



# IGF-1 hos häst

- Analysmetodik och träningseffekter

---

*IGF in horses – Methods of analyses and effects of exercise*

Amanda Segervall

Självständigt arbete • 15hp  
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU  
Institutionen för anatomi, fysiologi och biologi  
Husdjursagronoms programmet  
Uppsala 2020



# IGF-1 hos häst – Analysmetodik och träningseffekter

Amanda Segervall

**Handledare:** Anna Jansson, SLU, inst. för anatomi, fysiologi och biokemi  
**Bitr. handledare:** Lisa Johansson, inst. anatomi, fysiologi och biokemi  
**Examinator:** Kristina Dahlborn, SLU, inst. för anatomi, fysiologi och biokemi

**Omfattning:** 15hp  
**Nivå och fördjupning:** Grundnivå, G2E  
**Kurstitel:** Självständigt arbete i husdjursvetenskap  
**Kurskod:** EX0865  
**Program/utbildning:** Agronomprogrammet - Husdjur  
**Kursansvarig inst.:** Institutionen för husdjurens utfodring och vård

**Utgivningsort:** Uppsala  
**Utgivningsår:** 2020  
**Omslagsbild:** Fotograf: Amanda Segervall

**Nyckelord:** Equine, Häst, IGF-1, Träning

## Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

## Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Fulltexten kommer dock i samband med att dokumentet laddas upp arkiveras digitalt.

Om ni är fler än en person som skrivit arbetet så gäller krysset för alla författare, ni behöver alltså vara överens. Mer information om publicering och arkivering går att hitta här: <https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.

## Sammanfattning

Hästsporten i Sverige är stor och vi är konkurrenskraftiga i internationella tävlingar. En viktig faktor som påverkas av både fysisk aktivitet, energi- och proteintillförsel är insulin growth factor-1 (IGF-1) som är ett hormon som bland annat stimulerar ben- och muskeltillväxt.

Syftet med det här arbetet var att beskriva vilka metoder som använts för att analysera IGF-1 i plasma och serum på häst och undersöka hur många studier på arbetande hästar som finns där IGF-1 analyserats (DEL 1). Syftet var också att undersöka om koncentrationen av IGF-1 i blodplasman skiljer sig mellan två grupper av travhästar som följt träningsprogram med två olika träningsintensitet (DEL 2). Min hypotes för försöket var att koncentrationen av IGF-1 inte skulle skilja sig signifikant mellan hästarna som följt de olika träningsprogrammen.

För att svara på syftet i DEL 1 gjordes en överskådlig sammanfattning (tabell) över vilka studier som finns tillgängliga i Web of Science och Scopus vid en sökning på orden "exercise, horse och IGF-1". Tabellen bestod av åtta artiklar och analysmetoden ELISA var den mest förekommande. Det visade sig att det inte finns några studier som fått tydliga resultat på hur koncentrationen av IGF-1 i plasma påverkas av olika träningsintensiteter och många studier har inte kontroll över viktiga faktorer som exempelvis protein- och energiintaget. Det finns dock studier vars resultat pekar mot att IGF-1 ger flera gynnsamma effekter på till exempel hästens skelett- och broskuppbyggnad.

I DEL 2 i denna studie analyserades IGF-1 koncentrationen i plasmaprover från två grupper av hästar på samma foderstat men som följt separata träningsprogram med olika träningsintensitet. Den statistiska analysen visade ingen signifikant skillnad mellan IGF-1-koncentrationerna mellan de två grupperna. Att det inte blev någon signifikant skillnad kan bero på att skillnaderna i träningsprogrammen var för små eller att det eventuellt är lättare att upptäcka skillnader efter fysiskt arbete i IGF-1-koncentrationer hos hästar före könsmognad.

*Nyckelord:* Equine, Häst, IGF-1, Träning

## Abstract

Equestrian sports in Sweden are expanding and we are competitive in international competitions.

An important factor that is affected by both exercise and the supply of energy- and protein is insulin growth factor-1 (IGF-1), which is a hormone that for example stimulates both bone- and muscle growth.

The aim of this study was to describe the methods used to analyse IGF-1 in plasma or serum of horses and to investigate how many studies on working horses there are where IGF-1 has been analysed (PART 1). The purpose was also to investigate whether the concentration of IGF-1 in blood plasma differs between two groups of Standardbred horses following training programs with different exercise intensity (PART 2). My hypothesis for the experiment was that the concentration of IGF-1 would not differ significantly between horses following different training programs.

To answer the questions in PART 1 a summary (table) has been compiled. The results showed that ELISA was a common method used to analyse IGF-1. Eight publications were found in Web of Science and Scopus when the search "exercise, horse and IGF-1" were used. There were no clear results on how the concentrations of IGF-1 in plasma would occur at different exercise intensities. There are, however, studies that indicate that IGF-1 have several beneficial effects on the horse's skeletal and cartilage structure.

In PART 2 the statistical test showed no significant difference between horses who had followed different training programs.

*Keywords:* Equine, Exercise, Horse, IGF-1

# Innehållsförteckning

<b>1. Introduktion .....</b>	<b>7</b>
<b>2. IGF-1.....</b>	<b>8</b>
2.1. Verkningsmekanismer.....	9
<b>3. DEL 1: Analysmetodik och bibliometri .....</b>	<b>11</b>
3.1. Analys av IGF-1 .....	11
3.1.1. Enzymkopplad immunoabsorberande analys .....	11
3.1.2. Radioimmunoanalys .....	12
3.2. Bibliometri.....	13
3.3. Föreslagna effekter på hästar.....	17
<b>4. DEL 2: Syfte och hypotes.....</b>	<b>18</b>
4.1. Studiens design och hästar .....	18
4.2. Analys.....	19
4.3. Statistisk analys .....	20
<b>5. Resultat.....</b>	<b>21</b>
<b>6. Diskussion och slutsats.....</b>	<b>22</b>
<b>7. Referenser.....</b>	<b>25</b>

## Förkortningar

CV	Koefficienten av variation (Coefficients of variation)
ELISA	Enzymkopplad immunoabsorberande analys (Enzyme-linked immunosorbent assay)
GH	Growth hormone
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
RIA	Radioimmunoanalyser (Radioimmunoassays)

