



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin  
och husdjursvetenskap

# Utformning av ett nytt diagnostiskt test för att utvärdera behandlingseffekten av SGLT2-hämmare hos hästar med ekvint metabolt syndrom

A new diagnostic test for evaluation of the effect of treatment with SGLT2 inhibitors in horses with equine metabolic syndrome



*Hannah Jacobson*

*Uppsala*

*2020*

*Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet*



# Utformning av ett nytt diagnostiskt test för att utvärdera behandlingseffekten av SGLT2-hämmare hos hästar med ekvint metabolt syndrom

## A new diagnostic test for evaluation of the effect of treatment with SGLT2 inhibitors in horses with equine metabolic syndrome

*Hannah Jacobson*

**Handledare:** Johan Bröjer, Institutionen för kliniska vetenskaper

**Biträdande handledare:** Sanna Truelsen Lindåse, Institutionen för kliniska vetenskaper

**Examinator:** Katarina Nostell, Institutionen för kliniska vetenskaper

*Examensarbete i veterinärmedicin*

**Omfattning:** 30 hp

**Nivå och fördjupning:** Avancerad nivå, A2E

**Kurskod:** EX0869

**Kursansvarig institution:** Institutionen för kliniska vetenskaper

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2020

**Elektronisk publicering:** <https://stud.epsilon.slu.se>

**Omslagsillustration:** Fotografi taget av Emma Tegler

**Nyckelord:** ekvint metabolt syndrom, insulindysreglering, häst, GGI, SGLT2-hämmare

**Key words:** equine metabolic syndrome, insulindysregulation, equine, horse, GGI, SGLT2 inhibitor

Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för kliniska vetenskaper



## SAMMANFATTNING

Ekvint metabolt syndrom (EMS) karakteriseras av en samling av särskilda kliniska fynd och riskfaktorer så som fetma, insulindysreglering (ID), hyperlipemi och hypertriglyceridemi associerat med utveckling av endokrin fång. Fång kan orsakas av flera olika saker, men endokrin fång relaterat till ID anses vara den vanligaste orsaken. Insulindysreglering är den viktigaste komponenten av EMS, vilket innebär avvikelser i insulinmetabolismen som inkluderar hyperinsulinemi och insulinresistens. Eftersom hästar med EMS har en uppreglerad  $\beta$ -cellsfunktion så har de en högre risk att utveckla postprandiell hyperinsulinemi d.v.s. de utsöndrar höga koncentrationer av insulin efter intag av föda som i sin tur predisponerar för fång. Genom att minska  $\beta$ -cellssvaret kan därför risken för att hästen drabbas av fång potentiellt minska.

EMS kontrolleras främst via diet- och olika motionsprogram för att förbättra insulinregleringen och minska risken för fetma. Vid kraftig insulinresistens kan dessa åtgärder vara otillräckliga, därför finns det ett behov av att hitta läkemedel som kan användas för att reglera insulinpåslaget. Idag finns inga registrerade läkemedel för att minska hyperinsulinemi hos ponnyer och hästar. På humansidan kan läkemedel som sänker blodglukoskoncentrationen användas vid behandling av typ II diabetes. *Sodium-glucose cotransporter 2* (SGLT2) hämmare är ett exempel på ett sådant läkemedel men endast ett fåtal studier har gjorts inom veterinärmedicin för att utvärdera läkemedlet på häst. Genom att öka glukosutsöndringen i urinen kan SGLT2-hämmare minska risken för hyperglykemi och indirekt minska risken för hyperinsulinemi. Preliminära studier har visat att dessa läkemedel kan vara effektiva på hästar med EMS för att minska insulinsvaret.  $\beta$ -cellerna reglerar insulinutsöndringen beroende på graden av insulinkänslighet (IS), nivån av hyperglykemi och effekten av påverkande gastrointestinala hormoner (inkretiner). Dessvärre är sammankopplingen mellan dessa faktorer inte helt klarlagd och  $\beta$ -cellernas funktion är svår att bedöma på grund av dess komplexitet. Det finns flera olika metoder för att mäta IS och  $\beta$ -cellsresponsen, där varje metod har sin styrka och svaghet.

I denna studie utvecklades och utvärderades en metod kallad *graded intravenous glucose infusion* (GGI) på häst. Detta är ett diagnostiskt test som används på humansidan för att utvärdera  $\beta$ -cellsfunktionen utan inkretineffekten men som tidigare inte använts på häst. Testet modifierades för att användas på häst och användes sedan för att studera effekten av SGLT2-hämmaren kanagliflozin; om den minskade  $\beta$ -cellssvaret hos hästar med EMS. Studien bestod av två delar. Del 1 (adaptionen av metoden för häst) utfördes på tre kliniskt friska hästar. Olika protokoll med olika glukosinfusionshastigheter testades innan GGI kunde användas i del 2 (utvärdering av SGLT2-hämmare). Tre hästar med konstaterad EMS ingick i del 2. Glukosinfusionshastigheten ökades stegvis för att få en graderad glukostrappa. Hästarna i del 2 behandlades med kanagliflozin (1,8 mg/kg p.o., q 24 hr) under tre veckor. Resultaten från studien visade att GGI kan användas som en diagnostisk metod för att mäta  $\beta$ -cellsfunktionen på häst. Kanagliflozin förbättrade ID indirekt genom att minska glukosnivåerna i blodet och på så sätt minska insulinresponsen. Läkemedlet hade även en direkt effekt på  $\beta$ -cellsfunktionen, vilket är en helt ny upptäckt. Detta innebär att läkemedlet potentiellt skulle kunna minska risken för fång hos hästar som är predisponerade p.g.a. ID.

## SUMMARY

Equine metabolic syndrome (EMS) is characterized by a collection of specific clinical findings and risk factors such as obesity, insulin dysregulation (ID), and hypertriglyceridemia associated with endocrinopathic laminitis. Laminitis can occur by several causes but endocrinopathic laminitis associated with ID is considered to be the most common cause. Insulin dysregulation is the most important component of EMS, which involves abnormalities in the insulin metabolism including hyperinsulinemia and insulin resistance. Because the ID horses have an upregulated  $\beta$ -cell response they have a higher risk to develop postprandial hyperinsulinemia, i.e. they secrete higher concentration of insulin after feeding, which predisposes them for laminitis. By reducing the  $\beta$ -cell response the risk of laminitis can potentially be reduced.

EMS is controlled primarily by diet and exercise programs to decrease the insulin response and reduce the risk of obesity. These actions can be insufficient for horses with severe insulin dysregulation. Therefore, there's a need to find pharmacological aids that can be used to regulate and decrease the insulin response. Today there are no registered drugs reducing hyperinsulinemia for ponies and horses. In human medicine there are drugs reducing the blood glucose concentration that can be used in treatment of type II diabetes. Sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) is an example of such a pharmacological aid but only a few studies have been done to evaluate its effect on horses. By increasing the glucose secretion in the urine the SGLT2 inhibitor can lower the risk for hyperglycaemia and indirect reduce the risk for hyperinsulinemia. Preliminary studies have shown that these drugs can be effective on horses with EMS to reduce the insulin response. The  $\beta$ -cells regulate the insulin secretion depending on the degree of insulin sensitivity (IS), the level of hyperglycemia and the effect of gastrointestinal hormones like incretins. Unfortunately the relationship between these factors is not fully understood and the  $\beta$ -cells function is hard to evaluate due to its complexity. Several methods for measuring IS and  $\beta$ -cell response exist - each method with its strength and weakness.

In this study, a method called graded intravenous glucose infusion (GGI) was developed and evaluated for horses. This is a diagnostic test that is used in human medicine to evaluate  $\beta$ -cell function without the effect of incretins, but has not yet been used in horses. The test was modified to be used in horses and was then used to study the effect of SGLT2 inhibitors, if it reduces the  $\beta$ -cell response in horses with EMS. The study was divided into two parts. Part 1 (adaption of GGI) was performed on three clinically healthy horses. Different protocols with different glucose infusion rates were tested before the GGI could be applied in part 2 (evaluation of SGLT2 inhibitors). Three horses with confirmed EMS were included in part 2. The glucose infusion rate was increased step by step to create a response in a stepwise manner. The horses in part 2 were treated with canagliflozin during three weeks. The results from the study showed that GGI could be used as a diagnostic method to measure  $\beta$ -cell function in horses. Canagliflozin indirectly improved ID by reducing the glucose levels in the blood and thereby decreasing the insulin response. This means that this drug can potentially reduce the risk of developing laminitis in ID horses.

## INNEHÅLL

INLEDNING .....	1
LITTERATURÖVERSIKT .....	2
EMS – Ekvint metabolt syndrom .....	2
Mätning av $\beta$ -cellernas funktion.....	4
Hur utvärderas $\beta$ -cellernas funktion?.....	4
Hyperglykemisk clamp .....	5
Graderat intravenöst glukosinfusionstest .....	5
SGLT2-hämmare .....	6
MATERIAL OCH METODER .....	9
Del 1, adaption av GGI för häst.....	9
Hästar .....	9
Studiedesign .....	9
Del 2, pilotstudie med GGI för utvärdering av SGLT2-hämmare.....	10
Hästar .....	10
Studiedesign .....	10
Blodprovstagning och analys.....	11
Beräkningar och statistiska analyser.....	11
RESULTAT .....	12
Del 1, adaption av GGI.....	12
Del 2, pilotstudie med GGI för utvärdering av SGLT2-hämmare.....	13
DISKUSSION .....	16
POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING.....	19
REFERENSER.....	21





## INLEDNING

Hästar med ekvint metabolt syndrom (EMS) har en uppreglerad  $\beta$ -cellsfunktion, som leder till en postprandiell hyperinsulinemi. Det innebär att de utsöndrar höga koncentrationer av insulin efter intag av foder. Efter utfodring kan insulinnivåerna i blodet bli så höga att de blir toxiska för hästen och predisponera för utveckling av endokrin fång (Meier *et al.*, 2017). Genom att minska  $\beta$ -cellssvaret (den postprandiella hyperinsulinemin) kan risken för att hästen drabbas av fång minskas. Dagens behandling och hantering av hästar med EMS utgår från att man försöker minska insulinsvaret genom att utfodra hästen med foder, som har ett lågt sockerinnehåll. Även andra strategier med olika motionsprogram för att förbättra insulinregleringen och minska risken för fetma har föreslagits (Dugdale *et al.*, 2010; Durham *et al.*, 2019). Om hästen har ett kraftigt uppreglerat  $\beta$ -cellssvar (kraftig postprandiell hyperinsulinemi) är dessa åtgärder oftast inte tillräckliga. I dagsläget finns det inga registrerade läkemedel som minskar  $\beta$ -cellssvaret efter utfodring hos hästar med EMS. Eftersom EMS är ett ökande problem och tidigare behandlingsmetoder ofta inte är tillräckliga kan utveckling av medicinsk behandling som minskar insulinsvaret vara indicerat (Lindåse *et al.*, 2015).

*Sodium-glucose cotransporter 2* (SGLT2) hämmare är ett humant antidiabetiskt läkemedel som sänker blodglukoskoncentrationen genom att hämma glukosabsorptionen i njuren, vilket indirekt minskar insulinkoncentrationerna. Preliminära studier har visat att dessa läkemedel kan vara effektiva på hästar med EMS för att sänka insulinsvaret efter utfodring (Meier *et al.*, 2018). De studier som gjorts använder substanser som inte finns registrerade i Sverige, men kanagliflozin (SGLT2 hämmare) är en aktiv substans som finns registrerat i Sverige och som skulle kunna vara ett användbart läkemedel vid behandling av EMS. För att få en ökad förståelse hur läkemedlet påverkar det uppreglerade  $\beta$ -cellssvaret krävs bra diagnostik. Få diagnostiska metoder utvärderar  $\beta$ -cellssvaret på häst (Lindåse *et al.*, 2019). En bra metod på människa är *graded intravenous glucose infusion* (GGI) (Byrne *et al.*, 1995).

