



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för kliniska vetenskaper

Behandling med kontinuerlig glukosinfusion till häst – olika glukoskoncentrationers effekt på den endogena insulinresponsen

Maja Månsby

*Uppsala
2016*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2016:49*

Behandling med kontinuerlig glukosinfusion till häst – olika glukoskoncentrationers effekt på den endogena insulinresponsen

Treatment with continuous glucose infusion in horses – the effect of different infusion rates on the endogenous insulin response

Maja Månsby

Handledare: Johan Bröjer, Institutionen för kliniska vetenskaper

Biträdande handledare: Sanna Truelsen Lindåse, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Pia Haubro Andersen, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0736

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2016

Delnummer i serie: Examensarbete 2016:49

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: häst, glukos, infusion, insulin, hyperglykemi, hyperinsulinemi, triglycerider, hyperlipidemi

Key words: horse, glucose, infusion, insulin, hyperglycemia, hyperinsulinemia, triglycerids, hyperlipidemia

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Ett stort problem vid behandling av kritiskt sjuka hästar är att den normala energimetabolismen ofta sätts ur spel. Vid fysiologisk stress såsom sjukdom eller trauma ökar ofta energibehovet samtidigt som foderintaget minskar och hästen får en negativ energibalans. Normalt när energibehovet ökar svarar kroppen med mobilisering av energireserver i form av fettsyror men hos kritiskt sjuka hästar kan ett sådant svar bli alldeles för kraftigt och hästen utvecklar hyperlipidemi. Hyperlipidemi kan så småningom leda till förfettning av flera organ med organsvikt som följd. Hästar med förhöjda lipidkoncentrationer i blodet kan behandlas med en kontinuerlig glukosinfusion. Målet med behandlingen är att skapa en hyperglykemi som stimulerar den endogena insulinfrisättningen och på så sätt leder till ökat upptag av lipider till cellerna och minskad nedbrytning av fettvävnad. Vilken grad av hyperglykemi som krävs för att ge tillräcklig effekt på den endogena insulinfrisättningen och en minskning av triglyceridkoncentrationen är dock dåligt utforskat.

Syftet med studien var att undersöka effekten på ämnesomsättningen av blodglukos och insulin vid behandling med en kontinuerlig glukosinfusion hos friska hästar. Två olika målkoncentrationer för blodglukos användes (7 mmol/l och 10 mmol/l) för att undersöka om skillnad i effekt kunde ses mellan dem. I studien ingick totalt sex friska varmblodsston med varierande grad av insulinkänslighet. Hästarna behandlades vid två olika tillfällen med glukosinfusion under 36 timmar. Målet var att skapa en *steady state* vid de två olika blodglukoskoncentrationerna. Varje glukosinfusion föregicks av en hyperglykemisk clamp under två timmar för mätning av insulinkänslighet och pankreas β -cellsfunktion. Blodprover togs enligt bestämt tidsintervall och analyserades för glukos, insulin och triglycerider.

Resultaten från studien visade på ett hyperbolt samband mellan hästarnas insulinkänslighet och β -cellsrespons under den hyperglykemiska clampen, vilket innebär att en häst med låg insulinkänslighet får en hög β -cellsrespons. Detta samband har inte visats hos häst förut. Det fanns också ett hyperbolt samband mellan insulinkänsligheten och insulinresponsen under den kontinuerliga glukosinfusionen. En dosresponskurva mellan glukoskoncentration och insulinkoncentration visade att en högre glukoskoncentration gav en högre insulinkoncentration. Det sågs däremot inte någon skillnad i sänkningen av triglycerider mellan en lägre (7 mmol/l) och högre (10 mmol/l) blodglukoskoncentration vilket tyder på att en lägre glukoskoncentration skulle kunna användas med samma effekt vid behandling av hyperlipidemi. Försöken är dock utförda på friska hästar och fler studier krävs för att utreda effekten hos sjuka individer.

SUMMARY

A major problem in the treatment of critically ill horses is that the normal energy metabolism often is disturbed. During physiological stress, such as illness or trauma, the energy demand often increases at the same time as feed intake is reduced and the horse develops a negative energy balance. Normally, when the need of energy increases the body responds by mobilizing energy reserves in the form of fatty acids. In critically ill horses, however, such a response can be too drastic and the horse develops hyperlipidemia. Hyperlipidemia can eventually lead to lipidosis in several organs with organ failure as a result. Horses with hyperlipidemia can be treated with a continuous glucose infusion. The goal is to create hyperglycemia which stimulates the endogenous insulin secretion, thus leading to increased uptake of lipids to the cells and reduced degradation of fatty tissue. The degree of hyperglycemia that is required for sufficient effect on the endogenous insulin secretion and a reduction of triglycerides is, however, unknown.

The purpose of this study was to investigate the effect of treatment with a continuous glucose infusion on the metabolism of blood glucose and insulin in healthy horses. The effect of two different concentrations of blood glucose (7 mmol/l and 10 mmol /l) on the metabolism of glucose and insulin were evaluated. The study included six clinically healthy warmblood mares with different degrees of insulin sensitivity. The horses were treated at two different occasions with glucose infusion for 36 hours. The goal was to create a steady state at the two different blood glucose concentrations. Each glucose infusion was preceded by a hyperglycemic clamp for two hours for determination of insulin sensitivity and pancreatic β -cell function. Blood samples were taken at predetermined time intervals and were analyzed for glucose, insulin and triglycerides.

The results of the study showed a hyperbolic relationship between the horses' insulin sensitivity and β -cell response during the hyperglycemic clamp, which means that a horse with low insulin sensitivity, has a high β -cell response. This relationship has not been demonstrated in horses before. There was also a hyperbolic relationship between insulin sensitivity and insulin response during the continuous glucose infusion. A dose response curve between the glucose concentration and insulin concentration showed that a higher glucose concentration resulted in a higher insulin concentration. However, no difference in the lowering of triglycerides between a lower (7 mmol/l) and a higher (10 mmol/l) glucose concentration was observed, which indicates that a lower glucose concentration could have the same effect when treating horses with hyperlipidemia. The study however, was conducted on healthy horses and more studies are needed to investigate the effect in critically ill patients.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

<u>Inledning</u>	1
<u>Syfte</u>	1
<u>Litteraturoversikt</u>	2
<u>Normal metabolism hos häst</u>	2
<u>Störningar i metabolismen</u>	4
<u>Insulinresistens</u>	4
<u>Hyperlipidemier</u>	5
<u>Material och metod</u>	7
<u>Hästar</u>	7
<u>Studiedesign</u>	7
<u>Genomförande</u>	8
<u>Hyperglykemisk clamp</u>	8
<u>Kontinuerlig glukosinfusion</u>	9
<u>Biokemiska analyser</u>	9
<u>Blodprovsanalyser</u>	9
<u>Urinprovsanalys</u>	9
<u>Statistiska analyser och beräkningar</u>	10
<u>Resultat</u>	11
<u>Hyperglykemisk clamp</u>	11
<u>Kontinuerlig glukosinfusion</u>	12
<u>Diskussion</u>	17
<u>Hyperglykemisk clamp</u>	17
<u>Kontinuerlig glukosinfusion och effekten på insulinresponsen</u>	18
<u>Effekt på fettmetabolismen</u>	18
<u>Effekter vid fysiologisk stress</u>	19
<u>Litteraturförteckning</u>	20

INLEDNING

Ett stort problem vid behandling av kritiskt sjuka hästar är att den normala energimetabolismen ofta sätts ur spel. Vid fysiologisk stress såsom sjukdom eller trauma ökar ofta energibehovet samtidigt som foderintaget brukar minska och hästen utvecklar en negativ energibalans. Normalt när energibehovet ökar svarar kroppen med mobilisering av energireserver i form av fettsyror men hos kritiskt sjuka hästar kan ett sådant svar bli alldeles för kraftigt. Stora mängder lipider frisätts och hinner inte metaboliseras utan ackumuleras istället i blodet och hästen utvecklar hyperlipidemi (förhöjda lipidkoncentrationer i blodet). Hyperlipidemi kan så småningom leda till förfettning av flera organ med organsvikt som följd. En faktor som anses viktig i utvecklandet av hyperlipidemi är insulinresistens. Det finns flera orsaker som visats kunna bidra till utvecklandet av insulinresistens som t.ex. obesitas, inaktivitet, fasta, foder med högt sockernehåll och systemisk inflammation, varav den sistnämnda är högst aktuell hos kritiskt sjuka hästar.

Hästar med förhöjda lipidkoncentrationer i blodet kan behandlas med en kontinuerlig glukosinfusion. Syftet med behandlingen är att skapa en hyperglykemi som stimulerar den endogena insulinfrisättningen och på så sätt leder till ökat upptag av lipider till cellerna och minskad nedbrytning av fettvävnad. Vilken grad av hyperglykemi som krävs för tillräcklig effekt på den endogena insulinfrisättningen och en minskning av triglyceridkoncentrationen är dock dåligt utforskat, likaså ev. skillnader i effekt hos individer med olika grad av insulinresistens.

SYFTE

Syftet med studien var att undersöka effekten över tid på ämnesomsättningen av blodglukos och insulin vid behandling med en kontinuerlig glukosinfusion hos friska hästar. Två olika målkoncentrationer användes för att undersöka skillnader i effekt på den endogena insulinfrisättningen och triglyceridkoncentrationen i blodet vid en lindrig respektive en kraftig hyperglykemi, och utifrån det kunna optimera glukoskoncentrationen för bäst effekt på den endogena insulinfrisättningen. Individer med olika insulinkänslighet studerades för att undersöka hur olika grad av insulinresistens kan påverka resultatet.