# 1. Introduktion

Hästsporten i Sverige expanderar och vi är konkurrenskraftiga i internationella tävlingar. Vi lägger stor vikt på djurväl-färden samtidigt som vi vill prestera. Forskningen inom hästsporten har därför ökat på senare tid. En upptäckt är att growth hormone (GH), som frisätts vid fysiskt arbete, stimulerar levern och andra vävnader att producera Insulin-like growth factor-1 (IGF-1). IGF-1 är en komponent som verkar vara viktig ur ett prestationssammanhang då det stimulerar tillväxt av kroppsmassa (Sjaastad *et al.* 2016) samt att IGF-1 kan gynna ben- och brosktillväxt (Jackson *et al.* 2003; Fortier *et al.* 2005). IGF-1 i plasma används också som en markör för att upptäcka dopning med GH (Noble *et al.* 2007). Det har även föreslagits att IGF-1 kan användas som en indikator på tidig överträning (de Graaf-Roelfsema *et al.* 2007). En ökad förståelse kring vad som påverkar frisättningen av IGF-1 och dess mekanismer kan vara användbart i flera olika sammanhang och inte minst för att utforma träningsprogram för hästar som kan förbättra prestationen och välfärden parallellt.

Transporten av IGF-1 i kroppen sker i blodet genom att det binder till specifika transportproteiner. Detta möjliggör analys av den cirkulerande IGF-1-koncentrationen i blodet, vilket följaktligen skapar möjligheten att undersöka om det uppstår skillnader i frisättning efter att olika träningsprogram har följts (Noble *et al.* 2007).

Syftet med det här arbetet var att beskriva vilka metoder som använts för att analysera IGF-1 på häst och undersöka hur många studier på arbetande hästar som finns där IGF-1 analyserats (DEL 1). Syftet var också att undersöka om koncentrationen av IGF-1 i blodplasman skiljer sig mellan två grupper av travhästar som följt träningsprogram med två olika träningsintensiteter (DEL 2). Min hypotes för försöket var att koncentrationen av IGF-1 inte skulle skilja sig signifikant mellan hästarna som följt de olika träningsprogrammen.

## 2. IGF-1

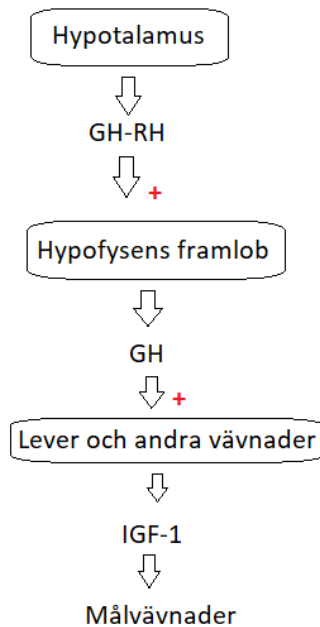
IGF-1 är ett peptidhormon bestående av 70 aminosyror i en enkel peptidkedja (Sjaastad *et al.* 2016) som har en anabol påverkan på flera vävnader (Jackson *et al.* 2003). IGF-1 kan ha endokrin, parakrin och autokrin effekt (Tabell 1).

Tabell 1. Förklaring av endokrin-, parakrin- och autokrin signalering av hormoner med exempel utifrån IGF-1

	Endokrin	Parakrin	Autokrin
Fysiologisk definition	Hormoner transporteras från endokrina celler till målceller via blodet (Heindel & Treinen 1989).	Lokala hormoner transporteras från en endokrincell till närliggande målceller via extracellulärvätskan (Sjaastad <i>et al.</i> 2016).	Lokala hormoner påverkar samma cell som producerar och frisätter dem (Heindel & Treinen 1989).
Exempel, IGF-1	När GH binder till sin receptor i levern stimuleras frisättning av IGF-1 som via blodet transporteras till andra vävnader, detta ger IGF-1 en endokrinfunktion (Delafontaine <i>et al.</i> 2004).	IGF-1 produceras i sertolieceller och verkar på närliggande testikelceller exempelvis leydigceller (Heindel & Treinen 1989).	IGF-1 produceras i sertolicellerna i testikeln och verkar även på samma celler för att inducera celltillväxt (Heindel & Treinen 1989).

Träning i form av fysiskt arbete kan vara ett stimuli för att hypotalamus ska frisätta Growth hormone-releasing hormone (GH-RH) som stimulerar frisättning av GH i hypofysen. GH stimulerar främst levern men även andra vävnader att producera IGF-1 (Figur 1).





Figur 1. Schematisk bild över hur frisättning av IGF-1 stimuleras. Det centrala nervsystemet stimulerar hypotalamus att producera growth hormone-releasing hormone (GH-RH), vid exempelvis träning. GH-RH stimulerar sedan hypofysens framlob att producera GH som stimulerar lever och andra vävnader att producera och frisläppa IGF-1 som sedan transporteras till dess målvävnad. Omgjord efter Sjaastad *et al.* (2016).

Sekretionen av IGF-1 påverkas även av hästarnas nutrition (Sticker *et al.* 1995; Salazar-Ortiz *et al.* 2014). Salazar-Ortiz *et al.* (2014) såg att hästar som endast blev utfodrade med 60% av sitt energibehov fick en lägre IGF-1 koncentration i plasma i jämförelse med om hela energibehovet blev uppnått. I en annan studie gjord av Sticker *et al.* (1995) undersöktes bland annat om IGF-1- och GH koncentrationen i blodplasma hos hästar påverkades av 50% restriktion av både energi- och proteinbehovet samtidigt och/eller var för sig. I alla försöksgrupper sågs en minskning i koncentrationen av IGF-1 i plasma. De konstaterade att minskningen inte korrelerade med förändringen i GH-koncentrationen, då den var oförändrad eller ökade. De drog istället slutsatsen att frisättningen från vävnaderna som själva syntetiserar IGF-1 inhiberades av energi- och näringsbristen (Sticker *et al.* 1995).