Syftet med studien var att anpassa en GGI till djurslaget häst och se om den kan användas för att utvärdera om SGLT2-hämmare minskar insulinresponsen hos hästar med EMS. Vilka stegvisa glukosinfusionshastigheter krävs för att få en insulinrespons och kunna anpassa en GGI till häst? Hur påverkas  $\beta$ -cellssvaret under en GGI vid behandling med SGLT2-hämmare hos hästar med EMS? Genom att komma fram till en effektiv dos och studera läkemedlets effekter hos häst kommer pilotstudien vara till grund för större studier vid behandling av EMS hästar med kanagliflozin för att på sikt kunna komma fram till en bra behandlingsplan.

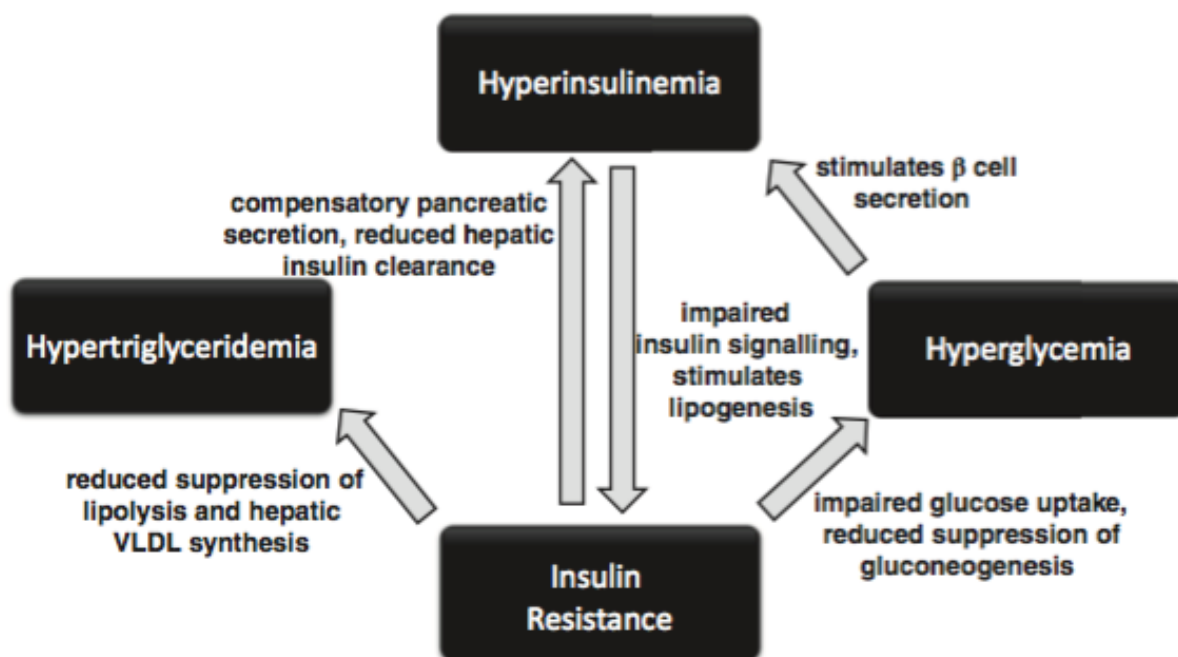
## LITTERATURÖVERSIKT

### EMS – Ekvint metabolt syndrom

Ekvint metabolt syndrom (EMS) karakteriseras av en samling av särskilda kliniska fynd eller riskfaktorer som består ofta av fetma, hypertriglyceridemi, insulinresistens (IR) och hyperinsulinemi som predisponerar för fång (Johnson, 2002; Frank *et al.*, 2010). På humansidan finns ett liknande fenomen som innehåller faktorer som övervikt, dyslipidemi, hypertension, hyperglykemi och IR associerat med typ II diabetes mellitus och kardiovaskulära sjukdomar (Grundy, 2008). Flera studier har hittat skillnader i insulinsensitivitet och postprandiell insulinsvar mellan friska hästar i olika raser, vilket innebär att vissa raser kan vara EMS predisponerade och därmed ha en större risk att drabbas av fång (Bröjer *et al.*, 2013; Bamford *et al.*, 2014; Lindåse *et al.*, 2016). Likaså har äldre hästar större risk att drabbas (Jacob *et al.*, 2017).

En av de viktigaste riskfaktorerna inom EMS är **insulindysreglering (ID)**, vilket är en term som introducerades 2014. Insulindysreglering innebär avvikelser i insulinmetabolismen, vilket innebär att hästen har hyperinsulinemi och IR. Insulinkänslighet (IS) definieras som insulins förmåga att höja glukos användningen genom att stimulera glukosupptaget i skelettmuskulatur och fettvävnad, samt genom att öka leverns glykogeninlagringen och minska glukoneogenesisen. Insulinresistens definieras som ett tillstånd av minskad vävnadsrespons till insulin, trots normala eller ökade koncentrationer av insulin i blodet (Frank & Tadros, 2014). Konsekvenser av IR är ett nedsatt glukosupptag i vävnaden, minskad hämning av glukoneogenesisen och ökad lipolys (Treiber *et al.*, 2006). För att upprätthålla normala glukosnivåer kompenserar  $\beta$ -cellerna för IR genom att öka utsöndringen av insulin i blodet, vilket resulterar i hyperinsulinemi (Wilcox, 2005). Insulindysreglering har en central roll i EMS och kännetecknas främst av postprandiell hyperinsulinemi (de Laat *et al.*, 2016). Hyperinsulinemi orsakas av ökad insulinutsöndring eller minskad insulin clearance (nedbrytning i levern), vilket kan vara orsakat av eller en konsekvens av IR. Postprandiell hyperinsulinemi är ofta en kompensatorisk respons till systemisk IR, men kan även ske hos hästar utan IR. Insulindysreglering används därför för att beskriva hästar som har hyperinsulinemi (ökat insulinsvar till oral eller intravenös glukosgiva) och/eller IR (Frank & Tadros, 2014, Lindåse, 2017). En överblick över några relaterade komponenter av ID kan ses i figur 1.

Hos människor leder compensationen av IR nästan oundvikligt till dekompenenserad IR, vilket resulterar i nedsatt glukostolerans och typ II diabetes mellitus, d.v.s. förhöjda glukoskoncentrationer i blodet (hyperglykemi). Hög produktion av insulin från pancreas  $\beta$ -celler leder slutligen till utmattning av  $\beta$ -cellerna, nedsatt insulinutsöndring och bristande insulinsvar. (Wilcox, 2005). Hästar drabbas sällan av diabetes typ II eftersom de fortsätter i ett kompenserat stadium av IR, d.v.s.  $\beta$ -cellerna verkar kunna kompensera för IR över en längre period, vilket i sin tur leder till hyperinsulinemi (Wilcox, 2005; Toth *et al.*, 2010). Hyperinsulinemi kan också utvecklas som en konsekvens av minskad nedbrytning (clearance) av insulin i levern (Mittelman *et al.*, 2000; Carter *et al.*, 2009b; Toth *et al.*, 2010).



Figur 1. Relaterade komponenter av insulin dysregulation (Durham et al., 2019).

**Fång**, ett smärtsamt tillstånd där hästens lamellager blir inflammerat och hovväggen separeras från hovbenet, uppkommer ofta efter att hästen intagit stora mängder icke strukturella kolhydrater (NSC) via fodret eller under betesperioden då hästar har obegränsad tillgång till bete. Betesassocierad fång har beskrivits i ett flertal studier och observationer har visat en tydlig koppling mellan hyperinsulinemi och fång. Däremot är det inte klarlagt exakt hur hyperinsulinemi orsakar fång (Treiber *et al.*, 2006; Carter *et al.*, 2009c). I flera studier har man kunnat visa på en koppling mellan hyperinsulinemi och fång genom att experimentellt inducera fång på friska hästar och ponnys med en konstant infusion av insulin (Asplin *et al.*, 2007; De Laat *et al.*, 2010). Endokrin fång kan också uppstå till följd av *pituitary pars intermedia dysfunction* (PPID) eller efter behandling med glukokortikoider. Fång kan även uppstå av andra anledningar som inte är relaterade till ID, såsom systemisk *inflammation respons syndrom* (t.ex. vid colit, enterit, metrit) och överbelastning (Durham *et al.*, 2019). Hos människor med metabolt syndrom skapas ett pro-inflammatoriskt tillstånd som bl.a. kan förstärka skador på kärlfunktionen. Hästar kan också få skador på kärlfunktionen eller ett pro-inflammatoriskt tillstånd som skadar lamellvävnaden lokalt i hoven och lättare ger upphov till fång (Geor & Frank, 2009). I en relativt ny studie nämns det att fång verkar ha en större koppling till kraftig insulinresistens och postprandiell hyperinsulinemi än till mild insulinresistens (Lindåse *et al.*, 2017).

**Fetma** har varit en del av EMS sedan syndromet först beskrevs. Tidigare har fetma beskrivits som orsak till ID, men numera anses fetma vara något som förvärrar ID utan att vara den direkta orsaken till ID (McCue *et al.*, 2015; Selim *et al.*, 2015). Generell eller regionalt överdriven fettansamling är ofta associerat med EMS, men undantag finns (Bailey *et al.*, 2008). Kopplingen mellan fetma och ID är inte helt självklar. Det är möjligt för hästar med EMS att ha en normal eller smal fenotyp, likaså att ha överflödiga fettdepåer utan att ha ID eller EMS (Durham

*et al.*, 2019). Det är därför viktigt att konstatera ID hos ett överviktigt djur innan man diagnosticerar EMS. Ökad regional fettansamling i framförallt nackregionen anses vara associerat med IR och fång (Johnson, 2002; Treiber *et al.*, 2006). Däremot verkar EMS vara vanligare hos fysiskt inaktiva djur, kanske p.g.a. de positiva effekterna av motion på insulinregleringen. Fysisk aktivitet leder även till minskad mängd fettvävnad och ökad stimulering av antiinflammatoriska effekter (Menzies-Gow *et al.*, 2014; Durham *et al.*, 2019). Det verkar finnas en stark koppling mellan pro-inflammatoriska cytokiner, fetma och IR hos människa (Tanti *et al.*, 2013). Motsvarande samband existerar på häst, men verkar inte vara lika starkt som hos människa (Vick *et al.*, 2007). Kopplingen mellan fetma, fång och inflammation, samt deras samband med ID är fortfarande komplext och kräver fler studier för att förstå sambanden och dess mekanismer (Mittelman *et al.*, 2000).

## **Mätning av $\beta$ -cellernas funktion**

$\beta$ -cellsfunktionen kan definieras som  $\beta$ -cellernas förmåga att producera, lagra och utsöndra insulin i tillräckliga koncentrationer för att upprätthålla normala glukosnivåer i blodet.