LITTERATURÖVERSIKT

Normal metabolism hos häst

Kolhydrater är hos häst, som hos andra herbivorer, vanligtvis den största energikällan. Hästens energimetabolism har utvecklats efter ett kontinuerligt intag av energisnål föda som gräs/grovfoder. Grovfoder består till stor del av cellulosa, hemicellulosa och lignin (strukturella kolhydrater), protein samt icke-strukturella kolhydrater som socker och stärkelse i varierande mängd och liten del fett. Protein, fett och icke-strukturella kolhydrater absorberas framför allt i tunntarmen medan de strukturella kolhydraterna först måste brytas ner av mikrober i grovtarmen och tas upp som fria fettsyror (VFA, *volatile fatty acids*) för att kunna nyttjas som energi. Acetat och smörtsyra är två viktiga VFAs och de kan i vissa vävnader fungera som energisubstrat direkt, alternativt nyttjas vid syntes av fettsyror (främst i fettvävnad), medan en tredje, propionat, tas upp i levern och kan användas vid glukoneogenes. Glukos som når blodcirkulationen kan antingen användas som näring direkt eller lagras som energireserv i olika vävnader. Som grovtarmsjäsnare kan hästar anpassa sin metabolism till vilken typ av foder de utfodras med. Hos hästar som främst får grovfoder nyttjas VFA-metabolism i större utsträckning än hos hästar som får foder med mycket lösliga kolhydrater, som istället får ett högre glukosupptag i tunntarmen. (McKenzie, 2011)

Som tidigare nämnts absorberas fett från födan framför allt i tunntarmen. Kortkedjiga fettsyror kan transporteras bundna till albumin eller som fosfolipider eller triglycerider via portasystemet till levern. Övriga fettsyror transporteras som triglycerider i kylomikroner via lymfan till blodcirkulation och sedan vidare till lever eller andra vävnader (Reed *et al.*, 2004). I levern esterifieras fria fettsyror till triglycerider och packas ihop med fosfolipider, kolesterol och specifika transportproteiner till *very-low-density lipoproteins* (VLDL) som frisätts till blodet. VLDL är för stora för att ta sig igenom kapillärväggarna men bundet till endotelcellernas yta, framförallt i fettvävnad men även till viss del i skelett- och hjärtmuskulatur, finns lipoproteinlipas (LPL) som konverterar triglyceriderna i VLDL till fria fettsyror och glycerol. De fria fettsyrorerna kan sedan tas upp direkt av fettvävnaden, där de återigen bildar triglycerider, eller användas som energi av flera vävnader och transporteras då i blodet bundet till albumin. Energi utvinns genom oxidation av fettsyrorerna och används för att producera ATP. Fettsyror som inte tas upp perifert går normalt tillbaka till levern. Eftersom albuminets kapacitet att transportera fria fettsyror är begränsad ger bildandet av VLDL kroppen ökade möjligheter att transportera fettsyror i blodet. När triglyceriderna hydrolyserats omvandlas VLDL till *low-density lipoproteins*, LDL, vilka har som uppgift att transportera kolesterol till cellerna som t.ex. används i syntesen av cellmembran och steroider. Levern producerar också HDL (*high-density lipoproteins*) som i motsats till LDL transporterar överskott av kolesterol från cellerna till levern (Sjaastad *et al.*, 2010).

Insulin är ett av fyra peptidhormon som produceras i och frisätts från cellerna i de Langerhanska öarna i pankreas och är det hormon som främst styr metabolism och upplagring av kolhydrater, protein och fett. Höjda koncentrationer av glukos och aminosyror i blodet, t.ex. efter födointag, stimulerar insulinsekretion. Sekretionen anpassas till mängden näring som absorberats. Flera studier har t.ex. visat att djur som enbart äter grovfoder får ett lägre insulinsvar än de som

utfodras med kolhydratrikt spannmål (Reed *et al.*, 2004). Högre parasympatisk aktivitet och minskad sympatikusaktivitet ökar också sekretionen av insulin, liksom vissa hormoner som produceras i tarmkanalen (främst *glucose-dependent insulintropic polypeptide*, GIP) (Sjaastad *et al.*, 2010). Adrenerg stimulering av pankreas, adrenalina från binjurarna och somatostatin inhiberar istället insulinfrisättningen. Katekolaminer hämmar den insulinsekretion som stimuleras av högt blodglukos (Reed *et al.*, 2004).

Insulin har effekt framför allt i tre vävnader; skelettmuskulatur, lever och fettvävnad. I skelettmuskulatur stimulerar insulin upptaget av glukos och aminosyror, glykogenes samt proteinsyntes och minskar proteolys. Insulin stimulerar också upptag och syntes av fettsyror och triglycerider i fettvävnad (Reed *et al.*, 2004) och hämmar lipolys genom att minska aktiviteten hos hormonkänsligt lipas (HSL). HSL funktion är att initiera nedbrytningen av triglycerider, vilket frigör glycerol och fria fettsyror (FFA) som kan metaboliseras och användas som energi (McKenzie III, 2011). Både skelettmuskulatur och fettvävnad har insulinberoende glukostransportörer (GLUT-4), vilket innebär att insulin reglerar upptaget av glukos i dessa celler genom att öka uttrycket av GLUT-4 på cellytan. I lever, hjärna och erythrocyter samt i epitelceller i bl.a. njure och tarmkanal finns andra glukostransportmolekyler som inte är insulinberoende. I levern har insulin dock andra effekter där det stimulerar glykogenes och fettsyresyntes och inhiberar glukoneogenes, ketogenes och nedbrytning av glykogen (Sjaastad *et al.*, 2010).

Ett annat hormon som produceras i endokrina delen av pankreas är glukagon och det har motsatt effekt mot insulin. Hormonet utför framförallt effekt på levern och stimulerar leverns glykogenolys och glukoneogenes, vilket ger en ökning i blodglukoskoncentrationen. Glukagon ökar upptag och metabolism av aminosyror som behövs vid glukoneogenesen. Förutom effekt på levern stimulerar glukagon också lipolys i fettvävnad genom att aktivera HSL (Sjaastad *et al.*, 2010). Glukagonsekretion, till skillnad mot insulinsekretion, inhiberas av högt blodglukos men stimuleras istället när glukoskoncentrationen sjunker (Reed *et al.*, 2004). Vid negativ energibalans samverkar flera signaler för att bibehålla normoglykemi och det sker en ökning i sekretion av glukagon medan insulinsekretionen minskar. Följden blir ett katabolt tillstånd med glukoneogenes, glykogenolys och perifer lipolys och fettsyror blir ny primär energikälla för att värna om den begränsade mängden glukos (McKenzie III, 2011).

Levern har en central roll i upprätthållandet av normal glukoskoncentration, speciellt hos djur som häst och idisslare där VFA och inte glukos är den huvudsakliga energikällan (Reed *et al.*, 2004). Eftersom hästdjur har en relativt begränsad mängd upplagrat glykogen töms snart reserverna om energiintaget minskar eller behovet ökar kraftigt varför de blir starkt beroende av glukoneogenes i levern. Proteinnedbrytningen ökar för att försöka levern med aminosyror som fungerar som prekursorer vid syntesen av glukos. Även frisättningen av leptin, som är ett hormon som bildas i fettvävnad, kan öka vilket leder till ytterligare frigöring av energi (McKenzie III, 2011). En väsentlig andel av de fettsyror som frisätts tas upp av levern men levercellerna har begränsad kapacitet att oxidera dessa och en del används istället för syntes av ketonkroppar. Ketonerna kan sedan användas som alternativ energikälla till glukos, främst av hjärnan, när mängden glukos inte räcker till. Överproduktion kan leda till ketoacidosis, vilket är

relativt vanligt hos kor, men hästar producerar bara en liten mängd ketoner. Istället esterifieras fettsyror som inte oxiderats återigen till triglycerider och exporteras från levern som lipoproteiner (Sjaastad *et al.*, 2010).

Störningar i metabolismen

Vid fysiologisk stress såsom sjukdom eller trauma ökar kroppens energibehov och samtidigt minskar ofta också foderintaget och därmed tillförseln av energi och protein (Reed *et al.*, 2004). Kroppens svar på den negativa energibalansen accelererar vid fysiologisk stress. Den endogena produktionen av glukokortikoider ökar vid stress, vilket leder till förhöjda plasmanivåer av kortisol. Kortisol i sin tur stimulerar katabolism och hämmar insulinfrisättningen och dess effekter, vilket så småningom leder till ytterligare ökning av cirkulerande glycerol och fria fettsyror. Flera faktorer kan bidra till störningar i energimetabolismen hos hästar, varav vanligaste tydliga orsaken är insulinresistens (McKenzie III, 2011).

Insulinresistens

Insulin har effekt på cellnivå genom att binda till specifika receptorer, som leder till vidare signalering in i cellen, t.ex. i skelettmuskulatur där det uppreglerar uttrycket av GLUT-4. Den maximala effekten av insulin på glukosmetabolismen definieras som insulinresponsivitet medan insulinkänslighet definieras som insulinkoncentrationen som krävs för hälften av maximala responsen (Muniyappa *et al.*, 2008). Insulinresistens (IR) definieras som minskad effekt av insulin på perifera vävnaders upptag av glukos (Xu *et al.*, 2003) och är resultatet av förändringar i insulinreceptorerna, postreceptor-effekter eller en kombination av de båda. Normalt måste ett flertal insulinreceptorer samtidigt binda insulin för att insulinet ska få biologisk verkan. Vid insulinresistens kan därför högre insulinkoncentration krävas för att tillräckligt många receptorer ska aktiveras. Om en ökad insulinkoncentration krävs för biologisk effekt innebär det en minskad insulinkänslighet och om maximal effekt aldrig uppnås innebär det en minskad insulinresponsivitet. För att åstadkomma biologisk respons leder den minskade insulinkänsligheten så småningom till hyperinsulinemi (Reed *et al.*, 2004).

Det finns flera metoder för att utvärdera glukos- och insulindynamik hos häst. Euglykemisk hyperinsulinemisk clamp (EHC) och *frequently sampled intravenous glucose tolerance test* (FSIGTT) är två olika kvantitativa och specifika metoder för att diagnostisera insulinresistens men de har begränsad användbarhet kliniskt på grund av tidsåtgång, kostnader och tekniska svårigheter (Kronfeld *et al.*, 2005). Ett dynamiskt test som oftare används i klinisk verksamhet är det kombinerade glukos- och insulin-testet (CGIT). Detta test kan inte kvantifiera hästens insulinkänslighet men ger information om både glukos- och insulinsvaret (Frank *et al.*, 2010). Den hyperglykemiska clampen (HC) är en metod där både patientens insulinkänslighet och β -cellernas glukoskänslighet kan kvantifieras (DeFronzo *et al.*, 1979). För att diagnostisera insulinresistens under mer fältmässiga förhållanden kan ett oralt glukostoleranstest användas (Schuver *et al.*, 2014).

