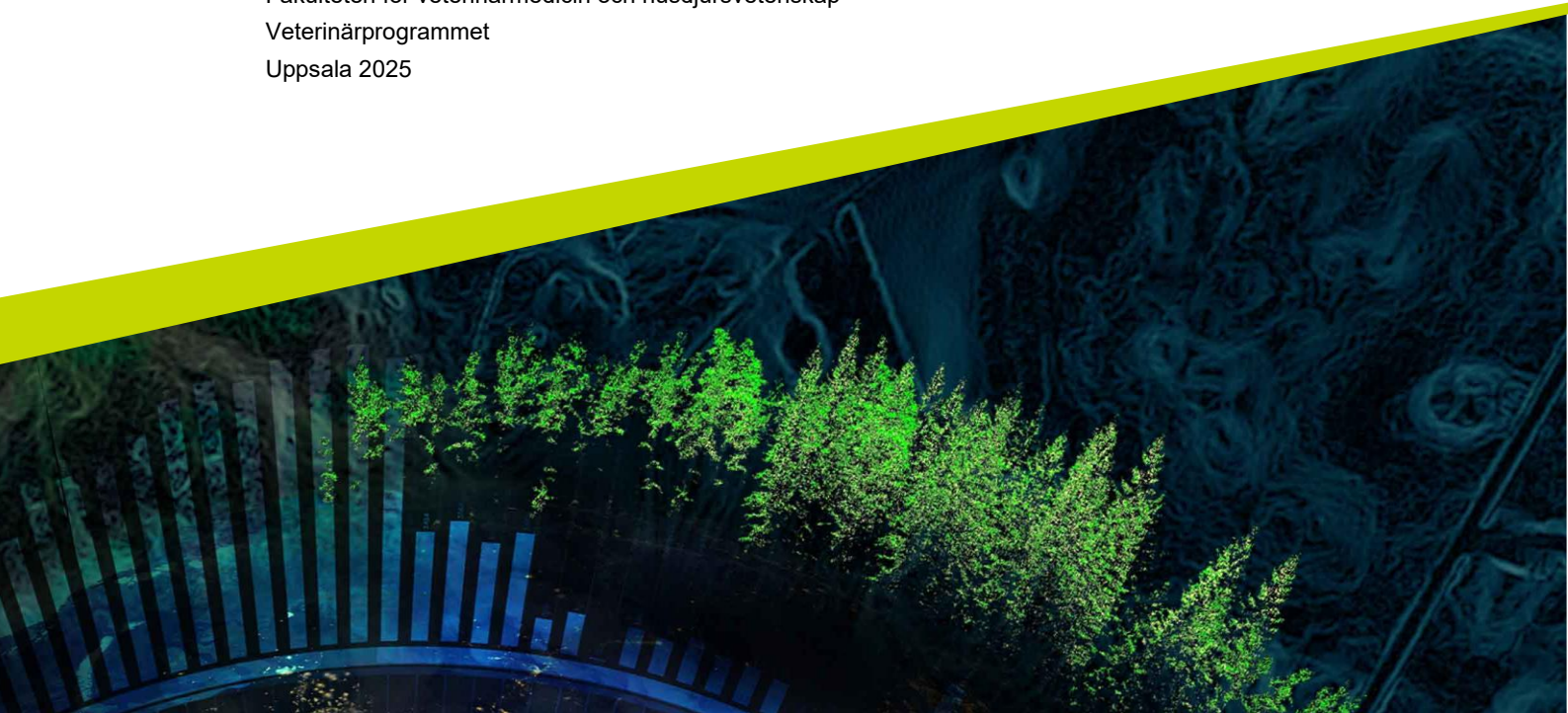




Biologisk variation av fasteinsulin i serum hos friska islandshästar

Alma Kozma

Självständigt arbete • 30 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet
Uppsala 2025



Biologisk variation av fasteinsulin i serum hos friska islandshästar

Biological variation of fasting serum insulin in healthy Icelandic horses

Alma Kozma

Handledare:	Emma Strage, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper
Bitr. handledare:	Sanna Truelsen Lindåse, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper
Examinator:	Inger Lilliehöök, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper
Omfattning:	30 hp
Nivå och fördjupning:	Avancerad nivå, A2E
Kurstitel:	Självständigt arbete i veterinärmedicin
Kurskod:	EX1003
Program/utbildning:	Veterinärprogrammet
Kursansvarig inst.:	Institutionen för kliniska vetenskaper
Utgivningsort:	Uppsala
Utgivningsår:	2025
Upphovsrätt:	Alla bilder används med upphovspersonens tillstånd.
Nyckelord:	insulin, biologisk variation, häst, ekvint metabolt syndrom

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Veterinärprogrammet

Sammanfattning

Analys av insulin används vid diagnostik av ekvint metabolt syndrom (EMS). Hästar med EMS har insulindysreglering (ID) som innebär insulinresistens och hyperinsulinemi vid fasta och/eller postprandiellt. Analys av insulin kan göras på fastande hästar, postprandiellt eller efter glukos-toleranstest. Sensitiviteten vid analys av fasteinsulin för detektion av ID har visat sig vara låg. Detta beror delvis på att insulin i blodet, liksom alla analyter, uppvisar en biologisk variation och koncentrationen kommer att skilja sig åt mellan provtagningar. Denna biologiska variation är till viss del slumpmässig men insulinfrisättning påverkas även av flera faktorer som till exempel födointag och hull. Det saknas tidigare studier om hur den biologiska variationen av insulin ser ut hos hästar. Detta är av värde att veta om då man utifrån det bland annat kan beräkna hur stor skillnad man behöver ha mellan två provtagningar för att skillnaden ska vara kliniskt signifikant. Detta examensarbete hade som syfte att undersöka hur den biologiska variationen av fasteinsulin ser ut mellan hästar och inom en och samma häst hos en grupp av friska islandshästar. För att göra detta togs blodprover för fasteinsulin från åtta friska islandshästar vid fem tillfällen med cirka en veckas mellanrum. Samtliga prover analyserades för insulin och variationskoefficienten (CV) räknades ut för inomhäst-variation (CV_I), mellanhäst-variation (CV_G) och analysvariation (CV_A).