## 2.1. Verkningsmekanismer

Transporten av IGF-1 i kroppen sker via blodet genom att det binder till specifika transportproteiner, IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 och -6 (Firth & Baxter 2002). Denna bindning är stark och det resulterar i att halveringstiden för IGF-1 blir relativt lång, ca 20 timmar (Fortier *et al.* 2005). Transportproteinerna kan även hjälpa till vid bindningen till IGF-1s receptorer, som kan hittas i exempelvis brosk, epitelceller och ben (Verwilghen *et al.* 2009). Innan IGF-1 binder till sin receptor dimeriseras den, vilket betyder att två IGF-1 peptider slås ihop för att sedan kunna aktivera

receptorn, som också dimeriseras (två receptorer slås ihop). När IGF-1-dimeren har bundit till receptor-dimeren induceras en tyrosinkinase aktivitet intracellulärt på de intracellulära delarna av receptorerna. Samma delar blir sedan autofosforylerade, vilket betyder att receptorn fosforylerar sig själv (Sjaastad *et al.* 2016). Efter autofosforyleringen kan den aktiverade receptorn fosforylera andra substrat som består av tyrosin, vilket till sist leder till att exempelvis komplex som styr celltillväxt aktiveras (LeRoith *et al.* 1995). Detta sker bland annat i kondrocyterna i tillväxtzonen i vissa skelettben (Sjaastad *et al.* 2016).

Det verkar som att koncentrationen av IGF-1 i plasma kan vara en bra indikator för att bestämma dess verkningsmekanismer i kroppen. Fortier *et al.* (2005) kunde nämligen i sin studie korrelera koncentrationen av både IGF-1 och IGFBP-3 i plasma till könsmognaden hos häst. I deras analys såg de toppar i koncentrationerna precis innan könsmognadsprocessen påbörjades, vid ca. 8,3 månaders ålder. Nivåerna hade sedan stabiliserats igen vid 15 månaders ålder. Deras slutsats var att hästar utvecklar könsmognad mellan 8,3–15 månaders ålder och efter det kan ses som fullt köns mogna. De såg även att koncentrationerna av IGF-1 och IGFBP-3 var korrelerade med broskets utveckling hos hästar i åldern 4 – 28 månader (Fortier *et al.* 2005).

## 3. DEL 1: Analysmetodik och bibliometri

### 3.1. Analys av IGF-1

Som tidigare nämnts kan IGF-1 binda till transportproteiner i blodet. Bindningen gör så att koncentrationen av IGF-1 blir stabil under hela dygnet och möjliggör analys av både den fria och den bundna koncentrationen av IGF-1 i blodets plasma och serum, exempelvis med analysmetoderna Enzymkopplad immunoabsorberande analys, ELISA (Fortier *et al.* 2005) eller radioimmunoanalys, RIA (Baskerville *et al.* 2017).

#### 3.1.1. Enzymkopplad immunoabsorberande analys

ELISA används för att uppskatta mängden specifika antigen eller antikroppar i ett prov (Aydin 2015), exempelvis blodplasma eller -serum (Baskerville *et al.* 2017). Enligt Aydin (2015) finns det olika typer av ELISA men principen är den samma. Utförandet sker antingen i rör eller i mindre brunnar på en platta. Rörens och brunnarnas väggar är täckta av antikroppar eller antigen mot det aktuella ämnet som ska undersökas. Provet som ska undersökas hålls ner i rören eller brunnarna och därefter bildas ett antigen-antikroppskomplex som fäster i väggarna, resten tvättas sedan bort. Till sist analyseras koncentrationen av den specifika antigenen eller antikroppen som bildat komplexet (Aydin 2015).

För att uttrycka precisionen, eller repeterbarheten, av immunoanalysens testresultat använder sig forskare oftast av två mått; variationskoefficienten (CV) för flera analyser av samma prov på samma provplatta (intra-assay CV) och CV för samma prov analyserat på olika provplattor (inter-assay CV) (Jansson, 2020).

#### *Intra- och inter-assay variation*

De flesta studier mäter varje prov i duplikat i varje analys. I vilken grad duplikaten skiljer sig kan uttryckas genom att beräkna standardavvikelsen för de två resultaten och konvertera dem till CV. Testning av varje prov med större antal replikat skulle ge statistiskt bättre resultat för standardavvikelsen och beräkningen av CV, men detta är dyrare. I större studier med många prover som ska testas är det nödvändigt

att prover körs på flera analysplattor. Varje platta körs med sina egna kalibratorer för standardkurvan, och kontroller med kända koncentrationer av det som ska undersökas, vanligtvis ett högt och ett lågt värde. Inter-assay CV är ett uttryck för hur konsekventa medelvärdena är från platta till platta. Det är beräknat från medelvärdena från de höga och de låga kontrollerna på varje platta (Gumucio, 2020).

Det finns få tillgängliga ELISA-kit utformade för analys av IGF-1 hos häst, därför används ofta kit utformade för människor istället (Baskerville *et al.* 2017). Otte *et al.* (1996) såg i sin studie att hästars IGF-1 nukleotidsekvens är identisk med människans, varför det föreslogs att immunoanalyser framtagna för mänskligt IGF-1 kan användas till häst (Ropp *et al.* 2003). Detta utvärderades vidare av Baskerville *et al.* (2017) genom att först beräkna intra-assay CV och inter-assay CV för tre olika kit och sedan jämföra uppmätta koncentrationer av IGF-1 från varje ELISA-kit med koncentrationerna som Noble *et al.* (2007) fick fram i sin studie, där de använde sig av RIA. Baskerville *et al.* (2017) satte en gräns på att CV max skulle vara 10 % för både inter- och intra-assay. Det var endast ett av de tre studerade ELISA-kiten som klarade denna gräns. Samma kit var även det enda som kom tillräckligt nära de nivåer som Noble *et al.* (2007) observerade i sin studie. Baskerville *et al.* (2017) drog slutsatsen att detta ELISA-kit, som var utformat för att mäta mänskligt IGF-1 i serum, var det mest tillförlitliga vid analys av IGF-1 i plasma hos häst.

### 3.1.2. Radioimmunoanalys

RIA är en metod som ofta används när stora data ska analyseras (Shen *et al.* 2019). Vid en RIA-analys är testplattans brunnar täckt med en specifik antikropp för det man vill analysera i sitt prov. En viss mängd antigen eller hormon som är märkt med en radioaktivmolekyl tillsammans med ett prov innehållande det som ska analyseras i samma brunn. Principen går ut på att det märkta antigenet eller hormonet binder till antikropparna och bildar ett märkt antigen-antikropps-komplex. Sedan konkurrerar omärkta antigen eller hormon från det tillsatta provet om antikropparna. Det leder till att bindningen mellan antikropp och märkt antigen/hormon inhiberas, det vill säga ju högre koncentration omärkt antigen/hormon som provet innehåller ju mindre radioaktiv-märkta antigen/hormoner är bundna till antikroppar. Själva beräkningen av koncentrationen i provet går ut på att jämföra den hämningen som observerats i RIA med redan kända hämningar som producerats av standardlösningar innehållande kända mängder hormon (Berson & Yalow 1968; Shen *et al.* 2019).

