

Kan behandling med kanagliflozin sänka postprandiella glukos- och insulinkoncentrationer hos hästar med EMS?

Utvärdering av behandlingseffekten med hjälp av ett oralt
sockerbelastningstest

Can treatment with canagliflozin reduce the postprandial glucose and insulin concentration in horses with EMS?

Evaluation of treatment effect using an oral sugar test



Olga Svensson

*Uppsala
2020*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

Kan behandling med kanagliflozin sänka postprandiella glukos- och insulinkoncentrationer hos hästar med EMS?

Utvärdering av behandlingseffekten med hjälp av ett oralt sockerbelastningstest

Can treatment with canagliflozin reduce the postprandial glucose and insulin concentration in horses with EMS?

Evaluation of treatment effect using an oral sugar test

Olga Svensson

Handledare: Sanna Truelsen Lindåse, institutionen för kliniska vetenskaper

Biträdande handledare: Johan Bröjer, 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:

Nyckelord: häst, ekvint metabolt syndrom, EMS, insulinresistens, hyperinsulinemi, kanagliflozin, oralt sockerbelastningstest

Key words: horse, equine metabolic syndrome, EMS, insulin resistance, hyperinsulinaemia, canagliflozin, oral sugar test

Sveriges lantbruksuniversitet

Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för kliniska vetenskaper

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. Läs om SLU:s publiceringsavtal 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. (Embargo 6 mån)

SAMMANFATTNING

Ekvint metabolt syndrom (EMS) är en endokrin rubbning hos häst som leder till ökad risk för utveckling av fång. Syndromet innefattar insulindysreglering, basal- och postprandiell hyperinsulinemi, insulinresistens, samt övervikt och/eller regionala fettdepåer.

Insulin är ett hormon som ansvarar för glukosreglering i blod och vävnader och produceras i pankreas av β -celler i de Langerhanska cellöarna. Då insulinresistens uppstår fås ej ett normalt insulinsvar vid höjda blodglukosnivåer, vilket hos häst leder till hyperinsulinemi (förhöja nivåer av insulin i blodet) på grund av ökade insulinutsöndring från pankreas. Hyperinsulinemi har i flertalet studier visat sig leda till fång hos hästar.

Fång är ett smärtsamt sjukdomstillstånd som drabbar lamellvävnaden i hästens hovar och orsakar kraftig hälta. Patofysiologin bakom fång är ej helt klarlagd. Flertalet hästar avlivas på grund av fång årligen. I dagsläget finns ingen medicinsk behandling som har visat sig ha god effekt för behandling av insulindysreglering hos häst. Hästar drabbade av EMS rekommenderas därför behandling med viktning, motion och foderrestriktion, framför allt gällande mängden icke-strukturella kolhydrater i fodret.

Olika metoder finns för diagnostik av hästar med insulindysreglering men flertalet intravenösa tester är komplicerade och tidskrävande. Istället är orala dynamiska tester bättre för diagnostik i fält. Ett modifierad oralt sockerbelastningstest (OST) för bedömning av β -cellssvaret hos hästar togs fram av forskare vid Sveriges lantbruksuniversitet (SLU).

Kanagliflozin är ett av många läkemedel som används vid behandling av diabetes mellitus typ II hos människor. Läkemedlet verkar hämmande på natrium-glukos-ko-transportör 2 (SGLT2) och minskar därmed reabsorptionen av glukos i njurarna. Detta resulterar i att en större mängd glukos utsöndras i urinen vilket sänker glukos- och insulinkoncentrationen i blodet. Effekten av SGLT2-hämmare som behandling för hästar har utvärderats i några få studier, med positiva resultat.

En pilotstudie utfördes under 2019 där tre insulinresistenta hästar valdes ut för att delta i studien. Syftet med denna studie var att utvärdera behandlingseffekter av kanagliflozin hos hästar diagnostiserade med EMS, med hjälp av ett OST.

En generell sänkning av postprandiella insulinkoncentrationer sågs hos alla tre hästar i studien, och postprandiella glukoskoncentrationer sänktes hos två av tre hästar. Även sänkta maxkoncentrationer av både blodglukos och plasmainsulin sågs hos alla hästar. Ingen av hästarna i studien utvecklade fång eller hypoglykemi under studiens gång. Resultatet från denna pilotstudie indikerar att medicinering med kanagliflozin kan sänka postprandiella blodglukos- samt plasmainsulinkoncentrationer hos hästar med insulindysreglering.

SGLT2-hämmare kan i framtiden komma att bli ett nytt behandlingsalternativ för hästar med EMS och insulindysreglering, men fler studier med större studiepopulationer behöver göras i framtiden.

SUMMARY

Equine metabolic syndrome (EMS), is an endocrine disorder that predispose horses to laminitis. The syndrome includes insulindysregulation, basal- and postprandial hyperinsulinemia, insulin resistance, overweight and increased regional fat deposits.

Insulin is a hormone responsible for glucose regulation in the blood and tissues and is excreted by β -cells in the pancreatic Isles of Langerhans. Insulin resistance is defined as an abnormal insulin response to elevated blood glucose concentrations which, in horses, leads to hyperinsulinemia as pancreas increases its' insulin secretion. In several studies, hyperinsulinemia has been shown to lead to laminitis in horses.

Laminitis is a painful hoof condition in horses affecting the lamellae within the hoof wall, which leads to separation of the lamellae, pain and pronounced lameness. The pathophysiology behind the disease is not yet fully understood and many horses have to be euthanized due to laminitis every year. Until today, no pharmacological treatment have been found to be effective for treating insulin dysregulation in horses. Options for treatment today include induction of weight loss, exercise and dietary restrictions with focus on lowering the amount of non-structural carbohydrates in the feed.

Several different methods are available for diagnosing horses with insulin dysregulation, but many intravenous tests are complicated to perform and time consuming. Instead, oral sugar tests are easier to use for diagnosing horses under field settings. A modified oral sugar test was developed by Swedish scientists at the Swedish university of agricultural sciences (SLU).

Canagliflozin, a SGLT2-inhibitor, is one of many medical substances used for treating diabetes mellitus type II in humans. The drug works through inhibiting effects on sodium-glucose-co-transporter 2 (SGLT2), which is normally responsible for reabsorption of glucose in the proximal tubuli of the kidney. By inhibiting this receptor, glucose is excreted in urine in large amounts, resulting in lowered glucose- and insulin concentrations in blood.

A pilot study was performed during spring and fall of 2019 where three horses diagnosed with insulin resistance were selected to participate. The aim of this study was to evaluate the effect of canagliflozin on blood glucose and plasma insulin concentrations in horses with EMS, evaluated with a modified oral sugar test. A general reduce in postprandial insulin concentrations were seen in all three horses participating in this study, and reduced levels of blood glucose were seen in two out of three horses. Peak concentrations of both blood glucose and plasma insulin were lowered in all three horses. None of the horses developed laminitis or hypoglycaemia during the study. The result from this pilot study indicates that treatment with canagliflozin can reduce the postprandial blood glucose and plasma insulin concentrations in horses with insulin dysregulation. SGLT2-inhibitors might become a new treatment option for horses with EMS and insulin dysregulation. Further studies using larger study populations has to be performed in the future.

INNEHÅLL

INLEDNING	1
SYFTE.....	2
LITTERATURÖVERSIKT.....	3
Insulin.....	3
Insulinresistens och hyperinsulinemi	3
Rasskillnader i insulinreglering.....	3
EMS – ekvint metabolt syndrom.....	4
Fång och ekvint metabolt syndrom	4
Hullbedömning.....	5
Diagnostiska metoder för insulinresistens och hyperinsulinemi	5
Kvantitativa tester	5
Euglycemisk hyperinsulinemisk clamp - EHC.....	6
Hyperglycemisk clamp - HC	6
Frequently sampled intravenous glucose tolerance test - FSIGTT.....	6
Dynamiska intravenösa tester.....	6
Combined glucose-insulin test - CGIT.....	6
Dynamiska orala tester	6
Meal tolerance test - MTT	6
Standard oralt glukostoleranstest - OGTT.....	6
In-feed oralt glukostoleranstest - OGTT	7
Oralt sockerbelastningstest - OST	7
Modifierad OST	7
Behandling av hästar med EMS och insulindysreglering.....	7
Foderrestriktion och motion	7
Farmakologisk behandling	8
Metforminhydroklorid.....	8
Pioglitazon.....	8
SGLT2-hämmare.....	9
MATERIAL OCH METODER.....	10
Hästar	10
Studiedesign	10
Instrumentering.....	11
Fodrings- och uppställningsrutiner.....	11
Modifierat oralt sockerbelastningstest - OST	11
Analys av blodglukos och plasmainsulin	11
Bearbetning av data samt beräkningar	11
RESULTAT	12
Basalkoncentrationer för glukos och insulin	12
Arean under kurvan (AUC) för glukos.....	12
Arean under kurvan (AUC) för insulin	13
Maxkoncentrationer för glukos i blod ($Peak_{glu}$)	13
Maxkoncentrationer för insulin ($Peak_{ins}$).....	14
DISKUSSION	15
Bieffekter av medicinering.....	16

Utvärdering av OST	17
Studiebegränsningar	17
KONKLUSION.....	18
POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING	19
KÄLLFÖRTECKNING	20

FÖRKORTNINGAR

EMS	Ekvint metabolt syndrom
OST	Oralt sockerbelastningstest
SLU	Sveriges lantbruksuniversitet
SGLT2	Sodium glucose co-transporter 2
BCS	Body condition score
CNS	Cresty neck score
PPID	Pituitary pars intermedia dysfunction, Cushings sjukdom
EHC	Euglycemisk hyperinsulinemisk clamp
HC	Hyperglycemisk clamp
FSIGTT	Frequently sampled intravenous glucose tolerance test
CGIT	Combined glucose-insulin test
MTT	Meal tolerance test
OGTT	Oralt glukostorelanstest
GGI	Graded glucose infusion
NCS	Non-structured carbohydrates, icke-strukturella kolhydrater
AUC	Area under curve
AUC _{glu}	Area under curve för blodglukos
AUC _{ins}	Area under curve för plasmainsulin
Peak _{glu}	Maxkoncentration för blodglukos
Peak _{ins}	Maxkoncentration för plasmainsulin
Diff _{glu}	Differensen för AUC _{glu}
Diff _{ins}	Differensen för AUC _{ins}
AUC _{ins/glu}	Differensen för AUC _{ins} dividerat med AUC _{glu}
Diff _{ins/glu}	Kvot för differens av plasmainsulinkoncentration dividerat med differensen för blodglukoskoncentration

INLEDNING

Ekvint metabolt syndrom (EMS) hos häst är en samling riskfaktorer för utveckling av fång vilket, enligt ett *consensus statement* från 2018, inkluderar generell och regional fetma samt insulindysreglering, vilket är ett samlingsnamn för insulinresistens i vävnader, basal- samt postprandiell hyperinsulinemi (onormalt hög insulinkoncentration i blodet). Namnet EMS och dess definition fastställdes först år 2002 (Johnson, 2002) baserat på definitionen av humant metabolt syndrom, vilket inkluderar bland annat visceral fetma, högt blodtryck, högt kolesterol, triglyceridemi samt en ökad risk för utveckling till diabetes mellitus typ II.