Resultatet visade $CV_I=25\%$, $CV_G=39\%$ och $CV_A=16\%$. Detta innebär att hos denna grupp av hästar varierar insulinkoncentrationer i snitt 25 % inom en och samma häst och 39 % mellan hästar, samt att 16 % av variationen beror på analysens CV. *Reference change value*, som är ett mått på hur mycket insulinkoncentrationen behöver ändras mellan två provtagningar för att räknas som en klinisk signifikant förändring, beräknades till 226 % för ökning och 44 % för minskning. Man kan utgå ifrån dessa resultat för att bedöma om populationsbaserade referensintervall är lämpliga att använda eller inte vid individuella bedömningar genom att räkna ut *index of individuality*. Utifrån denna studie bedöms populationsbaserade referensintervall inte vara optimala att använda, men är inte heller oanvändbara. Studien begränsas av att endast en liten grupp hästar av samma ras studerats, men ger en initial bild av hur den biologiska variationen ser ut hos friska hästar. Detta kan vara till hjälp vid tolkning av provsvar, till exempel för att veta hur stor förändring av insulinkoncentration mellan två tillfällen som är kliniskt signifikant.

Nyckelord: insulin, biologisk variation, häst, ekvint metabolt syndrom

Abstract

Insulin analysis is mostly used to diagnose equine metabolic syndrome (EMS). Horses with EMS have insulin dysregulation (ID) which is characterized by insulin resistance and fasting and/or postprandial hyperinsulinemia. Samples for insulin can be analyzed on fasted horses, postprandially or after a glucose tolerance test. The sensitivity of fasting insulin for detection of ID is low. The reason for this is partly because the concentration of insulin, like all analytes, has biological variation and will vary between samples taken at different times. This biological variation is partly random but the secretion of insulin is also affected by, for example, feed-intake and body condition score. It is important to know about the biological variation of insulin, for example it can tell us if a change between two samples is clinically significant or not, but there is a lack of studies on this subject. The purpose of this study was to examine the biological variation of fasting insulin concentrations between and within horses in a group of healthy Icelandic horses. Eight horses were sampled five times at approximately one week intervals and all samples were analyzed for insulin. The coefficient of variation (CV) was calculated for within-horse-variation (CV_I), between-horse-variation (CV_G) and analytical variation (CV_A).

The results showed $CV_I=25\%$, $CV_G=39\%$ and $CV_A=16\%$. This means that the average variation within horses is 25%, between horses 39% and variation attributable to the analysis is 16%. Reference change values, a measure of how big a change needs to be between two samples to be considered a clinically significant change, was calculated to 226% for an increase in concentration and 44% for a decrease in concentration. These results can be used to assess whether population-based reference intervals are appropriate to use for individual assessments or not by calculating the index of individuality. Based on this study, population-based reference intervals are not optimal, but they are not considered to be unusable. Limits of this study are that the results are based on a quite small study population which only consists of one breed, but the study gives an initial estimate of the biological variation of insulin in healthy horses. The results from this study can be of help when interpreting test results, for example to assess if a difference between two samples is clinically significant or not.

Keywords: insulin, biological variation, horse, equine metabolic syndrome

Innehållsförteckning

Förkortningar	8
Inledning	9
1.1 Frågeställningar	9
Litteraturöversikt.....	10
2.1 Insulinets fysiologi	10
2.2 Ekvint metabolt syndrom (EMS)	10
2.2.1 EMS och fång	11
2.3 Insulinresistens (IR) och hyperinsulinemi	12
2.4 Diagnostik av insulindysreglering.....	13
2.4.1 Analysmetoder.....	13
2.4.2 Metoder för att utvärdera insulinresistens	14
2.5 Biologisk variation	15
2.6 Variation i insulinkoncentrationer	16
2.6.1 Inomhäst-variation av insulin	16
2.6.2 Mellanhäst-variation av insulin	17
2.7 Påverkan av olika faktorer på insulin	18
2.7.1 Föda.....	18
2.7.2 Inre faktorer	18
2.7.3 Yttre faktorer	19
Material och metod.....	21
3.1 Hästar.....	21
3.2 Studiedesign	21
3.2.1 Provtagningar	21
3.2.2 Analys av insulin	22
3.2.3 Bearbetning av data.....	22
Resultat	23
4.1 Hästar och provtagningar.....	23
4.2 Insulinkoncentrationer	23
4.3 Bearbetning av data.....	24
Diskussion	25
5.1 Konklusion.....	28
Referenser.....	30
Populärvetenskaplig sammanfattning	36
Tack.....	39

Förkortningar

Förkortning	Betydelse
ACVIM	American College of Veterinary Internal Medicine
BCS	Body condition score
CGIT	Combined glucose-insulin test
CLIA	Chemiluminescence immunoassay
CNS	Cresty neck score
CV	Coefficient of variation
CV _A	Analytisk variation
CV _G	Variation mellan hästar
CV _I	Variation inom häst
ECEIM	European College of Equine Internal Medicine
EHC	Euglycemic-hyperinsulinemic clamp
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMS	Ekvint metabolt syndrom
FSIGTT	Frequently sampled intravenous glucose tolerance test
GLUT	Glukostransportör
HOMA-IR	Homeostasis model assessment for insulin resistance
ID	Insulindysreglering
II	Index of individuality
IR	Insulinresistens
lnx	Naturliga logaritmen av x
NSC	Non-structural carbohydrates
OGT	Oralt glukostoleranstest
OST	Oral sugar test
PPID	Pituitary pars intermedia dysfunction
RCV	Reference change value
REML	Restricted maximum likelihood
RIA	Radioimmunoassay
SD	Standard deviation
SLU	Sveriges lantbruksuniversitet
UDS	Universitetsdjursjukhuset

Inledning

Insulin är ett livsviktigt metabolt hormon som frisätts från β -celler i pankreas som svar på ökade blodglukoskoncentrationer (Sjaastad *et al.* 2016). Hästar med ekvint metabolt syndrom (EMS) lider av insulindysreglering (ID) vilket innebär att de är insulinresistenta och kan få onormalt hög insulinkoncentration i blodet (hyperinsulinemi) både vid fasta och postprandiellt (Frank *et al.* 2010; Frank & Tadros 2014). Detta är ett stort välfärdsproblem då EMS är en vanlig bakomliggande orsak till att hästar utvecklar fång (Karikoski *et al.* 2011).