## 3.2. Bibliometri

En sökning i databaserna Web of Science och Scopus på orden ”IGF-1, horse och exercise” gav 15 respektive 5 träffar, i maj 2020. Vissa artiklar hade jag ej åtkomst till samt att vissa artiklar visades som träffar i båda sökmotorerna, därför innehåller Tabell 2 åtta artiklar. Det finns artiklar som undersökt hur IGF-1-koncentrationen i plasma och serum analyseras på bästa sätt (Lygren *et al.* 2013; Baskerville *et al.* 2017, tabell 2) samt om det är möjligt att analysera IGF-1 i senvävnadsextrakt (Lygren *et al.* 2013, tabell 2). Sedan finns det artiklar där sambandet mellan IGF-1-koncentrationen och andra hormoner eller metaboliter i serum eller plasma har studerats (Cartmill *et al.* 2003; Jackson *et al.* 2003; Fortier *et al.* 2005; de Graaf-Roelfsema *et al.* 2007; Fenger *et al.* 2014, tabell 2), där Jackson *et al.* (2003) och Fortier *et al.* (2005) inkluderade hur IGF-1-koncentrationen samspelar med ben- och broskmetabolismen. Ett fåtal artiklar har undersökt hur IGF-1 koncentrationen i serum eller plasma förändras efter träning i form av fysiskt arbete hos häst (Jackson *et al.* 2003; Noble *et al.* 2007, tabell 3).

Tabell 2. Översikt över tidigare publicerade artiklar i Web of Science och Scopus med sökorden: ”IGF-1”, ”Horse” och ”Exercise”

Studie	Syfte	Hästar och foderstat (K= känd foderstat, O= okänd)	Ålder	Typ av studie	Koncentration av uppmätt IGF, pg/L (K=kontrollgrupp B=behandling)	Tidskrift / Typ av publikation
de Graaf-Roelfsema <i>et al.</i> (2007)	Jämföra effekter av överträning hos människa och häst	-	-	Review	-	Veterinary Quarterly
Noble <i>et al.</i> (2007)	Undersöka hur faktorer som träning, tid på dagen, kön och ålder påverkar IGF-1 i serum hos friska hästar.	(1 <sup>i</sup> ) 6 valacker. K (2 <sup>ii</sup> ) 8 valacker. O (3 <sup>ii</sup> ) 2 valacker, 1 hingst & 1 sto. O (4 <sup>ii</sup> ) 12 valacker. O (5 <sup>ii</sup> ), 734 ston, 307 hingstar & 782 valacker. O	(1 <sup>ii</sup> ) 2-13år, (2 <sup>ii</sup> ) 2 - 8 år, (3 <sup>ii</sup> ) 7-12år, (4 <sup>ii</sup> ) 2-13år, (5 <sup>ii</sup> )1-29år	Grupperna 1-5 jämfördes	(1 <sup>ii</sup> ) 382 ± 9 (2 <sup>ii</sup> ) medel ~ 400 (3 <sup>ii</sup> ) medel ~ 200 (4 <sup>ii</sup> ) 290 (5 <sup>ii</sup> ) 310 ± 2	Journal of Animal Science

<sup>i</sup> Vilken grupp av hästar som det syftar till. Ex. Grupp 1 bestod av 6 valacker i åldern 2 – 13 år.

Jackson <i>et al.</i> (2003)	Utvärdera förändringar i IGF-1 och biokemiska markörer i serum för benmetabolism vid olika arbeten.	12 fullblods ston. K <sup>ii</sup>	18–21 mån.	Behandling / kontrollgrupp	<sup>iii</sup> Vecka 0: K: 145 ± 16 B: 171 ± 11 Vecka 20: K: 222 ± 19 B: 149 ± 19	American Journal of Veterinary Research
Baskerville <i>et al.</i> (2017)	Jämföra olika ELISA-kit för IGF-1-analys i blodplasman.	(1 <sup>iv</sup> ). 6 travhästar. O (2 <sup>iv</sup> ). 6 ponnys. O (3 <sup>iv</sup> ). 6 Andalusierkorsningar O	(1 <sup>iv</sup> ). 6–16 år (2 <sup>iv</sup> ). 6 – 17 år (3 <sup>iv</sup> ). 7 – 14 år	Kiten jämfördes med varandra	(1 <sup>iv</sup> ) 123 <sup>v</sup> (2 <sup>iv</sup> ) 174 <sup>vi</sup> (3 <sup>iv</sup> ) 125 <sup>vi</sup>	Open Veterinary Journal
Fortier <i>et al.</i> (2005)	Fastställa normala värden för IGF-1 och IGF-1 och IGF-1 och IGF-1 före- och efter könsmognad hos fullblodshästar, samt korrelera dessa med förändringar i artikulär broskstruktur mellan olika åldrar.	44 fullblodsston och 56 fullblodshingstar. O	9 – 715 dagar	Tvärsnittsstudie	Dag 0–224: 311 ± 21 Dag 224 – 715: 543 ± 68	Equine Veterinary Journal
Cartmill <i>et al.</i> (2003)	Att undersöka samband mellan leptinnivåer i plasma och andra hormoner.	36 varmbloodsston och 18 varmbloodsvalacker. O	Ston: 8,7 år Valack: 13,7 år	Svar på behandlingar jämfördes mellan en grupp med låga leptinnivåer och en med höga.	Valack, låg leptin: ~ 20 Valack, hög leptin: ~ 55 Sto, låg leptin: 40 Sto, hög leptin: ~ 30	Journal of Animal Science

<sup>ii</sup> Energi- och proteinintag ej känt.

<sup>iii</sup> Endast analyserade prover från första och sista provtagning med. I studien redovisas analys av prover från vecka 0, 4, 8, 12, 16 och 20.

<sup>iv</sup> Siffran syftar på vilken grupp av hästar som det gäller. Ex. Grupp 1 bestod av 6 travhästar som var mellan 6 – 16 år gamla.

<sup>v</sup> Värde från ELISA-kitet som validerades för att använda vid analys på IGF-1 hos häst.