Koncentrationen av insulin i cirkulationen är kopplad till insulinkänsligheten, kroppens kapacitet att metabolisera glukos och förmågan att hämma glukosproduktionen i levern (Wilcox, 2005).  $\beta$ -cellerna reglerar insulinutsöndringen beroende på graden av insulinkänslighet, nivån av hyperglykemi och inkretineffekten. Dessvärre är sammankopplingen mellan dessa faktorer inte helt klarlagd (Lindåse *et al.*, 2019). På människa sker insulinutsöndringen i pankreas i två faser. Den första fasen av insulinutsöndringen utgörs av redan syntetiserat insulin, som har lagrats i sekretoriska granula. Den andra fasen representerar sekretion av både lagrat och nyproducerat insulin, vilken börjar samtidigt som första fasen men är långsammare och ger en mer sammanhängande ökning (Wilcox, 2005). Hos häst finns det ingen tydlig uppdelning i fas 1 och fas 2 (Lindåse *et al.*, 2019). Andra fasens insulin respons verkar sammanfalla med första fasen hos hästar (Toth *et al.*, 2010). Fas 1 är emellertid inte tillräckligt utvärderad på häst men om fas 1 finns på häst så är den inte lika kraftig som hos människa. Förenklat sägs det därför ofta att fas 1 insulinrespons inte finns hos häst, att de endast har en fas 2 (Lindåse *et al.*, 2019)

## **Hur utvärderas $\beta$ -cellernas funktion?**

$\beta$ -cellernas funktion är svår att bedöma på grund av deras komplexa svar på sekretorisk stimuli. Hormoner i magtarmkanalen påverkar insulinsvaret vid oralt glukosintag och själva tarminnehållet (ingesta) stimulerar insulinsekretionen, d.v.s det sker en aktivering av *the entero-insular axis* vilket inte sker vid intravenös glukosadministration (Pacini & Mari, 2003). Ett exempel på ett sådant hormon är inkretiner som utsöndras från celler i tunntarmen. Hormonen stimulerar pancreas  $\beta$ -celler att utsöndra insulin, samt förlänger tiden för magsäckstömning. På så sätt minskar glukosnivåerna i blodet efter matintag (postprandiell hyperglykemi). *Glucose-dependent insulinotropic polypeptide* (GIP) och *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) är de två viktigaste inkretinerna hos människa (Wilcox, 2005; Yamaoka-Tojo *et al.*, 2010). Hos häst vet man att inkretinerna GIP, GLP-1 och *glucagon-like peptide-2* (GLP-2) existerar, men deras roll i ID är fortfarande oklar (Durham *et al.*, 2019). Ett fåtal studier har visat på ökade koncentrationer av GLP-1 och GLP-2 hos ponnyer med ID, men vidare utredning krävs (de Laat *et al.*, 2016; de Laat *et al.*, 2018).

För att justera  $\beta$ -cellsresponsen på ett lämpligt sätt hos människa krävs ofta en samtidig mätning av insulinkänsligheten (Hannon *et al.*, 2018). Sambandet mellan  $\beta$ -cellssvaret och insulinkänsligheten beskrivs som ett rektangulär-hyperbolt (exponentiellt avtagande) samband hos människor, gnagare och hundar, men som upptäckts även hos häst under senare studier. Hästar med tydlig nedsatt insulinsensitivitet har därför stora förändringar i sitt  $\beta$ -cellssvar. När insulinkänslighetsgraden är mycket nedsatt som vid t.ex. kraftig insulinresistens, uppregleras  $\beta$ -cellernas funktion kraftigt (Lindåse *et al.*, 2017).

Relevanta mätningsmetoder för  $\beta$ -cellsfunktionen beskrivs kort nedan.

### **Hyperglykemisk clamp**

Hyperglykemisk clamp (HC) är en kvantitativ metod där man använder sig av en konstant exogen glukosinfusion för att öka blodglukoskoncentrationen och sedan bibehålla den vid en specifik målkoncentration. Den hyperglykemiska stimulinen är konstant, vilket ger en precis och repeterbar stimuli till insulin/C-peptid utsöndringen och en klar separation av första respektive andra fasen för insulinresponsen vid intravenös glukos hos människa (Elahi, 1996; Hannon *et al.*, 2017).

En nyligen publicerad studie har visat att HC ger ett mätvärde för  $\beta$ -cellssvaret, som har mycket hög repeterbarhet och tillförlitlighet (Lindåse *et al.*, 2019). Testet ger dock inget inkretinsvar eftersom man mäter svaret vid intravenös tillförsel av glukos. Eftersom HC använder sig av en *steady-state* blodglukoskoncentration kommer mängden tillförd glukos vara den samma som mängden glukos som metaboliseras per tidsenhet. En HC mäter därför också patientens IS. Metoden är dock mycket tidskrävande och dyr. Den kräver även expertis inom området för att kunna justera glukosnivåerna och få pålitliga resultat. Därmed används den främst inom forskning (Lindåse *et al.*, 2019).

### **Graderat intravenöst glukosinfusionstest**

Graderat intravenöst glukosinfusions test (*graded intravenous glucose infusion*, GIGI), även kallat graderad glukosinfusion (*graded glucose infusion*, GGI), är en metod där man mäter  $\beta$ -cellsfunktionen genom att tillföra succesivt ökande nivåer av glukos intravenöst. Graderad glukosinfusion kan anses vara en förenklad, stegvis variant av HC och där vi i likhet med HC endast får ut  $\beta$ -cellssvaret utan inkretinets effekt. På humansidan används GGI ofta för att utvärdera läkemedels behandlingseffekter på  $\beta$ -cellsfunktionen (Byrne *et al.*, 1995).

Det graderade glukosinfusionstestet är en experimentell rekonstruktion för att få ett exakt mått på dos-respons sambandet mellan insulinutsöndring och glukoskoncentration. I andra tester så som *frequently sampled IV glucose tolerance test* (FSIGTT) eller *oral glucose tolerance test* (OGTT) uppskattas sambandet genom modellering istället för att beräknas (Pratt-Phillips *et al.*, 2015). Det experimentella protokollet för GGI hos människa utgår från en glukosinfusionshastighet på 2 mg/min/kg, vilken sedan höjs i steg om 1-2 mg/min/kg var 40:e minut tills en glukosinfusion på 8 mg/kg/min nås. Glukos och C-peptidkoncentrationen (en komponent av proinsulinet som klyvs innan pancreas utsöndrar ”moget” insulin) monitoreras kontinuerligt. Insulinutsöndringen beräknas matematiskt med hjälp av C-peptidkoncentrationerna. En  $\beta$ -cells dos-respons kurva fås genom att man plottar den genomsnittliga insulinutsöndringen vid varje glukosinfusionssteg mot den korresponderade genomsnittliga glukoskoncentrationen. Detta ger

oss en bättre bild av  $\beta$ -cellernas respons till intravenöst glukos (Pacini & Mari, 2003). Graderat glukosinfusionstest designades för att få en dos-respons kurva för att kunna utvärdera korrelationen mellan glukoskoncentrationen och insulinutsöndringen. Hos människor har denna en sigmoidal form (Byrne *et al.*, 1995).

De främsta begränsningarna med GGI är behovet av två i intravenösa infusionslinjer och expertis med de matematiska delarna, som behövs för få ut information och data. Metoden tar i princip lika lång tid som flera andra tester, men metoden kräver mindre tekniskt och praktiskt kunnande jämfört med utförandet av en hyperglykemisk clamp. Dessutom är inte blodprovstagningarna vid GGI lika frekventa som vid en HC. Graderad glukosinfusion ger en stor fördel av att direkt kunna beräkna  $\beta$ -cellernas glukossensitivitet och möjlighet till en precis reglering av glukosstimulin. Däremot får man inga traditionella mätningar av första och andra fasen insulinrespons med denna metod (Hannon *et al.*, 2017).

## SGLT2-hämmare

*Sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitors* är en ny klass läkemedel som används på humansidan vid behandling av typ II DM. *Sodium-glucose cotransporter 2* är en insulinoberoende transportör i proximala tubuli i njuren, som reabsorberar större delen av den glukos som utsöndras med urinen. Vid inhibering av SGLT2 kan glukosnivåerna i blodet minska genom att öka utsöndringen av glukos i urinen. Eftersom transportören är insulinoberoende kan den användas vid  $\beta$ -cells dysfunktion eller IR (Jabbour, 2014; Gallo *et al.*, 2015).

Njurarna har en stor roll vid glukoshantering och metabolismen för att hålla glukosnivåerna i blodet på en normal nivå. Glukosnivåerna regleras genom glukosutsöndring i cirkulationen via glukoneogenes, samt glukoskonsumtion och reabsorption av glukos från filtrationen i glomeruli. Levern och njurarna är de enda organen som är kapabla att utsöndra glukos i cirkulationen. Levern ökar de endogena glukosnivåerna i blodet genom glukoneogenes och glykogenolys, medan njurarna endast använder sig av glukoneogenes (Mather & Pollock, 2011). Den primära mekanismen för att hantera glukoshomeostasen i njurarna är glukosfiltrationen och reabsorptionen. Reabsorptionen, när glukos transporteras över cellmembranen, sker via transportproteiner som SGLT och GLUT (*glucose transporter*) (Dardi *et al.*, 2016).

*Sodium-glucose cotransporter 2* är de mest dominerande SGLT transportörerna i njurarna, vilka står för ca 90 % av den renala glukosreabsorptionen hos människor. Den resorberade glukosen tas tillbaka till den systemiska cirkulationen och glukoskoncentrationen i glomeruli filtrationen ökar linjärt med plasmaglukosnivåerna. Ökningen sker fram till att glukostransporten är maximal (vid en viss GFR), vilket innebär att den renala glukostransporten är mättad och överflödig glukos utsöndras i urinen; glukosurin ökar då linjärt med plasmaglukosnivåerna (Dardi *et al.*, 2016). *Sodium-glucose cotransporter 1 (SGLT1)* är ett annat transportprotein som istället har en stor betydelse i gastrointestinala kanalens glukosabsorption då den har hög affinitet för både galaktos och glukos. Till skillnad från SGLT1 är SGLT2 transportprotein specifika för glukos och inte t.ex. galaktos (Mather & Pollock, 2011).

Hos personer med typ II diabetes har man observerat ett hyperglykemiskt tillstånd, högre postprandiell glukosutsöndring och nedsatt postprandiell glukosmetabolism, också vid fastande

tillstånd. Istället för att utsöndra mycket glukos i urinen försöker kroppen öka glukosupptaget genom att uppreglera SGLT2 och GLUT2 i renala tubuli. Detta bidrar till det hyperglykemiska tillståndet och utvecklar andra tillstånd som karakteriseras av typ II diabetes. *Sodium-glucose cotransporter 2* hämmare sänker njurens tröskel för glukosutsöndring, vilket gör att glukosutsöndringen i urinen ökar och blodglukos sänks. Genom att sänka den renala tröskeln för glukosutsöndringen kan SGLT2-hämmare minska risken för hyperglykemi, men även bidra till vikt-nedgång och sänka blodtrycket. Eftersom SGLT2-hämmarnas mekanism verkar oberoende av insulin kan de användas hos patienter med IR och beta-cell dysfunktion (Dardi *et al.*, 2016).

Vid behandling med SGLT2-hämmare finns risk för biverkningar, men riskerna är ofta låga och hanterbara. Hypoglykemi har t.ex. inträffat hos personer som behandlats med SGLT2-hämmare (kanagliflozin) i kombination med andra läkemedel med liknande effekt (Yang *et al.*, 2014; Dardi *et al.*, 2016). Andra problem är ökad risk för urinvägsinfektioner och mykotiska infektioner i könsorganen p.g.a. ökad glukosuri. Infektionerna ger sällan upphov till några stora problem då de ofta är milda och enkla att behandla. Andra risker som utvärderas är förlust av vätska via diures (Dardi *et al.*, 2016).