En rad olika metoder för att undersöka graden av ID har studerats och de metoder som har högst sensitivitet för att mäta graden av insulinresistens (IR) är komplicerade att utföra (Firshman & Valberg 2007). Metoder där endast ett enda blodprov för insulin tas för att undersöka förekomst av hyperinsulinemi har fördelen att det går att använda vid klinisk diagnostik eller i större studiepopulationer, men har lägre sensitivitet för att upptäcka ID. En anledning till detta är att insulin, liksom alla ämnen i kroppen, uppvisar en viss biologisk variation och det finns många faktorer som påverkar frisättningen av insulin. Dessutom kommer analysvariation ytterligare att påverka provresultatet. Detta försvårar tolkningen av provsvaren och man riskerar att få både falskt negativa och falskt positiva svar.

Ett flertal studier har gjorts gällande hur faktorer som bland annat *body condition score* (BCS), ålder, kön, ras, diet och motion påverkar insulinkoncentrationerna (Firshman & Valberg 2007), men i nuläget saknas utförligare studier på hur mycket insulinkoncentrationen kan variera inom friska individer under liknande provtagningsförhållanden. Syftet med detta examensarbete var att utföra upprepade blodprover på en grupp hästar under liknande förhållanden, det vill säga i samma miljö och med samma rutiner kring provtagning och hantering av prover. Från detta studerades hur insulinkoncentrationer i blodet varierade inom en och samma individ samt mellan olika individer. Detta för att få en större förståelse över hur den biologiska variationen av insulinfrisättning ser ut hos friska hästar och på så sätt bidra till en säkrare tolkning av provsvar.

1.1 Frågeställningar

Hur stor är variationen av fasteinsulin inom en häst samt mellan hästar hos en grupp av friska islandshästar?

Litteraturöversikt

2.1 Insulinets fysiologi

Insulin är kroppens viktigaste anabola hormon (Sjaastad *et al.* 2016). Frisättningen från β -celler i pankreas ökar postprandiellt främst till följd av en ökad koncentration av blodglukos. Frisättningen ökar även vid ökade nivåer av aminosyror i blodet samt till följd av frisättning av inkretiner (GIP och GLP-1), vilka är hormoner som frisätts från epitelceller i magtarmkanalen när föda når tunntarmen. När insulinkoncentrationen ökar i blodet stimulerar det till intracellulärt upptag av glukos och aminosyror från blodet. När glukos släpps in i cellerna minskar koncentrationen av glukos i blodet och sekretionen av insulin minskar som svar på detta. På detta sätt regleras koncentrationerna av insulin och glukos i blodet vilket är nödvändigt för en fungerande metabolism. Inaktivering och nedbrytning av insulin sker delvis i målceller men även i levern och njurarna. Frisättning av insulin sker från pankreas till portavenen vilket resulterar i att insulin når levern innan övriga vävnader (Tóth *et al.* 2010; Petersen & Shulman 2018). En del av insulinet extraheras direkt av levern och når därför aldrig den perifera cirkulationen (Tóth *et al.* 2010).

Insulin verkar genom att binda till insulinreceptorer i cellmembranet på målceller (Sjaastad *et al.* 2016). Detta aktiverar en intracellulär signalkaskad som resulterar i att glukotransportörer (GLUT-4) translokeras till cellmembranet så att glukos kan transporteras in i cellen. Denna mekanism sker i bland annat muskel- och fettceller. Övriga vävnader har andra glukotransportörer som aktiveras via mekanismer som inte är beroende av insulin. Leverns glukosupptag sker främst via GLUT-2 som inte är beroende av insulin men insulin påverkar glukosmetabolismen i levern via bland annat glykogensyntes och minskad glukoneogenes (Petersen & Shulman 2018).

2.2 Ekvint metabolt syndrom (EMS)

Ekvint metabolt syndrom (EMS) är ett samlingsbegrepp för ett flertal hormonella avvikelser som inkluderar generell och/eller regional fetma samt insulindysreglering (ID) (Frank *et al.* 2010; Frank & Tadros 2014; Durham *et al.* 2019). Insulindysreglering kännetecknas av insulinresistens (IR) och hyperinsulinemi och ger en ökad risk för att en häst utvecklar fång (Frank & Tadros 2014; Durham *et al.* 2019). Hyperinsulinemi kan föreligga vid fasta eller efter födointag då hästar med EMS får onormalt höga insulinkoncentrationer i blodet efter intag av kolhydrater. Den regionala fetman visar sig oftast som ökad fettansättning kring nacken och graden av fettansättning kan bedömas via *cresty neck score* (CNS) (Carter *et al.* 2009a).

Många hästar som lider av sjukdomen PPID (*pituitary pars intermedia dysfunction*) har samtidig ID (Frank & Tadros 2014; Meier *et al.* 2018). En studie visade att 32 % av hästar med PPID har hyperinsulinemi vilket ökar risken för att dessa individer utvecklar fång (Mcgowan *et al.* 2013).