Postprandiell hyperinsulinemi har i flera kliniska studier konstaterats vara en riskfaktor för utvecklingen av fång (Bailey *et al.*, 2004; Geor, 2008). En kontinuerlig infusion av insulin i blodet under 48–72 h har visat sig kunna inducerat fång hos tidigare friska individer utan bakomliggande endokrin sjukdom (Asplin *et al.*, 2007; de Laat *et al.*, 2010). Det finns således bevis för en direkt koppling mellan hyperinsulinemi och utveckling av fång hos häst.

Fång är ett smärtsamt tillstånd där lamellerna mellan hovbenet och hovväggen försvagas och separeras, vilket sekundärt leder till rotation och sänkning av hovbenet (Pollitt, 1996; Jubb *et al.*, 2016). I en retrospektiv studie där man studerade olika dödsorsaker hos häst under en treårsperiod, var fång den trettonde vanligaste dödsorsaken i studiepopulationen (Penell *et al.*, 2005).

Flertalet olika metoder finns för diagnostik av hästar med insulindysreglering (Asplin *et al.*, 2007), men många intravenösa tester som används är tidskrävande, kostsamma och svåra att utföra i fältmässig miljö (Firshman and Valberg, 2007). Med tanke på den kausala kopplingen mellan hyperinsulinemi och utveckling av fång, kan ett oralt sockerbelastningstest (OST) vara ett användbart verktyg för att lättare upptäcka individer med hyperinsulinemi och insulindysreglering (Asplin *et al.*, 2007).

Ett OST för häst togs fram av forskare i USA för att kostnadseffektivt och på kort tid i fält, kunna diagnosticera hästar med insulindysreglering (Schuver *et al.*, 2014). Vid ett OST ges en sockersirap i hästens mun varefter blodprover tas för analys av glukos och insulin. Då den sockersirap som används i USA vid det orala sockertestet inte finns att köpa kommersiellt i Skandinavien, utvecklade forskare vid Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU) ett modifierat oralt sockerbelastningstest där man istället använder Dansukker Glykossirap® (Lindåse *et al.*, 2016).

Flera olika medicinska behandlingar har utvärderats för hästar med insulindysreglering, men ingen har hittills visat sig ha god effekt (Meier *et al.*, 2018b). I dagsläget är motion samt foderrestriktioner de förebyggande och behandlande åtgärder som rekommenderas, samt smärtlindring och boxvila om hästen väl utvecklat fång (Durham *et al.*, 2019).

Kanagliflozin (Invokana®) är ett humant läkemedel som används för behandling av diabetes mellitus typ II (FASS, 2019). Kanagliflozin sänker plasmaglukosnivåer genom hämning av natrium-glukos-kotransportör 2 (SGLT2) (Chao, 2014) som finns lokaliserad i proximala njurtubuli. Natrium-glukos-kotransportör 2 ansvarar normalt för huvuddelen av reabsorptionen av filtrerad glukos i proximala njurtubuli. En hämning av SGLT2 sänker glukoströskeln i njuren, vilket ökar glukosutsöndringen via urinen. Detta resulterar i en sänkning av glukos- samt osmotisk diures och kaloriförlust vilket kan ge viktnedgång och sänkt blodtryck hos humanpatienter som medicineras med kanagliflozin (Rosenthal, 2015).

SYFTE

Syftet med denna pilotstudie var att utvärdera skillnaden i blodglukos- samt plasmainsulinnivåer före respektive efter 20 dagars behandling med kanagliflozin hos tre hästar diagnostiserade med EMS. Detta utvärderades med ett modifierat oralt sockerbelastningstest.

Frågeställning:

- Kan medicinering med kanagliflozin sänka postprandiella glukos- samt insulinkoncentrationer hos hästar med EMS med olika grad av insulindysreglering?
- Ger medicinering med kanagliflozin på morgonen samma effekt på blodglukos- och plasmainsulinnivåer uppmätta strax efter, samt 11 timmar efter behandling?

LITTERATURÖVERSIKT

Insulin

Insulin är ett hormon som ansvarar för att hålla en jämn glukosnivå i blodet genom reglering av glukosupptag och dess användning i vävnader, glukosutsöndring via njurar samt ändringar i kolhydrat-, protein- och fettmetabolism. Insulin produceras av β -celler i de Langerhanska cellöarna i pankreas och utsöndras normalt pulsativt ut i portavenerna som ett svar på höjda glukosnivåer i blodet (Wilcox, 2005). Insulinfrisättning leder normalt till minskad glukoneogenes (nybildning av glukos) i levern samt stimulerat upptag och användning i främst skelettmuskulatur och fettväv (Frank *et al.*, 2010).

Hos människor är insulinsekretionen bifasisk (två faser). En första, snabb frisättning sker inom en minut och efterföljs av en andra, något längre, sekundär frisättning (Bratanova-Tochkova *et al.*, 2002). Hos häst är insulinutsöndringens faser är inte helt klarlagda. Troligtvis är den första fasen hos hästen så liten att den är svår att uppmäta (Bröjer, J., SLU, pers. medd., 2019).

Insulinresistens och hyperinsulinemi

Med insulinresistens menas att kroppens vävnader inte längre svarar normalt på fysiologiska koncentrationer av insulin, vilket leder till förhöjda blodglukosnivåer (Boden, 2001). Sekundärt uppstår hyperinsulinemi (förhöjda nivåer av insulin i blodet) då betacellerna i pankreas måste öka insulinsekretionen som kompensation för insulinresistensen (Wilcox, 2005). Att utsöndringen av insulin via levern minskar, kan också bidra till att hyperinsulinemi uppstår (Tóth *et al.*, 2010). Hyperinsulinemi och insulinresistens innebär en onormal insulinmetabolism och brukar tillsammans kallas för insulindysreglering, vilket är en nyckeldel i ekvint metabolt syndrom (Frank and Tadros, 2014).

Hos människor med insulinresistens är utveckling till diabetes mellitus typ II vanligt, på grund av en utmattning hos betacellerna som tillslut inte kan kompensera för den rådande insulinresistensen (Wilcox, 2005). Hästar drabbas vanligen av kompenserad insulinresistens och kan uppväga för denna under en längre period. Detta genom ökad insulinproduktion från β -cellerna, och hästar utvecklar därför sällan dekomparerad insulinresistens och diabetes mellitus typ II (Tóth *et al.*, 2010; Truelsen Lindåse, 2017). Bakgrunden till detta utfall är fortfarande inte helt utrett (de Laat *et al.*, 2015a).

Flertalet faktorer anses påverka insulinsvaret hos hästar, bland andra foderkomposition, motion och ålder. Äldre hästar har ett generellt kraftiga insulinsvar på stärkelsesrikt foder jämfört med hästar av yngre ålder (Jacob *et al.*, 2018). Även stress anses påverka insulinsekretionen hos hästar och ponnyer (Tóth *et al.*, 2018; Schuver *et al.*, 2014). Forskare vid SLU (Sveriges lantbruksuniversitet) har studerat stressorer (faktorer som ökar stressnivåer) påverkan på hästars insulinkurvor (Bröjer *et al.*, 2013).

Skillnader i insulinsvaret har setts då hästar med EMS jämfördes med friska kontrollhästar (Lindåse *et al.*, 2016). Hästar med EMS har ett mer heterogent insulinsvar och insulin-koncentrationer i plasma stiger långsammare och når sin maximala koncentration senare jämför med de friska hästarna.

Rasskillnader i insulinreglering

Ponnyer tenderar att vara insulinresistenta i högre grad än hästar (de Laat *et al.*, 2015), och rasrelaterade skillnader i glukos- och insulinreglering har identifierats i olika studier (Bamford *et al.*, 2014; Bröjer *et al.*, 2013). I en studie av Bamford och medförfattare sågs 4-5 gånger

högre plasmainsulinsvar samt lägre insulinsensitivitet (IS) hos ponnyer och Andalusier jämfört med varmbloodshästar. I studien ingick endast hästar i normalt hull (BCS 5 +/- 0.3) vilket talar för att hyperinsulinemi även kan förekomma utan samtidig fetma. En genetisk komponent anses finnas i patofysiologin bakom insulindysreglering och därmed EMS, vilket kan bero på vissa hästar har tvingats adaptera sig till hårdare levnadsförhållanden och sämre tillgång på föda (Treiber *et al.*, 2006). Även friska hästar av olika raser verkar ha olika insulinsensitivitet och olika kraftigt postprandiellt insulinsvar (Bröjer *et al.*, 2013).

EMS – ekvint metabolt syndrom

Ekvint metabolt syndrom (EMS) beskrevs för första gången så sent som 2002 (Johnson) och är ett syndrom bestående av flera endokrina faktorer som ökar risken för utveckling av fång. Insulindysreglering är ett samlingsbegrepp för insulinresistens, faste- samt postprandiell hyperinsulinemi, och utgör en viktig komponent i EMS. Andra komponenter i syndromet är generell eller regional fetma, hypertriglyceridemi eller dyslipidemi, systemisk inflammation, hyperleptinemi, arteriell hypertension samt förändrad reproduktionscykel hos ston (Durham *et al.*, 2019; Frank *et al.*, 2010).

Fång och ekvint metabolt syndrom

Då en häst utvecklar fång uppstår ett kraftigt smärttillstånd på grund av en rotation och sänkning av hovbenet när de lameller som finns mellan hovbenet och hovväggen försvagas och separeras (Pollitt, 1996; Jubb *et al.*, 2016). Den smärta och hälta som uppstår, som även kan riskera att bli kronisk, innebär ett stort välfärdsproblem för den drabbade individen (Truelson Lindåse, 2017).