Inom veterinärmedicin har endast några få studier gjorts för att utvärdera SGLT2-hämmare på häst då denna typ av läkemedel inte är registrerade för användning på häst. Velagliflozin är ett exempel på en SGLT2-hämmare, som nyligen studerats som en eventuell behandling för hästar med ID. Preparatet är ännu inte registrerat för varken häst eller människa. År 2018 utfördes en studie där ponnyer med ID behandlades under 39 dagar med velagliflozin när de utfodrades med en hög NSC diet. Den maximala glukoskoncentrationen var lägre (22 %) hos de behandlade ponnyerna jämfört med kontrollgruppen, vilket också resulterade i en minskning av den maximala insulinkoncentrationen (45 %). Ponnyernas diet under studien speglar däremot inte riktigt en normal foderstat för en häst med ID, men den höga halten NSC inducerade fång hos 13 av 37 i kontrollgruppen, medan inga ponnyer i gruppen som behandlats med velagliflozin utvecklade fång (Meier *et al.*, 2018).

Meier *et al.* (2019) utvärderade säkerheten och effektiviteten vid behandling med velagliflozin under 16 veckor på 24 ponnyer med ID. Studien använde sig av en *diet challenge* (diet med hög NSC) var 8e vecka under och fyra veckor efter avslutad behandling för att undersöka om den postprandiella hyperinsulinemin minskade. Under studien var läkemedlet väl accepterat och ponnyerna fick inga uppenbara bieffekter såsom hypoglykemi. I studien hade de även en kontrollgrupp vars serum insulinnivåer (insulin  $C_{max}$ ) inte skilde sig signifikant under studieperioden. Den behandlade gruppens insulin  $C_{max}$  var däremot betydligt lägre efter en 16 veckors behandlingsperiod. De lovande resultaten tyder på ett säkert alternativ att behandla hästar med insulindysreglering genom att sänka den postprandiella insulinkoncentrationen under tröskeln för risken att utveckla fång (Meier *et al.*, 2019).

Som tidigare nämnts är inte velagliflozin ett inregistrerat läkemedel, snarare en substans som endast använts inom forskning. I den aktuella pilotstudien används istället en annan SGLT2-hämmare, kanagliflozin (tablett, Inovokana), som är ett registrerat läkemedel. Kanagliflozin har däremot inte utvärderats tidigare på djurslaget häst, men har visat en förbättring i glykemin hos människor med typ II diabetes (Stenlöf *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014). Andra intressanta

antidiabetiska läkemedel vid behandling av IR hos människor är Metformin och Pioglitazone, som har olika verkningsmekanismer på insulinkänsligheten. Till skillnad från SGLT2-hämmare verkar istället metformin genom att minska glukoneogenesisen i levern och glukosabsorptionen i tarmen (Hustace *et al.*, 2009; Tinworth *et al.*, 2010). Det krävs dock ytterligare studier för att undersöka preparatets verkan och kliniska betydelse hos häst som behandling av ID (Rendle *et al.*, 2013). Pioglitazone ökar istället insulinkänsligheten genom att aktivera specifika receptorer i lever, fett och skelettmuskulatur (Wearn *et al.*, 2011), men som kan vara en del av framtida utveckling av eventuell medicinsk behandling för hästar med ID (Legere *et al.*, 2019).



## MATERIAL OCH METODER

Studien är godkänd i etisk prövning via kliniska vetenskapers generella försökstillstånd (diarienummer 5.8.18-15533/2018). Studien delades in i två delar, en för utvecklandet av GGI (del 1) och en för pilotstudien med läkemedlet kanagliflozin (del 2).

Vid kategorisering av hästarnas totala mängd kroppsfett användes *body condition scoring* (BCS) enligt Henneke *et al.* (1983) med en skala från 1 till 9. För kategorisering av regional fettansamling i nackområdet användes *cresty neck scoring* (CNS) enligt Carter *et al.* 2009a där man använder sig av en skala från 1 till 5.

### Del 1, adaption av GGI för häst

#### **Hästar**

Vid utveckling av en GGI, som är anpassad till häst, användes två varmlodiga travare och en ponny. Hästarna ägs av institutionen för kliniska vetenskaper, Sveriges lantbruksuniversitet (tabell 1). De tre hästarna bedömdes vara kliniskt friska och utan tecken på metabol sjukdom. Samtliga försök utfördes i hästens egen box och hästarna stod uppbundna så att huvudet kunde röras fritt under provtagningsperioden.

Tabell 1. Information om hästarna under del 1, utvecklande av GGI

Häst	Ras	Född	Kön	Vikt (kg)
1	Varmblodig travare	2011	Sto	514
2	Varmblodig travare	2011	Sto	538
3	Ponny	2009	Sto	269,5

#### **Studiedesign**

Initialt utvecklades en GGI anpassad till häst. Ett område över båda jugularvenerna rakades och lokalbedövades sedan med en gel av lokalanestetika (EMLA). Området steriltvättades innan kateterisering. Kvällen innan GGI testet utfördes sattes en intravenös permanentkateter (Intranule, 2.0 x 105 mm) i vardera jugularvenen; en för provtagning och en för infusion av glukos. Hästarna fastades under 8 timmar innan testet påbörjades och fick inte heller äta foder under testets gång. Normal fodergiva erbjöds hästen när testet var genomfört. Innan testet startade påbörjades en kort infusion med 20 % glukoslösning (200 ml/h under 31 sekunder) för att fylla förlängning och kateter med glukoslösning. Det stegvisa intravenösa glukosinfusionstestet startade genom att låta 20 % glukoslösning tillföras kontinuerligt via den ena katetern med hjälp av en volymetrisk infusionspump (Braun Infusomat ® Space). Glukosinfusionen ökades till en ny nivå var 40:e minut och totalt utfördes testet med 6 stegvis ökande glukosinfusionshastigheter. Häst 1 testades i två omgångar med nio dagars mellanrum där första glukosinfusionen startade med 0.25 mg/kg/min och ökades sedan till 0.5, 0.75, 1.0, 2.0 och 3.0 mg/kg/min. För

häst 2 startade glukosinfusionen med 0.5 mg/kg/min och ökades sedan till 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 och 4.0 mg/kg/min. Glukosinfusionen för häst 1 (andra försöksomgången) och för häst 3 startade med 0.4 mg/kg/min och ökades sedan till 0.8, 1.2, 1.6, 2.4 och 3.2 mg/kg/min. Via den andra permanentkatetern togs blodprover (3-5 ml) 10 minuter före och precis innan infusionen startade. Därefter togs blodprov var 10:e minut under testets genomförande. Glukos analyserades i proverna från de diagnostiska testerna. Efter sista infusionsnivån skulle blodglukoskoncentrationen hos hästen hamna på ca 10 mmol/L.

## Del 2, pilotstudie med GGI för utvärdering av SGLT2-hämmare

### Hästar

Totalt ingick tre hästar i pilotstudien, två islandshästar och en shetlandspionny (tabell 2a). Alla hästar i pilotstudien var privatägda och var tidigare diagnostiserade med EMS. För att uppfylla inklusionskriterierna skulle hästarna haft plasmainsulinkoncentrationer över 150 mIU/L vid tidpunkterna 60 eller 90 minuter under ett tidigare utfört OST. Dessutom skulle hästarna ha diagnostiserats med fång av veterinär vid minst ett tidigare tillfälle. Ingen av hästarna hade en pågående episod av fång under studieperioden. Åldern på hästarna var mellan 10-15 år och kroppsvikten varierade mellan 125-430 kg (tabell 2). Samtliga försök utfördes i hästens egen box och hästarna stod uppbundna så att huvudet kunde röras fritt under det diagnostiska testet. Under dagtid fick hästarna gå ute i paddock, förutsatt att kateterområdet skyddades med bandage. Hästarna hade fri tillgång till vatten före, under och efter försöken.

Tabell 2. Information om hästarna i pilotstudien

Häst	Ras	Född	Kön	Vikt (kg)	BCS (1-9)	CNS
A	Shetlandspionny	2004	Valack	125	5,5	2,5
B	Islandshäst	2009	Sto	377	5	2,5
C	Islandshäst	2004	Valack	430	6	3,5

### Studiedesign

Pilotstudien utfördes för att utvärdera behandlingseffekten av kanagliflozin på  $\beta$ -cellssvaret hos hästar med EMS. Hästarna med EMS genomgick en GGI efter 8 timmars fastande. Kateterläggning och förberedelser utfördes som för delstudie 1. Glukosinfusionen startade klockan 08.00 med 0.4 mg/kg/min och ökades sedan stegvis var 40:e minut till 0.8, 1.2, 1.6, 2.4 och därefter 3.2 mg/kg/min. Blodprov togs (3-5 ml) 10 min före och precis innan infusionen startade och därefter var 10:e minut under testets genomförande för analys av blodglukos och plasma-insulin. Efter varje blodprov sköljdes katetern med fysiologiskt NaCl. Dagen efter inleddes behandling med SGLT2-hämmaren kanagliflozin (Inovokana, tabletter 300 mg; 1,8 mg/kg p.o., q 24 hr) under tre veckor. Medicineringen gavs klockan 07:00 varje dag och tabletterna stoppades in i en bit morot eller äpple för att underlätta medicineringen. Under den sista behandlingsdagen gjordes ett nytt GGI (med samma infusionshastigheter och provtagningar som tidigare) en timme efter att kanagliflozin getts.

I pilotstudien utfördes även ett *meal tolerance test* (MMT) och *oral sugar test* (OST) som ingår i andra studentprojekt.

## Blodprovstagning och analys

Blodprover överfördes till vacutainerrör med litium-heparin som sedan centrifugerades under 10 min vid 2700 g. Plasman överfördes till eppendorfrör som sedan frystes i -80 °C för senare analys av insulinkoncentrationerna vid kliniska vetenskapers laboratorium. Vid analys av plasmainsulinkoncentrationerna användes en ELISA (Mercodia Equine Insulin ELISA, Mercodia AB, Uppsala, Sweden). Glukoskoncentrationen från helblod analyserades direkt efter provtagning med hjälp av en glukometer (AccuCheck Aviva, Roche Diagnostics Scandinavia AB, Bromma, Sverige).

## Beräkningar och statistiska analyser

Samtliga grafer och regressionsanalyser gjordes i programmet *GraphPad Prism 8*. En icke linjär regressionsanalys utfördes (anpassad för sigmoidal kurva) för de kurvor som beskriver förhållandena mellan insulinresponsen och blodglukoskoncentrationen (både före och efter behandling med kanagliflozin) – så kallade dos-responskurvor för insulinfrisättningen i förhållande till blodglukoskoncentrationen. Blodglukoskoncentrationen erhöles genom att ta medelvärdet för de två sista blodglukoskoncentrationerna vid varje glukosinfusionssteg under GGI. Signifikansen sattes till  $p < 0.05$ .