Fasta har visats kunna inducera insulinresistens hos friska hästar. Även fysisk inaktivitet, ökande ålder, foder med högt socker- och stärkelseinnehåll samt obesitas bidrar till

utvecklingen av insulinresistens (McKenzie III, 2011). Flera studier visar på samband mellan insulinresistens och andra sjukdomar så som *pituitary pars intermedia dysfunction*, (PPID) (Klinkhamer *et al.*, 2011), ekvint metabolt syndrom, (EMS) (Frank *et al.*, 2010), fång (Geor, 2010) och endotoxinemi (Toth *et al.*, 2008; Vick *et al.*, 2008). Det faktum att systemisk inflammation kan förknippas med utvecklingen av insulinresistens kan många gånger komplicera hanteringen av kliniskt sjuka hästar.

Hyperlipidemier

Hyperlipidemi definieras genom förhöjda lipidkoncentrationer i blodet och är främst associerat med negativ energibalans och fysiologisk stress. Denna ökning av lipider är ett normalt fysiologiskt svar på negativ energibalans men vissa omständigheter kan ge ett överdrivet svar. Riskfaktorer för ett sådant svar är t.ex. EMS, PPID och endotoxinemi, samtliga kopplade till insulinresistens, samt dräktighet och laktation där energibalansen naturligt förändras (McKenzie III, 2011). De FFAs som frisätts från fettvävnaden görs om till triglycerider i levern och exporteras som VLDLs vilka ackumuleras i blodet (Watson *et al.*, 1992). Flera normala fysiologiska funktioner kan påverkas av stigande fettsyrekoncentrationer varav en är insulinkänsligheten (Shulman, 2000). Insulinresistens kan förvärra graden av hyperlipidemi ytterligare genom att kroppens förmåga att begränsa fettmobiliseringen försämras (McKenzie III, 2011). Förhöjda fettsyrekoncentrationer i blodet leder till ackumulering av fettmetaboliter i muskulatur och lever, vilket i sin tur stör glukoneogenesen i levern och det insulininducerade glukosupptaget i skelettmuskulaturen (Shulman, 2000). Då bildandet av ketonkroppar är dåligt utvecklat hos häst, och levern själv inte utnyttjar FFAs som energikälla i någon större utsträckning, leder det till att det istället produceras stora mängder triglycerider av de FFA som levern tar upp. Vid för kraftig frisättning av fettsyror kan leverns förmåga att omvandla triglycerider till VLDL överskridas, vilket leder till upplagring av triglycerider i levern och leverlipidos. Även andra organ kan drabbas av lipidosis och förfettningen kan slutligen leda till organsvikt, i värsta fall med döden som följd (McKenzie III, 2011).

Hyperlipidemier är vanligast hos ponnyraser, miniatyrhästar och åsnor (Hughes *et al.*, 2004) men även större hästraser kan drabbas och tillståndet anses ha ökat hos inskrivna patienter, eventuellt som en effekt av den ökande frekvensen överviktiga och feta hästar. Dunkel och McKenzie III (2003) visade i en studie att kliniskt sjuka hästar av flera olika raser med inappetens och *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) hade kraftigt förhöjda triglyceridkoncentrationer i blodet. Flera olika termer används för att beskriva varierande grad av förändring. När triglyceridkoncentrationerna överstiger normalvärdet (100 mg/dl, motsvarande 1,1 mmol/l) utan att hästen visar klinisk sjukdom klassas det som hypertriglyceridemi (McKenzie III, 2011). Hyperlipidemi karaktäriseras av en triglyceridkoncentration i serum mellan 100 och 500 mg/dl (1,1 – 5,6 mmol/l) utan tydlig lipemi (blodet grumlas pga. de höga koncentrationerna triglycerider). Kraftig hyperlipidemi definieras som triglyceridkoncentration över 500mg/dl (5,6 mmol/l) men fortfarande utan lipemi (Dunkel and McKenzie, 2003). Hyperlipemi definieras som triglyceridkoncentration överstigande 500mg/dl (5,6 mmol/l) med synlig lipemi samt förfettning av levern eller flera organsystem (McKenzie III, 2011).

Symtomen vid hyperlipidemier är ofta ospecifika men vanligtvis ses anorexi, nedsatt allmäntillstånd och minskad törst (Dunkel & McKenzie III, 2003). Kolik, diarré, feber, ikterus, ventrala ödem och kakexi kan ses i allvarligare fall och är generellt en följd av lever- och/eller njurlipidos. Hästar med (obehandlad) hyperlipemi utvecklar så småningom nervösa symtom som ataxi, dysfagi, *head pressing* och cirkelgång. Slutligen blir de liggande med konvulsioner innan de avlider (Watson & Love, 1994). Blodprovsanalys av triglyceridkoncentrationen krävs för definitiv diagnos av hyperlipidemier. Hos hästar med hyperlipemi ses ofta också förändringar i njur- och levervärden då organens funktion påverkas av lipidos (Hughes *et al.*, 2004).

En grundläggande förutsättning för effektiv behandling av hyperlipidemier är att drabbade patienter upptäcks så tidigt som möjligt. Den viktigaste delen i behandlingen är att snabbt försöka åtgärda den underliggande orsaken till metabolismrubbningarna, t.ex. en systemisk inflammation, och den andra delen är att korrigera den negativa energibalansen (McKenzie III, 2011). Hos patienter som får äta och har fortsatt aptit kan vanlig utfodring med näringsriktigt foder användas, medan inappetenta hästar vars tillstånd fortfarande tolererar näringstillskott via tarmen kan behandlas med s.k. enteral nutrition, vilket innebär olika näringsblandningar som, om hästen själv inte vill äta det, kan ges med nässvalgssond. Enteral nutrition föredras om möjligt då den är mest fysiologisk och har positiv effekt på bland annat organfunktion, tarmslemhinnan och immunförsvaret (Carr, 2009). Hästar som inte får eller kan utnyttja enteral näringstillförsel behandlas istället intravenöst och vanligen framförallt med kolhydrater (glukoslösning). Teoretiskt ska glukosbehandling ge en hyperglykemi som stimulerar den endogena insulinfrisättningen, vilket i sin tur leder till sänkt triglyceridkoncentration i blodet genom ökat upptag i fettvävnad. Då många drabbade patienter samtidigt är insulinresistenta behandlas de även med exogent insulin. Insulinbehandling har teoretiskt många fördelar hos en patient med hyperlipidemier då insulin stimulerar lipogenes och upptag av VLDL i fettvävnad samtidigt som det hämmar lipolys och bildandet av VLDL. Eftersom många av dessa patienter också är insulinresistenta finns dock teorier om att det skulle vara skadligt med exogent tillförd insulin då kraftig hyperinsulinemi visats kunna framkalla fång redan på kort tid (Asplin *et al.*, 2007; de Laat *et al.*, 2010). Studierna har dock kritiserats på grund av de extremt höga insulinkoncentrationerna som använts.

Dunkel och McKenzie III (2003) visade i en studie att åtta hästar med kraftig hyperlipidemi (TG>500mg/dl) kunde behandlas framgångsrikt med enbart glukosinfusion. I en annan studie sågs effekt hos 30 hästar med varierande grad av förhöjda triglyceridkoncentrationer som behandlats med både glukosinfusion och bolusinjektioner med insulin (intravenöst alt. subcutant) (Waite & Cebra, 2009). Vid intravenös behandling med glukos används 5% eller 50% glukoslösning som innehåller 0,17 kcal/ml respektive 1,7 kcal/ml. Den svagare koncentrationen kommer inte tillgodos det dagliga energibehovet (22-23 kcal/kg/d) som ensam energikälla då det skulle kräva för hög infusionshastighet (5ml/kg/h istället för underhållsbehovet 1 – 2 ml/kg/h) men kan användas för att stimulera den endogena insulinfrisättningen (McKenzie III, 2011). Är hästen inte insulinresistent tolereras den behandlingen väl (Magdesian, 2010). Som alternativ kan 50% glukoslösning ges (samtidigt som isoton vätsketerapi), vilket också tolererats väl hos majoriteten av behandlade hästar (Dunkel

& McKenzie, 2003). Om patienten kräver samtidig behandling med insulin ställer det genast högre krav på kontroll och monitorering för att inte riskera hypoglykemi. Blodglukos bör kontrolleras minst en gång i timmen den första tiden och infusionshastigheten korrigeras efter resultatet. När *steady state* uppnåtts brukar vidare förändringar i infusionshastigheten inte behövas. Behandling med glukosinfusion eller kombinerad glukos- och insulininfusion bör trappas ned långsamt samtidigt som uppfodring sker (McKenzie III, 2011).

Är hästen av predisponerad ras och har hyperlipemi eller kräver längre tids parenteral nutrition (>24-72h) rekommenderas att även aminosyror tillsätts infusionslösningen, s.k. *lipid-free* parenteral nutrition, vilket innebär 50% glukoslösning och lika del 8,5% aminosyralösning som blandas i sterilt vatten (Carr, 2009; Magdesian, 2010, McKenzie III, 2011). Parenteral nutrition bör dock inte ses som en alternativ väg att fortsätta tillföra näring utan som ett komplement för att garantera adekvat kaloriupptag. För tarmkanalens fysiologi är det viktigt att hästen börjar äta igen och förändringar i aptiten kan ge en bild av hästens utveckling (Durham & Thiemann, 2015).

MATERIAL OCH METOD

Hästar

Studien utfördes på sex hästar som ägs av institutionen för kliniska vetenskaper, Sveriges lantbruksuniversitet (SLU). Alla hästarna var varmblodshästar som inte tränas utan nyttjas av institutionen till undervisning och forskning. De vistas normalt i hage dagtid och hålls uppstallade i box under natten och utfodras med hö och hösilage. Hästarna var i åldrarna 8 – 23 år med en medelålder på $15 \pm 5,1$ år och samtliga var ston. Hästarna bedömdes som kliniskt friska utan tecken på metabol sjukdom.