2.2.1 EMS och fång

Hästar med EMS har ID vilket ökar risken för att drabbas av fång (Durham *et al.* 2019). Fång innebär att de dermala och epidermala lamellerna i hoven separerar från varandra vilket gör att hovbenets upphängning i hovkapseln påverkas (Pollit 2011). Detta leder till kraftig smärta och hålt och drabbar oftast främst framhovarna. Man har sett att ökad koncentration av basalinsulin är en signifikant riskfaktor för utvecklandet av fång (Carter *et al.* 2009b; Menzies-Gow *et al.* 2017). Då en EMS-fenotyp med generell och regional fettansättning korrelerar med ID (Carter *et al.* 2009a) är denna typ av hästar oftare drabbade av fång än hästar i normalhull (Carter *et al.* 2009b). I en studie gav man intravenös insulininfusion för att upprätthålla ett tillstånd av hyperinsulinemi hos fem tidigare friska ponnyer och samtliga utvecklade fång inom två dygn (Asplin *et al.* 2007). Resultat från detta försök visar att även insulinkänsliga hästar kan få fång om de utsätts för hyperinsulinemi. Glukoskoncentrationen i blodet hölls normal i försöket vilket indikerar att hyperglykemi inte påverkar sjukdomsutvecklingen. Detta talar emot tidigare teorier om att fång orsakas av glukotoxicitet (Frank & Tadros 2014). Den exakta mekanismen bakom hur höga insulinnivåer ger upphov till fång är ännu inte helt klarlagd men flertalet möjliga verkningsmekanismer har föreslagits. Asplin *et al.* (2007) diskuterar att det kan ha att göra med en hypoxi och hypoperfusion i de dermala och epidermala lamellerna i hoven till följd av endothelin-1 medierad vasokonstriktion, samt att de cirkulatoriska förändringarna kan resultera i en uppreglering av matrix-metalloproteaser (MMP) med destruktion av lamellernas basalmembran som följd. När insulin hos friska hästar binder receptorer på celler startas en intracellulär signalväg som bland annat resulterar i vasodilatation och att GLUT-4 translokeras till cellmembranet så att glukos kan transporteras in i cellerna (Durham *et al.* 2019). Denna signalväg hämmas delvis hos insulinresistenta individer och då ökar istället en signalväg via MAP-kinas i omfattning (Geor & Frank 2009; Durham *et al.* 2019). Denna signalväg leder bland annat till frisättning av endothelin-1 som ger upphov till vasokonstriktionen.

Hormonella sjukdomar är sannolikt den vanligaste bakomliggande orsaken till att hästar utvecklar fång (Karikoski *et al.* 2011). I Finland gjordes en studie där alla hästar som inkom med fång till ett djursjukhus utreddes för bakomliggande hormonella sjukdomar vilket man fann hos nästan 90 % av hästarna. En tredjedel av dessa hade PPID och resterande hade basal hyperinsulinemi utan tecken på PPID (Karikoski *et al.* 2011).

2.3 Insulinresistens (IR) och hyperinsulinemi

Insulinresistens innebär att insulinets verkan på insulinreceptorn blir mindre effektiv och det krävs en högre koncentration av insulin i blodet för att hålla glukoskoncentrationen inom ett normalt spann (Frank & Tadros 2014; Petersen & Shulman 2018). Detta leder till en hyperinsulinemi då insulinsekretionen från pankreas ökar till följd av hyperglykemin (Frank & Tadros 2014; Petersen & Shulman 2018). Tóth *et al.* (2010) visade att även insulinnedbrytning i levern verkar minska hos insulinresistenta hästar och kan därför bidra till utvecklandet av hyperinsulinemi. Det finns en tydlig koppling mellan övervikt och IR och IR är ofta reversibelt och kan minska vid vikttnedgång (Delarocque *et al.* 2020). Hos människor övergår ofta en kompenserad IR, där pankreas ökar sekretionen av insulin för att kompensera för det ökade behovet, till en icke-kompenserad IR där β -cellerna inte klarar av att producera tillräckliga mängder insulin (Kasuga 2006). Den minskade insulinfrisättningen beror ofta på bland annat lipotoxicitet och glukotoxicitet och leder till utvecklandet av hyperglykemi och diabetes typ 2 (Prentki & Nolan 2006). Hästars pankreas är mindre benägna att utmattas vid en ökad insulinsekretion över tid och de utvecklar diabetes mellitus mer sällan än människor (Frank & Tadros 2014; Bertin & de Laat 2017).

Det är mycket man inte vet om hur IR uppstår men man har sett ett minskat uttryck av aktiva GLUT-4 på ytan av skelettmuskelceller hos insulinresistenta hästar, människor och gnagare vilket sannolikt är en del av mekanismen (Waller *et al.* 2011; Petersen & Shulman 2018). Hos människor och gnagare har man även hittat receptordefekter på insulinreceptorn hos feta individer samt förändringar i de intracellulära signalvägarna i målcellerna (Petersen & Shulman 2018).

Det finns en tydlig koppling mellan IR och hyperinsulinemi hos hästar (Lindåse *et al.* 2017), men det är viktigt att påtala att hästar med IR inte alltid uppvisar förhöjt basalinsulin (Frank *et al.* 2006). Det finns dessutom fler faktorer än graden av IR som påverkar nivån av hyperinsulinemi postprandiellt, bland annat konsumtionshastighet av fodret, i vilken hastighet magsäckstömning sker, glukosabsorption i tunntarmen samt inkretineffekter (Kronfeld *et al.* 2005; de Laat *et al.* 2016).

Vad som definieras som hyperinsulinemi skiljer mellan studier, beroende av analysmetod och om hästen haft tillgång till foder eller inte innan provtagning (Durham *et al.* 2019). Ofta definieras hyperinsulinemi som att basalinsulin är $>20 \mu\text{U/mL}$ (analyserat med Coat-a-Count insulin RIA, Immulite CLIA eller DSL-1600 Insulin RIA) (Frank *et al.* 2010; Durham *et al.* 2019) men andra har använt cut-off värdet att $>32 \mu\text{U/mL}$ (analyserat med Coat-a-Count RIA) innebär ökad risk för utvecklandet av fång (Carter *et al.* 2009b).

I hästuppopulationen är det internationellt en relativt stor andel som lider av olika grader av IR och/eller hyperinsulinemi. I en amerikansk studie där blodprover för seruminsulin togs på 366 friska hästar i USA och analyserades med Coat-a-Count RIA sågs förhöjda basalinsulinnivåer ($>30 \mu\text{U/mL}$) hos 8 % (Pratt-Phillips *et al.*

2010). I en annan amerikansk prevalensstudie på 300 friska hästar där insulin analyserades med Coat-a-Count RIA sågs förhöjda insulinkoncentrationer >20 µU/mL hos 18 % och >30 µU/mL hos 10 % (Pleasant *et al.* 2013). Liknande studier för hur prevalensen av hyperinsulinemi och ID ser ut i Sverige saknas.