Den exakta patofysiologin bakom fång inte är helt klarlagd, men modern forskning har visat att de bakomliggande faktorerna till syndromet är många. Patofysiologin ansågs vara samma oavsett sjukdomsorsak ändra fram till millenieskiftet, sedan dess har forskare kommit fram till att det både finns likheter och skillnader i utvecklingen av fång som uppstått till följd av olika primära problem. Fång som sjukdom kan därför övergripande delas in i tre former; fång relaterad till endokrin sjukdom (insulin- eller glukokortikoidysreglering), sepsisrelaterad fång (sepsis-related laminitis, SRL) samt belastningsfång (*supporting-limb laminitis*, SLL). (Eps and Burns, 2019).

Endokrin sjukdom, däribland EMS och PPID (pituitary pars intermedia dysfunction, Cushings sjukdom), anses vara den vanligaste utlösande faktorn för fång hos häst (Eps and Burns, 2019; McGowan, 2010; Meier *et al.*, 2018a; Patterson-Kane *et al.*, 2018). Mellan år 1997 och 2000 studerades orsaksspecifik morbiditet i en population på 107 000 hästar, alla försäkrade i ett svenskt försäkringsbolag. Där sågs fång vara den trettonde vanligaste dödsorsaken (Penell *et al.*, 2005).

Att insulinresistens kunde vara en bakomliggande faktor till utveckling av fång, nämndes redan på 1980-talet efter studier gjorda med orala och intravenösa glukostester (Treiber *et al.*, 2006). Sedan dess har flertalet studier återigen visat att postprandiell hyperinsulinemi kan vara en riskfaktor för att utveckla fång (Bailey *et al.*, 2004; Geor, 2008) då man jämfört insulinnivåer hos ponnyer som tidigare drabbats av fång med friska kontrollindivider. Sambandet har påvisats både i fältstudier och i experimentella försök (McGowan, 2010).

Genom 48-72 timmars infusion av insulin har fång inducerats hos friska ponnyer och hästar, dessa utan en föregående historia av endokrin sjukdom, insulinresistens eller fånganfall (Asplin *et al.*, 2007; de Laat *et al.*, 2010). Att tidigt kunna upptäcka postprandiell hyperinsulinemi kan

därmed vara ett viktigt verktyg för att kunna förutspå och därmed förebygga fånganfall hos predisponerade individer (Asplin *et al.*, 2007). En central del i förebyggandet av fång associerad med endokrin sjukdom anses vara att sänka insulinnivåer i blodet över tid (Eps and Burns, 2019).

Hullbedömning

Övervikt och fetma har visat sig vara kopplat till insulinresistens och fång hos häst (Frank and Tadros, 2014; Johnson, 2002). ”*Fat storage condition*” har använts för att beskriva metabola syndrom för att belysa teorin om att insulinresistens och möjligheten att lagra fett från början ökar chansen för överlevnad och förhindrar svält under perioder med födobrist (Johnson *et al.*, 2013).

I dagsläget finns ingen universell bedömningskala för fetma hos häst, men vanligen används body condition score (BCS) utvecklad av Henneke *et al.* (1983) för att hullbedömma ponnyer och hästar i Sverige. Enligt denna skala, som går från 1-9, klassas ponnyer och hästar med ett BCS på 7 eller över som överviktiga eller feta.

Cresty neck score (CNS) är en annan hullbedömningsmetod som kan för att uppskatta fettackumulering kring nackbandet. CNS har en skala som går från noll till fem, där ett värde på tre eller högre klassas som en ”*cresty neck*” eller så kallad fettnacke (onormalt stor fettackumulering i området för nackbandet). En studie har påvisat en positiv korrelation mellan ett $CNS \geq 3$ och hyperinsulinemi (Carter *et al.*, 2009).

Diagnostiska metoder för insulinresistens och hyperinsulinemi

Lättanvända tester för att bedöma insulindysreglering är nödvändiga då en kausal koppling finns mellan fång, hyperinsulinemi och insulinresistens (Firshman and Valberg, 2007; Henneke *et al.*, 1983; Schuver *et al.*, 2014). Flertalet olika metoder finns tillgängliga för bedömning av insulinsensitivitet hos hästar, både kvantitativa och dynamiska tester, samt provtagning av basalvärden för glukos och insulin. Endast kvantitativa metoder kan på ett korrekt sätt mäta insulinkänsligheten (Kronfeld *et al.*, 2005; Truelsen Lindåse, 2017). Att mäta nivåer av plasma-insulin efter fasta kan användas som ett screeningtest för insulindysreglering (Schuver *et al.*, 2014). Dock har man sett att fastevärden för insulin inte skiljer sig mellan hästar med respektive utan insulinresistens som diagnostiserats med en kvantitativ metod (Dunbar *et al.* 2016).

Dynamiska tester, både orala och intravenösa, klassas generellt som mer känsliga och är nödvändiga vad gällande diagnostik av insulindysreglering. Dessa mäter insulin- och glukosdynamik efter en oral- eller intravenös glukosgiva och förändring över tid (Bröjer *et al.*, 2013; Durham *et al.*, 2019; Schuver *et al.*, 2014). Dynamiska intravenösa tester är dock tidskrävande, kostsamma och kräver ofta vistelse på djursjukhus, vilket försvårar användning i fält (Durham *et al.*, 2019; Truelsen Lindåse, 2017). Orala dynamiska metoder är lättare att utföra i fält samt mer tidseffektiva, till följt av färre blodprovstagningar och är även mindre kostsamma (Schuver *et al.*, 2014; Truelsen Lindåse, 2017). Populariteten bland veterinärer för användningen av orala sockertester ökar därmed (de Laat *et al.*, 2015).

Kvantitativa tester

Kvantitativa intravenösa tester där tillförsel sker av exogent insulin, glukos eller både och, har som fördel att gastrointestinala faktorer såsom magsäckstömning och inkretinpåverkan med

flera, kan förbises. Med hjälp av dessa kan graden av insulinresistensen kvantifieras. Dessa metoder är därmed användbara i forskningssyften (Durham *et al.*, 2019).

Euglycemisk hyperinsulinemisk clamp - EHC

Att utföra en så kallad euglycemisk hyperinsulinemisk clamp innebär att en stabil plasma-glukosnivå hålls med hjälp av glukosinfusion, under en kontrollerad, inducerad hyperinsulinemi. Plasmaglukoskoncentrationen hålls på en förbestämd nivå, vanligen 5 mmol/L, medan den endogena glukosproduktionen hålls nedtryckt med hjälp av exogen insulininfusion. På så sätt kan utsöndringshastigheten för glukos räknas ut och insulinsensitiviteten mätas (Kronfeld *et al.*, 2005).

Hyperglycemisk clamp - HC

B-cellssvaret hos hästar kan även mätas med hjälp av en så kallad hyperglycemisk clamp (Truelsen Lindåse, 2017) Här induceras hyperglykemi i blodet, vilket hålls på en platanivå under ungefär två timmar för att på så sätt trycka ned den endogena glukosproduktionen i levern. Eftersom glukoskoncentrationen i blodet hålls på en fast nivå, ger mängden glukosinfusion en bild av hästens glukosmetabolism (Rijnen and van der Kolk, 2003).

Frequently sampled intravenous glucose tolerance test - FSIGTT

I den modifierade varianten av ett FSIGTT, som vanligen används, ges vid testets start en glukosbolus efterföljt av en insulinbolus 20 minuter senare. Därefter tas blodprover frekvent för analysering för att analysera glukosutsöndringen i förhållande till insulinnivåer (Truelsen Lindåse, 2017).

Dynamiska intravenösa tester

Combined glucose-insulin test - CGIT

Efter en intravenös dos av glukos administreras insulin direkt, vid ett combined glucose-insulin test. Basalnivåer samt nivåer av glukos och insulin efter 45 respektive 75 minuter mäts och används för analys (Durham *et al.*, 2019).

Dynamiska orala tester

Orala glukostoleranstester (OGT) speglar bättre de fysiologiska förhållanden som råder vid utfodring och bete jämfört med intravenösa tester. Resultaten från ett OGT påverkas dock av ett flertal faktorer såsom magsäcktömning, glukosupplagring i levern, gastrointestinala hormoner (bl.a. inkretiner) (Lindåse *et al.*, 2017; Truelsen Lindåse, 2017).

Meal tolerance test - MTT

Ett standardiserat foderbelastningstest (MTT) kan användas för att analysera det postprandiella insulinsvaret hos hästar, men än finns inga likriktade protokoll utvecklade (Truelsen Lindåse, 2017). Jämfört med ett OGT där glukosirap administreras, speglar ett MTT mer fysiologiska förhållanden vad gällande till exempel grovfoderspjälkning och magsäckstömning.

Standard oral glukostoleranstest - OGTT

OGTT är ett sedan länge använt test för diagnos av diabetes mellitus hos människor. Detta test innebär, på häst, att en sockerlösning (1 g glukos/kg kroppsvikt) administreras via en nässvalgsond. Blodprover med intervaller om vanligen trettio minuter under fyra till sex timmar efter sockergiva, för analys och glukos och insulin (Smith *et al.*, 2016; Truelsen Lindåse, 2017).

Detta test är bra att använda i fält, men kräver viss kompetens och träning hos den som utför testet, samtidigt som nässvalgsondning riskerar att stressa hästen.

In-feed oralt glukostoleranstest - OGTT

Detta test är variant av ovan nämnda OGTT där glukos (0,75-1,5 g/kg kroppsvikt) istället blandas i en mindre mängd kraftfoder (Smith *et al.*, 2016). Administrerings sättet förenklas gentemot ett standard-OGTT, dock har högre koncentration glukos i fodergivan i vissa fall orsakat matvägran hos ponnyer (de Laat and Sillence, 2017).