Kvällen före försöken ställdes hästarna på box med spån, som de sedan fick stanna i under hela försöksomgången. Samma morgon som behandling skulle påbörjas vägdes hästarna. Vägningen upprepades inför andra behandlingstillfället för att få aktuell vikt. Vikterna varierade mellan 461kg och 619kg med en medelvikt på $535,7 \pm 59,2$ kg. I tidigare studier på institutionens hästar har insulinkänsligheten utvärderats och resultaten därifrån har utnyttjats i valet av hästar till den här studien för att inkludera individer med olika grad av insulinresistens.

Försöket bedömdes vara av ringa svårighet och är godkänt av *Uppsala Djurförsöksetiska nämnd* (Dnr: C30/15).

Studiedesign

Studien var en prospektiv studie med experimentella kliniska försök i *cross over*-design och omfattade behandling med kontinuerlig 50% glukosinfusion under 34 timmar vid två tillfällen per häst. De två behandlingarna skedde med sju dagars mellanrum. Målet med studien var att skapa en *steady state* vid två olika blodglukoskoncentrationer: 7 mmol/l och 10 mmol/l. Vid det första behandlingstillfället lottades vilken häst som började med den lägre koncentrationen och vid nästa tillfälle byttes målkoncentrationen till den motsatta för respektive häst. Varje glukosinfusion föregicks av en HC under två timmar för mätning av insulinkänslighet och

pankreas β -cellsfunktion. Därefter användes den första timmen under den kontinuerliga glukosinfusionen till att justera blodglukoskoncentrationen till den förutbestämda målkoncentrationen (7 eller 10 mmol/l) och sedan bevarades aktuell koncentration följande 33 timmar. Blodprover togs enligt bestämt tidsintervall och analyserades för glukos, insulin och triglycerider.

Genomförande

Hästarna ställdes i box dagen innan försöket och intravenös permanentkateter (Intranule, 2,0 x 105 mm, Vygon, Ecouen, Frankrike) anlades i jugularerna på båda sidor efter rakning, lokalbedövning (EMLA, AstraZeneca, Södertälje, Sverige) samt steriltvätt. Efter första behandlingsomgångens slut avlägsnades permanentkatetrarna och nya anlades på samma sätt inför nästa tillfälle. Hästarna hade fri tillgång till vatten och salt natten innan men utfodrades sista gången på kvällen för att uppnå minst åtta timmars fasta. Under försöken vistades hästarna i box med fortsatt fri tillgång till vatten och salt och efter försökets första tre timmar tilldelades hästarna sin vanliga dyngsgiva grovfoder i små, frekventa portioner för att fördela foderintaget jämt över dygnet. Hästarna vägdes samma dag som försöket påbörjades för dagsaktuell vikt. Förlängningsslangar (Discofix B. 250mm, Braun Medical AG, Schweiz) och spiralaggregat (Baxter flo-guard, filter 15 μ m, Baxter Healthcare SA, Schweiz) fästes till den ena permanentkatetern för administration av glukos (Glucose 500 mg/ml, Fresenius Kabi AB, Uppsala, Sverige). Förlängning för blodprovstagning fästes till den andra katetern och samtliga blodprover togs via den katetern efter att 5 ml först aspirerats ur. Efter varje provtagning spolades katetern med 10 ml steril natriumklorid. När försöket avslutats trappades glukosinfusionshastigheten successivt ned tills hästarna nådde fysiologisk blodglukoskoncentration. Under veckan mellan de två behandlingstillfällena återgick hästarna till sina vanliga rutiner.

Hyperglykemisk clamp

De första två timmarna av försöket användes för att få ett mått på β -cellsresponsen och insulinkänsligheten hos respektive häst med hjälp av en HC och utfördes enligt den metod som beskrivits av DeFronzo *et al.* (1979). Metoden går ut på att genom tillförelse av glukos orsaka en konstant hyperglykemisk nivå under en bestämd tidsperiod och infusionshastigheten som krävs för upprätthållandet av den koncentrationen blir ett mått på glukosmetabolismen (DeFronzo *et al.*, 1979). Koncentrationen av insulin i blodet när *steady state* uppnåtts kan ge ett mått på β -cellernas respons på glukos (Rijnen and van der Kolk, 2003) och genom matematiska beräkningar kan ett kvantitativt mått för vävnadens insulinkänslighet bestämmas (DeFronzo *et al.*, 1979; Rijnen & van der Kolk, 2003). Målkoncentrationen för blodglukos under HC var i den här studien 10 mmol/l för samtliga hästar.

Före försökets start togs två fasteprover (vid -10 minuter och -1 minut) för analys av glukos, insulin och triglycerider. Vid start för HC gavs hästarna en bolusdos glukos intravenöst (100 mg/kg 50 % glukos) under en minut för att uppnå hyperglykemi. Därefter startades kontinuerlig glukosinfusion för att upprätthålla hyperglykemin (ca 10 mmol/l) under clampens två timmar. Glukoslösningen administrerades med hjälp av en volymetrisk infusionspump (Colleague, Volumetric infusion pump, Baxter Healthcare SA, Zurich, Schweiz) och infusionshastigheten

reglerades kontinuerligt för att upprätthålla den önskade glukoskoncentrationen i blodet. För att kontrollera blodglukoskoncentrationen togs blodprover via permanentkateter var femte minut och analyserades direkt på plats med hjälp av en glukometer (Accu-Check Aviva, Roche Diagnostics Scandinavia AB, Bromma, Sverige). Om blodglukoskoncentrationen skiljde mer än 0,2 mmol/l från målkoncentrationen (10 mmol/l) justerades infusionshastigheten för glukos. Den första av clampens två timmar användes som inställningsfas för att nå konstant hyperglykemisk blodglukosnivå (10 mmol/l) och under andra timmen eftersträvades att bevara *steady state*. Var tionde och tjugonde minut sparades blodprover för senare analys av plasmaglukos respektive plasmainsulin. Efter clampens slut (2h) togs urinprov sterilt via urinkateter på samtliga hästar för mätning av urinens volym och glukoskoncentration för att kunna korrigera för eventuell glukosuri vid statistiska beräkningar.

Kontinuerlig glukosinfusion

Direkt efter HC följde behandling med en kontinuerlig glukosinfusion under 34 timmar. Under denna tid hölls blodglukoskoncentrationen på en konstant hyperglykemisk nivå med målkoncentration 7 mmol/l alternativt 10 mmol/l. Glukos tillfördes fortsatt med hjälp av volymetrisk infusionspump och blodglukoskoncentrationen mättes med hjälp av glukometer. Den första timmen användes för att nå *steady state* för respektive målkoncentration och under efterföljande 33 timmar bevarades *steady state* genom justeringar av infusionshastigheten för glukos. Blodprov analyserades direkt med glukometer var femte minut den första timmen och därefter varje halvtimme under 33 timmar. Prover sparades var tionde och var tjugonde minut (för senare analys plasmaglukos respektive plasmainsulin) första timmen och resterande tid en gång i timmen för analys av plasmaglukos samt en gång var tredje timme för analys av plasmainsulin. Prover för triglycerider togs vid start av den kontinuerliga glukosinfusionen och sedan var tolfte timme (räknat från start av HC).

Biokemiska analyser

Blodprovsanalyser

Aspirerade blodprover överfördes till sterila blodprovsrör med litium-heparin eller till serumrör beroende på planerad analys vid aktuellt provtagningstillfälle. Blodprovsrören centrifugerades i 10 minuter, 2700 x g, och därefter avskildes plasma respektive serum för förvaring i eppendorffrör i -80 °C tills laboratorieanalyser utfördes. Proverna analyserades med avseende på plasmakoncentration av glukos och insulin samt serumkoncentration av triglycerider vid Institutionen för kliniska vetenskaper, SLU respektive Klinisk kemiska laboriet UDS, SLU. Glukos analyserades med en membranbunden enzym-elektrodmotodik (YSI 2300 STAT Plustm™ analyzer, YSI Inc, Yellow Springs, Ohio, USA) och insulin med en ELISA (Mercodia Equine Insulin ELISA, Mercodia AB, Uppsala, Sverige).

Urinprovsanalys

Urinblåsan kateteriserades och tömdes fullständigt på urin. Den uppsamlade volymen urin uppmättes. En mindre volym urin överfördes till serumrör som centrifugerades i 10 minuter, 2700 x g. Därefter avskildes vätskefraktionen från urinsediment och förvarades i eppendorffrör i -80 °C fram tills laboratorieanalyser utfördes. Urinprovet analyserades med avseende på

koncentration av glukos med en membranbunden enzym-elektrodmeter (YSI 2300 STAT Plustmtm analyzer, YSI Inc, Yellow Springs, Ohio, USA) .

Statistiska analyser och beräkningar

För att bestämma insulinkänsligheten för varje häst vid respektive försökstillfälle beräknades metaboliserad glukos (M-värde) och mängden metaboliserad glukos per insulinenhet (M/I-kvot, där I=plasmainsulinkoncentrationen) under HCs *steady state* (dvs. mellan 80 och 120 minuter).

M-värdet beräknades enligt ekvationen:

$$M = INF - UC - SC$$

Där M är metaboliserad glukos, INF är infusionshastigheten för glukos, UC är förlust av glukos till urinen och SC är *space correction* vilket innebär korrigering för att glukoskoncentrationen i blodet fluktuerar över tid i förhållande till målkoncentration (10 mmol/l). Även under *steady state* förekommer viss fluktuation i blodglukoskoncentrationen och därför approximeras den faktiska mängden metaboliserad glukos utifrån den mängd som translokteras från eller till den extracellulära vätskan genom SC. Om blodglukoskoncentrationen ökar (under en bestämd tidsperiod) har all glukos som tillförts inte metaboliserats utan glukosöverskottet har fördelats i den extracellulära volymen. Sjunker istället blodglukoskoncentrationen har mer glukos metaboliserats än vad som tillförts under den givna tidsperioden. (DeFronzo *et al.*, 1979)

$$SC = \frac{(G_2 - G_1) \times (0,19 \times bw)}{t \times bw} = \frac{(G_2 - G_1) \times 0,19}{t}$$

SC beskriver förändringen i tillförsel och eliminering av glukos från distributionsvolymen över tid. Distributionsvolymen för glukos (V_d i liter) motsvarar 19 % av kroppsvikten ($V_d = 0,19 \times bw$). SC beräknades genom att differensen mellan glukoskoncentrationen i slutet av en bestämd tidsperiod (G_2) och glukoskoncentration i början av tidsperioden (G_1) multiplicerades med den andel av kroppsvikten som glukos fördelar sig i under den bestämda tidsperioden (t).