2.4 Diagnostik av insulindysreglering

2.4.1 Analysmetoder

För att ställa diagnoserna ID och EMS används i regel analys av glukos- och insulinnivåer i blodet (Bertin & de Laat 2017). Olika analysmetoder för insulin som används är till exempel ELISAs (*enzyme-linked immunosorbent assays*), RIA (*radioimmunoassays*) eller CLIA (*chemiluminescence immunoassay*) (Warnken *et al.* 2016). Resultat från olika analysinstrument skiljer sig åt och därför bör man endast använda referensintervall för det aktuella analysinstrumentet man använder och inte direkt jämföra resultat som kommer från olika analysmetoder.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

En ELISA utvecklad för humanprover är inte optimalt att använda då det finns strukturella skillnader i ekvint och humant insulin vilket kan leda till varierande korsreaktivitet vid analysen och felaktiga provsvar (Öberg *et al.* 2012). Säkrare resultat fås vid användandet av en hästspecifik ELISA där antikropparna och analysintervallet är anpassade efter rätt art.

Mercodia Equine Insulin ELISA (hästspecifik insulin ELISA) fungerar genom att en antikropp binder insulinmolekylen till plattan och en peroxidas-konjugerad fri antikropp fäster till annan plats på insulinmolekylen (Mercodia 2023). Efter inkubation tvättas antikroppar som inte bundit bort och därefter tillsätts ett substrat som reagerar med peroxidaset på antikropparna. Detta genererar en färgförändring som mäts spektrofotometriskt och mängden färg är proportionerlig mot mängden insulin i provet.

Öberg *et al.* (2012) undersökte precisionen (analysvariationen) hos Mercodia Equine Insulin ELISA genom att mäta variationskoefficienten (CV; *coefficient of variation*) inom och mellan körningar. De uppmätte ett CV inom körningar på 2,0–6,5 % samt ett CV mellan körningar på 10,7 %. I samma studie undersöktes stabiliteten av insulin i serum under olika förhållanden. Resultaten visade att insulinkoncentrationen i serum inte sjunkit signifikant efter tre dagar i 18–20 °C, en månad i 6–8 °C eller efter ett år i -20 °C. I rumstemperatur (18–20 °C) sågs en signifikant minskning av koncentrationen efter en månad jämfört med prover som förvarats i frys. I hemolyserade prover sågs en signifikant minskning av insulinkoncentrationerna jämfört med icke-hemolyserade prover efter förvaring i både kyl- och frystemperatur. Studier har även visat att insulinkoncentrationer förändras av att upprepade gånger tina och frysa om prover (Warnken *et al.* 2016).

2.4.2 Metoder för att utvärdera insulinresistens

EHC och FSIGTT med minimal model analysis

De bästa metoderna för att utvärdera graden av IR hos hästar är att använda kvantitativa och specifika metoder som euglykemisk-hyperinsulinemisk clamp (EHC; *euglycemic-hyperinsulinemic clamp*) eller intravenöst glukostoleranstest med frekventa provtagningar (FSIGTT; *frequently sampled intravenous glucose tolerance test*) med minimal model analys (Frank & Tadros 2014; Dunbar *et al.* 2016). Metoden EHC anses vara gold-standard för att mäta insulinkänslighet (Kronfeld *et al.* 2005). Den går ut på att man mäter hur mycket glukos som behövs för att upprätthålla en normal koncentration av glukos i blodet medan man med hjälp av intravenös tillförsel av exogent insulin upprätthåller ett tillstånd av hyperinsulinemi. Denna metod ger en direkt bild av vävnaders känslighet för insulin (Bertin & de Laat 2017), men är inte tillämpbar i större studiepopulationer eller för användning kliniskt då det tar tid att utföra och kräver viss utrustning (Kronfeld *et al.* 2005; Frank & Tadros 2014). Metoden FSIGTT med minimal model analys är likt EHC ett sätt att mäta insulinkänslighet och går ut på att man ger glukos intravenöst och under en tid efter tar frekventa blodprov för glukos och insulin vid givna intervall (Pratt *et al.* 2005). Pratt *et al.* (2005) har visat i försök att EHC har lägre CV mellan dagar (14 %) än FSIGTT (24 %) och repeterbarheten verkar därför vara bättre för EHC.

Oralt glukostolerans test

En dynamisk metod för att diagnosticera ID är oralt glukostolerans test (OGT) där principen är att mäta insulinnivåer en viss tid efter oral administration av glukos (Bertin & de Laat 2017). Denna metod kan enkelt användas kliniskt då endast ett blodprov krävs, men den har visat låg sensitivitet för att påvisa IR i jämförelse med FSIGTT (Dunbar *et al.* 2016). Dock ger OGT inte en direkt bild av insulinkänsligheten utan påverkas även av faktorer som hastighet av magsäckstömning och absorptionshastighet (Kronfeld *et al.* 2005). Vissa menar att ett OGT är lämpligt att använda vid diagnostik då det indikerar vilken postprandiell ökning av insulin som fås efter intag av kolhydrater, som till exempel vid bete, och därför kan identifiera vilka individer som riskerar att drabbas av fång orsakad av hyperinsulinemi (Frank & Tadros 2014; de Laat *et al.* 2016). Dessutom har OGT visat sig ha en relativt god repeterbarhet då det utförs vid ett flertal tillfällen hos samma individ under liknande förhållanden (de Laat & Sillence 2017).

Basalinsulin

Ett enstaka blodprov för att mäta basalnivån av seruminsulin, och eventuellt i kombination med glukos, har fördelen att det är enkelt att utföra men nackdelen att variationer i insulinsekretion påverkar sensitiviteten av testet (Firshman &

Valberg 2007). Treiber *et al.* (2005) har i försök sett en signifikant måttlig korrelation mellan basalinsulin och insulinkänslighet, det vill säga att högre insulinkoncentration har en koppling till nedsatt insulinkänslighet.

Rekommendationer gällande fasta eller inte inför provtagning varierar. För att minska risken att födointag påverkar insulinnivåerna rekommenderas i ACVIM:s (*American College of Veterinary Internal Medicine*) konsensusuttalande (Frank *et al.* 2010) att hästar ska fasta i sex timmar innan provtagning sker. I ECEIM:s (*European College of Equine Internal Medicine*) konsensusuttalande (Durham *et al.* 2019) är rekommendationen borttagen på grund av låg sensitivitet hos faste-insulin och man diskuterar huruvida fasta i sig kan ge ökad insulinresistens.