Oralt sockerbelastningstest - OST

Ett oralt sockerbelastningstest för häst togs fram av forskare i USA för att möta behovet av ett dynamiskt test för insulindysreglering som är billigt, tidseffektivt och lätt att utföra i fält. En sirap (Karo® Corn light syrup) administrerades som ett basalprov tagits, därefter tas blodprover med cirka 30 minuters intervall för att analysera glukos och insulin. Resultatet från OSTn utvärderades mot ett intravenöst glukostoleranstest (IVGTT). Här sågs att uppmätta värden korrelerade med varandra, både vad gällande glukos och insulin (Schuver *et al.*, 2014). Flertalet studier har genomförts som styrker att OSTn är användbar för att i fält diagnosticera insulindysreglering (Asplin *et al.*, 2007; de Laat and Sillence, 2017; Lindåse *et al.*, 2016). Rasspecifika skillnader finns i insulinsvaret hos hästar, men hittills har inga rasanpassade referenser fastställts för ett OST (Schuver *et al.*, 2014).

Modifierad OST

Det modifierade orala sockertest, som tagits fram vid Sveriges lantbruksuniversitet, innebär att hästen administreras 0.2 ml Dansukker® Glykossirap (Nordic Sugars A/S, Köpenhamn, Danmark) per kilo kroppsvikt. Detta eftersom Karo Corn Light syrup ej finns att köpa i Skandinavien. Dansukker® glykossirap utvinns från vetestärkelse och innehåller främst glukos (12 %), maltos (11 %) och maltotrios (10 %) utöver vatten och långa sockerkedjor, t.ex. malto-dextrin (Dansukker, 2019).

Efter sockergiva tas blodprover via en permanentkanyl strax före (-10 minuter) samt 30, 60, 90, 120, 150, 180 minuter efter oral administration av glykossirap. Ett modifierat OST är primärt till för att estimerar β -cellssvaret, och ej för att kvantifiera insulinsensitiviteten hos insulin-resistenta hästar (Truelson Lindåse, 2017).

Med hjälp av beräkningar utifrån insamlad data, kan insulinkänsligheten hos en häst beräknas utifrån ett OST eller ett OGTT. Inget av dessa tester kan själv exakt mäta eller kvantifiera insulinkänsligheten. B-cellssvaret (mängden utsöndrat insulin från pancreas) hos häst påverkas av insulinkänsligheten och tvärt om. En ändring i en hästs insulinkänslighet ger ett modifierat β -cellssvar som påverkas av den bakomliggande insulinkänsligheten (Truelson Lindåse, 2017).

God överensstämmelse mellan beräknade index för insulinsensitivitet sågs då ett OST jämfördes med kvantitativa mätningar från en EHC (Lindåse *et al.*, 2017).

Behandling av hästar med EMS och insulindysreglering

Foderrestriktion och motion

Fodersammansättning påverkar insulinsensitivitet och postprandiellt insulinsvar hos hästar (Jacob *et al.*, 2018). Ett signifikant högre postprandiellt insulinsvar har setts hos friska kontrollhästar vid utfodring med en stor mängd ickestrukturella kolhydrater (17 % NCS, *non-structured carbohydrates*) jämfört med efter utfodring med ett kontrollfoder (4 % NCS) (Borgia

et al., 2011). Att utfodra hästar med grovfoder innehållande < 10-12 % NCS rekommenderas till hästar med EMS (Geor, 2008).

Effekten av motion på insulinkänslighet hos häst har utvärderats i olika studier. Hos friska varmbloodhästar sågs en ihållande, förbättrad insulinsensitivitet (IS) fem dagar efter 7 dagars konditionsträning (Stewart-Hunt *et al.*, 2006). Då hyperinsulinemiska ponnyer utsattes för sex veckors träning och begränsat foderintag sågs initialt en sänkning av index för insulin och glukos. Därefter sågs ingen ytterligare skillnad mellan gruppen som motionerats jämfört med kontrollhästarna, även om förbättringen i insulinkänslighet höll i sig även under veckorna som följde efter studiens avslut (Freestone *et al.*, 1992). Motionseffekter på IS och vikt studerades på överviktiga (BCS ≥ 7), insulinresistenta hästar, där en effekt sågs på övervikt men ej i insulinkänslighet jämfört med kontrollhästar. Författarna till studien spekulerar kring huruvida mer högintensiv träning och kraftigare viktminskning krävs för att förbättra insulinkänsligheten. Sammanfattningsvis indikerar dessa studier att enbart motion inte alltid har effekt på insulinkänsligheter (Carter *et al.*, 2010). Insulinresistenta hästar som redan utvecklat fång kan inte heller motioneras för att öka insulinsensitiviteten (Frank and Tadros, 2014).

Farmakologisk behandling

I skrivande stund finns ingen vetenskapligt validerad medicinsk behandling för hästar med EMS och insulindysreglering som visat sig verksamt (Durham *et al.*, 2019; Meier *et al.*, 2018a). Effekten av olika humana läkemedel för behandling av insulindysreglering hos hästar har studerats med blandade resultat. Exempel på läkemedel som har studerats är metforminhydroklorid, pioglitazon samt velagliflozin (Durham *et al.*, 2019). Valet av behandlingsmetod är därmed begränsat (Eps and Burns, 2019).

Metforminhydroklorid

Metforminhydroklorid är en antihyperglykemisk medicin som används vid behandling av diabetes mellitus hos människa. Läkemedlet ökar insulinsensitiviteten genom att öka perifert upptag av glukos, inhiberar glukoneogenes i levern och minskar upptaget av glukos i tarmen. En studie utförd på häst kunde visa att den orala biotillgängligheten för metforminhydroklorid är låg, endast 2,9–8,6 %. Detta kan jämföras med en oral biotillgänglighet på 40–60 % hos människor (Tinworth *et al.*, 2012).

Pioglitazon

Pioglitazon används inom humanmedicin för att kontrollera insulindysreglering. Läkemedlet verkar genom att öka proliferationen av adipocyter som är mindre till storlek och mer insulinkänsliga samt öka produktionen av adiponektin. Adiponektin utsöndras av adipocyter i fettvävnad och ökar insulinkänslighet samt minskar inflammation.

Ett fåtal studier har utvärderat effekten av pioglitazon hos häst. Ingen effekt på perifer insulinkänslighet sågs vid en mindre studie efter 14 dagars medicinering på icke insulinresistenta hästar (Suagee *et al.*, 2011).

I en studie av Legere *et al.*, (2019) utvärderades effekten av medicinering med pioglitazon (2 mg/kg kroppsvikt) under 28 dagar, med hjälp av ett OST samt mätning av adiponektin- samt leptinkoncentrationer. Ingen effekt sågs på insulinkänsligheten mätt med hjälp av ett FSIGTT. Insulinsvaret under ett OST minskade för samtliga hästar efter medicinering jämfört med värden uppmätta före studiestart (Legere *et al.*, 2019).

SGLT2-hämmare

Redan år 1835 lyckades franska kemister isolera ett ämne ur barken på äppelträd som kom att kallas florizin eller ”äppelbarkens glykosid”. Ämnet troddes kunna användas för att bota feber, infektion och malaria, men bevisade sig 50 år senare ge glukosuri, polyuri och viktnedgång, likt diabetes hos människor. En receptor, sodium-glucose-co-transporter 2 (SGLT2) vilken främjar glukosreabsorption i njurens proximala tubuli upptäcktes på tidigt 1970-tal, vilken florizin sågs ha högre affinitet för än för glukos självt. På sent 1980- och tidigt 1990-tal ökade intresset igen för florizin då det, när det gavs till råttor som genomgått en 90 %-ig pankreatomi (borttagning av bukspottkörteln), normaliserade råttornas glukosnivåer och insulinresistens. Florizin användes aldrig som human diabetesmedicin på grund av den låga biotillgängligheten samt på grund av inhibering av både SGLT1 och SGLT2. Analogor har tagits fram för att undkomma dessa problem (Chao, 2014; White, 2010).

Inom humanmedicin används idag kanagliflozin, en SGLT2-hämmare, både som monoterapi och tillsammans med andra läkemedel för glykemisk kontroll hos patienter med diabetes mellitus typ II (Karagiannis *et al.*, 2017; Wilding, 2014). Genom hämning av SGLT2 minskar reabsorptionen av glukos i proximala njurtubuli. Som ett resultat ökar utsöndringen av glukos via urinen och plasmakoncentrationen av glukos sänks. Hos människor har man sett att behandling med kanagliflozin kan minska insulinsekretionen som sker till följd av hyperglykemi (Chao, 2014).

Ett fåtal studier har utvärderat effekten av SGLT2 hämmare på hästar med insulindysreglering, där man kunnat påvisa en sänkning av det postprandiella insulinsvaret. I dessa studier har SGLT2-hämmaren velagliflozin använts (Meier *et al.*, 2018b; Meier *et al.*, 2019). Samma författare studerade även under 2018 om medicinering med velagliflozin kunde minska graden av hyperinsulinemi och därmed förebygga fång hos ponnyer med insulindysreglering som utfodrades en hög mängd icke-strukturella kolhydrater (Meier *et al.*, 2018a). Inga ponnyer i gruppen som behandlats med velagliflozin utvecklade fång, medan ponnyer i kontrollgruppen som ej behandlats blev sjuka.

MATERIAL OCH METODER

Hästar

Denna pilotstudie är godkänd av Uppsala Djurförsöksetiska nämnd (dnr: 5.8.18-15533/2018).

Tre hästar deltog i studien (två islandshästar och en shetlandsponny), samtliga hästar hade tidigare diagnosticerats med EMS genom ett OST (plasmainsulin $\geq 150 \mu\text{IU/mL}$ vid 60 minuter). Alla hästar i studien hade en historik av fång men ingen hade akut fång eller tecken på fång vid studiestarten. Body condition score (BCS; skala 1-9) användes för att hullbedöma hästarna, och deras regionala fettdepåer bedömdes med hjälp av Cresty neck score (CNS; skala 0-5), se tabell 1.

Av logistiska skäl utfördes studien på häst A och B under samma tidsperiod, medan häst C undersöktes separat. Hästarna fungerade som sin egen kontroll.