Fenger <i>et al.</i> (2014)	Att undersöka effekten på IGF-1 i serum av att ge råmjölk från kor till häst.	12 fullblod. Ston och valacker. O	2-3 år	Behandling / kontrollgrupp	Innan träning (v. 0) <sup>vi</sup> K: ~275 B: ~ 250	Journal of Equine Veterinary Science
Lygren <i>et al.</i> (2013)	Att undersöka om IGF-1 kan analyseras i serum och i senvävnadsextrakt hos häst med ELISA-kit utformade för humanserum och plasma.	Serum och senvävnad från slakteri. O	Ej känt	Jämförelse av metoder att extrahera senvävnad och förbehandlingsprotokoll.	Torr senvävnadsextrakt : 126 ± 20 Blöt senvävnadsextrakt : 124 ± 14	Veterinary Clinical Pathology

<sup>vi</sup>En av fem provtagningar, ingen provtagning visade signifikant skillnad mellan kontrollgrupp och behandlingsgrupp.

Tabell 3. Sammanfattning av artiklar som analyserat IGF-1 efter träning

Studie	Effekter av arbetet	Metod för analys av IGF-1	Tränings typer som jämfördes och typ av försökstest
Noble <i>et al.</i> (2007)	Ingen av träningsformerna gav enligt studien effekt på IGF-1 koncentrationen i blodet.	Serum analyserades med ELISA	<p><u>Fitness-träningsprogram:</u> 150–160 slag/min i 30 minuter i samma hastighet varje dag i 7 veckor.</p> <p>Försökstest: samma upplägg som träningsprogrammet.</p> <p><u>Akut arbete, medelintensivt:</u> Okänt träningsprogram<sup>vii</sup>.</p> <p>Försökstest: Intervallträning i 20 min, 150–160 slag/min</p> <p><u>Akut arbete, högintensivt<sup>viii</sup>:</u> Trav och galopp i 1 h/dag 5 dagar/veckan. Försökstest: intervallträning: (400 m trav + 400 m galopp) x 3</p>
Jackson <i>et al.</i> (2003)	IGF-1 koncentrationen i serum var lägre i gruppen som utfört ett intensivare arbete jämfört med kontrollgruppen.	Serum analyserades med ELISA	<p><u>Medelintensivträningsprogram</u> Mån: 4800m, 10 m/s Ons: 800m, 13 m/s x 3 Fre: 1300m, 11 m/s Samt 40 min i skrittmaskin 6 dagar/veckan</p> <p><u>Lågintensivt träningsprogram:</u> Skritt i 40min, 6 dagar/veckan</p>

<sup>vii</sup>Träningsprogrammets nivå för varje häst stämde överens med arbetsbelastningen i träningsstestet som utfördes.

<sup>viii</sup> Hästarna i denna grupp var med i ett separat försök som studerades i ett annat land än de andra två grupperna av hästar, därför mättes ej hjärtfrekvens



### 3.3. Föreslagna effekter på hästar

I de tidigare studier som presenterats i tabell 2 finns flera olika förslag på hur IGF-1 koncentrationen påverkas av träning. Enligt studien utförd av Noble *et al.* (2007) på olika grupper av hästar runt samma ålder (en grupp hade något högre medelålder, se tabell 2) gav inte fitness-träning, medelintensivt- eller högintensivt akut arbete någon skillnad i koncentrationen av IGF-1. Endast fitness-träningsgruppens foderstat var dokumenterad, men det är oklart om hästarna var i neutral-, positiv- eller negativ energibalans. Utfodringen av alla grupper av hästar framgick inte i studien (Noble *et al.* 2007). Jackson *et al.* (2003) å andra sidan studerade två grupper av hästar i två års åldern som utfodrades med en koncentratgiva dagligen och hö *ad libitum*. Energi- och proteinbalansen var inte dokumenterad. Den ena gruppen följde ett medelintensivt träningsprogram och den andra var kontrollgrupp som endast skrittades (lågintensivt). De såg att koncentrationen av IGF-1 i plasma blev lägre hos de hästar som hade följt det intensivare träningsprogrammet. De drog parallellen att det kan bero på att deras nybildning av skelett var lägre än hos de hästar som tränades mindre, som istället hade en hög benomsättning. De ansåg att det är rimligt då IGF-1 har en nyckelroll i ben bildningsprocessen (Jackson *et al.* 2003).

Noble *et al.* (2007) studerade även om ålder och kön har någon påverkan på IGF-1 koncentrationen (Tabell 2). De kom fram till att de basala IGF-1-koncentrationsnivåerna i princip är identiska mellan ston och valacker, medan hingstar har en signifikant högre basal koncentration. De såg även att IGF-1 koncentrationerna påverkas av ålder hos ston och valacker, den minskar signifikant med en ökande ålder. Hos hingstar såg de inte samma samband, deras resultat visade nämligen ingen signifikant skillnad i IGF-1 koncentrationerna mellan hingstar i olika åldrar (Noble *et al.* 2007).

## 4. DEL 2: Syfte och hypotes

Syftet med den här delen av arbetet var att undersöka om koncentrationen av IGF-1 i blodplasman skiljer sig mellan två grupper av hästar som tränat efter olika träningsprogram där intensiteten skiljer sig mellan programmen.

Eftersom det inte finns tillräckligt med resultat som skulle stödja att en ökad träningsintensitet skulle ge en ökning av IGF-1 koncentrationen i plasma (tabell 3) var min hypotes att koncentrationen av IGF-1 i plasman inte skiljer sig signifikant mellan de två olika grupperna av hästar.

### 4.1. Studiens design och hästar

Designen på den här studien finns tidigare beskriven i Ringmark *et al.* (2015) och Ringmark *et al.* (2017). Studien utfördes på hästnäringens riksanläggning Wången, Sverige. 16 varmblodiga travhästar som var födda 2009 studerades. De började köras in som ett-åringar i september 2010. Hästarna kom från fyra olika uppfödare och de hade större delen av sin härstamning från amerikanska förfäder. Från hösten 2010 till mars 2011 tränades alla hästar utifrån samma träningsprogram. Efter det delades de in i två grupper, en kontrollgrupp (KON) och en grupp (RED) där högintensivt arbete reducerades med 30%. Högintensivt arbete definierades som arbete vid en arbetspuls över 180 slag/min. Ringmark *et al.* (2015) valde gränsen på 180 slag/min eftersom en arbetsbelastning över det stimulerar både aeroba och anaeroba system att utvecklas. Hästarna behöll sina grupper fram tills att de var tre år, 2012 (Ringmark *et al.* 2015). Denna studie kommer dock endast fokusera på träningen de utförde fram till juli 2011 då blodproverna som ingår i analysen togs.