Fasteinsulin har i försök visat på dålig sensitivitet för att detektera IR (Dunbar *et al.* 2016). Sensitiviteten och specificiteten av provet är dock beroende av vilket cut-off värde man väljer och genom att sänka cut-off värdet kan man höja sensitiviteten, men minskar då samtidigt specificiteten (Olley *et al.* 2019). I ACVIM:s konsensusuttalande rekommenderas referensvärdet $<20 \mu\text{IU/mL}$ (vid analys med Coat-a-count insulin RIA, Immulite CLIA eller DSL-1600 Insulin RIA) (Frank *et al.* 2010). Vid detta referensvärde har fasteinsulin visat sig ha en låg sensitivitet (15 %) för diagnos av ID men genom att sänka referensvärdet till $5,2 \mu\text{IU/mL}$ ökade sensitiviteten till 63 % och specificiteten minskade till 87 % (vid analys med Immulite CLIA) (Olley *et al.* 2019). Lindåse *et al.* (2021) visade att det optimala cut-off värdet för fasteinsulin är $9,5 \mu\text{IU/mL}$ (vid analys med Mercodia Equine Insulin ELISA) vilket gav en sensitivitet på 91 % och en specificitet på 85 %.

En metod för att få en mer direkt bild av insulinkänsligheten och β -cellsresponsen utifrån blodprov taget vid ett enda tillfälle är att använda matematiska algoritmer där man utgår från värden på basalinsulin och glukos (Treiber *et al.* 2005). Dessa algoritmer har utvärderats på både friska hästar där korrelation sågs med insulinkänslighet (Treiber *et al.* 2005) och på insulindysreglerade hästar där ingen matematisk algoritm hade bättre sensitivitet och specificitet jämfört med fasteinsulin (Lindåse *et al.* 2021).

2.5 Biologisk variation

Vid upprepade provtagningar hos en och samma häst kommer en viss variation att ses i resultaten (Fraser 2001). Denna variation beror av pre-analytisk variation, analytisk variation och biologisk variation. Den pre-analytiska variationen beror på faktorer i samband med provtagning och hantering av provet fram till analys, till exempel skillnader i tillgång till föda innan provtagning, centrifugeringstid och förvaring av provet innan analys. Analytisk variation består av både slumpmässig variation och systematiska fel som sker vid analysen. Biologisk variation finns för alla analyter i större eller mindre omfattning. Denna beror delvis av slumpmässig variation men kan även i vissa fall påverkas av faktorer som till exempel cyklisk

variation eller påverkan av individens ålder på analyten. Biologisk variation uttrycks ofta som CV och finns både inom individer (CV_I) och mellan individer (CV_G). Det finns flera anledningar till att det är värdefullt att veta hur stor den biologiska variationen är, bland annat för att veta hur stor skillnad mellan två provtagningar som är kliniskt signifikant, utforma referensintervall och undersöka individualiteten för ett värde.

Index of individuality (II) är en metod för att undersöka om en analys har hög eller låg individualitet och baseras på värden för biologisk variation (Freeman *et al.* 2017). Om $II < 0,7$ har analysen låg individualitet och om $II > 1,7$ har analysen hög individualitet. Ett värde mellan 0,7–1,7 innebär en intermediär individualitet. Det är av värde att veta om II då en låg individualitet innebär stor likhet mellan individer och att populationsbaserade referensintervall är lämpliga att använda, medan dessa fungerar sämre om analyten har hög individualitet då normala värden hos olika individer skiljer sig mycket åt.

För att undersöka hur stor den biologiska variationen är behöver man minimera inverkan från den pre-analytiska variationen (Fraser 2001). Detta görs genom att standardisera utförandet kring provtagningen och hantering av provet så att de sker under så liknande förhållanden som möjligt vid varje provtagning. Den analytiska variationen (CV_A) bör minimeras genom att alla prover analyseras vid samma tillfälle (Fraser 2001; Freeman *et al.* 2017). Genom att prover analyseras i duplikat kan man dessutom räkna ut analytiska variationen och subtrahera den från den totala variationen. Genom denna metod kan man undersöka hur stor den biologiska variationen är inom och mellan individer.

2.6 Variation i insulinkoncentrationer

2.6.1 Inomhäst-variation av insulin

Hur den biologiska variationen av insulin ser ut inom hästar saknas det utförligare studier kring. I en studie har man studerat inomhäst-variation av bland annat basalinsulin hos fem friska hästar och en ponny genom upprepad blodprovstagning för insulin (Pratt *et al.* 2009). Denna studie följer dock inte publicerade riktlinjer (Freeman *et al.* 2017) för hur man räknar ut biologisk variation inom hästar då de inte räknat bort analysvariationen från den totala variationen. Prover togs i studien under liknande förhållanden vid sex tillfällen över två veckor (Pratt *et al.* 2009). Hästarna provtogs ca sex timmar efter kraftfodergiva men hade tillgång till hö innan provtagningen, vilket kan ha påverkat glukos och insulinnivåer. Resultatet visade ett CV_I på 33 % i medel men varierade mellan hästarna på mellan 17–57 %. Den med lägst CV_I var ponnyn som genomgående hade hyperinsulinemi i alla prover och författarna diskuterar att detta kan indikera att hästar med höga insulinkoncentrationer har mer konstanta mätvärden. Utifrån resultat i denna studie menar författarna att ett enskilt blodprov för insulin inte är lika till-

förlitligt och har lägre repeterbarhet för att uppskatta insulinkänslighet än metoder som EHC (Pratt *et al.* 2005; 2009). Det är dock få hästar som undersökts och faktorer i studieupplägget, som att hästarna hade tillgång till hö innan provtagning, kan ha påverkat variationerna i mätvärden (Pratt *et al.* 2009).

I en senare genomförd studie där prov för fasteinsulin togs på morgonen innan utfodring på friska hästar och hästar med IR sågs en lägre CV_I på ca 24 % (Lindåse *et al.* 2021). Prover togs vid två tillfällen under liknande förhållanden under två på varandra följande dagar. Då provtagning skedde på fastande hästar blev förhållandena mer standardiserade jämfört med i studien av Pratt *et al.* (2009) och kan sannolikt förklara det lägre värdet på CV. Inte heller i denna studie räknades analysvariationen bort från den totala variationen.

