

		N	Controllo					SOP				
			Prelievo	Minimo	25°	50°	75°	Massimo	Minimo	25°	50°	75°
BASO	T0	4	0,1	0,15	0,35	0,625	0,7	0,2	0,325	0,7	0,925	1
BASO	T40	4	0,1	0,1	0,15	0,275	0,3	0,1	0,125	0,2	0,425	0,5

A T30 dopo il lavoro si osservato nel gruppo trattato con SOP GO HORSE un aumento del livello plasmatico di LDH rispetto al valore a riposo (P = 0,025). Il gruppo controllo ha presentato un livello di LDH plasmatico più elevato del gruppo trattato con SOP GO HORSE a riposo per il prelievo effettuato a T0 (P = 0,077). Nessun'altra differenza significativa è stata evidenziata tra i diversi prelievi per quanto riguarda l'LDH. Nel gruppo controllo, dopo una sessione di lavoro, l'albumina plasmatica è diminuita da T0 a T30 (P = 0,003) e la tendenza inversa si è verificata per il gruppo trattato con SOP GO HORSE (P = 0,054). Il livello di albumina è stato significativamente inferiore nel gruppo trattato a T0 (a riposo P = 0,022 e dopo il lavoro P = 0,086) mentre a T30 il valore di albumina del gruppo trattato con SOP GO HORSE è risultato superiore a quello del gruppo controllo (P = 0,026). Il valore di γ -globulina a T30, dopo il lavoro, è risultato più elevato per il gruppo controllo rispetto al gruppo trattato (P = 0,036). E' stata osservata una diminuzione della concentrazione di calcio per i prelievi effettuati a T0 e a T30 dopo il lavoro, sia nel gruppo trattato (P = 0,029) che nel gruppo controllo (P = 0,008). Il gruppo controllo ha presentato un livello

plasmatico di calcio superiore rispetto al gruppo trattato con SOP GO HORSE a T30 dopo il lavoro ($P = 0,013$). Il potassio plasmatico ha presentato una tendenza a decrescere dopo il lavoro tra T0 e T30 nel gruppo controllo ($P = 0,068$), mentre nessuna differenza è stata riscontrata tra le concentrazioni di potassio dopo le sessioni di lavoro nel gruppo trattato con SOP GO HORSE. La concentrazione di cloro plasmatico ha presentato una tendenza alla diminuzione nel gruppo controllo a T30 dopo il lavoro rispetto al valore osservato a riposo (0,059). Al contrario, sempre considerando i prelievi effettuati a T30, il gruppo trattato con SOP GO HORSE ha presentato un aumento della concentrazione di cloro plasmatico tra il momento a riposo e il prelievo dopo il lavoro ($P = 0,059$). Inoltre sono state riscontrate variazioni sulla concentrazione di cloro plasmatico tra il gruppo controllo ed il gruppo trattato per i prelievi ottenuti a T30, sia a riposo ($P = 0,058$) sia dopo il lavoro ($P = 0,078$).

Figura 1. Variazione dei profili ematochimici ed elettrolitici in funzione del prelievo, dell'esercizio e del trattamento analizzati tramite i test parametrici. (A) LDH (U/L), (B) Alb (g/L), (C) γ -globulina (g/L), (E) Calcio (mg/dL); ** $P < 0,05$; * $P \leq 0,10$; †/‡ effetto di trattamento.