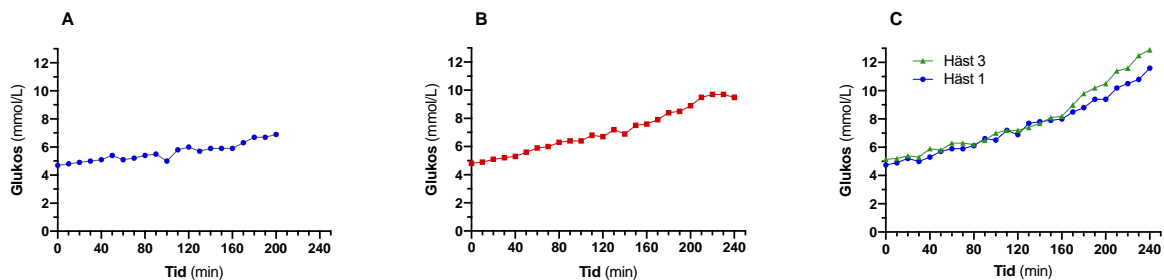
Kvoten av plasmainsulin/blodglukoskoncentration under en GGI ger en bild av hur mycket insulin som frisätts per blodglukosenhet. Glukosintervallet mellan 5 och 9 mmol/L har antagits representera ett fysiologiskt blodglukosintervall pre- och postprandiellt. Ett genomsnittligt mått på hur mycket insulin som utsöndras per glukosenhet för varje häst i glukosintervallet 5-9 mmol/L beräknades genom att ta medelvärdet för samtliga kvoter inom detta blodglukosintervall under GGI och uttrycka det som medelvärdet  $\pm$  standardavvikelsen. Hur mycket mindre insulin som i medeltal frisattes per glukosenhet inom blodglukosintervallet 5-9 mmol/L efter behandling med kanagliflozin har beräknats relativt och sedan uttryckts i procent.

## RESULTAT

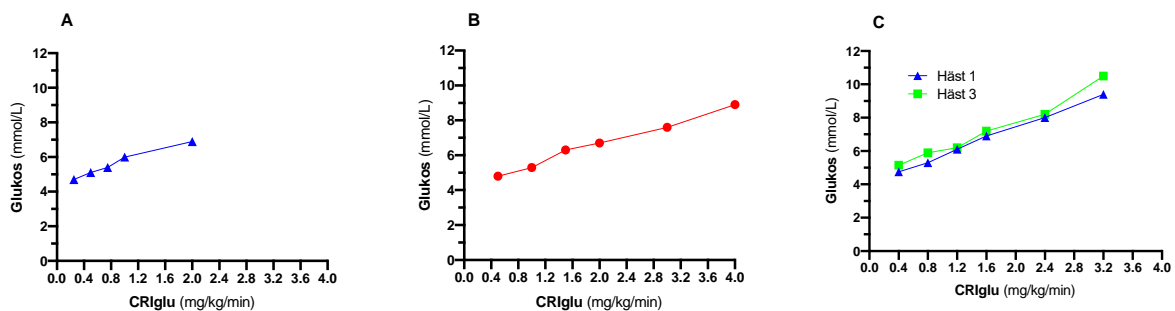
Ingen av hästarna visade tecken på fång eller annat sjukligt tillstånd i samband med studierna.

### Del 1, adaption av GGI

Figur 1A – 1C visar glukoskoncentrationerna i blodet (mmol/L) över tid (minuter) för de olika GGI-testerna. I figur 2A – 2C visas glukosinfusionens hastighet (mg/kg/min) mot korresponderande glukoskoncentrationer i blodet (mmol/L). Alla hästar visade ett positivt linjärt samband mellan glukoskoncentrationen och infusionshastigheten av glukos.



Figur 1. Glukoskoncentration i helblod (mmol/L) under 240 minuter (min) med en GGI. Blodglukoskoncentrationen vid tiden 0 minuter är medelvärde av glukoskoncentrationerna vid 10 och 1 min före glukosinfusionens start. Graf A visar häst 1 vid första omgången med glukosinfusionshastigheterna 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0 och 3.0 mg/kg/min. Graf B visar häst 2 med glukosinfusionshastigheterna 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 och 4.0 mg/kg/min. Graf C visar häst 1 under andra omgången och häst 3; båda med glukosinfusionshastigheterna 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.4 och 3.2 mg/kg/min.



Figur 2. Glukoskoncentration i helblod (mmol/L) över en stegvis ökande glukosinfusion (CRI, mg/kg/min). Graf A visar häst 1 under första omgången. Graf B visar häst 2. Graf C visar häst 1 under andra omgången och häst 3.

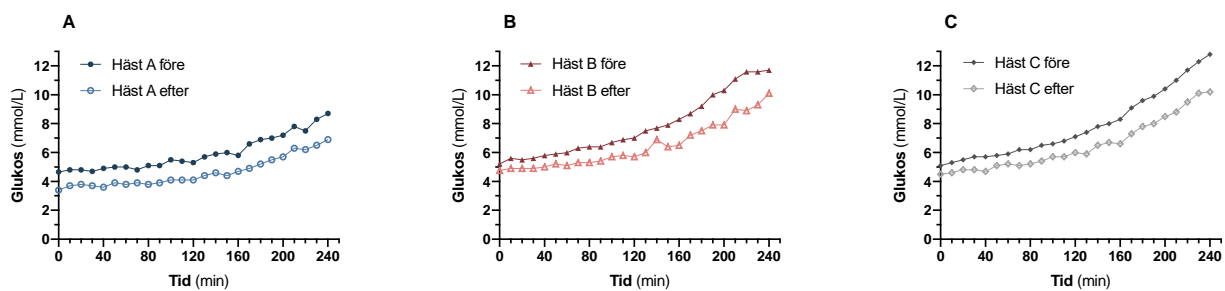
Hos häst 1 var höjningarna i glukosinfusionshastigheterna för låga (0.3, 0.5, 0.8, 1.0 och 2.0 mg/kg/min) för att blodglukoskoncentration på 10 mmol/L skulle nås mot slutet av sista infusionssteget. Kurvan i figur 1A steg inte tillräckligt mycket under testets 200 min för att få en tillräckligt tydlig glukostrappa. Detta kan även ses i figur 2A där glukoskoncentrationerna i blodet inte steg tillräckligt vid varje höjning av glukosinfusionshastigheterna. Den stegvisa höjningen hos häst 2 (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 och 4.0 mg/kg/min) ledde till att blodglukoskoncentrationen kom upp i 10 mmol/L (figur 1B). Data för 3,0 mg/kg/min i figur 2A saknades för att infusionen fick avbrytas av tekniska skäl.

Ett nytt försök utförs på en ponny, d.v.s häst 3, men med ett protokoll där man sänkt glukosinfusionshastigheterna något (0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.4 och 3.2 mg/kg/min) jämfört med häst 2. Samtidigt testades häst 1 igen med samma glukosinfusionshastigheter som för häst 3. Det bildades en tydlig glukostrappa med stegvis ökande blodglukoskoncentrationer (figur 1C). Hästarna 1 och 3 betedde sig på liknande sätt, vilket ses genom att kurvorna följer varandra i ett liknande mönster. Blodglukoskoncentrationerna översteg 10 mmol/L för både häst 1 och 3 (figur 1C) vid sista provtagningen.

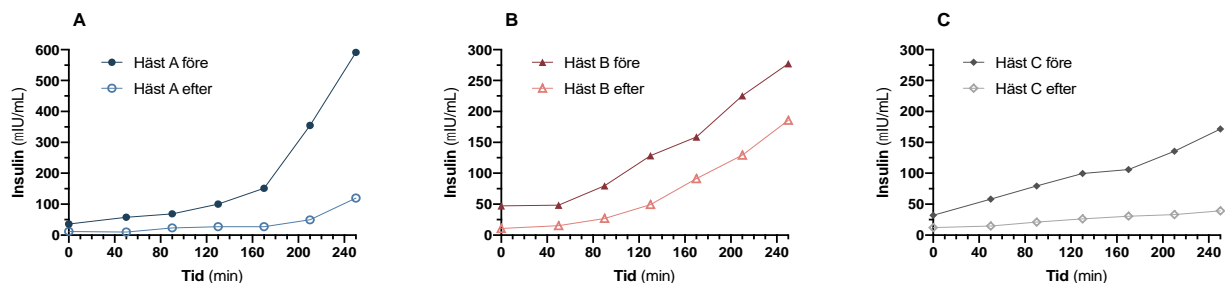
## Del 2, pilotstudie med GGI för utvärdering av SGLT2-hämmare

Samtliga hästar i studien tolererade läkemedlet väl men ägaren till häst C i pilotstudien upplevde att hästen var något tröttare än normalt.

Glukos- och insulinkoncentrationerna under 240 min med en GGI före och efter behandling med kanagliflozin visas i figur 1A-C och 2A-C. Det bildades en tydlig glukostrappa med stegvis ökande blodglukoskoncentrationer parallellt med ökande infusionshastigheter av glukos (figur 1A-C). Koncentrationerna av både blodglukos och plasmainsulin efter fasta var lägre efter behandling med SGLT2-hämmaren jämfört med innan behandling. Skillnaden mellan obehandlad och behandlad ökade med tiden för både glukos och insulin (figur 1A-C och 2A-C).

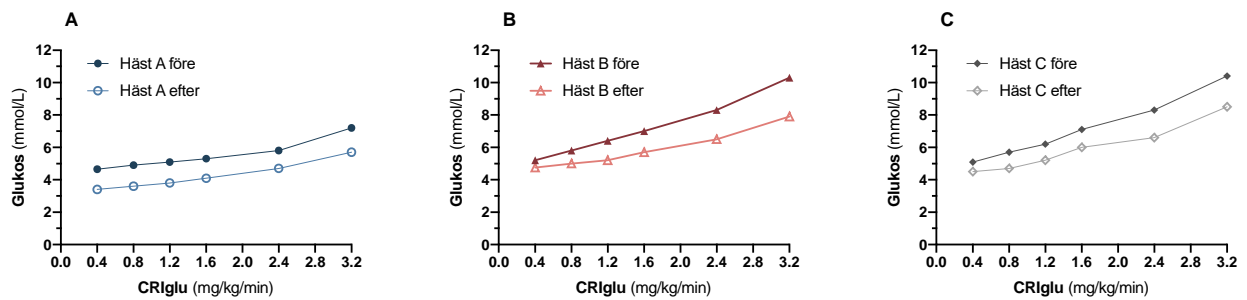


Figur 1. Blodglukoskoncentration i helblod (mmol/L) under 240 minuter (min) med en GGI (glukosinfusionshastigheterna 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.4 och 3.2 mg/kg/min). Separata kurvor för respektive häst (Häst A, B och C) före och efter behandling med kanagliflozin. Blodglukoskoncentrationen vid tiden 0 minuter är medelvärde av glukoskoncentrationerna vid 10 och 1min före glukosinfusionens start.

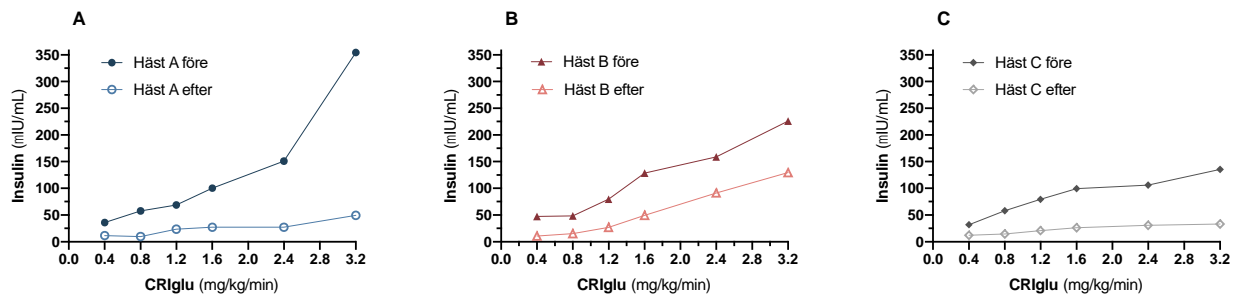


Figur 2. Insulinkoncentration i plasma ( $\mu\text{IU/mL}$ ) under 240 min med en GGI. Separata kurvor för respektive häst (häst A, B och C) före och efter behandling med kanagliflozin.