Tabell 1. Data gällande ras, kön, ålder, body condition score (BCS) samt cresty neck score (CNS) för hästarna i studien

Individ	Ras	Kön	Ålder (år)	BCS	CNS
Häst A	Shetlandsponny	Valack	15	5.5	2.5
Häst B	Islandshäst	Sto	-	5.0	2.5
Häst C	Islandshäst	Valack	15	6.0	3.5

Studiedesign

De tre hästarna i pilotstudien undersöktes med tre olika diagnostiska metoder under tre på varandra följandedagar. Undersökningarna utfördes i två omgångar: före- respektive efter 18-21 dagars behandling med kanagliflozin (1,7 mg/kg kroppsvikt, q24h). Under respektive delexperiment, både före och efter behandling med kanagliflozin, användes tre olika metoder för att utvärdera behandlingseffekten. Första dagen med ett fodertoleranstest (meal tolerans test, MTT), dag två med ett modifierat oralt sockerbelastningstest (oral sugar test, OST) och dag tre med en *graded glucose infusion* (GGI). Det orala sockertestet utvärderas i detta examensarbete, övriga undersökningsmetoder behandlas i andra examensarbeten. Hästarna fick fasta 8 timmar inför varje undersökning men hade fri tillgång till vatten före, under och efter försöket.

Utförandet av undersökningarna var identiskt vid bägge försöksperioderna, bortsett från att hästarna under andra försöksperioden medicinerades med kanagliflozin på morgonen (kl. 07.00) innan provtagningsstart.

Mellan försöksperioderna medicinerades hästarna med kanagliflozin varje morgon klockan 07.00. Medicinen administrerades i form av tabletter (Invokana®, 300 mg) som gavs per oralt gömda i godis eller upplösta i vatten eller uppblandat i vatten med hjälp av en spruta.

Häst A och B undersöktes på morgonen med start kl 08.00 och häst C undersöktes på kvällen med start kl 18.00. Detta för att kunna jämföra plasmaglukos- och plasmainsulinnivåer uppmätta direkt efter samt 11 timmar efter medicinering med kanagliflozin.

Instrumentering

Dagen innan respektive försöksperiodsstart lades en intravenös permanentkateter (Intranule, $2,0 \times 105$ mm. Vygon, Ecouen, France eller MILA, $2,1 \times 90-130$ mm. MILA International Inc., Kentucky, USA) i ena halsvenen och suturerades fast i huden (Supramid 0, B.Braun Medical AB, Danderyd, Sverige). Detta efter att hudområdet över venen hade klippts, lokalbedövats (EMLA, AstraZeneca AB, Södertälje, Sverige) och steriltvättats.

Fodrings- och uppställningsrutiner

Under provtagningstiden hölls hästarna i box. Dagtid efter avslutad undersökning fick hästarna gå ut i en sandpaddock med permanentkatetern skyddad av ett lätt bandage samt återgå till sina normala utfodringsrutiner fram till nästa delexperiment. Hästarna fick under försöksperioden samma totala mängd foder, men uppdelat på färre givor för att säkerställa 8 timmar fasta inför varje delexperiment.

Modifierat oralt sockerbelastningstest - OST

Nedan beskrivs utförande av det modifierade orala sockerbelastningstestet, vilket är den del av försöket som behandlas i detta examensarbete.

Dan Sukker Glykossirap ($0,5$ ml per kilo kroppsvikt) administrerades per oralt med en spruta. Blodprover ($5-10$ ml per prov) togs från permanentkatetern tio minuter före glukosadministrering och därefter vid 30, 60, 90, 120, 150 och 180 minuter efter sockergivan. Direkt efter blodprovstagning analyserades blodglukos, därefter fördes blodet över till vacutainerrör med litiumheparin och centrifugerades. Plasman pipetterades sedan över till eppendorfrör och frös sedan in i -20 C.

Analys av blodglukos och plasmainsulin

Blodglukos analyserades i anslutning till provtagningen med hjälp av en bärbar glukosmätare (Accu-Check Aviva, Roche Diagnostics Scandinavia AB, Bromma, Sweden). Plasmainsulin analyserades med hjälp av ett kommersiellt häst-optimerat ELISA (Mercodia Equine Insulin ELISA, Mercodia AB, Uppsala, Sweden) som evaluerats för användning på häst (Öberg et al., 2012). Insulinnivåerna kontrollerades med ett kommersiellt kit (Mercodia Animal Insulin Control (Low, Medium, High), Mercodia AB, Uppsala, Sweden).

Bearbetning av data samt beräkningar

Med hjälp av en trapetzformel i GraphPad Prism 8 beräknades arean under kurvan för glukos och insulin (AUC_{glu} respektive AUC_{ins}). Basalvärden för glukos och insulin, maxkoncentrationer för glukos ($Peak_{glu}$) och insulin ($Peak_{ins}$) samt tid till uppnådd maxkoncentration för glukos (Tid till $Peak_{glu}$) och insulin (Tid till $Peak_{ins}$) redovisades

RESULTAT

Alla hästar i pilotstudien uppfyllde inklusionskriterierna och ingen häst utvecklade fång under studieperioden.

Glukosgivan tolererades väl, och mängden glukossirap som blev kvar på utsidan av sprutan eller runt hästarnas munnar var försummande liten och bedöms ej påverka testresultaten.

Basalkoncentrationer för glukos och insulin

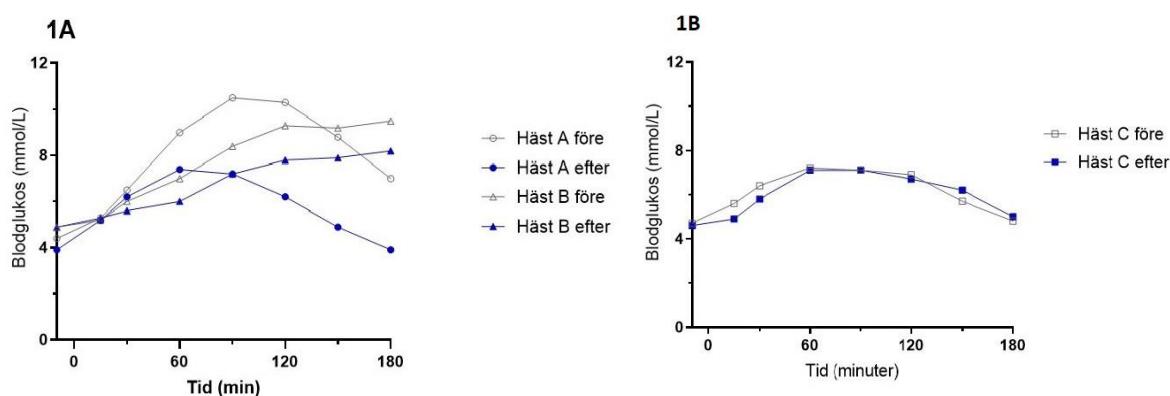
Efter behandling sågs en sänkning av basalkoncentrationen (blodprov taget 10 minuter före glukosgiva) av blodglukos hos häst A och C, men inte hos häst B. Basala insulinkoncentrationen i plasma (blodprov taget 10 minuter före glukosgiva) var lägre efter medicinering jämfört med värden uppmätta före medicinering hos alla hästar i pilotstudien.

Tabell 2. Basalkoncentrationer av glukos (mmol/L) i blod och insulin ($\mu\text{IU}/\text{m}$) i plasma för tre hästar (A, B och C) under ett oralt sockerbelastningstest före och efter medicinering med kanagliflozin

Individ	Basala glukoskoncentrationer i blod (mmol/L)		Basala insulinkoncentrationer i plasma ($\mu\text{IU}/\text{mL}$)	
	Före	Efter	Före	Efter
Häst A	4.4	3.9	20.0	12.3
Häst B	4.9	4.9	22.1	6.9
Häst C	4.7	4.6	31.8	12.1

Arean under kurvan (AUC) för glukos

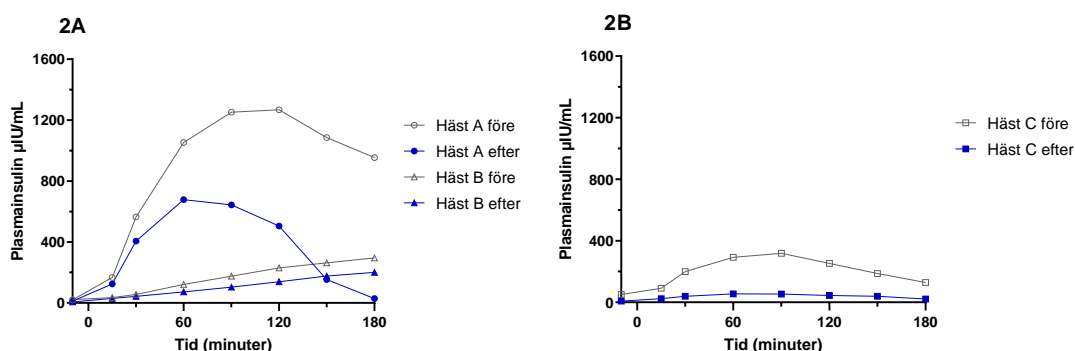
En minskning av blodglukoskoncentrationen (sänkt AUC_{glu}) efter medicinering med kanagliflozin sågs hos alla hästar i studien,. Den största skillnaden i blodglukos före och efter behandling sågs hos häst A och B. Se figur 1A, 1B samt tabell 2.



Figur 1(A, B). Glukoskoncentrationer (mmol/L) i blod för tre hästar (A, B och C) under ett oralt sockerbelastningstest (OST) utfört före- respektive efter 19 dagars medicinering med kanagliflozin. Fig.1A visar data för häst A och häst B som provtagits på morgonen. 1B visar motsvarande resultat för häst C som provtagits på kvällen.

Arean under kurvan (AUC) för insulin

En tydlig generell sänkning av insulinresponsen (AUC_{ins}) sågs efter medicinering hos alla tre hästarna i pilotstudien (mellan 31 % och 81 % sänkning). Se figur 2A, 2B samt tabell 3.



Figur 2 (A, B): Insulinkoncentrationer ($\mu\text{IU}/\text{mL}$) i plasma under ett oralt sockerbelastningstest utfört före- respektive efter 19 dagars medicinering med kanagliflozin. 2A visar data för häst A och B som provtagits morgontid. 2B visar motsvarande resultat för häst C som provtagits kvällstid.