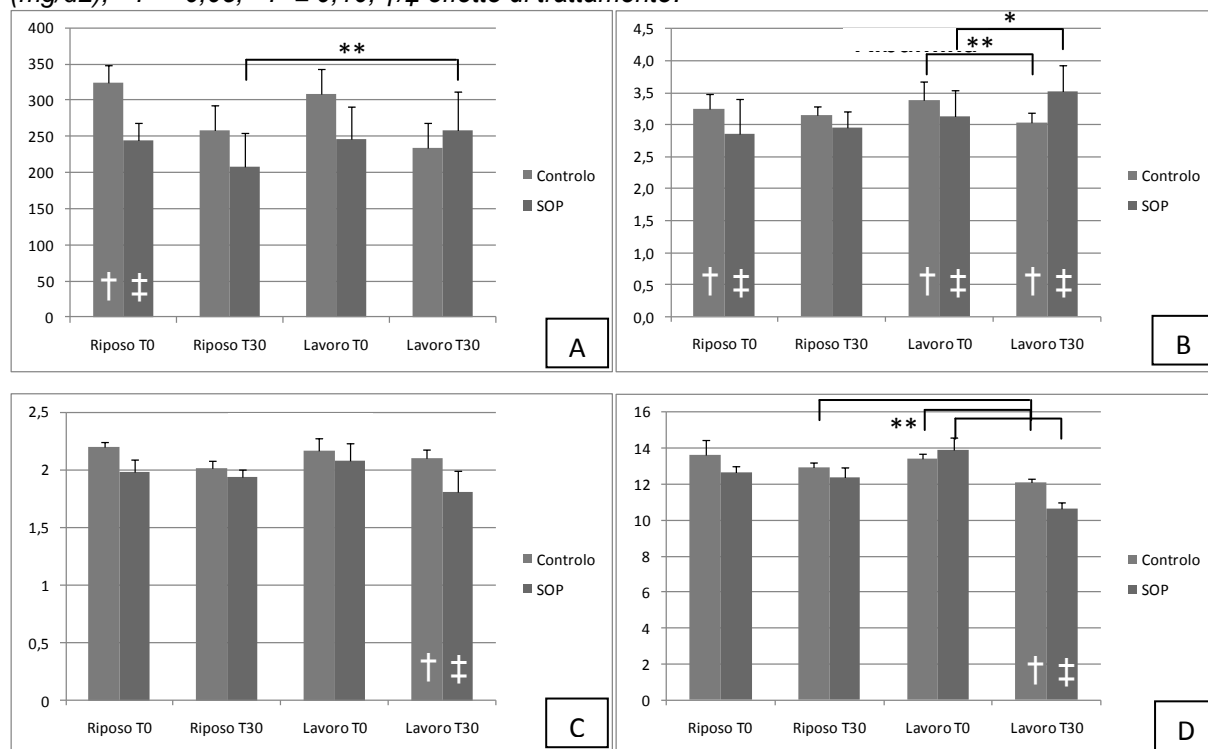
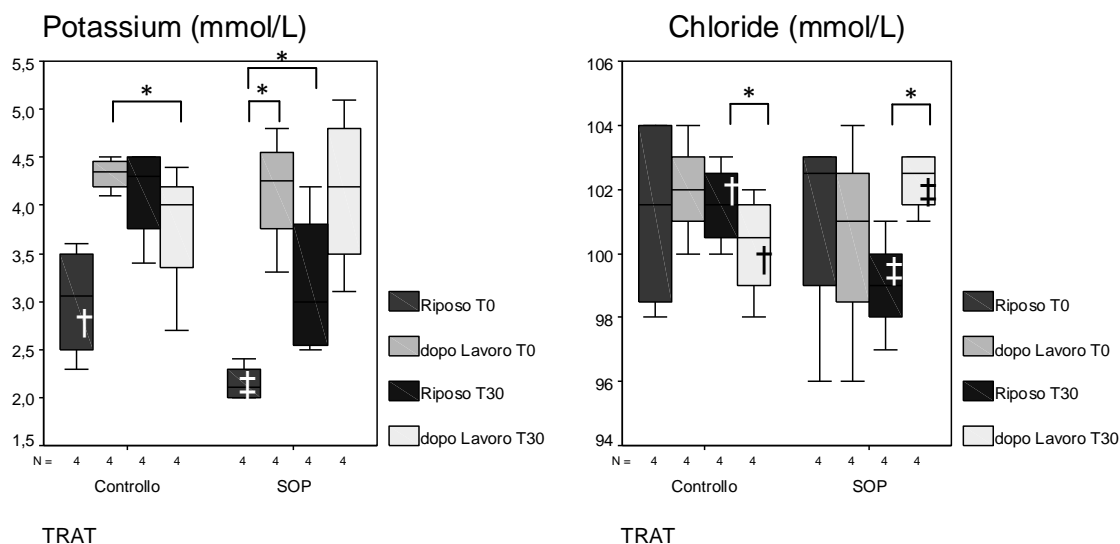


Figura 2. Variazione della concentrazione di cloro (mmol/L) in funzione del prelievo, dell'esercizio e del trattamento analizzati tramite i test nonparametrici; * $P \leq 0,10$; †/‡ effetto di trattamento.