I ett försök där insulinkoncentrationer efter OST (*oral sugar test*) mättes hos 29 hästar varannan månad under sex tillfällen var 41 % av hästarna klassade som ID vid vissa provtagningstillfällen men inte andra då insulinkoncentrationerna varierade mellan provtagningstillfällena (Karikoski *et al.* 2022). Denna relativt stora variation tyder på att man lätt kan feldiagnosticera individer om provtagning sker vid ett enda tillfälle. Denna studie räknar inte heller ut hur stor del av den totala variationen som beror på analytisk variation. Ingen av nämnda studier om inomhäst-variation följer alltså publicerade riktlinjer om hur biologisk variation räknas ut enligt Freeman *et al.* (2017).

2.6.2 Mellanhäst-variation av insulin

Det saknas studier som mätt den biologiska variationen av insulin mellan friska hästar och uttryckt det i CV_G. För att veta hur variation av insulinkoncentrationer ser ut mellan hästar och tolka provsvar kan man även använda sig av referensintervall. Populationsbaserade referensintervall är baserade på prover från grupper av friska individer (Fraser 2001). Som tidigare nämnts beror referensintervallen för insulin på analysmetod och provtagningsförhållanden (tillgång till föda eller inte) och kan därför skilja sig mellan studier (Durham *et al.* 2019). Huruvida populationsbaserade referensintervall är lämpliga eller inte att använda beror dessutom på *index of individuality* (II) (Freeman *et al.* 2017) och hur II ser ut för insulin hos häst saknas det i dagsläget studier på. Det finns ett flertal studier som mätt koncentration av basalinsulin hos flera hästar och jämfört dessa men studierna följer inte rekommendationer för hur man mäter biologisk variation och uttrycker inte variationen i CV_G, vilket är nödvändigt för att kunna räkna ut data från den biologiska variationen (Freeman *et al.* 2017). En studie som undersökt basalinsulin hos 366 hästar och analyserat med Coat-a-Count RIA uppmätte ett medelvärde på 16,2 µU/mL och en standardavvikelse på 36,6 µU/mL (Pratt-Phillips *et al.* 2010). Proverna som togs var inte på fastande hästar och i studiegruppen fanns hästar med historik av fång så sannolikt kan hästar med ID ha inkluderats. I en annan studie uppmättes ett medelvärde på 10,0 µIU/mL och en

standardavvikelse på 5,3 $\mu\text{IU/mL}$ hos 22 friska hästar analyserat med en RIA (Hart *et al.* 2016). Dessa hästar fastade inte heller innan provtagning.

2.7 Påverkan av olika faktorer på insulin

2.7.1 Föda

Insulinnivåerna i blodet skiljer sig åt om provtagning sker efter fasta eller efter födointag (Öberg *et al.* 2012). Efter födointag ses en signifikant ökad koncentration av insulin i blodet jämfört med fasteinsulin. I prov taget på 40 friska hästar sågs en medelkoncentration på 123 ng/L hos fastande hästar och en medelkoncentration på 347 ng/L efter födointag analyserat med Mercodia Equine Insulin ELISA (Öberg *et al.* 2012).

Även vilken typ av foder som hästen äter spelar roll för utvecklande av IR. Man har sett ökad grad av IR vid utfodring med en foderstat rik på socker och stärkelse jämfört med en foderstat innehållande mer fett och fibrer (Williams *et al.* 2001; Hoffman *et al.* 2003; Pratt *et al.* 2006). I en annan studie sågs att innehållet av icke-strukturella kolhydrater (NSC; *non-structural carbohydrates*) i hösilage är nära relaterat till den postprandiella ökningen av insulin hos hästar utan IR (Lindåse *et al.* 2018). Insulindysreglerade hästar som äter foder med högt NSC-innehåll har därför en ökad risk att få hyperinsulinemi och drabbas av fång (Meier *et al.* 2018).

2.7.2 Inre faktorer

Flera studier har sett en korrelation mellan fetma och ökad IR (Jeffcott *et al.* 1986; Hoffman *et al.* 2003; Pratt-Phillips *et al.* 2010; Hart *et al.* 2016). Man har också sett korrelation mellan högre *cresty neck score* (regional fetma) och hyperinsulinemi hos ponnyer (Carter *et al.* 2009a).

Pratt-Phillips *et al.* (2010) såg att valacker hade signifikant högre insulin-koncentrationer jämfört med ston och hingstar medan Hart *et al.* (2016) inte såg någon signifikant skillnad mellan könen.

Vissa studier har noterat en signifikant ökning av insulinkoncentrationer med ökande ålder (Pleasant *et al.* 2013; Hart *et al.* 2016) medan Pratt-Phillips *et al.* (2010) inte kunde påvisa ett signifikant samband mellan ålder och insulinkoncentrationer.

Det har gjorts ett flertal studier om hur insulinkänslighet varierar mellan olika raser. I en studie sågs ingen skillnad i insulinkänslighet mellan islandshästar och varmblodiga travhästar (Lindåse *et al.* 2018). Däremot har man tidigare sett långsammare clearance av glukos vid CGIT (*combined glucose-insulin test*) hos islandshästar jämfört med varmblodiga travhästar vilket kan indikera en skillnad i insulinkänslighet (Bröjer *et al.* 2013). Ytterligare studier har visat signifikant högre insulinkoncentrationer hos ponnyer och halvblod jämfört med arabiska

fullblod, quarterhästar, painthästar och morganhästar (Pratt-Phillips *et al.* 2010) samt högre grad av IR hos ponnyer och andalusier i jämförelse med varmblodiga travhästar (Jeffcott *et al.* 1986; Bamford *et al.* 2014).

2.7.3 Yttre faktorer

Powell *et al.* (2002) såg att ston som genomförde lågintensiv träning ökade sin insulinkänslighet på kort sikt och även Pratt *et al.* (2006) kunde se att hästar som motionerades under sju veckor hade högre insulinkänslighet än hästar i vila. I en annan studie av Pratt-Phillips *et al.* (2010) sågs däremot inget signifikant samband mellan insulinkoncentrationer och träningsintensitet.