Tabell 3. Beräkningar av arean under kurvan för glukos- och insulinkoncentrationer för tre hästar (A, B och C) under ett oralt sockerbelastningstest utfört före respektive efter 19 dagars medicinering med kanagliflozin. AUC_{glu} = arean under kurvan för glukos; $Diff_{glu}$ = differensen för AUC_{glu} uppmätt före- respektive efter medicinering; AUC_{ins} = arean under kurvan för insulin; $Diff_{ins}$ = differensen för AUC_{ins} uppmätt före- respektive efter medicinering; AUC_{ins}/glu = AUC_{ins} dividerat med AUC_{glu} före respektive efter behandling; $Diff_{ins}/glu$ = differensen av föregående kvot. Positiva differenser beskriver ökning, negativa differenser beskriver minskningar

Individ	AUC_{glu} (mmol/L*min)		$Diff_{glu}$ (%)	AUC_{ins} ($\mu\text{IU}/\text{mL}*\text{min}$)		$Diff_{ins}$ (%)	AUC_{ins}/glu		$Diff_{ins}/glu$ (%)
	Före	Efter		Före	Efter		Före	Efter	
Häst A	734.3	380.0	-49.5	166601	69304	-58.4	226.9	182.1	-19.8
Häst B	528.8	352.3	-33.4	26163	18125	-31.0	49.5	51.5	+0.04
Häst C	300.8	300.0	-0.01	30907	6009	-81.0	102.7	20.0	-81.0

Maxkoncentrationer för glukos i blod ($Peak_{glu}$)

Vid jämförande av $Peak_{glu}$ hos de tre hästarna i pilotstudien kan skillnader ses både i uppmätta värden och i tid fram till uppnådd $Peak_{glu}$ under OST. Hos häst A ses både en lägre och tidigare uppnådd $Peak_{glu}$ efter medicineringsperioden jämfört med värden uppmätta före behandling. Hos häst B och C ses en lägre $Peak_{glu}$ efter behandling, men denna infaller vid samma tidpunkt som före medicinering.

Maxkoncentrationer för insulin (Peak_{ins})

Samtliga tre hästar har en lägre Peak_{ins} efter- jämfört med före behandling med kanagliflozin. Häst A och C når även sin Peak_{ins} tidigare efter medicinering jämfört med före.

Tabell 4. Presentation av beräkningar utifrån data under ett oralt sockerbelastningstest före respektive efter 19 dagars medicinering med kanagliflozin. Samtliga hästar i pilotstudien finns representerade i tabellen. Diff_{glu} beskriver differensen för AUC_{glu} uppmätt före respektive efter medicinering. Diff_{ins} beskriver motsvarande värden för insulin. AUC_{ins/glu} representerar AUC_{ins} dividerat med AUC_{glu} före respektive efter behandling. Diff_{ins/glu} beskriver differensen av föregående kvot. Positiva differenser beskriver ökning, negativa differenser beskriver minskningar

Individ	AUC _{glu} (mmol/L*min)		Diff _{glu} (%)	AUC _{ins} (μIU/mL*min)		Diff _{ins} (%)	AUC _{ins/glu}		Diff _{ins/glu} (%)
	Före	Efter		Före	Efter		Före	Efter	
Häst A	734.3	380.0	-49.5	166601	69304	-58.4	226.9	182.1	-19.8
Häst B	528.8	352.3	-33.4	26163	18125	-31.0	49.5	51.5	+0.04
Häst C	300.8	300.0	-0.01	30907	6009	-81.0	102.7	20.0	-81.0

Tabell 5. Maxkoncentrationer av insulin och glukos under ett oralt sockerbelastningstest utfört före- respektive efter 19 dagars medicinering med kanagliflozin. Peak_{glu} = maxkoncentration för blodglukos (mm/L); Peak_{ins} = maxkoncentration för plasmainulin (μIU/mL); Tid till Peak_{glu} = tiden i minuter från provtagningsstart fram till uppnådd maxkoncentration av glukos. Tid till Peak_{ins} = tiden i minuter från provtagningsstart fram till uppnådd maxkoncentration av insulin

Individ	Peak _{glu} (mmol/L)		Tid till Peak _{glu} (minuter)		Peak _{ins} (μIU/mL)		Tid till Peak _{ins} (minuter)	
	Före	Efter	Före	Efter	Före	Efter	Före	Efter
Häst A	10.5	7.4	90	60	1267.9	678.0	120	60
Häst B	9.5	8.2	180	180	295.5	200.4	180	180
Häst C	7.2	7.1	60	60	318.9	54.4	90	60

DISKUSSION

I denna studie utvärderades kanagliflozin som behandling av insulindysreglering hos hästar diagnostiserade med EMS. Behandlingseffekten utvärderades med hjälp av ett OST.

Resultat från denna pilotstudie indikerar att kanagliflozin effektivt kan sänka den postprandiella glukos- och insulinresponsen hos hästar med insulindysreglering. Dessa resultat är överensstämmande med resultat från tidigare studier som har visat att behandling med en annan SGLT2-hämmare, velagliflozin, sänker det postprandiella insulinsvaret hos ponnyer med insulindysreglering (Meier *et al.*, 2018b; Meier *et al.*, 2019). Genom att sänka graden av hyperinsulinemi kan behandling med kanagliflozin potentiellt minska risken för utveckling av fång hos hästar och ponnyer med EMS.

Pilotstudien har även påvisat att medicinering med kanagliflozin på morgonen har effekt på blodglukos- och plasmainsulinnivåer uppmätta 11 timmar efter behandling. Hos häst C, som medicinerade på morgonen men provtogs kvällstid, sågs en sänkning både av glukos- och insulinnivåer uppmätta efter medicinering med kanagliflozin jämfört med värden uppmätta före medicinering. Resultaten indikerar alltså att effekten av behandlingen kvarstår i minst 11 timmar efter medicinering. Detta är information som är viktig inför vidare studier och utvärdering av kanagliflozin, till exempel gällande hur ofta medicinen behöver administreras. Att dra långtgående slutsatser kring hur mycket effekt medicineringen har på uppmätta värden direkt samt efter 11 timmar då studiepopulationen var liten och heterogen.

I denna pilotstudie sågs en stor skillnad i hästarnas individuella svar på behandlingen, vilket kan bero på skillnader i grad av insulindysreglering. Man har i tidigare studier identifierat rasrelaterade skillnader, där ponnyraser tenderar att vara mer insulinresistenta än hästar (Bamford *et al.*, 2014; Bröjer *et al.*, 2013; de Laat *et al.*, 2015b). Resultatet i denna studie kan därför ha påverkats av att hästar av olika raser ingick i populationen.

Insulinkurvan för häst B var kontinuerligt uppåtgående och böjde ej av vid sista provtagningstidpunkten (180 minuter) under OSTn. Detta tolkas som att häst B har en förskjuten $Peak_{ins}$ och det är därmed möjligt att häst B ej hunnit uppnå $Peak_{ins}$ vid sista provtagningstiden. Hästar med kraftig insulinresistens kan ha en förskjuten kurva för insulinutsöndring gentemot friska individer, vilket kan vara en förklaring till kurvans utseende hos häst B (Lindåse *et al.*, 2016). Av denna anledning hade det varit önskvärt med en längre provtagningstid för att kunna utvärdera häst B's insulinkurva fullt ut.

AUC_{glu} minskade ej lika mycket efter behandling hos häst C, i jämförelse med häst A och B. Detta trots att häst C:s plasmainsulinnivåer minskade signifikant. En möjlig teori är att häst C:s endogena glukosproduktion i levern ökade till följd av ökad glukagonfrisättning från alfaceller i pankreas. Ökad glukagonfrisättning skulle kunna uppstå då insulinkoncentrationerna var lägre efter behandling med kanagliflozin, vilket ger en minskad hämning på glukagonfrisättning från alfacellerna. Även i en studie av Meier *et al.* (2019) sågs ingen minskning av $Peak_{glu}$ hos de behandlade ponnyerna trots samtidig sänkning av insulin, vilket författarna menar kan bero på en sekundärt ökad endogen glukosproduktion likt ovan beskrivet. Det som talar emot denna teori är att insulinresponsen borde vara mer eller mindre den samma före- och efter behandling, om glukosresponsen inte sänks mer än marginellt. En möjlig förklaring till att insulinresponsen är så kraftigt sänkt hos häst C, trots en marginell sänkning i glukos, kan vara att SGLT2-hämmare har andra effekter på betacellssvaret, alternativt att marginella sänkningar i glukosresponsen ändå har stor effekt på sänkning av insulinresponsen. En sista förklaring kan vara att

ett OST inte är tillräckligt känsligt för att identifiera sänkningar i glukoskoncentrationen, vilket kan relatera till att provtagning sker med relativt stora mellanrum, 30 minuter.

Den marginella minskning av glukosnivåer kontra den stora sänkning av plasmainsulin som ses hos häst C påverkar även kvoten mellan AUC för insulin och glukos. Kvoten skiljer sig före och efter medicinering hos alla hästar, men skillnaden är störst hos häst C. Denna kvot representerar mängden insulin utsöndrat i förhållande till blodglukosnivåer. En förklaring till kvotskillnader som ses kan vara att hästarna efter medicinering inte når upp till lika kraftigt insulinsvar som före behandling. Normalt sett är en kurva som beskriver förhållandet mellan glukos och insulindynamiken sigmoidal och inte linjär (Lindåse *et al.*, 2017). Mängden utsöndrat insulin per glukosenhet är därav inte konstant, vilket kan förklara varför förhållandet mellan insulinutsöndring och glukosnivåer förändras efter medicinering med kanagliflozin.

Valet av substans, kanagliflozin, gjordes baserat på det faktum att det till skillnad från velagliflozin är ett registrerat läkemedel i Sverige. Enligt vad vi känner till har kanagliflozin har inte tidigare utvärderats på häst. För att få en indikation om vilken dos som kunde vara lämplig för medicinering av häst användes resultat från en studie som utvärderat behandling med velafloxazin på häst. I den studien användes tre olika doseringar (1,2, 2,4 och 3,6 mg/kg kroppsvikt, q24h), och effekt av behandlingen sågs vid den lägsta doseringen (Frank *et al.*, 2018). Vårt val av dos (1,7 mg/kg kroppsvikt, q24h) låg alltså strax över tidigare använd lägsta dos. Trots relativt låg dosering sågs tydliga effekter i vår studie på samtliga hästars glukos- och insulinkoncentrationer.

Flera tänkbara användningsområden finns för medicinering med kanagliflozin på hästar med insulindysreglering. Säsongsmässig medicinering med kanagliflozin kan vara aktuell till exempel under perioder då hästar är i riskzonen att utveckla fång. Kanagliflozin bör inte användas som enda behandling av insulindysreglerade hästar, utan i kombination med andra åtgärder såsom motion och foderrestriktioner.