Medelkoncentrationen av plasmainsulin under *steady state* är ett mått på β -cellernas respons på glukos. β -cellsresponsen kalkylerades genom att beräkna medelvärdet av plasmainsulinkoncentrationen vid 80 min, 100 min och 120 min under HCn.

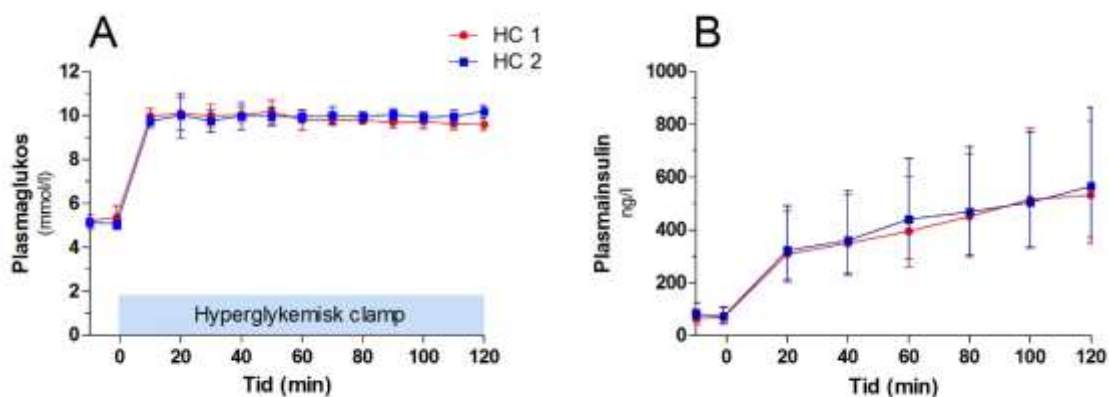
Ett statistikprogram (JMP® Pro 11.0.0, SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) användes för statistisk analys av mätdata. Trapetzoidmetoden användes för kalkylering av arean under kurvan (AUC) för koncentrationerna av plasmainsulin och plasmatriglycerider över tid. För hypotesprövning användes en parat t-test eller en tvåvägs variansanalys för upprepade mätningar (ANOVA) samt efterföljande Tukey-test. Data logtransformerades innan statistisk analys i de fall då residualerna inte var normalfördelade. Logtransformerade data redovisas som geometriskt medelvärde \pm 95 % konfidensintervall (CI). Övriga data redovisas som medelvärde \pm standardavvikelse (SD). För att studera korrelationen mellan flera parametrar utfördes linjär

och icke linjär regressionsanalys. Linjär regression utfördes för att undersöka om de två regressionslinjerna för data från kontinuerlig glukosinfusion (34 h) vid de två olika plasmaglukoskoncentrationerna (7 eller 10 mmol/l) hade samma lutning. Nollhypotesen om samma lutning och intercept av regressionslinjerna testades med hjälp av en ANCOVA med tillägg för en interaktionsterm. Som gränsvärde för att bestämma statistisk signifikans användes $P < 0,05$.

RESULTAT

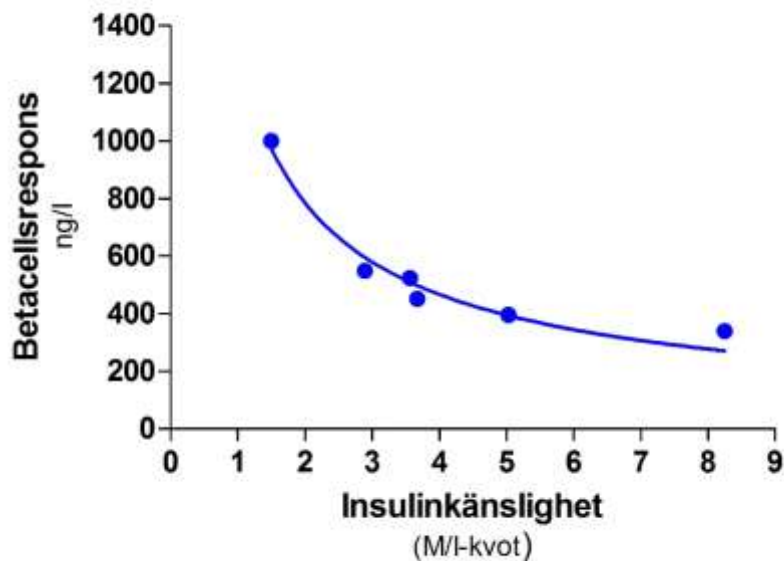
Hyperglykemisk clamp

Figur 1A visar medelvärden för plasmaglukoskoncentrationen över tid vid första och andra HCn. Det fanns ingen signifikant skillnad i glukoskoncentration mellan de två clamparna ($P=0,39$). Figur 1B visar geometriska medelvärden för plasmainsulinkoncentrationerna över tid för respektive försökstillfälle. Inte heller där fanns någon signifikant skillnad mellan första och andra clampen ($P=0,13$). Plasmainsulinkoncentrationen ökar kraftigare initialt men vid tiden för *steady state* (60 – 120 minuter) fanns inga skillnader i plasmainsulinkoncentrationerna över tid ($P=0,78 - 1,0$).



Figur 1. Fig. 1A visar medelvärden \pm SD för plasmaglukoskoncentrationen (mmol/l) över tid (min) under respektive hyperglykemiska clamp (HC1, HC2). Fig. 1B visar geometriska medelvärden \pm CI för plasmainsulinkoncentrationen (ng/l) över tid (min) under respektive HC. Rött representerar det första försökstillfället (HC 1) och blått det andra tillfället (HC 2).

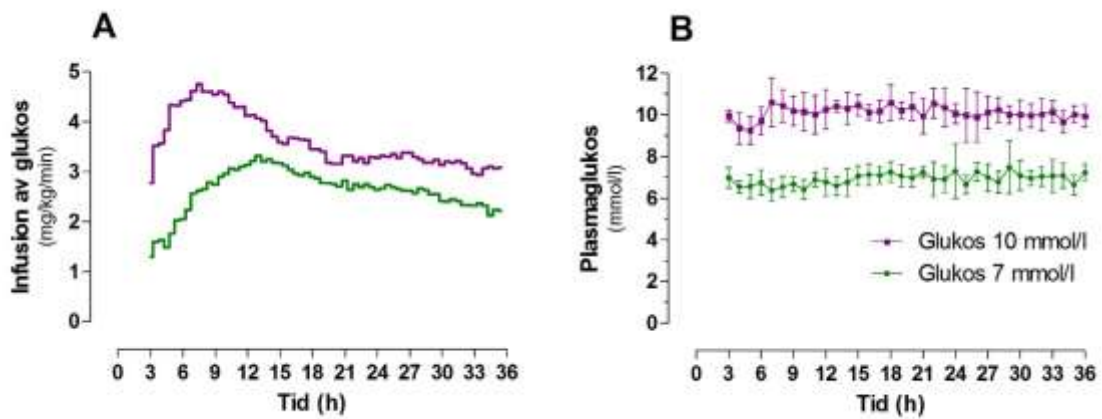
Resultaten från båda försökstillfällena (HC1 och HC2) sammanfördes för varje enskild parameter och redovisades som genomsnittsvärde för respektive häst. M-värdet (mängd metaboliserad glukos) varierade från 1,5 – 2,9 mg/kg/min med ett medelvärde på $1,9 \pm 0,5$ mg/kg/min. M/I-kvoten (mängd metaboliserad glukos/insulinenhet) varierade från 1,5 – 8,2 ($[\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}]/[\text{ng}/\text{l}]$) med medelvärde $4,2 \pm 2,1$ ($[\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}]/[\text{ng}/\text{l}]$). Hästarnas β -cellsrespons varierade från 340 – 1000 ng/l med medelvärde 534 ± 216 ng/l. Sambandet mellan β -cellsresponsen (ng/l) och insulinkänsligheten (M/I-kvot; $[\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}]/[\text{ng}/\text{l}]$) var hyperbolt, dvs. kunde beskrivas enligt modellen: $\log(\beta\text{-cellsrespons}) = \text{konstant} + \text{faktor} \cdot \log(\text{M/I-kvoten})$ ($r^2 = 0,96$), och visas i figur 2.



Figur 2. Hyperbolt samband mellan hästarnas betacellsrespons (ng/l) och deras insulinkänslighet (M/I-kvot; $[\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}]/[\text{ng}/\text{l}]$).