Alla kurvorna för respektive häst efter behandling följer kurvorna före behandling men de kommer inte upp i lika höga glukos- eller insulinkoncentrationer (figur 3A-C och 4A-C). Skillnaden ökar mellan obehandlad och behandlad häst för både glukos och insulin (figur 3B-C och 4A-C)



Figur 3. Glukoskoncentration i helblod (mmol/L) över ökande glukosinfusion (CRI, mg/kg/min) under en GGI. Separata kurvor för respektive häst (häst A, B och C) före och efter behandling med kanagliflozin.



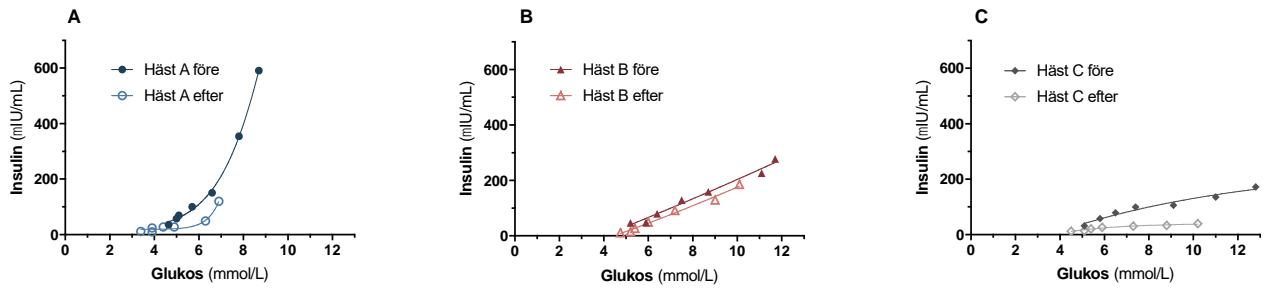
Figur 4. Insulinkoncentration i plasma (µIU/mL) över ökande glukosinfusion (CRI, mg/kg/min) under en GGI. Separata kurvor för respektive häst (häst A, B och C) före och efter behandling med kanagliflozin.

Figur 5 visar respektive individs dos-responskurva från en GGI före och efter behandling med kanagliflozin. Dos-responskurvorna har utmärkt korrelation för en sigmoidal kurva med  $R^2 \geq 0,96$ : häst A ( $R^2_{\text{före}} = 0,99$ ,  $R^2_{\text{efter}} = 0,97$ ), B ( $R^2_{\text{före}} = 0,98$ ,  $R^2_{\text{efter}} = 0,99$ ) och C ( $R^2_{\text{före}} = 0,96$ ,  $R^2_{\text{efter}} = 0,96$ ).

Häst A, B och C får olika dos-responskurvor (Figur 5A-C). Mest utsöndrat insulin per glukosenhet uppstår hos häst A följt av häst B och därefter häst C. Förenklat kan man säga att  $\beta$ -cellsvaret för intravenös glukos är mest uppreglerat hos häst A, följt av häst B och sist häst C som har minst uppreglerat  $\beta$ -cellsvar.

Insulin/glukos-kvotens medelvärde för häst A inom glukosintervallet 5-9 mmol/L minskade med 25 % efter behandling med kanagliflozin ( $19,5 \pm 8,9$  vs.  $14,6 \pm 14,5$  mIU/mmol). Kvotens medelvärde för häst B minskade med 24 % ( $14,4 \pm 4,5$  vs.  $10,9 \pm 4,8$  mIU/mmol) och för häst C med 62 % ( $11,5 \pm 2,1$  vs.  $4,4 \pm 0,5$  mIU/mmol) efter behandling. Alla hästarna fick således

en signifikant minskning av mängden utsöndrad insulin per mmol blodglukos efter behandlingsperioden med kanagliflozin.



Figur 5. Förhållandet mellan insulinkoncentrationen i plasma och blodglukoskoncentrationen (dos-responskurvor från GGI) före och efter behandling med kanagliflozin för häst A (graf A), häst B (graf B) och häst C (graf C).

## DISKUSSION

Med studien har man lyckats ta fram en modifierad GGI för häst med glukosinfusionssteg som gav upphov till en tydlig och stegvis ökning av blodglukoskoncentrationerna. Med denna diagnostiska metod kan man studera  $\beta$ -cellsresponsen utan att få med inkretineffekten. Det graderade glukosinfusionstestet kan anses vara en förenklad, stegvis variant av HC. Hyperglykemisk clamp anses vara *the gold standard* för att beräkna  $\beta$ -cellsvaret utan påverkan av endogent inkretin, men testet är kostsamt, tidskrävande, mycket komplext och kräver expertis (Shankar *et al.*, 2016; Lindåse *et al.*, 2019). En annan stor skillnad är att HC undersöker  $\beta$ -cellsvaret vid en förutbestämd nivå av hyperglykemi (viss förutbestämd steady-state) medan GGI får ett dynamiskt intervall av ökande nivåer av hyperglykemi. Detta ger oss en möjlighet att undersöka förändringar i insulinutsöndringens respons och mönster vid förändrade glukosnivåer i kroppen. Med en GGI kan man således utvärdera den varierande insulinresponsen när blodglukos stiger, men även undersöka kopplingen mellan förändringar i insulinutsöndring och aktuell glukoskoncentration.

En studie visade en stark korrelation mellan insulinutsöndringssvaren från en GGI och HC, vilket indikerar att båda metoderna, d.v.s. dynamiskt förändrat hyperglykemi vs. en enda nivå av hyperglykemi, ger en liknande förståelse för insulinutsöndringens kapacitet (Shankar *et al.*, 2016). Resultaten visade också skillnader i insulinsekretionen i förhållande till glukosnivåerna mellan de olika patientgrupperna (normalhull, överviktiga respektive personer med typ II diabetes) vid användning av en GGI. Studien visade att GGI är en väldigt värdefull metod för att förstå insulinutsöndringens mönster vid diabetes typ II och för att förstå effekterna av behandling. Resultaten av den här studien indikerar att GGI även skulle vara en mycket bra metod att använda kliniskt som hjälp för att detektera och förklara förändringar i  $\beta$ -cellsresponsen hos hästar med ID även om de sällan utvecklar diabetes typ II.

En annan fördel med GGI är att den är enkel att utföra, vilket gör att den lämpar sig att använda i klinisk verksamhet. Andra test som lämpar sig för kliniskt bruk är orala glukostoleranstester, t.ex. oralt sockertest (OST), som också är enkelt att utföra. Orala glukostoleranstester är dock generellt mindre specifika vid mätning av  $\beta$ -cellsvar jämfört med GGI. Det beror på att insulinutsöndringen efter en oral glukosgiva påverkas av flera olika faktorer såsom t.ex. magsäckens tömning, glukosupptag i levern och inkretineffekten (Kronfeld *et al.*, 2005; Hannon *et al.*, 2017). Oralt sockertest är därför endast en uppskattning av insulinsensitiviteten och  $\beta$ -cellresponsen. Trots att resultaten inte är exakta visar orala tester en mer fysiologisk stimulering av insulinutsöndringen jämfört med ett intravenöst test (Pacini & Mari, 2003; Kronfeld *et al.*, 2005; Lindåse *et al.*, 2017). Ett graderat glukosinfusionstest har däremot fördelen att det direkt beräknar  $\beta$ -cellernas glukossensitivitet och möjliggör en precis reglering av glukosstimulin. Däremot får man inga traditionella mätningar av första och andra fasens insulinrespons med denna metod, vilket ändå inte har någon betydelse hos häst då de verkar sakna första fasens respons. Om syftet hade varit att titta på inkretinresponsen så hade man kunnat kombinera en GGI med en OST då den får med inkretinets effekter på insulinsvaret.

De friska hästarnas blodglukoskoncentrationer tog längre tid innan de kom upp till 10 mmol/L under sin GGI jämfört med hästarna med ID. Protokollet med glukosinfusionshastigheterna 0.4,



0.8, 1.2, 1.6, 2.4 och 3.2 mg/kg/min bildade en tydlig glukostrappa med stegvis ökande blodglukoskoncentrationer. Blodglukoskoncentrationerna översteg 10 mmol/L för både häst 1 och 3 vid sista provtagningen. Det är en fördel om blodglukoskoncentrationen i sista infusionssteget ligger runt 10 mmol/L eftersom detta räknas som tröskeln för att glukosuri ska uppstå. Blir glukosurin för stor uppstår en felkälla vid kalkylering av vissa parametrar där infusionshastigheten av blodglukos jämförs med t.ex. blodglukos eller plasmainsulinkoncentrationen. Däremot påverkas inte dos-responskurvan mellan frisatt insulin och plasmaglukoskoncentrationen. Den valda stegvisa infusionsökningen fungerade bra för både de friska hästarna och hästarna med ID i studien eftersom alla hästar visade ett positivt linjärt samband mellan glukoskoncentrationen och infusionshastigheten av glukos. Hos hästarna med ID blev blodglukoskoncentrationerna markant högre i sista infusionssteget, vilket beror på att de är mer insulinresistenta. När GGI utförs kommer det därför bli en variation i kurvutseendet beroende på vilken IS patienten har.

Ett annat viktigt mål för studien var att undersöka  $\beta$ -cellsresponsen med en GGI vid behandling av SGLT2-hämmaren kanagliflozin på häst. Doseringen av kanagliflozin (1,8 mg/kg p.o., q 24 hr) baserades på en muntlig presentation som hölls av Nicolas Frank, ACVIM, juni 2018. Alla tre hästar i studiens del 2 utgick från samma glukosinfusionshastigheter i GGI:n baserat på resultaten från del 1. Resultaten från denna studie visar en tydlig minskning av insulinsvaret efter behandling med kanagliflozin (fig. 1A-C, del 2). *Sodium-glucose cotransporter 2* hämmare påverkar insulinnivåerna indirekt genom att minska upptaget av glukos i njuren och på så sätt sänka glukoskoncentrationen i blodet. Den här studien har visat på en tydlig skillnad i glukos och insulinresponsen vid stegvis ökande infusion av glukos i blodet före och efter behandling med kanagliflozin. Vid behandling med SGLT2-hämmaren ökar inte heller plasmaglukoskoncentrationerna lika mycket som innan behandling. Insulinutsöndringens kapacitet hos patienter med EMS är signifikant förhöjd till följd av deras ID. Resultaten talar för att GGI kan användas för att mäta skillnader i  $\beta$ -cellsresponsen till hyperglykemi för hästar med olika grad av ID (fig. 2A-C och 4A-C, del 2).

Dos-responskurvan hos hästarna i denna studie är sigmoidala, likt hur Byrne *et al.* (1995) beskriver dos-responskurvan i sin helhet hos människor. I en del tidigare studier av  $\beta$ -cellsresponsen med GGI eller HC inom humanmedicinen har dos-responskurvan mellan insulinrespons och blodglukos beskrivits få en sigmoidal form med en plåtå vid kraftigare hyperglykemi (Grodsky *et al.*, 1972; Cersosimo *et al.*, 2014), medan andra har beskrivit dos-respons kurvorna med ett linjärt samband över ett begränsat blodglukosintervall (Byrne *et al.*, 1995; Kjems *et al.*, 2003; Shankar *et al.*, 2016). Dos-responskurvan är dock sigmoidal om man även tar hänsyn till ofysiologiska nivåer av blodglukoskoncentrationerna (kraftig hypoglykemi och extrem hyperglykemi). I ett mer fysiologiskt spektrum från normoglykemi till normala postprandiella nivåer av blodglukos så blir förhållandet linjärt (förenklat). Med hjälp av dos-responskurvorna kunde man även jämföra hur uppreglerat  $\beta$ -cellssvaret var hos hästarna (del 2) för intravenös glukos. I denna studie kunde man säga att häst A hade mest uppreglerat  $\beta$ -cellsvar (kraftig ID med kraftigare insulinsvar), följt av häst B och minst uppreglerat hade häst C genom att beräkna hur mycket insulin som utsöndras per glukosenhet.