Framtida studier kan även komma att ge svar på frågan om individuellt anpassad medicinering kan vara aktuell och hur dosering isåfall skulle fastställas. En skillnad i dosering och behandlingsstrategi skulle även kunna tänkas behövas vid medicinering av individer som tidigare drabbats av fång där man vill förebygga framtida episoder, gentemot behandling av insulindysreglerade hästar som inte tidigare haft fång.

Bieffekter av medicinering

Häst C upplevdes tröttare samt tappade lindrigt i vikt under studiens gång enligt ägaren. Detta kan bero på effekter av medicineringen och hästens sänkta blodglukoskoncentrationer. Att detta ej sågs hos häst A eller B kan vara orsakat av att häst C ej i grunden lider av lika grav insulindysreglering som de två första. Hos häst C kan medicineringen därmed haft kraftigare effekt, och en lägre dos än den vi använt hade troligtvis räckt för att se en effekt på blodglukos- och plasmainsulinkoncentrationer. Ingen mer grav biverkning i form hypoglykemi sågs dock hos häst C. Olika dosspann kommer i framtiden behövas beroende på hur insulindysreglerad hästen som ska medicinerar är.

SGLT2-hämmare sänkte blodglukoskoncentrationer hos hästarna i studien, men inga tecken på hypoglykemi (för låga blodglukosnivåer) sågs i vår pilotstudie trots olika grader av insulindysreglering hos häst A, B och C. Detta tyder på att behandlingen verkar ofarlig i anseendet, men fler studier behöver göras för att bättre utvärdera förekomsten av biverkningar med tanke på storleken på vår studiepopulation. Hypoglykemi har ej heller setts i tidigare studier som

utvärderat effekt av behandling med SGLT2-hämmare på häst (Meier *et al.*, 2018b; Meier *et al.*, 2019) och människa (Wilding, 2014).

Höga nivåer av glukos i urinen förser bakterier i urinen med en miljö som främjar bakterietillväxt vilket kan resultera i urinvägsinfektion (Chao, 2014). I vår studie sågs inga kliniska tecken på urinvägsinfektion hos hästarna (frekvent urinering, anuri, missfärgad urin etc.) och urinvägsinfektion förekommer sällan hos häst (Frye, 2006). Framtida studier bör dock undersöka om detta kan vara en biverkning som bör tas i beaktning hos häst.

Utvärdering av OST

Det modifierade orala sockerbelastningstestet (OST) som tagits fram vid SLU (Lindåse *et al.*, 2016) upplevdes lätt att använda i vår studie. Testet var tidseffektivt och gav tillräckligt mycket information för att kunna utvärdera medicineringens effekter. Ett OST är en grövre diagnostisk metod jämfört med intravenösa tester och Detta OST ger en uppskattning av betacellsvaret och insulinregleringen hos hästen, men insulinkänslighet och betacellssvar kan ej kvantifieras med denna metod. Då hästar med EMS ofta har ett uppreglerat betacellssvar vilket sekundärt leder till hyperinsulinemi, räcker dock den information som fås vid ett OST i kliniskt användnings-syfte. Trots val av grövre utvärderingsmetod sågs tydliga behandlingseffekter hos alla hästar i denna pilotstudie. Detta tyder på att OST är ett bra test för att utvärdera behandlingseffekten vid medicinering med kanagliflozin hos hästar med EMS.

Studiebegränsningar

I vår studie föreligger stora individuella skillnader i insulinresponsen vid ett OST, vilket även är fallet i andra studier som utvärderat behandling med SGLT2-hämmare på häst (Meier *et al.*, 2018b). Skillnader individer emellan försvårar utvärderingen av hur stor effekt medicinering med SGLT2-hämmare har på hästar med insulindysreglering. Med en liten studiepopulation där stora individuella skillnader förekommer försvåras extrapolering av resultat till en större population.

Rasskillnader i glukos- och insulindynamik har observerats, begränsas även denna pilotstudie av att få raser finns representerade (Bamford *et al.*, 2014; Bröjer *et al.*, 2013).

I vår pilotstudie har endast en dosering testats. Studier där olika dosering av kanagliflozin används behövs. Detta för att kunna utvärdera behandlingseffekt och förekomst av biverkningar i förhållande till mängd kanagliflozin som givits.

Varje häst fungerade som sin egen kontroll i denna behandlingsstudie. Detta en begränsning i utvärderingen av medicinering med kanagliflozin, då en blindad studie där en kontrollgrupp med EMS-hästar behandlade med ett placebopreparat hade varit önskvärt.

Fler studier behöver utvärdera behandling med kanagliflozin på häst, innan läkemedlet kan börja användas kliniskt som behandling vid EMS. Framförallt krävs studier liknande vår pilotstudie, med medicinering över en längre tid, med en större studiepopulation inkluderat en kontrollgrupp. Få studier har gjorts på kanagliflozin och andra SGLT2-hämmare men med positiva resultat (Meier *et al.*, 2018b; Meier *et al.*, 2019).

KONKLUSION

Kanagliflozin är ett läkemedel som potentiellt i framtiden kan användas för att sänka postprandiella glukos- och insulinkoncentrationer hos hästar med EMS med olika nivå av insulindysreglering. Effekten av kanagliflozin på blodglukos- och plasmainsulinnivåer ses även upp till 11 timmar efter medicinering.

Behandling med kanagliflozin bör kunna minska risken för fång hos hästar med EMS, då en kausal koppling mellan fång och hyperinsulinemi har påvisats. Detta genom att man får en minskad insulinrespons till följd av minskade blodglukoskoncentrationer. För att säkerställa effekten och säkerheten av läkemedlet behöver en större population med olika hästraser studeras under en längre period, samt olika doser av preparatet utvärderas. Denna population bör även jämföras med en kontrollgrupp. Fler studier behöver även göras för att ta reda på om den effekt som kvarstår av läkemedlet 11 timmar efter medicinering, är lika stor som direkt efter läkemedelsgeva.

POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING

Ekvint metabolt syndrom (EMS) är ett syndrom hos häst som innefattar obalans i hästens insulinreglering och en ökad risk för att utveckla fång, vilket är en sjukdom i hästens hovar som leder till hälta, smärta och i värsta fall avlivning. Huvudkomponenter vid EMS är insulinresistens och onormalt höga nivåer av insulin i blodet, både före och efter utfodring. Insulinresistens innebär att kroppens vävnader ej svarar normalt på det insulin som utsöndras för att reglera blodsockernivåer efter födointag. Som kompensation för insulinresistensen ökar bukspottkörteln sin utsöndring av insulin, vilket leder till de onormalt höga insulinkoncentrationerna i blodet, så kallad hyperinsulinemi. En koppling har setts mellan hyperinsulinemi och fång, och man har i studier visat att tillförsel av höga doser insulin till tidigare friska hästar kan framkalla fång.

Ponnyraser drabbas oftare av EMS jämfört med de flesta andra stora hästraser, och en genetisk komponent tros vara iblandad i utvecklingen av syndromet. Även fetma och intag av stora mängder stärkelserikt foder anses vara kopplat till höga insulinnivåer.

I skrivande stund finns ingen medicinsk behandling för hästar med EMS. Flera läkemedel som används inom humanmedicin har testats på häst men inget har visat sig ha god effekt. I nuläget behandlas hästar med EMS genom utfodring med foder innehållande en mycket begränsad mängd stärkelse samt motion. Läkemedlet kanagliflozin, en SGLT2-hämmare, används inom humanmedicin vid behandling av Diabetes Mellitus typ II. Kanagliflozin verkar genom att minska återupptaget av glukos (blodsocker) i njurarna och därmed ökar utsöndringen av glukos via urinen. Detta medför att koncentrationen av glukos i blodet sänks och därmed även produktionen av insulin från bukspottkörteln.

Det övergripande syftet med denna pilotstudie var att undersöka effekten av behandling med kanagliflozin på tre hästars glukos- och insulinnivåer. Hästarna behandlades i tre veckor och koncentrationer av glukos och insulin undersöktes före och efter behandlingen med hjälp av ett modifierat oralt sockerbelastningstest (OST). Vid ett OST tas upprepade blodprover för att analysera glukos- och insulinkoncentrationer efter att en sockergiva med Dansukker® glykosirap getts i munnen. Flertalet olika diagnostiska tester finns för mäta graden av insulinresistens hos häst, men många av dessa är tidskrävande, dyra och kräver mycket kunskap av den som utför testet. Ett OST är därför en bra metod för diagnostik av sjuka hästar ute i fält.

En effekt av behandlingen sågs på alla tre hästar i studien och nivåer av blodglukos och insulin påverkades. Samtliga hästar i studien fick lägre glukos- och insulinkoncentrationer efter behandling med kanagliflozin. Detta visar på att kanagliflozin kan sänka nivåer av glukos och insulin hos hästar med EMS och förhoppningsvis förebygga fång, eftersom en koppling har setts mellan höga insulinnivåer i blodet, så kallad hyperinsulinemi, och utveckling av fång. Fler studier med ett större antal individer krävs för att verifiera läkemedlets effekt.

Medicinering med kanagliflozin fick olika stor behandlingseffekt hos de tre hästarna, där skillnaden före och efter behandling var störst hos häst A och C. Den individuella skillnaden i behandlingssvar tros bero på att hästarna i grunden var olika mycket insulinresistenta före studiens start.

Sammantaget visar resultatet från denna pilotstudie att ett OST är ett bra test för att utvärdera behandlingseffekten av kanagliflozin, samt att detta läkemedel är ett lovande behandlingsalternativ för att förhoppningsvis förebygga fång hos hästar.