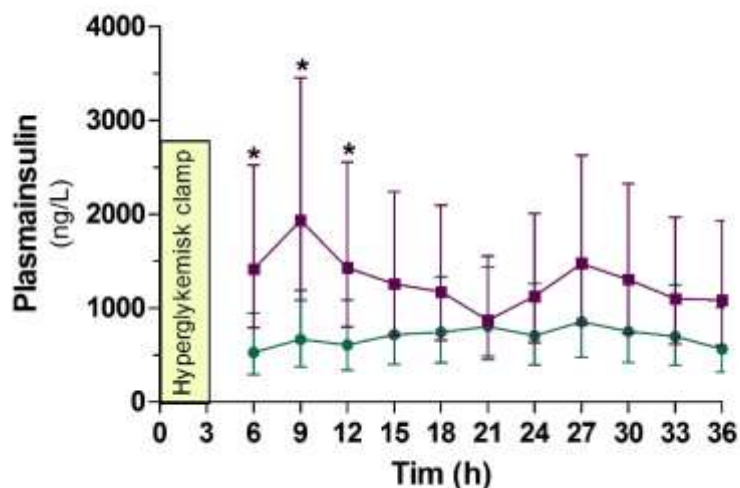
Kontinuerlig glukosinfusion

Medelinfusionshastigheten av glukos över tid vid de två olika målkoncentrationerna (7 respektive 10 mmol/l) visas i figur 3A. Det fanns en signifikant skillnad mellan infusionshastigheterna för att bevara plasmaglukoskoncentration vid 7 respektive 10 mmol/l ($P < 0,001$). Glukosinfusionshastigheten ändrade sig över tid ($P < 0,001$) och vid både 7 och 10 mmol/l krävdes en ökning av infusionshastigheten initialt för att bibehålla avsedd plasmaglukoskoncentration. Eftersom förändringarna i infusionshastighet såg olika ut för 7 respektive 10 mmol/l fanns det en interaktion mellan målkoncentrationerna och tiden ($P < 0,001$). Vid ca 6 – 9 h (10 mmol/l) respektive ca 12 – 15 h (7 mmol/l) nådde ökningen sin topp och infusionshastigheten avtog sedan för att nå *steady state* mellan 15 och 36 h (10 mmol/l) respektive mellan 18 och 36 h (7 mmol/l). Figur 3B visar att det fanns en signifikant skillnad i plasmaglukoskoncentration för de två olika målkoncentrationerna ($P < 0,001$) medan det inte fanns någon skillnad i plasmaglukoskoncentration över tid inom respektive målkoncentration ($P = 0,27$).

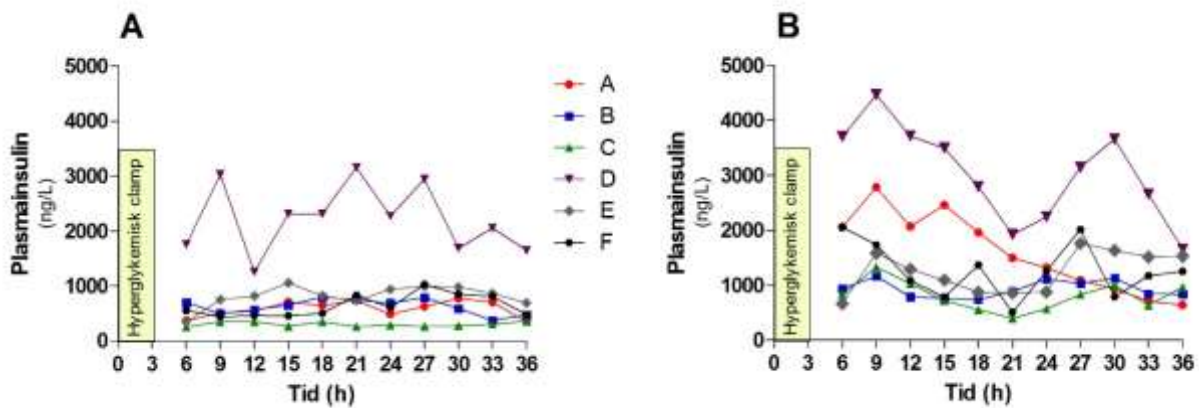


Figur 3. Fig. 3A visar medelinfusionshastigheterna av glukos (mg/kg/min) över tid (h) vid olika målkoncentrationer för plasmaglukos och fig. 3B visar medelvärden \pm SD för plasmaglukoskoncentrationen (mmol/l) över tid (h). Grönt representerar målkoncentrationen 7 mmol/l och lila representerar målkoncentrationen 10 mmol/l.

Geometriska medelvärden \pm CI för plasmainsulinkoncentrationen under de kontinuerliga glukosinfusionerna redovisas i figur 4. Mellan de två olika målkoncentrationerna förelåg en signifikant skillnad i plasmainsulinkoncentration ($P < 0,0001$) vid tre tidpunkter. Inom respektive målkoncentration (7 alt. 10 mmol/l) fanns det ingen generell skillnad i plasmainsulinkoncentrationer över tid ($P = 0,11$). Det fanns en interaktion mellan tid och målkoncentration, dvs. kurvornas utseende skiljer sig åt ($P = 0,014$). Figur 5 visar hästarnas individuella värden för plasmainsulinkoncentrationen under kontinuerlig glukosinfusion vid de olika målkoncentrationerna.

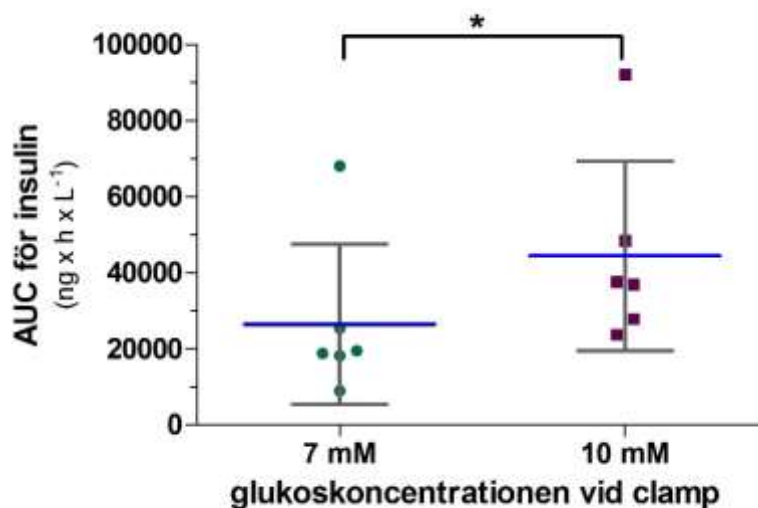


Figur 4. Grafen visar geometriska medelvärden \pm CI för plasmainsulinkoncentrationen över tid (h) från 6 – 36 h vid två olika målkoncentrationer. Grön linje och cirklar visar data vid målkoncentration för glukos på 7 mmol/l och lila linje och fyrkanter visar data vid målkoncentration för glukos på 10 mmol/l. Asterisk i grafen anger att insulinkoncentrationen vid 10 mmol/l skiljer sig från korresponderande insulinkoncentration vid 7 mmol/l.



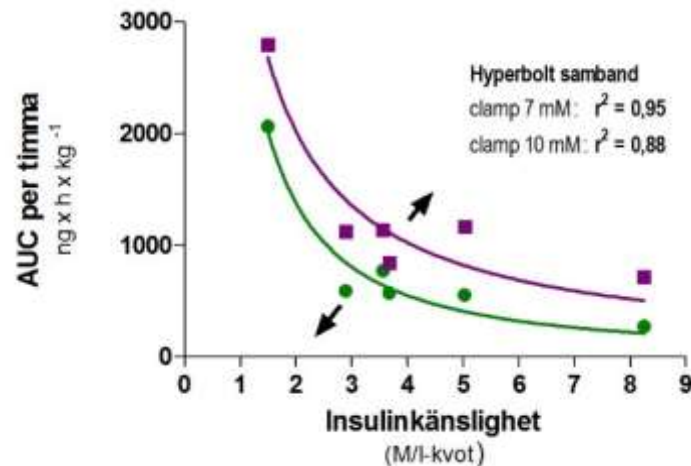
Figur 5. Graferna visar hästarnas individuella värden i plasmainsulinkoncentration (ng/l) över tid (h) för samtliga hästar (A – F) vid målkoncentration för plasmaglukos på 7 mmol/l (fig. 5A) respektive 10 mmol/l (fig. 5B).

Arean under kurvan (AUC) för plasmainsulinkoncentration motsvarar totala mängden insulin som funnits i den systemiska cirkulationen under en bestämd tid och är ett mått på insulinresponsen. AUC för plasmainsulinkoncentrationen mellan 6 och 36 timmar vid respektive målkoncentration redovisas i figur 6. Medelvärde \pm SD samt hästarnas individuella värden är utsatta i grafen. Det fanns en signifikant skillnad i insulinresponsen mellan målkoncentrationerna ($P = 0,003$).

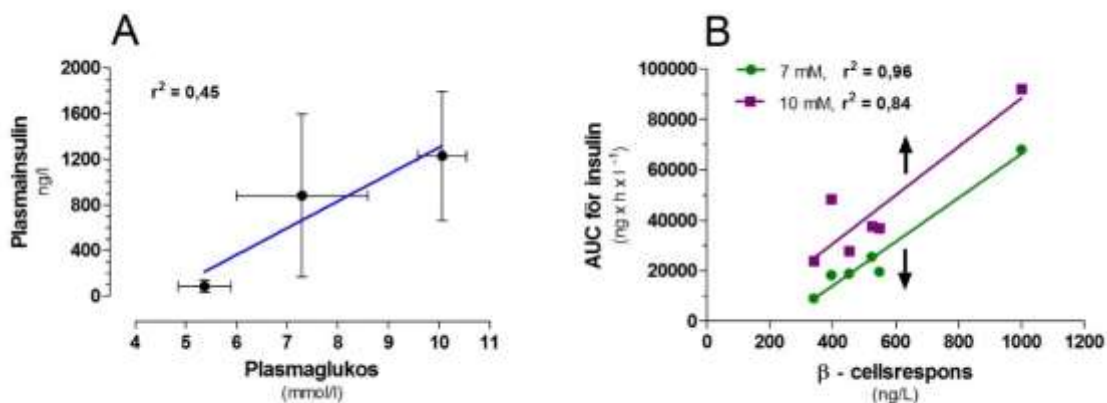


Figur 6. Insulinresponsen uttryckt som AUC för plasmainsulinkoncentrationen mellan 6 och 36 timmar vid målkoncentration för glukos på 7 mmol/l respektive 10 mmol/l. Blå linje representerar medelvärdet och blå linjer representerar SD. Gröna cirklar visar hästarnas individuella värden vid 7 mmol/l och lila fyrkanter visar deras individuella värden vid 10 mmol/l. Asterix anger att det finns signifikant skillnad mellan glukoskoncentrationerna ($P = 0,003$).