Ett annat mycket intressant fynd var att alla hästar fick en signifikant minskning av mängden utsöndrad insulin per mmol glukos efter behandlingsperioden. Detta sågs genom att dos-responskurvorna efter behandlingen var förskjutna nedåt. Kanagliflozin verkar därför, i varje fall hos häst, utöver att ha en indirekt effekt på insulinutsöndringen genom att sänka glukoskoncentrationen i blodet också ha en direkt effekt på  $\beta$ -cellsvaret. Att SGLT2-hämmare även utövar en direkt effekt på  $\beta$ -cellerna är inte visat tidigare på något djurslag. Eftersom längre perioder med hyperinsulinemi inducerar fång (Asplin *et al.*, 2007) kan behandling med kanagliflozin potentiellt vara till stor nytta för hästar som är predisponerade för fång. Ytterligare studier behövs för att undersöka om sänkningen av insulinnivåerna är tillräcklig under de perioder då risken för fång är störst (t.ex. under betesperioden). Dietrestriktioner och anpassade motionsprogram kommer alltid att vara viktiga, men behandlingen kommer förhoppningsvis att kunna hjälpa hästar med kraftig ID som inte svarat på diet och motion.

Hästarna i studien uppvisade inte någon av de biverkningar som man sett på människa, t.ex. ökad risk för urinvägsinfektioner (Dardi *et al.*, 2016). Det är också oklart hur individer med nedsatt njurfunktion tolererar medicinen vilket man bör ta hänsyn till när man överväger att sätta in behandling. För att kunna utvärdera detta behövs studier med ett större antal hästar. Brister i studien är framförallt antalet behandlade hästar och att det saknades en kontrollgrupp. Det färre antalet hästar i studien berodde på finansiell begränsning. Antalet hästar i studien är däremot tillräckligt för att vara till grund för fortsatta studier angående kanagliflozins effekter på hästar med ID. Helst skulle man även vilja utvärdera GGI testets variabilitet genom att köra samma test på samma häst två gånger. Fler studier kan även behövas för att undersöka effekten och eventuella biverkningar till följd av upprepad behandling med läkemedlet under riskperioder för fång. Till skillnad från en del andra studier av SGLT2-hämmare på häst har denna studie utgått från en mer realistisk diet än de som utgår från en fodergiva med hög NSC under behandlingsperioden. Det postprandiella insulinsvaret påverkas även av fodrets innehåll av NSC. Foder med högt innehåll av NSC ger ett ökat postprandiellt insulinsvar hos normala hästar och överdrivet högt hos hästar med ID, men kan skilja sig mellan raser. Tanken är att en häst med ID helst fodras med en diet med lågt innehåll av NSC för att minska risken för postprandiell hyperinsulinemi och utveckling av fång (Lindåse *et al.*, 2018).

Sammanfattningsvis visar denna studie att en modifierad GGI kan användas som en diagnostisk metod för att mäta  $\beta$ -cellsfunktionen hos häst. Det graderade glukosinfusionstestet användes sedan för att undersöka om SGLT2-hämmaren kanagliflozin minskade insulinresponsen hos hästar med EMS. Kanagliflozin hade en indirekt effekt genom att minska glukosnivåerna i blodet och på så sätt minska insulinresponsen. Läkemedlet hade även en direkt effekt på  $\beta$ -cellerna genom att nedreglera  $\beta$ -cellernas respons till glukos, vilket är en helt ny upptäckt. Detta innebär att läkemedlet potentiellt skulle kunna minska risken för fång hos hästar som har postprandiell hyperinsulinemi p.g.a. ID. Denna pilotstudie kan ligga till grund för större studier av behandling av EMS-hästar med kanagliflozin. Fler studier krävs för att utvärdera behandlingseffekten och säkerheten vid behandling med kanagliflozin hos hästar med ID.

## POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING

Efter utfodring har hästar med ekvint metabolt syndrom (EMS) en kraftig insulinfrisättning från bukspottkörteln. Detta innebär att insulinnivåerna i blodet kan bli så höga att de blir toxiska för hästen och predisponera för utveckling av fång. Ekvint metabolt syndrom liknar mycket metabolt syndrom hos människa där övervikt och en balansrubbing mellan insulin, glukos och lipider har en stor roll. Dagens behandling och hantering av EMS utgår från att man försöker minska insulinsvaret genom att utfodra hästen med foder som har ett lågt sockernehåll och följa olika motionsprogram. Enligt tidigare forskning är dessa åtgärder oftast inte tillräckliga, därför är utveckling av medicinsk behandling som sänker insulinsvaret av stort intresse. På människor med diabetes har man börjat använda läkemedel som sänker blodglukoskoncentrationen. Preliminära studier har visat att dessa läkemedel kan vara effektiva på hästar med EMS för att sänka insulinsvaret. De studier som gjorts använder substanser som inte finns registrerade i Sverige, men kanagliflozin är en aktiv substans som finns registrerat i tabletter vid namn Invokana.

Syfte med studien är att anpassa en *graded intravenous glucose infusion* (GGI) för djurslaget häst och med den undersöka om behandling med kanagliflozin (Invokana) minskar insulinsvaret hos hästar med EMS. På så sätt kan resultaten ligga till grund för att upprätta en behandling för hästar med EMS i framtiden. Pilotstudien kommer ligga till grund för större studier av behandling med kanagliflozin hos hästar med EMS.

Studien bestod av två delar. Del 1 fokuserade på utvecklandet av ett nytt diagnostiskt test som tidigare inte använts på häst men som används frekvent inom humanmedicin vid diagnostik av typ II diabetes mellitus och andra metabola sjukdomar. Initialt utvecklades därför en *graded intravenous glucose infusion* (GGI) anpassad till djurslaget häst. I del 1 ingick fyra hästar som fick en infusion i blodet av en glukoslösning vars infusionshastighet ändrades likt en stigande trappa. På så sätt kunde varje ökning av glukosinfusionens hastighet och dess korresponderande insulinfrisättning från bukspottkörteln utvärderas. Metoden ger oss mer information om hur bukspottkörteln svarar på glukos utan påverkan av vissa hormoner från tarmkanalen (inkretiner), som kan påverka insulinfrisättningen. Inkretiner är ett exempel på ett viktigt hormon som påverkar insulinsvaret och ökar den glukosinducerade insulinutsöndringen. Olika nivåer av glukoslösningens infusionshastighet testades tills ett lämpligt protokoll kunde utformas. Med ett passande protokoll var det möjligt att tillämpa denna diagnostiska metod på häst; GGI kunde därmed användas för att utvärdera farmakologiska effekter av läkemedlet kanagliflozin i studiens del 2. Genom att använda denna diagnostiska metod kan noggrann information om bukspottkörtelns insulinutsöndringskapacitet erhållas. Testets enkelhet är också ett skäl till att använda det som ett diagnostiskt alternativ i klinisk verksamhet inom hästmedicin.

Efter att GGI hade anpassats till häst kunde denna diagnostiska metod appliceras i pilotstudien för att utvärdera läkemedlets effekt på insulinutsöndringen. Under del 2 behandlades tre hästar med EMS med läkemedlet under tre veckor. Kanagliflozin är en ny klass läkemedel som används inom humanmedicin vid behandling av typ II diabetes. Läkemedlet sänker glukosnivåerna i blodet genom att låta glukos utsöndras med urinen, vilket påverkar insulinnivåerna indirekt. En GGI utfördes innan och efter behandling för att kunna utvärdera läkemedlets effekt på

insulinutsöndringen. Samtliga hästar hanterade läkemedlet bra och resultaten efter behandling visade signifikanta minskningar av glukos- och insulinnivåerna. Vid varje ökning av infusionshastigheten med glukoslösningen ökade nivåerna av glukos i blodet och insulin inte lika mycket som tidigare. Dessa resultat innebär att läkemedlet potentiellt skulle kunna minska risken för utvecklandet för fång hos hästar som är predisponerade för fång pga deras kraftiga insulinutsöndring. Kanagliflozin skulle kunna användas som komplement till motionsprogram och foderrestriktioner, som är de vanligaste metoderna för att hjälpa en häst med EMS. Dessutom skulle läkemedlet kunna hjälpa de hästar som har en mycket kraftig insulinutsöndring och där de tidigare behandlingsmetoderna inte varit tillräckliga. Denna pilotstudie ligger till grund för större studier vid behandling av EMS-hästar med kanagliflozin. Fler studier krävs för att utvärdera behandlingseffekten och säkerheten vid behandling med kanagliflozin hos hästar med kraftig insulinutsöndring från bukspottkörtlen.

## REFERENSER

- Asplin K.E., Sillence M.N., Pollitt C.C. & McGowan C.M. (2007). Induction of laminitis by prolonged hyperinsulinaemia in clinically normal ponies. *The Veterinary Journal*, 174: 520-535.
- Bailey S.R., Habershon-Butcher J., Ransom K., Elliot, J. & Menzies-Gow, N.J. (2008). Hypertension and insulin resistance in a mixed-breed population of ponies predisposed to laminitis: further characterizing prelaminitic metabolic syndrome. *American Journal of Veterinary Research*, 69: 122-129.
- Bamford N.J., Potter S.J., Harris P.A. & Bailey S.R. (2014). Breed differences in insulin sensitivity and insulinemic responses to oral glucose in horses and ponies of moderate body condition score. *Domestic Animal Endocrinology*, 47: 101-107
- Bröjer J., Lindåse S., Hedenskog J., Alvarsson K. & Nostell (2013). Repeatability of the combined glucose-insulin tolerance test and the effect of a stressor before testing in horses of 2 breeds. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27: 1543-1550.
- Byrne M.M., Sturis J. & Polonsky K.S. (1995). Insulin secretion and clearance during low-dose graded glucose infusion. *American Physiological Society*, 268: E21-E27.
- Carter R.A., Geor R.J., Burton Staniar W., Cubitt T.A. & Harris P.A. (2009a). Apparent adiposity assessed by standardised scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies. *The Veterinary Journal*, 179: 204-210.
- Carter R.A., McCutcheon L.J., George L.A., Smith T.L., Frank N. & Geor R.J. (2009b). Effects of diet-induced weight gain on insulin sensitivity and plasma hormone and lipid concentration in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 70: 1250-1258. Doi: 10.2460/ajvr.70.10.1250. [2017-02-18]
- Carter R.A. Treiber K., Geor R., Douglass L. & Harris P.A. (2009c). Prediction of incipient pasture-associated laminitis from hyperinsulinaemia, hyperleptinaemia and generalised and localised obesity in a cohort of ponies. *Equine Veterinary Journal*, 41: 171-178.
- Cersosimo E., Solis-Herrera C., Trautmann M.E., Malloy J. & Triplitt C.L. (2014). Assessment of pancreatic beta-cell function: review of methods and clinical applications. *Current Diabetes Reviews*, 10: 2-42.
- Dardi I., Kouvatsos T. & Jabbour S.A. (2006). SGLT2 inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, 101: 27-39, doi: 10.1016/j.bcp.2015.09.005. [2019-04-28]
- De Laat M.A., Fitzgerald D.M., Sillence M.N. & Spence R.J. (2018). Glucagon-like peptide-2: a potential role in equine insulin dysregulation. *Equine Veterinary Journal*, 50(6): 842-847
- De Laat M.A., McGowan C., Sillence M. & Pollitt C. (2010). Equine laminitis: Induced by 48h hyperinsulinaemia in Standardbred horses. *Equine Veterinary Journal*, 42: 129-135
- De Laat M.A., McGree J.M & Sillence M.N. (2016). Equine hyperinsulinemia: investigation of the enteroinsular axis during insulin dysregulation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 310: E61-E72, doi: 10.1152/ajpendo.00362.2015. [2019-09-11]
- Dugdale A.H., Curtis G.C., Cripps p., Harris P.A. & Argo C.M. (2010). Effect of dietary restriction on body condition, composition welfare of overweight and obese pony mares. *Equine Veterinary Journal*, 42: 600-610, doi: 10.1111/j.2042-3306.2010.00110.x. [2019-09-16]