Discussione e Conclusioni

La variazione del numero totale di leucociti e monociti osservate prima e dopo il periodo di trattamento associato all'allenamento è rimasta entro i limiti normali. Secondo Kingston (2004) l'allenamento non provoca variazioni dei leucociti totali. Nel presente studio è stato osservato un lieve aumento del numero totale di leucociti negli animali appartenenti al gruppo trattato e ciò potrebbe indicare un moderato aumento delle capacità immunitarie del cavallo dopo l'allenamento. Questo confermerebbe i risultati ottenuti in uno studio di campo preliminare in cui è stato utilizzato un altro integratore SOP con la finalità di modulare la composizione della flora intestinale nel cavallo immunodeficiente (Centinaio *et al.* 2009). L'aumento relativo dei leucociti è stato accompagnato da una diminuzione statisticamente significativa dei monociti. La diminuzione, con l'allenamento, del numero di monociti potrebbe indicare un aumento delle difese immunitarie, non collegato a malattie croniche non identificate prima dell'allenamento (Abate 1999). Inoltre, la differenza significativa tra il gruppo controllo ed il gruppo trattato potrebbe essere dovuta principalmente a differenze riscontrate a livello basale (T0).

Poiché l'LDH viene prodotta da diversi tessuti, la sua analisi *per se* offre una limitata possibilità di interpretazione dei risultati. Per approfondire le variazioni di LDH osservate dopo una sessione di lavoro a T30 nei cavalli trattati, nell'ipotesi di mettere in luce eventuali lesioni muscolari, si dovrebbe ricorrere all'analisi di altri enzimi come la l'alanina amino trasferasi (ALT) e la CPK (Knochel 1982, Piercy e Rivero 2004). La concentrazione di CPK non ha rivelato nessuna variazione significativa che permettesse di trarre conclusioni per i fattori studiati.

La concentrazione di albumina è rimasta entro i limiti normali per il cavallo. Tra le innumerevoli funzioni dell'albumina, si ricorda il mantenimento della pressione oncotica. L'aumento dell'albumina, per valori al di sopra del range normale di una determinata specie, viene associato a situazioni di disidratazione (Abate, 1999). Numerosi studi rivelano un aumento dell'albumina dopo una sessione di lavoro (salto ostacoli: Aguilera-Tejero *et al.* 2000; ed 80km di endurance: Hess *et al.* 2005). Aguilera-Tejero *et al.* (2000) hanno osservato dei valori superiori di albumina associati ad un aumento della concentrazione plasmatica di sodio. Questi autori hanno associato questa osservazione alla perdita di acqua col sudore e di conseguenza all'aumento della pressione oncotica. Nel presente studio le variazioni plasmatiche della concentrazione in sodio non si sono verificate probabilmente perché l'intensità dell'allenamento non ha provocato delle perdite di sudore consistenti. Detto ciò, il trattamento SOP GO HORSE non ha indotto delle variazioni plasmatiche di albumina diverse da quelle osservate in letteratura. Inoltre si è osservato il mantenimento di concentrazioni plasmatiche stabili di sodio. Uno studio effettuato su cavalli puro sangue ha indicato un aumento della γ -globulina associato all'esercizio (sprints di distanza pari a 2 km)(Coyne *et al.* 1990). La concentrazione più elevata di γ -globulina nel plasma dei cavalli controllo dopo la sessione di lavoro a T30 potrebbe essere indicativo di un'azione immunitaria collegata non con l'allenamento in sé, perché i valori a riposo in T30 non sono diversi tra i due gruppi, ma con la sessione di lavoro effettuata a T30. In questo ambito, i risultati potrebbero rivelare un adattamento più efficace al lavoro e allo stress da esso indotto nei cavalli trattati.