KÄLLFÖRTECKNING

- 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*, 174:530–535. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.07.003>
- Bailey, S.R., Marr, C.M., Elliott, J. (2004). Current research and theories on the pathogenesis of acute laminitis in the horse. *The Veterinary Journal*, 167:129–142. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(03\)00120-5](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(03)00120-5)
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2013.11.001>
- Boden, G. (2001). Pathogenesis of type 2 diabetes: Insulin resistance. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 30:801–815. [https://doi.org/10.1016/S0889-8529\(05\)70216-4](https://doi.org/10.1016/S0889-8529(05)70216-4)
- Borgia, L., Valberg, S., McCue, M., Watts, K., Pagan, J. (2011). Glycaemic and insulinaemic responses to feeding hay with different non-structural carbohydrate content in control and polysaccharide storage myopathy-affected horses. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 95:798–807. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2010.01116.x>
- Bratanova-Tochkova, T.K., Cheng, H., Daniel, S., Gunawardana, S., Liu, Y.-J., Mulvaney-Musa, J., Schermerhorn, T., Straub, S.G., Yajima, H., Sharp, G.W.G. (2002). Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes*, 51:S83–S90. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.2007.S83>
- Bröjer, J., Lindåse, S., Hedenskog, J., Alvarsson, K., Nostell, K. (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. <https://doi.org/10.1111/jvim.12172>
- Carter, R.A., Geor, R.J., Burton Staniar, W., Cubitt, T.A., Harris, P.A. (2009). Apparent adiposity assessed by standardised scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies. *The Veterinary Journal*; 179:204–210. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.02.029>
- Carter, R.A., McCutcheon, L.J., Valle, E., Meilahn, E.N., Geor, R.J. (2010). Effects of exercise training on adiposity, insulin sensitivity, and plasma hormone and lipid concentrations in overweight or obese, insulin-resistant horses. *American Journal of Veterinary Research*, 71:314–321. <https://doi.org/10.2460/ajvr.71.3.314>
- Chao, E.C. (2014). SGLT-2 inhibitors: A new mechanism for glycemic control. *Clinical Diabetes*, 32:4–11. <https://doi.org/10.2337/diaclin.32.1.4>
- de Laat, M.A., McGowan C.M., Sillence, M.N., Pollitt, C.C. (2010). Equine laminitis: Induced by 48 h hyperinsulinaemia in Standardbred horses. *Equine Veterinary Journal*, 42:129–135. <https://doi.org/10.2746/042516409X475779>
- de Laat, M.A., McGree, J.M., Sillence, M.N. (2015). Equine hyperinsulinemia: investigation of the enteroinsular axis during insulin dysregulation. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 310:E61–E72. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00362.2015>
- de Laat, M.A., Sillence, M.N. (2017). The repeatability of an oral glucose test in ponies. *Equine Veterinary Journal*, 49:238–243. <https://doi.org/10.1111/evj.12579>
- 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*, 33:335–349. <https://doi.org/10.1111/jvim.15423>
- Eps, A.W. van, Burns, T.A. (2019). Are there shared mechanisms in the pathophysiology of different clinical forms of laminitis and what are the implications for prevention and treatment? *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 35:379–398. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2019.04.001>

- Firshman, A.M., Valberg, S.J. (2007). Factors affecting clinical assessment of insulin sensitivity in horses. *Equine Veterinary Journal*, 39:567–575. <https://doi.org/10.2746/042516407X238512>
- Frank, N., Geor, R.J., Bailey, S.R., Durham, A.E., Johnson, P.J. (2010). Equine metabolic syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24:467–475. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0503.x>
- Frank, N., Tadros, E.M. (2014). Insulin dysregulation. *Equine Veterinary Journal*, 46:103–112. <https://doi.org/10.1111/evj.12169>
- Freestone, J.F., Beadle, R., Shoemaker, K., Bessin, R.T., Wolfsheimer, K.J., Church, C. (1992). Improved insulin sensitivity in hyperinsulinaemic ponies through physical conditioning and controlled feed intake. *Equine Veterinary Journal*, 24:187–190. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1992.tb02812.x>
- Frye, M.A. (2006). Pathophysiology, diagnosis, and management of urinary tract infection in horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 22:497–517. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2006.03.004>
- Geor, R.J. (2008). Metabolic predispositions to laminitis in horses and ponies: obesity, insulin resistance and metabolic syndromes. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28:753–759. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2008.10.016>
- Henneke, D.R., Potter, G.D., Kreider, J.L., Yeates, B.F. (1983). Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Veterinary Journal*, 15:371–372. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1983.tb01826.x>
- Jacob, S.I., Geor, R.J., Weber, P.S.D., Harris, P.A., McCue, M.E. (2018). Effect of age and dietary carbohydrate profiles on glucose and insulin dynamics in horses. *Equine Veterinary Journal*, 50:249–254. <https://doi.org/10.1111/evj.12745>
- Johnson, P.J. (2002). The equine metabolic syndrome: Peripheral Cushing's syndrome. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 18:271–293. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(02\)00006-8](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(02)00006-8)
- Johnson, R.J., Stenvinkel, P., Martin, S.L., Jani, A., Sánchez-Lozada, L.G., Hill, J.O., Lanaspa, M.A. (2013). Redefining metabolic syndrome as a fat storage condition based on studies of comparative physiology. *Obesity (Silver Spring)*, 21:659–664. <https://doi.org/10.1002/oby.20026>
- Karagiannis, T., Bekiari, E., Tsapas, A. (2017). Canagliflozin in the treatment of type 2 diabetes: an evidence-based review of its place in therapy. *Core Evidence*, 12:1–10. <https://doi.org/10.2147/CE.S109654>
- 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. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.712>
- Legere, R.M., Taylor, D.R., 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*, 82:102797. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.102797>
- Lindåse, S., Nostell, K., Bröjer, J. (2016). A modified oral sugar test for evaluation of insulin and glucose dynamics in horses. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 58 (Suppl 1):64. <https://doi.org/10.1186/s13028-016-0246-z>
- Lindåse, S., Nostell, K., Söder, J., Bröjer, J. (2017). Relationship between β -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. <https://doi.org/10.1111/jvim.14799>
- McGowan, C.M. (2010). Endocrinopathic laminitis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 26:233–237. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2010.04.009>

- Meier, A.D., de Laat, M.A., Reiche, D.B., Pollitt, C.C., Walsh, D.M., McGree, J.M., Sillence, M.N. (2018a). The oral glucose test predicts laminitis risk in ponies fed a diet high in nonstructural carbohydrates. *Domestic Animal Endocrinology*, 63:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2017.10.008>
- Meier, A., Reiche, D., de Laat, M., Pollitt, C., Walsh, D., Sillence, M. (2018b). The sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor velagliflozin reduces hyperinsulinemia and prevents laminitis in insulin-dysregulated ponies. *PLoS One*, 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203655>
- 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. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1811-2>
- Patterson-Kane, J.C., Karikoski, N.P., McGowan, C.M. (2018). Paradigm shifts in understanding equine laminitis. *The Veterinary Journal*, 231:33–40. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.11.011>
- Penell, J.C., Egenvall, A., Bonnett, B.N., Olson, P., Pringle, J. (2005). Specific causes of morbidity among Swedish horses insured for veterinary care between 1997 and 2000. *Veterinary Record*, 157:470–477. <https://doi.org/10.1136/vr.157.16.470>
- Pollitt, C.C. (1996). Basement membrane pathology: a feature of acute equine laminitis. *Equine Veterinary Journal*, 28:38–46. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1996.tb01588.x>
- Rijnen, K.E.P.M., van der Kolk, J.H. (2003). Determination of reference range values indicative of glucose metabolism and insulin resistance by use of glucose clamp techniques in horses and ponies. *American Journal of Veterinary Research*, 64:1260–1264. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2003.64.1260>
- Schuver, A., Frank, N., Chameroy, K.A., Elliott, S.B. (2014). Assessment of insulin and glucose dynamics by using an oral sugar test in horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34:465–470. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.09.006>
- Smith, S., Harris, P.A., Menzies-Gow, N.J. (2016). Comparison of the in-feed glucose test and the oral sugar test. *Equine Veterinary Journal*, 48:224–227. <https://doi.org/10.1111/evj.12413>
- Stewart-Hunt, L., Geor, R.J., McCutcheon, L.J. (2006). Effects of short-term training on insulin sensitivity and skeletal muscle glucose metabolism in Standardbred horses. *Equine Veterinary Journal*, 38:226–232. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2006.tb05544.x>
- Suagee, J.K., Corl, B.A., Wearn, J.G., Crisman, M.V., Hulver, M.W., Geor, R.J., McCutcheon, L.J. (2011). Effects of the insulin-sensitizing drug pioglitazone and lipopolysaccharide administration on insulin sensitivity in horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25:356–364. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0681.x>
- Tinworth, K.D., Boston, R.C., Harris, P.A., Sillence, M.N., Raidal, S.L., Noble, G.K. (2012). The effect of oral metformin on insulin sensitivity in insulin-resistant ponies. *Veterinary Journal*, 191:79–84. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.01.015>
- Tóth, F., Frank, N., Martin-Jiménez, T., Elliott, S.B., Geor, R.J., Boston, R.C. (2010). Measurement of C-peptide concentrations and responses to somatostatin, glucose infusion, and insulin resistance in horses. *Equine Veterinary Journal*, 42:149–155. <https://doi.org/10.2746/042516409X478497>
- Tóth, B., Auth, A., Rompos, L., Bakos, Z. (2018). Effect of feed deprivation on selected parameters of lipid mobilisation and hepatic function in healthy Akhal Teke horses. *Equine Veterinary Journal*, 50:98–103. <https://doi/full/10.1111/evj.12730>
- Treiber, K.H., Kronfeld, D.S., Geor, R.J. (2006). Insulin resistance in equids: possible role in laminitis. *Journal of Nutrition*, 136:2094S–2098S. <https://doi.org/10.1093/jn/136.7.2094S>
- Truelsen Lindåse, S. (2017). *Insulin sensitivity and postprandial insulin response in equines*. Diss. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet. <https://pub.epsilon.slu.se/14699/>
- White, J.R. (2010). Apple trees to sodium glucose co-transporter inhibitors: a review of SGLT2 inhibition. *Clinical Diabetes*, 28:5–10. <https://doi.org/10.2337/diaclin.28.1.5>

- Wilcox, G. (2005). Insulin and insulin resistance. *The Clinical Biochemist. Reviews*, 26:19–39.
- Wilding, J.P.H. (2014). The role of the kidneys in glucose homeostasis in type 2 diabetes: Clinical implications and therapeutic significance through sodium glucose co-transporter 2 inhibitors. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 63:1228–1237. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.06.018>
- Öberg, J., Bröjer, J., Wattle, O., Lilliehöök, I. (2012). Evaluation of an equine-optimized enzyme-linked immunosorbent assay for serum insulin measurement and stability study of equine serum insulin. *Comparative Clinical Pathology*, 21:1291–1300. <https://doi.org/10.1007/s00580-011-1284-6>