I figur 7 redovisas det hyperbola sambandet mellan AUC för plasmainsulinkoncentrationen per timme och insulinkänsligheten (vid målkoncentration 7 mmol/l respektive 10 mmol/l). AUC/timme är ett genomsnittligt värde av totala AUC för perioden dividerat med tiden för den kontinuerliga glukosinfusionen (33 timmar). Korrelationskoefficienten var $r^2 = 0,95$ för målkoncentration 7 mmol/l och $r^2 = 0,88$ för 10 mmol/l. En ökning eller sänkning i glukoskoncentration förändrar inte den hyperbola karaktären på kurvan utan flyttar kurvan uppåt vid en högre glukoskoncentration och neråt vid en lägre glukoskoncentration. Resultaten visar på att den endogena insulinresponsen per timme är starkt relaterad till insulinkänsligheten.



Figur 7. Hyperbolsamband mellan insulinresponsen uttryckt som AUC per timme och insulinkänsligheten (M/I-kvoten) vid olika plasmaglukoskoncentrationer. Grönt representerar målkoncentration för glukos på 7 mmol/l och lila 10 mmol/l. Cirklar och fyrkanter visar hästarnas individuella värden vid respektive glukoskoncentration. Pilarna anger vad som händer med kurvan om glukoskoncentrationen ökas eller sänks.

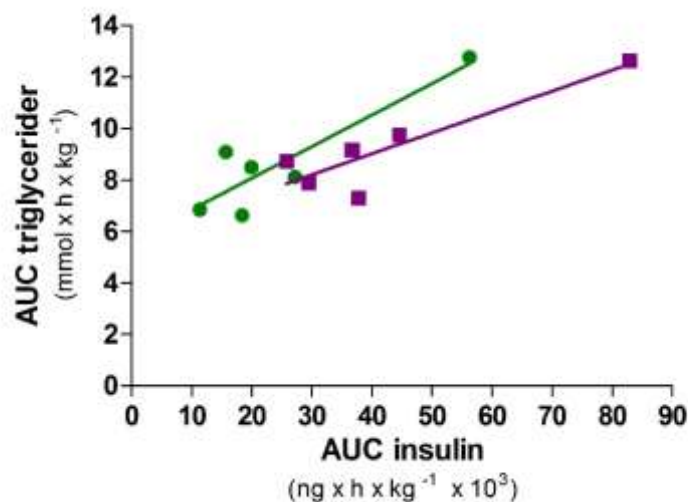


Figur 8. Fig. 8A visar en dosresponskurva mellan glukoskoncentrationen och insulinkoncentrationen. Första punkten avser medelvärde för glukos- och insulinkoncentration vid fasteprovet, mittenpunkten avser medelvärde vid 24 timmar för målkoncentrationen 7 mmol/l och den sista punkten medelvärde vid 24 timmar för målkoncentrationen 10 mmol/l. Error bars visar SD för de tre punkterna. Den blå linjen är en sammanfattande linjär regressionslinje för hästarnas individuella värden. Fig. 8B visar linjärt samband mellan hästarnas β -cellsrespons (ng/L) och deras insulinrespons (AUC) under kontinuerlig glukosinfusion (33 h) med olika målkoncentrationer för glukos. Grönt representerar 7 mmol/l och lila 10 mmol/l. Pilarna anger vad som händer med linjen om glukoskoncentrationen ökas eller sänks.

Det fanns ett linjärt samband ($r^2 = 0,45$) för dosrespons mellan plasmaglukoskoncentrationen och plasmainsulinkoncentrationen vilket visas i fig. 8A. Dosresponskurvan innebär att när glukoskoncentrationen i plasma ökar så ökar även plasmainsulinkoncentrationen. Sambandet är linjärt men linjens lutning kan variera beroende på hästens insulinkänslighet.

Fig. 8B beskriver sambandet mellan hästarnas β -cellsrespons och insulinrespons (AUC) under de kontinuerliga glukosinfusionerna (33 timmar) vid två olika målkoncentrationer för glukos (7 eller 10mmol/l). Förhållandet är linjärt ($r^2 = 0,96$ respektive $r^2 = 0,84$) och grafen visar att om hästens β -cellsrespons ökar så ökar också insulinresponsen under den kontinuerliga glukosinfusionen. Grafen visar också att om glukoskoncentrationen ökar är förhållandet mellan β -cellsresponsen och insulinresponsen fortfarande linjär (de två linjerna är parallella med varandra). Om glukoskoncentrationen under den kontinuerliga infusionen ökas flyttas linjen uppåt i övre pilens riktning och minskas glukoskoncentration flyttas kurvan nedåt i motsatt pils riktning.

Under försöken togs även prover för analys av triglycerider (TG) för att jämföra serumtriglyceridkoncentrationen vid de två olika målkoncentrationerna (7 och 10 mmol/l) och mellan hästar med olika insulinkänslighet. Alla hästarna hade normala TG-värden vid försökens start. Det förelåg ingen skillnad i serumtriglyceridkoncentration mellan de två målkoncentrationerna ($P = 0,66$) men det fanns en effekt av tid ($P < 0,001$). Det fanns ingen interaktion mellan tid och olika glukoskoncentration ($P = 0,19$). Efter HC sågs en sänkning av triglyceridkoncentrationen och sänkningen kvarstod sedan oavsett målkoncentration vid den efterföljande kontinuerliga glukosinfusionen. För att jämföra triglyceridkoncentrationen mellan hästar med olika insulinkänslighet beräknades triglyceridresponsen för respektive häst, uttryckt som AUC för triglyceridkoncentrationen, vilket är ett mått på totala mängden triglycerider under tidsperioden 2 – 36 timmar. Fig. 9 beskriver sambandet mellan triglyceridresponsen och insulinresponsen (här uttryckt som AUC för insulin vid samma mätpunkter som TG, dvs. vid 2, 12, 24 och 36 h) över tid. Triglyceridresponsen ökar proportionerligt med en ökad insulinrespons ($r^2 = 0,80$ respektive $r^2 = 0,80$) under en kontinuerlig glukosinfusion vid båda målkoncentrationerna för glukos (7 och 10 mmol/l). De två linjära regressionslinjerna var parallella med varandra (nollhypotesen om samma lutning kunde inte förkastas, $P = 0,18$).



Figur 9. Grafen visar triglyceridresponsen (AUC för serumtriglyceridkoncentrationen) i relation till insulinresponsen (AUC för plasmainsulinkoncentrationen) över tiden 2 – 36 h. Gröna cirklar representerar de individuella hästarna vid glukoskoncentration 7 mmol/l och de lila fyrkanterna är varje häst vid glukoskoncentration 10 mmol/l.

DISKUSSION

Hyperglykemisk clamp

Hyperglykemisk clamp genomfördes för att undersöka hästarnas insulinkänslighet. Att det fanns en variation i M-värde och M/I-kvot mellan hästarna i studien visar att de hade olika insulinkänslighet. β -cellsresponsen varierade också mellan hästarna vilket betyder att den endogena insulinfrisättningen skiljde sig mellan olika individer vid samma plasmaglukoskoncentration. β -cellsresponsen var exponentiellt avtagande i förhållande till insulinkänsligheten (hyperbolt samband) vilket innebär att hos en häst med från början hög insulinkänslighet kommer förändringar i insulinkänslighet ge liten effekt på β -cellsresponsen medan hos en häst med låg insulinkänslighet ses stor effekt på β -cellsresponsen redan vid mindre förändringar. Hyperbolt samband mellan β -cellsresponsen har tidigare visats hos människa (Kahn *et al.*, 1993; Pacini, 2006). Resultaten från den här studien stödjer teorin att samma hyperbola samband även finns hos häst.

Hyperglykemisk clamp är en metod för att bestämma insulinkänsligheten men det finns andra. Den metod som anses vara *golden standard* är EHC. Principen för en EHC är att bibehålla plasmaglukoskoncentrationen konstant vid en bestämd nivå av hyperinsulinemi (Kronfeld *et al.*, 2005). Exogent insulin ges som infusion för att uppnå en förutbestämd hyperinsulinemisk plåtå vilken hämmar den endogena insulinfrisättningen. Plasmaglukoskoncentration hålls konstant med hjälp av glukosinfusion i varierande hastighet. Den infusionshastighet av glukos som krävs för att hålla glukoskoncentrationen i plasma konstant under hyperinsulinemin blir ett mått på mängden glukos som tas upp av vävnaden. Eftersom insulinkoncentrationen är densamma i hela testgruppen vid en EHC ger den ett säkrare mått på insulinkänsligheten hos den perifera vävnaden än en HC där insulinfrisättningen är beroende av respektive individs β -

cellsrespons (Rijnen & van der Kolk, 2003). Nackdelen är att du inte kan kvantifiera β -cellsresponsen, som du kan göra vid en HC.

Det är troligt att glukosupptaget i icke-insulinberoende vävnad stiger vid en hyperglykemi eftersom det blir en ökning i koncentrationsgradienten mellan plasma och cellernas glukoskoncentration. En studie (Suagee *et al.*, 2011) visade på förhöjda nivåer av GLUT-1 i skelettmuskulatur efter sex timmar hyperglykemi vilket kan betyda ett ökat icke insulinberoende upptag av glukos. En liten del av den glukos som tillförs via infusionen kommer alltså tas upp via icke-insulinberoende GLUT-1 vilket betyder att M-värdet kommer verka något högre än det är. Effekten av det icke-insulinberoende upptaget på M-värdet blir mindre vid en EHC då euglykemi tillämpas eftersom koncentrationsgradienten av glukos blir mindre.

Kontinuerlig glukosinfusion och effekten på insulinresponsen

Det tog längre tid att nå *steady state* vid målkoncentration för glukos på 7 mmol/l än vid målkoncentration på 10 mmol/l. Det beror troligen på att glukoskoncentrationen sänktes i det första fallet men inte i det andra (glukoskoncentration vid HC var 10 mmol/l) vilket ger en förskjutning av *steady state* då systemet anpassar sig till den nya glukoskoncentrationen.

Vid båda behandlingstillfällena hade en av hästarna avvikande insulin- och triglyceridrespons. Eftersom studien var designad som en cross over och det var samma häst som avvek båda gångerna var det sannolikt ingen slump och resultatet visar på en variation i studiepopulationen.