Grupperna balanserades med hänsyn till bland annat uppfödare, skattat avelsvärde, mankhöjd och proportion av typ IIA/ IIB- muskelfiber i *musculus gluteus medius* från en biopsi tagen vid ett års ålder, i december 2010 (Ringmark *et al.* 2015).

Träningsprogrammen inkluderade heat-träning, intervallträning på planmark och i backe. Hästarna tränades av gymnasieelever under övervakning och handledning av professionella tränare. Banan hästarna tränades på var en 1000 meter lång, oval, sandbana. Hastigheten som hästarna tränades i bestämdes av tränaren och var

samma för båda grupperna. De siktade på att återhämtningspulsen tio minuter efter träning skulle vara 80 slag/min och hastigheten justerades efter detta i alla tränings-sessioner när hästarna var två år (Ringmark *et al.* 2015).

I februari 2011 introducerades träning på den ovala, 1600m långa, sandbanan varvat med joggning en till två gånger i veckan. Högintensiv träning utfördes i snitt två gånger i veckan, både heat-träning och senare även intervaller. Heat-träningen utfördes för grupp KON över 1600m/träningstillfälle och över 1100m för grupp Red. Därefter påbörjades intervallträning (Ringmark *et al.* 2015), men det skedde efter att våra blodprover hade tagits. Resterande träning som utfördes av hästarna beskrivs i artikeln av Ringmark *et al.* (2015).

Ett standardiserat tränings-test utfördes, vilket gick ut på att hästarna skulle springa en sträcka på 1600m i ett standardiserat tempo. Testet utfördes fem gånger när hästarna var två år gamla (mars, juli, augusti, oktober och december 2011). Under testet eftersträvades en jämn fart på 10,8 m/s (förutom det första testet som gjordes i mars 2011 eftersom hästarna då inte klarade den hastigheten. De höll då istället 10 m/s). Det var ingen skillnad i hastighet mellan de båda grupperna i 1600m testet (Ringmark *et al.* 2015).

Hästarna utfodrades *ad libitum* med hösilage vilket kompletterades med en mineralblandning och 0,25 - 1 kg pelleterad lucern (mängden berodde på näringsinnehållet i hösilaget) för att täcka behovet av råprotein samt för att förenkla intaget av mineralsupplement. Vatten gavs i två 20 L hinkar, som fylldes på två gånger om dagen. I hagen hade de ett stort vattenkar och även tillgång till gräsbete i viss omfattning från slutet av april fram till oktober (Ringmark *et al.* 2015). Hästarna var i neutral energibalans, och fick mellan 19 – 28 MJ/100 kg kroppsvikt (Ringmark *et al.* 2017).

Blodproverna som analyseras i denna studie är tagna mellan 06.00-07.00 i juli 2011, när hästarna var två år. Blodproven togs via jugularvenen i sju milliliters hepariniserade rör med vacutainer-teknik. Proverna förvarades kylt fram tills att de centrifugerades i tio minuter. Därefter pipetterades plasman av och förvarades fryst (-20 °C) fram till analys (Ringmark *et al.* 2015).

## 4.2. Analys

Proverna analyserades med ELISA-kitet IGF-1 DKO186 (Immunodiagnostic Systems, Boldon, Storbritannien) utformat för att analysera IGF-1 koncentrationen i humant serum. Kitet är validerat för plasmaprover från häst (Baskerville *et al.* 2017). Alla prover behandlades enligt tillverkarens instruktioner, bortsett från att kalibratorerna filtrerades med ett 0,45µm filter då de var grumliga. Först utfördes

en förbehandling som dissocierade transportproteinerna från IGF-1, vilket gjorde att både fritt IGF-1 och bundet IGF-1 mättes i analysen. Förbehandlingens första steg var att en volym av 100µl plasma mättes upp från varje häst och hälldes i mikrocentrifugrör. Samma sak gjordes med de två kontrollvätskorna med kända koncentrationer av IGF-1 och 400µl pre-treatment solution tillsattes. Sedan inkuberades proverna i 30 minuter. Efter det centrifugerades de i två minuter och 100 µl av utfällningen pipetterades över till polypropylenrör (PP-rör). Neutraliseringsvätska (600 µl) tillsattes i varje PP-rör. När förbehandlingen var klar påbörjades analysen direkt.

Analysen utfördes enligt följande; 50 µl av kalibratorerna, de förbehandlade plasmaproverna och kontrollvätskorna pipetterades till två brunnar var i ELISA-plattan. Därefter adderades 100 µl utspädd konjugatvätska till varje brunn. Efter detta inkuberades ELISA-plattan med de fyllda brunnarna i en timme. Efter inkuberingen tömdes och tvättades brunnarna med 400µl tvättbuffert tre gånger. TMB-substrat (Tetrametylbendizid-substrat) (200 µl) tillsattes i brunnarna efter tvätten och sedan inkuberades plattan i 15 minuter. Slutligen tillsattes 100 µl ”Stop-lösning” till brunnarna och absorbansen vid 450 nm analyserades i en Tecan M1000.

### 4.3. Statistisk analys

Ett two-sample t-test (antagande samma varianser) utfördes i Excel för att analysera om IGF-1-koncentrationen i plasma skiljde sig signifikant mellan de två träningsgrupperna. Signifikansnivån sattes till  $P < 0,05$  och beräknades med ett t-test i programmet R.

## 5. Resultat

Det var ingen signifikant skillnad mellan medelvärdet för IGF-1 koncentrationerna mellan grupperna enligt t-testet ( $P=0,7$ ). Intervallet för koncentrationerna i KON sträckte sig mellan 103,7 pg/L upp till 227 pg/L och medelvärdet  $\pm$  standardfelet för medelvärdet (SEM) var  $157,3 \pm 13,5$  pg/L. Intervallet för RED var mellan 110,5 pg/L upp till 182,0 pg/L och medelvärdet  $\pm$  SEM  $150,1 \pm 8,5$  pg/L.