Le variazioni osservate riguardo la concentrazione plasmatica di calcio sono dipendenti da diversi fattori endocrini (ormone paratiroide, colecalciferolo e calcitonina; Littledike ET e Goff J, 1987) che non sono stati analizzati nel presente lavoro. Secondo uno studio precedente (Vervuert *et al.*, 2006), in un esercizio standardizzato in treadmill, la concentrazione totale di calcio plasmatico è rimasta costante ma si è verificata una diminuzione della concentrazione in calcio ionizzato (Ca^{2+}) collegata all'attività fisica. I risultati presentati per T0 confermano il mantenimento di livelli costanti di calcio plasmatico durante l'esercizio. A conferma di ciò, dopo 30 giorni di allenamento, si è verificata una diminuzione della concentrazione plasmatica di calcio nel gruppo controllo. La validità biologica di questo risultato potrebbe tuttavia essere discutibile considerando che Vervuert *et al.* (2002 e 2005) non hanno osservato differenze significative nella concentrazione plasmatica in calcio collegate all'allenamento. La diminuzione statisticamente significativa della concentrazione di calcio osservata nel gruppo controllo non è stata rilevata nel gruppo sottoposto a trattamento con SOP GO HORSE. Il potassio ed il cloro sono elettroliti presenti nel sudore e per tale ragione l'entità delle perdite di questi elementi dipende dell'intensità dell'esercizio. Considerando che l'assorbimento degli elettroliti, in concomitanza con l'assorbimento dell'acqua, si verifica in grande parte al livello del cieco-colon (Kunzelmann e Mall, 2002), la gestione della salute di questo segmento del tratto digerente assume un'importanza cruciale sullo stato di

idratazione dei cavalli atleti e sulla promozione dell'assorbimento degli elettroliti. L'integrazione alimentare con SOP GO HORSE ha determinato un aumento della concentrazione plasmatica di entrambi gli elettroliti a T30, fatto che potrebbe essere benefico per lo stato di idratazione durante il lavoro e durante il periodo di recupero.

In conclusione, i risultati preliminari di questo studio sembrano indicare che il trattamento con SOP GO HORSE promuova lo stato di idratazione in cavalli sottoposti a lavoro di tipo moderato. Inoltre, i parametri ematici hanno rivelato una discreta tendenza migliorativa per quanto riguarda le difese immunitarie degli animali. Inoltre, il metabolismo muscolare sembra essere influenzato positivamente dal trattamento. Le differenze emerse in questo studio potranno essere più evidenti con il progredire dello studio sull'effetto dell'integrazione alimentare con SOP GO HORSE.

Bibliografia:

1. Abate O, 1999, Cooperativa Libreria Universitaria, Torino.
2. Aguilera-Tejero E, Estepa JC, López I *et al.*, 2000, *Res Vet Sci.* 68(2):103-108.
3. Belyaev IY, Alipov ED, 2001, *Biochim. Biophys. Acta.* 1526(3):269-276.
4. Centinaio A, Nery J, Accorinti I *et al.* 2009, *ESVCN Proceedings*, pp. 67, Oristano, Italy.
5. Coyne CP, Carlson GP, Spensley MS *et al.*, 1990, *Am J Vet Res.* 51(12):1956-1963.
6. Del Re B, Bersani F, Agostini C *et al.*, 2004, *Radiat. Environ. Biophys.* 43(4):265-270.
7. Frape D, 1986, Longman Group UK, Ltd.
8. Hess TM, Kronfeld DS, Williams CA *et al.*, 2005, *Am J Vet Res.* 66(3):466-473.
9. Kingston JK, 2004, In: Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ (eds.), pp. 939-966, Saunders, Philadelphia.
10. Knochel JP, 1982, *Annual Review of Medicine*, 33:435-443.
11. Kunzelmann K, e Mall M, 2002, *Physiol. Rev.* 82:245-289.
12. Littledike ET e Goff J, 1987, *J. Anim Sci.* 65:1727-1743.
13. Piercy RJ e Rivero J-L L, 2004, In: Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ (eds.), pp. 939-966, Saunders, Philadelphia.
14. Vervuert I, Coenen M, Wedemeyer U *et al.*, 2002, *Equine Vet J.* 34(7):713-718.
15. Vervuert I, Coenen M, Zamhöfer J, 2005, *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 89(3-6):134-139.
16. Vervuert I, Stanik K, Coenen M, 2006, *Equine Vet J Suppl.*(36):659-63.