En kontinuerlig glukosinfusion med en högre målkoncentration (10 mmol/l) gav en signifikant högre insulinrespons än vid en lägre målkoncentration (7 mmol/l). Insulinsvaret var generellt linjärt dosberoende av plasmaglukoskoncentrationen. Insulinresponsen var starkt relaterat till hästens β -cellsrespons och således också till insulinkänsligheten (hyperbolt samband mellan insulinkänslighet och insulinrespons). En högre β -cellsrespons gav en högre insulinrespons vid behandling med en kontinuerlig glukosinfusion över en längre tid (33 h) och detta förhållande var linjärt. Således blir den endogena insulinresponsen (under en längre tids kontinuerlig glukosinfusion) alltid beroende av behandlingens glukoskoncentration, men påverkas också av hästens β -cellsrespons (och därmed insulinkänslighet).

Effekt på fettmetabolismen

Triglyceridresponsen motsvarar den totala mängden triglycerider i blodet under glukosinfusionen (2 – 36 timmar). En hög triglyceridrespons betyder att mindre mängd triglycerider har eliminerats. Det fanns ett linjärt samband mellan triglyceridresponsen och insulinresponsen, där en ökning av insulinresponsen gav en proportionerlig ökning av triglyceridresponsen. Det betyder i förlängningen att hos en häst med hög insulinkänslighet eliminerades större mängd triglycerider än hos en häst med låg insulinkänslighet (=mer insulinresistent). Däremot sågs ingen skillnad i triglyceridrespons mellan de olika glukoskoncentrationerna för samma häst – alltså gav 7 mmol/l samma eliminering av triglycerider som 10 mmol/l hos respektive häst.

När hästarnas individuella data för plasmainsulinkoncentrationerna över tid vid de olika målkoncentrationerna för glukos (7 respektive 10 mmol/l) studeras ses att en individ (häst D) sticker ut oavsett målkoncentration (se fig. 5). Mer insulin i blodet vid en given glukoskoncentration betyder att hästen är mer insulinresistent (hög insulinrespons – lägre insulinkänslighet – mer insulinresistent) och det är sannolikt svårare att påverka fettmetabolismen hos en sådan häst jämfört med en mindre resistent häst. Eftersom vi inte kan påverka hästens insulinkänslighet med glukosbehandlingen kan vi enbart påverka glukoskoncentrationen för att höja eller sänka insulinresponsen. Resultaten från den här studien tyder dock på att en höjning av glukoskoncentrationen ger en ökning av insulinresponsen men den har inte någon ökad effekt på triglyceridsänkningen.

Effekter vid fysiologisk stress

Grundläggande kunskaper om hur en behandling påverkar en frisk häst är en förutsättning för att kunna dra slutsatser om hur samma behandling kommer att påverka en sjuk häst. Alla hästarna i studien var kliniskt friska och hade normala triglyceridvärden vid start för försöket. Hur förhållandena ser ut hos kritiskt sjuka hästar med en störd energimetabolism går inte att uttala sig om utifrån resultaten i studien då många fler aspekter kan påverka vid sjukdom (eller annan fysiologisk stress) så som inflammationsmediatorer och stresshormoner. Hästarnas varierande grad av insulinkänslighet kan dock ge en bild av vilken effekt utvecklandet av en insulinresistens har på insulin- och triglyceridresponsen.

Idag är den vanliga behandlingsstrategin en kontinuerlig intravenös glukosinfusion med en blodglukoskoncentration runt 10 mmol/l men det finns endast få publicerade studier där behandlingens effekt på hyperlipidemier har undersökts. Behandling med glukosinfusion vid en lägre glukoskoncentration skulle kunna minska riskerna som en hyperglykemi kan innebära (t.ex. glukotoxicitet, glukosuri och ökad diures (Reed *et al.*, 2004)). Det krävs dock studier på kritiskt sjuka hästar för att undersöka om en lägre glukoskoncentration har samma effekt på triglyceridkoncentrationen hos sjuka individer med en rubbad energibalans.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Asplin, K. E., M. N. Silience, C. C. Pollitt, and C. M. McGowan, 2007, Induction of laminitis by prolonged hyperinsulinaemia in clinically normal ponies: *Veterinary Journal*, v. 174, p. 530-535.
- Carr, E. A., 2009, Nutrition of Critically Ill Horses: *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice*, v. 25, p. 93-+.
- de Laat, M. A., C. M. McGowan, M. N. Silience, and C. C. Pollitt, 2010, Equine laminitis: Induced by 48 h hyperinsulinaemia in Standardbred horses: *Equine Veterinary Journal*, v. 42, p. 129-135.
- Defronzo, R. A., J. D. Tobin, and R. Andres, 1979, GLUCOSE CLAMP TECHNIQUE - METHOD FOR QUANTIFYING INSULIN-SECRETION AND RESISTANCE: *American Journal of Physiology*, v. 237, p. E214-E223.
- Dunkel, B., and H. C. McKenzie, 2003, Severe hypertriglyceridaemia in clinically ill horses: diagnosis, treatment and outcome: *Equine Veterinary Journal*, v. 35, p. 590-595.
- Durham, A. E., and A. K. Thiemann, 2015, Nutritional management of hyperlipaemia: *Equine Veterinary Education*, v. 27, p. 482-488.
- Frank, N., R. J. Geor, S. R. Bailey, A. E. Durham, and P. J. Johnson, 2010, Equine Metabolic Syndrome: *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 24, p. 467-475.
- Geor, R. J., 2010, Current Concepts on the Pathophysiology of Pasture-Associated Laminitis: *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice*, v. 26, p. 265-+.
- Hughes, K. J., D. R. Hodgson, and A. J. Dart, 2004, Equine hyperlipaemia: A review: *Australian Veterinary Journal*, v. 82, p. 136-142.
- Kahn, S. E., R. L. Prigeon, D. K. McCulloch, E. J. Boyko, R. N. Bergman, M. W. Schwartz, J. L. Neifing, W. K. Ward, J. C. Beard, J. P. Palmer, and D. Porte, 1993, QUANTIFICATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN INSULIN SENSITIVITY AND BETA-CELL FUNCTION IN HUMAN-SUBJECTS - EVIDENCE FOR A HYPERBOLIC FUNCTION: *Diabetes*, v. 42, p. 1663-1672.
- Klinkhamer, K., P. P. C. A. Menheere, and J. H. van der Kolk, 2011, Basal glucose metabolism and peripheral insulin sensitivity in equine pituitary pars intermedia dysfunction: *Veterinary Quarterly*, v. 31, p. 19-28.
- Kronfeld, D. S., K. H. Treiber, and R. J. Geor, 2005, Comparison of nonspecific indications and quantitative methods for the assessment of insulin resistance in horses and ponies: *Javma-Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 226, p. 712-719.
- Magdesian, K. G., 2010, Parenteral nutrition in the mature horse: *Equine Veterinary Education*, v. 22, p. 364-371.
- McKenzie, H. C., III, 2011, Equine Hyperlipidemias: *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice*, v. 27, p. 59-+.
- Muniyappa, R., S. Lee, H. Chen, and M. J. Quon, 2008, Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage: *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 294, p. E15-E26.
- Pacini, G., 2006, The hyperbolic equilibrium between insulin sensitivity and secretion: *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*, v. 16, p. S22-S27.
- Stephen M. Reed, Warwick M. Bayly, and Debra C. Sellon (2004) *Equine Internal Medicine* 2nd ed. Elsevier (USA) ISBN: 978-0-7216-9777-2
- Rijnen, K., and J. H. van der Kolk, 2003, Determination of reference range values indicative of glucose metabolism and insulin resistance by use of glucose clamp techniques in horses and ponies: *American Journal of Veterinary Research*, v. 64, p. 1260-1264.

- Schuver, A., N. Frank, K. A. Chameroy, and S. B. Elliott, 2014, Assessment of Insulin and Glucose Dynamics by Using an Oral Sugar Test in Horses: *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 34, p. 465-470.
- Shulman, G. I., 2000, Cellular mechanisms of insulin resistance: *Journal of Clinical Investigation*, v. 106, p. 171-176.
- Sjaastad, Ø. V., Sand O., Hove K. (2010). *Physiology of Domestic Animals*. 2. uppl. Oslo: Scandinavian Veterinary Press.
- Suagee, J. K., B. A. Corl, M. W. Hulver, L. J. McCutcheon, and R. J. Geor, 2011, Effects of hyperinsulinemia on glucose and lipid transporter expression in insulin-sensitive horses: *Domestic Animal Endocrinology*, v. 40, p. 173-181.
- Toth, F., N. Frank, S. B. Elliott, R. J. Geor, and R. C. Boston, 2008, Effects of an intravenous endotoxin challenge on glucose and insulin dynamics in horses: *American Journal of Veterinary Research*, v. 69, p. 82-88.
- Vick, M. M., B. A. Murphy, D. R. Sessions, S. E. Reedy, E. L. Kennedy, D. W. Horohov, R. F. Cook, and B. R. Fitzgerald, 2008, Effects of systemic inflammation on insulin sensitivity in horses and inflammatory cytokine expression in adipose tissue: *American Journal of Veterinary Research*, v. 69, p. 130-139.
- Waitt, L. H., and C. K. Cebra, 2009, Characterization of hypertriglyceridemia and response to treatment with insulin in horses, ponies, and donkeys: 44 cases (1995-2005): *Javma-Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 234, p. 915-919.
- Watson, T. D. G., and S. Love, 1994, EQUINE HYPERLIPIDEMIA: Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian, v. 16, p. 89-98.
- Watson, T. D. G., D. Murphy, and S. Love, 1992, EQUINE HYPERLIPIDEMIA IN THE UNITED-KINGDOM - CLINICAL-FEATURES AND BLOOD BIOCHEMISTRY OF 18 CASES: *Veterinary Record*, v. 131, p. 48-51.
- Xu, H. Y., G. T. Barnes, Q. Yang, Q. Tan, D. S. Yang, C. J. Chou, J. Sole, A. Nichols, J. S. Ross, L. A. Tartaglia, and H. Chen, 2003, Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance: *Journal of Clinical Investigation*, v. 112, p. 1821-1830.