- Durham, A. E., Frank, N., McGowan, C. M., Menzies-Gow, N. J., Roelfsema, E., Vervuert, I., Feige, K. & Fey, K. (2019). ECEIM consensus statement on equine metabolic syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(2), 335–349, doi:10.1111/jvim.15423. [2019-04-02]
- Elahi D. (1996). In praise of the hyperglycemic clamp. A method for assessment of beta-cell sensitivity and insulin resistance. *Diabetes Care*, 29: 278-286.
- Frank N., Geor R.J., Bailey S.R., Durham A.E. & Johnson P.J. (2010). Equine metabolic syndrome: peripheral Cushing's syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24: 467-475, doi: 10.1111/j.1939-1676.2010.0503.x. [2019-09-27]
- Frank N. & Tadros E.M. (2014). Insulin dysregulation. *Equine Veterinary Journal*, 46: 103-112.
- Gallo L.A., Wright E.M. & Vallon V. (2015). Probing SGLT2 as a therapeutic target for diabetes: basic physiology and consequences. *Diabetes & Vascular Disease Research*, 12: 78-89, doi: 10.1177/1479164114561992. [2019-10-16]
- Geor R. & Frank N. (2009). Metabolic syndrome – From human organ disease to laminar failure in equids. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 129: 151-154.
- Grundy S.M. (2008). Metabolic syndrome pandemic. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28: 629-636, doi: 10.1161/ATVBAHA.107.151092. [2019-09-27]
- Hannon T.S., Kahn S.E., Utzschneider K.M., Buchanan T.A., Nadeau K.J., Zeitler P.S., Ehrmann D.A., Arslanian S.A., Caprio S., Edelstein S.L., Savage P.J. & Mather K.J. (2017). Review of methods for measuring  $\beta$ -cell function: Design considerations from Restoring Insulin Secretion (RISE) Consortium. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 20: 14-24, doi:10.1111/dom.13005. [2019-04-02]
- Henneke D., Potter G., Kreider J. & Yeates B. (1983) Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Veterinary Journal*, 15: 371-372.
- Hustace J.L., Firshman A.M. & Mata J.E. (2009). Pharmacokinetics and bioavailability of metformin in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 70 (5): 665-668, doi: 10.2460/ajvr.70.5.665. [2019-09-16]
- Jabbour S.A. (2014). SGLT2 inhibitors to control glycemia in type 2 diabetes mellitus: a new approach to an old problem. *Postgraduate Medicine*, 126: 111-117, doi: 10.3810/pgm.2014.01.2731. [2019-10-16]
- Jacob S., Geor R., Weber P., Harris P. & McCue M. (2017). Effect of age and dietary carbohydrate profiles on glucose and insulin dynamics in horses. *Equine Veterinary Journal*, 50: 249-354.
- Johnson P. (2002). The equine metabolic syndrome: peripheral Cushing's syndrome. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 18: 271-293, doi: 10.1016/S0749-0739(02)00006-8. [2019-09-27]
- Kjems L.L., Holst J.J., Volund A. & Madsbad S. (2003). The influence of GLP-1 on glucose-stimulated insulin secretion. Effects on beta-cell sensitivity in type 2 and nondiabetic subjects. *Diabetes*, 52: 380-386.
- Kronfeld D.S., Treiber K.H. & Geor R.J. (2005). Comparison of nonspecific indications and quantitative methods for the assessment of insulin resistance in horses and ponies. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226: 712-719.
- Legere R.M., Taylor D.T., Davis J.L., Bello K., Parker C., Judd R.L. & Wooldridge A.A. (2019). Pharmacodynamic effects of pioglitazone on high molecular weight adiponectin concentrations

- and insulin response after oral sugar in equids. *Journal of Equine Veterinary Science*, 82, doi: 10.1016/j.jevs.2019.102797. [2019-10-29]
- Lindåse S. (2017). *Insulin Sensitivity and Postprandial Insulin Response in Equines*. Diss. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet.
- Lindåse S., Johansson H., Månsby N. & Bröjer J. (2019). Repeatability of the hyperglycaemic clamp for assessment of beta-cell response and insulin sensitivity in horses. *Equine Veterinary Journal*, doi: 10.1111/evj.13. [2019-10-17]
- Lindåse S., Müller C., Nostell K. & Bröjer J. (2018). Evaluation of glucose and insulin response to haylage diets with different content of nonstructural carbohydrates in 2 breeds of horses. *Domestic Animal Endocrinology*, 64: 49-58
- Lindåse S., Nostell K. & Bröjer J. (2015). A modified oral sugar test for evaluation of insulin and glucose dynamics in horses. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 58: 64, doi: 10.1186/s13028-016-0246-z. [2019-04-28]
- Lindåse S., Nostell K., Müller C., Jensen-Waern M. & Bröjer J. (2016). Effects of diet-induced weight gain and turnout to pasture on insulin sensitivity in moderately insulin resistant horses. *American Journal of Veterinary Research*, 77: 300-309.
- Lindåse S., Nostell K., Söder J. & Bröjer J. (2017). Relationship between  $\beta$ -cell response and insulin sensitivity in horses based on the Oral Sugar Test and the Euglycemic Hyperinsulinemic Clamp. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31: 1541-1550.
- Mather A. & Pollock C. (2011). Glucose handling by the kidney. *International Society of Nephrology*, 120: S1-S6, doi: 10.1038/ki.2010.509. [2019-10-16]
- McCue M., Geor R.J., Schultz N. (2015). Equine metabolic syndrome: a complex disease influenced by genetics and the environment. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35: 367-375.
- Meier A., de Laat M., Reiche D., Fitzgerald D. & Sillence M. (2019). The efficacy and safety of velagliflozin over 16 weeks as a treatment for insulin dysregulation in ponies. *BMC Veterinary Research*, 15:65, doi: 10.1186/s12917-019-1811-2. [2019-10-07]
- Meier A., de Laat M., Reiche D., Pollitt C., Walsh D., McGree J. & Sillence M. (2017). The oral glucose test predicts laminitis risk in ponies fed a diet high in nonstructural carbohydrates. *Domestic Animal Endocrinology*, 63: 1-9, doi: 10.1016/j.domaniend.2017.10.008. [2019-11-14]
- Meier A., Reiche D., de Laat M., Pollitt C., Walsh D. & Sillence M. (2018). The sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor velagliflozin reduces hyperinsulinemia and prevents laminitis in insulin-dysregulated ponies. *PLOS ONE*, 13:9, doi: 10.1371/journal.pone.0203655. [2019-10-07]
- Menzies-Gow N.J., Wray H., Bailey S.R., Harris P.A. & Elliott J. (2014). The effect of exercise on plasma concentrations of inflammatory markers in normal and previously laminitic ponies. *Equine Veterinary Journal*, 46: 317-321, doi: 10.1111/evj.12132. [2017-02-18]
- Mittelman S.D., Van Citters G.W., Kim S.P., Davis D.A., Dea M.K., Hamilton-Wessier M. & Bergman R.N. (2000). Longitudinal compensation for fat-induced insulin resistance includes reduced insulin clearance and enhanced beta-cell response. *Diabetes*, 49.
- Pacini G. & Mari A. (2003). Methods for clinical assessment of insulin sensitivity and  $\beta$ -cell function. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 17: 305-322.
- Pratt-Phillips S.E., Geor R.J. & McCutcheon L.J. (2015). Comparison among the euglycemic-hyperinsulinemic clamp, insulin-modified frequently sampled intravenous glucose tolerance test, and oral

- glucose tolerance test for assessment of insulin sensitivity in healthy Standardbreds. *American Journal of Veterinary Research*, 76: 84-91, doi: 10.2460/ajvr.76.1.84. [2019-09-30]
- Selim S., Elo K., Jaakkola S., Karikoski N., Boston R., Reilas T., Särkijärvi S., Saastamoinen M & Kokkonen T. (2015). Relationships among body condition, insulin resistance and subcutaneous adipose tissue gene expression during the grazing season in mares. *PLoS ONE*, 10 (5): e0125968
- Shankar S.S., Shankar R.R., Mixson L. A., Miller D.L., Chung C., Cilissen C., Beals C.R., Stoch S. A., Steinberg H.O. & Kelley D.E. (2016). Linearity of beta-cell response across the metabolic spectrum and to pharmacology: insights from a graded glucose infusion-based investigation series. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 310: E865-E873, doi: 10.1152/ajpendo.00527.2015.
- Stenlöf K., Cefalu W.T., Kim K.A., Alba M., Usiskin K., Tong C., Canovatchel W. & Meininger G. (2013). Efficacy and safety of canagliflozin monotherapy in subjects with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled with diet and exercise. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 15:372-382.
- Tanti J.F., Ceppo F., Jager J. & Berthou F. (2013). Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance. *Frontiers in Endocrinology*, 3: 181, doi: 10.3389/fendo.2012.00181. [2019-09-28]
- Tinworth K.D., Edwards S., Noble G.K., Harris P.A. Sillence M.N. & Hacket L.P. (2010). Pharmacokinetics of metformin after enteral administration in insulin-resistant ponies. *American Journal of Veterinary Research*, 71: 1201-1206, doi: 10.2460/ajvr.71.10.1201. [2019-11-15]
- Treiber K.h., Kronfeld D.S., Hess T.M., Byrd B.M, Splan R.K. & Staniar W.B. (2006). Evaluation of genetic and metabolic predisposition and nutritional risk factors for pasture-associated laminitis in ponies. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228: 1538-1545.
- Vick M.M., Adams A.A., Murphy B.A., Sessions D.R., Horohov D.W., Cook R.F., Shelton B.J. & Fitzgerald B.P. (2007). Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity in the horse. *Journal of Animal Science*, 85: 1144-1155.
- Wearn J.M.G., Crissman M.V, Davis J.L, Geor R.J., Hodgson D.R., Suagee J.K., Ashraf-Khorassani M. & McCutcheon, L.J. (2011). Pharmacokinetics of pioglitazone after multiple oral dose administration in horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 34: 252-258, doi: 10.1111/j.1365-2885.2010.01217.x.
- Wilcox G. (2005). Insulin and insulin resistance. *The Clinical Biochemist Reviews*, 26: 19-39.
- Yang X.P., Lai D., Zhong X.Y., Shen H.P. & Huang Y.L. (2014). Efficacy and safety of canagliflozin in subjects with type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 70:1149-1158, doi: 10.1007/s00228-014-1730-x. [2019-10-20]