## 6. Diskussion och slutsats

Syftet med DEL 1 i den här studien var dels att beskriva vilka metoder som används för att analysera IGF-1 på häst samt undersöka hur många studier på arbetande hästar som finns där IGF-1 analyserats. Min slutsats är att ELISA och RIA är de analysmetoder som används mest frekvent, även fast Baskerville *et al.* (2017) konstaterade att det finns få ELISA-kit som är utformade för att analysera IGF-1 koncentrationen i plasma eller serum hos häst. Det är relativt få studier gjorda inom ämnet och det behövs mer forskning för att kunna dra väl underbyggda slutsatser. Jag tycker att forskningen speglar att intresset för hästsporten blivit större under de senaste åren då alla artiklar i bibliometrin är publicerade under 2000-talet (Tabell 2).

Syftet med DEL 2 var att undersöka om koncentrationen av IGF-1 i blodplasma hos travhästar skiljer sig signifikant mellan två grupper som följt olika träningsprogram med olika träningsintensitet. Min hypotes att det inte var någon signifikant skillnad bekräftades. Att det inte blev någon skillnad kanske kan bero på att skillnaderna i träningsprogrammen var för små. Kanske kan också en eventuell effekt av fysisk aktivitet på IGF-1 vara lättare att observera på hästar som inte är könsmogna eller kastrerade, vilket de flesta hästarna i dessa studier var bortsett från en hingst i en grupp som studerades av Noble *et al.* (2007).

Det ELISA-kit som användes vid analysen i den här studien var likadant som det Baskerville *et al.* (2017) validerade för analys av koncentrationen av IGF-1 i plasma hos häst. Olyckligtvis bildades det klumpar i kalibratorerna för oss när de förbehandlades. För att klumparna inte skulle påverka analysen filtrerades dessa bort. Det är oklart vad som gjorde att klumparna bildades och vad det har för betydelse för mätningen av koncentrationen av IGF-1.

Koncentrationerna av IGF-1 som uppmättes i den här studien är lägre än de Noble *et al.* (2007) analyserade men ungefär samma som de Jackson *et al.* (2005) uppmätte. En skillnad mellan den här studien och de andra två (Noble *et al.* 2007; Jackson *et al.* 2005) är att de analyserade serum istället för plasma. Det är viktigt att poängtera detta då det finns en betydande del IGF-1 bundet till proteinet IGFBP-3 i trombocyterna som vid koaguleringsprocessen (som sker för att få fram serum) frisläpps och då kan genererar en högre IGF-1-koncentration. Att använda

hepariniserad (antikoagel) plasma bör ge en rättvisare bild över cirkulerande IGF-1 (Baskerville *et al.* 2017). Proverna i den här studien var hepariniserade, vilket kan förklara skillnaderna i koncentrationer mellan våra studier. Det fanns dock även andra skillnader i hanteringen av proverna. Noble *et al.* (2007) lät till exempel proverna stå i rumstemperatur i två timmar före analysen.

Noble *et al.* (2007) såg ingen skillnad i koncentrationen av IGF-1 mellan olika grupper av hästar som följt olika träningsprogram (Tabell 2). En brist i studien är dock att foderstaterna för de flesta grupper av hästar är okända, vilket gör att en nutritionell påverkan inte går att utesluta. Detta är en viktig parameter att uppfylla då IGF-1-koncentrationen minskar om energi- eller proteinbehovet ej är uppfyllt (Sticker *et al.* 1995; Salazar-Ortiz *et al.* 2014). I den här studien är det känt att hästarnas energi- och proteinbehov blev tillgodosett samt att de inte ökade i hull (Ringmark *et al.* 2015, 2017), vilket är en styrka.

Noble *et al.* (2007) undersökte även hur IGF-1-koncentrationen påverkades av ålder och kön. En styrka i den delen av studien är att de analyserat serum från ett stort antal hästar, dock har de ej korrigerat för att analyserna skedde i tre olika laboratorier i tre olika länder och med olika kit i sin statistiska modell. De har inte heller korrigerat för t.ex. rumstemperaturen i de olika laboratorierna vilken sannolikt kan skilja och då påverka resultatet. Det mest optimala hade varit om ett prov från en häst hade analyserats i alla tre laboratorier för att utvärdera om det fanns platseffekter som påverkat analyserna.

Till skillnad från den här studien och Noble *et al.* (2007) såg Jackson *et al.* (2003) att den grupp som tränat med högre intensitet hade lägre koncentration av IGF-1 i serum. Jackson *et al.* (2003) har inte redovisat en tillräckligt detaljerad foderstat för att kunna utesluta nutritionell påverkan, likt Noble *et al.* (2007). Jackson *et al.* (2003) gav hästarna hö med okänt näringsinnehåll *ad libitum*, vilket betyder att energi- och näringsintaget är okänt samt att hästarna kan ha ätit olika mycket under studiens gång, vilket kan påverka resultatet.

Noble *et al.* (2007) konstaterade att IGF-1-koncentrationen minskar med åldern, vilket betyder att åldern på hästarna i de olika studierna (Jackson *et al.* 2003; Noble *et al.* 2007; Ringmark *et al.* 2017) kan påverka resultatet. Alla hästar som deltog i dessa tre studier hade genomgått könsmodningsprocessen, som enligt Fortier *et al.* (2005) tar slut vid ca. 15 månaders ålder. Jackson *et al.* (2003) hade dock en lägre genomsnittlig ålder på hästarna som studerades än vad både Noble *et al.* (2007) och hästarna i den här studien hade. Noble *et al.* (2007) hade det största åldersspannet på hästarna i sin studie medan alla hästar i den här studien var lika gamla (Ringmark *et al.* 2017). Frågan som uppstår är om det är möjligt att jämföra resultat från hästar

i olika åldrar, både inom och mellan studier. Det skapar även ännu en osäkerhet om jämförelserna i studien av Noble *et al.* (2007) är tillförlitliga.



## 7. Referenser

- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, vol. 72, pp. 4–15. DOI:10.1016/j.peptides.2015.04.012
- Baskerville, C.L., Bamford, N.J., Harris, P.A. & Bailey, S.R. (2017). Comparison and validation of ELISA assays for plasma insulin-like growth factor-1 in the horse. *Open Veterinary Journal*, vol. 7 (1), pp. 75–80. DOI: 10.4314/ovj.v7i1.12
- Berson, S.A. & Yalow, R.S. (1968). General principles of radioimmunoassay. *Clinica Chimica Acta*, vol. 22 (1), pp. 51–69. DOI: 10.1016/0009-8981(68)90247-7
- Cartmill, J.A., Thompson, D.L., Storer, W.A., Gentry, L.R. & Huff, N.K. (2003). Endocrine responses in mares and geldings with high body condition scores grouped by high vs. low resting leptin concentrations. *Journal of Animal Science*, vol. 81 (9), pp. 2311–2321. DOI: 10.2527/2003.8192311x
- Delafontaine, P., Song, Y.-H. & Li, Y. (2004). Expression, Regulation, and Function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 Binding Proteins in Blood Vessels. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 24 (3), pp. 435–444. DOI: 10.1161/01.ATV.0000105902.89459.09
- Fenger, C., Tobin, T., Casey, P., Langemeier, J. & Haines, D. (2014). Bovine Colostrum Supplementation Does Not Influence Serum Insulin-like Growth Factor-1 in Horses in Race Training. *Journal of Equine Veterinary Science*, vol. 34 (8), pp. 1025–1027. DOI: 10.1016/j.jevs.2014.05.004
- Firth, S.M. & Baxter, R.C. (2002). Cellular Actions of the Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins. *Endocrine Reviews*, vol. 23 (6), pp. 824–854. DOI: 10.1210/er.2001-0033
- Fortier, L.A., Kornatowski, M.A., Mohammed, H.O., Jordan, M.T., O’Cain, L.C. & Stevens, W.B. (2005). Age-related changes in serum insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor-I binding protein-3 and articular cartilage structure in Thoroughbred horses. *Equine Veterinary Journal*, vol. 37 (1), pp. 37–42. DOI: 10.2746/0425164054406838
- de Graaf-Roelfsema, E., Keizer, H.A., van Breda, E., Wijnberg, I.D. & van der Kolk, J.H. (2007). Hormonal responses to acute exercise, training and overtraining - A review with emphasis on the horse. *Veterinary Quarterly*, vol. 29 (3), pp. 82–101. DOI: 10.1080/01652176.2007.9695232
- Heindel, J.J. & Treinen, K.A. (1989). Physiology of the Male Reproductive System: Endocrine, Paracrine and Autocrine Regulation. *Toxicologic Pathology*, vol. 17 (2), pp. 411–445. DOI: 10.1177/019262338901700219
- Jackson, B.F., Goodship, A.E., Eastell, R. & Price, J.S. (2003). Evaluation of serum concentrations of biochemical markers of bone metabolism and insulin-like growth factor I associated with treadmill exercise in young horses. *American Journal of Veterinary Research*, vol. 64 (12), pp. 1549–1556. DOI: 10.2460/ajvr.2003.64.1549
- LeRoith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D. & Roberts, C.T. (1995). Molecular and Cellular Aspects of the Insulin-Like Growth Factor I Receptor. *Endocrine Reviews*, vol. 16 (2), pp. 143–163. DOI: 10.1210/edrv-16-2-143

- Lygren, T., Schjerling, P., Jacobsen, S., Berg, L.C., Nielsen, M.O., Langberg, H. & Thomsen, P.D. (2013). Validation of the IDS Octeia ELISA for the determination of insulin-like growth factor 1 in equine serum and tendon tissue extracts. *Veterinary Clinical Pathology*, vol. 42 (2), pp. 184–189. DOI: 10.1111/vcp.12038
- Noble, G.K., Houghton, E., Roberts, C.J., Faustino-Kemp, J., de Kock, S.S., Swanepoel, B.C. & Sillence, M.N. (2007). Effect of exercise, training, circadian rhythm, age, and sex on insulin-like growth factor-1 in the horse. *Journal of Animal Science*, vol. 85 (1), pp. 163–171. DOI: 10.2527/jas.2006-210
- Ringmark, S., Lindholm, A., Hedenstrom, U., Lindinger, M., Dahlborn, K., Kvarn, C. & Jansson, A. (2015). Reduced high intensity training distance had no effect on V-La4 but attenuated heart rate response in 2-3-year-old Standardbred horses. *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol. 57, p. 17. DOI: 10.1186/s13028-015-0107-1
- Ringmark, S., Revold, T. & Jansson, A. (2017). Effects of training distance on feed intake, growth, body condition and muscle glycogen content in young Standardbred horses fed a forage-only diet. *Animal*, vol. 11 (10), pp. 1718–1726. DOI: 10.1017/S1751731117000593
- Ropp, J.K., Raub, R.H. & Minton, J.E. (2003). The effect of dietary energy source on serum concentration of insulin-like growth factor-I, growth hormone, insulin, glucose, and fat metabolites in weanling horses. *Journal of Animal Science*, vol. 81 (6), pp. 1581–1589. DOI: 10.2527/2003.8161581x
- Salazar-Ortiz, J., Monget, P. & Guillaume, D. (2014). The influence of nutrition on the insulin-like growth factor system and the concentrations of growth hormone, glucose, insulin, gonadotropins and progesterone in ovarian follicular fluid and plasma from adult female horses (*Equus caballus*). *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 12 (1), p. 72. DOI:10.1186/1477-7827-12-72
- Shen, Y., Prinyawiwatkul, W. & Xu, Z. (2019). Insulin: a review of analytical methods. *Analyst*, vol. 144 (14), pp. 4139–4148. DOI:10.1039/C9AN00112C
- Sticker, L.S., Thompson, D.L., Fernandez, J.M., Bunting, L.D. & DePew, C.L. (1995). Dietary protein and(or) energy restriction in mares: plasma growth hormone, IGF-I, prolactin, cortisol, and thyroid hormone responses to feeding, glucose, and epinephrine. *Journal of Animal Science*, vol. 73 (5), pp. 1424–1432. DOI: 10.2527/1995.7351424x
- Verwilghen, D.R., Vanderheyden, L., Franck, T., Busoni, V., Enzerink, E., Gangl, M., Lejeune, J.-P., van Galen, G., Grulke, S. & Serteyn, D. (2009). Variations of plasmatic concentrations of Insulin-like Growth Factor-I in post-pubescent horses affected with developmental osteochondral lesions. *Veterinary Research Communications*, vol. 33 (7), pp. 701–709. DOI: 10.1007/s11259-009-9219-2

**Icke publicerat material:**

- Gumucio, A (2020) *Sveriges Lantbruksuniversitet*. Personligkommunikation via mail.
- Jansson, A. (2020) *Sveriges Lantbruksuniversitet*. Personligkommunikation via mail.