I en studie där man undersökte säsongsvariation i IR hos ponnyer med fångshistorik sågs att insulinresistensen var högre under sommaren jämfört med under vintern trots att ponnyerna bibehöll samma kroppsvikt (Bailey *et al.* 2008). Författarna diskuterar ifall det snarare är en förändring av utfodring under sommaren då ponnyer fått tillgång på bete som ger upphov till förändringen snarare än en äkta säsongsvariation. En annan studie av Borer *et al.* (2012) har tvärtom visat en högre insulinkänslighet under sommaren jämfört med vintern. I andra studier där man gjort OGT under flera tillfällen per år sågs högre insulinkoncentrationer efter OGT på våren (Macon *et al.* 2022) och vintern (Beythien *et al.* 2017; Macon *et al.* 2022) jämfört med sommar och höst. I studier där man undersökt basalinsulin över året har man sett varierande resultat där vissa inte kunnat se någon säsongsvariation av basalinsulin (Place *et al.* 2010; Beythien *et al.* 2017) och andra har sett ökning av basalinsulin på våren (Hart *et al.* 2016). Då nämnda studier använt olika mått och metoder för att mäta insulinkänslighet och/eller hyperinsulinemi är de svåra att jämföra, men sammantaget kan man konstatera att det finns motsägelsefulla resultat huruvida säsongsvariation av insulinkoncentrationer eller insulinresistens föreligger.

Man har sett en högre postprandiell ökning av insulinkoncentrationer vid blodprover tagna på morgonen jämfört med på eftermiddagen (Gordon & McKeever 2005). Författarna diskuterar dock om det snarare är skillnaden i tid mellan utfodringar som resulterar i denna förändring snarare än en sann diurnal variation.

Administration av dexametason ökar graden av IR hos hästar vilket indikerar att det är viktigt att undvika stress i samband med provtagning av insulin för att stress inte ska ge falskt höga insulinkoncentrationer (Tiley *et al.* 2007). Man har också sett en förändrad glukosmetabolism vid utförande av CGIT (*combined glucose-insulin test*) efter stress (transport och byte av miljö) hos hästar (Bröjer *et al.* 2013).

Sammantaget finns ett flertal studier som undersöker variation i insulinfrisättning och de flesta fokuserar på hur inre och yttre faktorer påverkar graden av IR eller hyperinsulinemi. Resultaten som uppvisas är varierande och svåra att jämföra på grund av variationer i studieupplägg och olika analysmetoder.

Material och metod

3.1 Hästar

I studien deltog åtta privatägda islandshästar i åldern 7–15 år varav alla provtogs vid fem tillfällen. Storleken på studiepopulationen och antalet prover per häst bestämdes utifrån att alla prover skulle få plats på samma ELISA-platta och därmed kunna analyseras i samma körning. Ingen av hästarna var enligt uppgift från hästägarna sedan tidigare diagnostiserad med EMS eller PPID och ingen hade tidigare fånghistorik. Hästarna var kliniskt friska under tiden för provtagningarna och en allmän klinisk undersökning utfördes i samband med varje provtagningstillfälle. Vid första provtagningstillfället bedömdes hästarnas BCS på en skala 1–9 (Henneke *et al.* 1983) och CNS på en skala 0–5 (Carter *et al.* 2009a). Blodprov taget vid studiens första provtagningstillfälle analyserades för ett antal kemiparametrar (SAA, albumin, protein, gallsyror, GLDH och kreatinin) och hästar med avvikelser fick inte fortsätta delta i studien. Samtliga provtagningar skedde i hästarnas hemmiljö. Lista över hästar som deltog i studien visas i tabell 1.

Etiskt tillstånd (5.8.18-12184/2023) fanns för försöket och ägarna till hästarna skrev under ett godkännande om att hästarna deltog i projektet.

Tabell 1. Lista över hästar som deltog i studien. BCS=body condition score, skala 1–9 enligt Henneke et al. (1983). CNS=cresty neck score, skala 0–5 enligt Carter et al. (2009a).

Ras	Ålder	Kön	BCS	CNS
Islandshäst	13	Valack	7	2
Islandshäst	8	Valack	6,5	2
Islandshäst	15	Valack	6	2
Islandshäst	13	Valack	5,5	2
Islandshäst	7	Valack	6	2
Islandshäst	11	Valack	5,5	2
Islandshäst	12	Sto	6,5	3
Islandshäst	14	Valack	6	2

3.2 Studiedesign

3.2.1 Provtagningar

Blodprov togs från hästarna vid fem tillfällen med 6–8 dagars mellanrum under perioden september–oktober 2024. Innan provtagning rakades en ruta över jugularvenen och lokalbedövningskräm (EMLA) applicerades och fick verka 30–40 min. Klinisk undersökning av alla hästar utfördes i samband med varje prov-

tagning. Blodprov togs på morgonen innan utfodring mellan kl. 06:30–07:00. Hästarna hade då fått senaste utfodring med hösilage mellan kl. 21:00–22:00 kvällen innan och efter det inte haft tillgång till foder. Strömmaterial som hästarna stod på under natten var inte ätbart (torv eller spånpellets).

Blodprov togs via vacutainermetod (BD Vacutainer, 0,9 x 38 mm) från vänster jugularven i serumrör (BD vacutainer, 8,5 ml). Blodet fick koagulera i 30–40 min efter provtagning och därefter centrifugerades provrören (3400 G, 10 min). Serum delades upp och överfördes till kryorör och frystes omgående ner till -80 °C i en transportabel frys. Proverna förvarades i -80 °C tills analys genomfördes.

3.2.2 Analys av insulin

Analys av insulin genomfördes på serum med Mercodia Equine Insulin ELISA på klinisk kemiska laboratoriet, UDS, SLU. Proverna analyserades i duplikat i slumpmässig ordning på samma ELISA-platta.

3.2.3 Bearbetning av data

Innan statistisk analys av data genomfördes undersöktes förekomst av outliers mellan duplikat och inom hästar med hjälp av Cochrans test. Förekomst av outliers mellan hästar undersöktes med hjälp av Reeds criterion. Reeds criterion innebär att om skillnaden mellan det högsta eller lägsta värdet och det näst högsta eller lägsta värdet är större än en tredjedel av den totala skillnaden mellan högsta och lägsta värdet, ska det extrema värdet betraktas som en outlier (Fraser 2001).

Normalfördelning av data bedömdes med histogram och Q-Q plottar. Data logaritmerades då den inte var normalfördelad. Variansanalys gjordes med modellen REML (*restricted maximum likelyhood*) vilket är den rekommenderade metoden enligt Freeman *et al.* (2017). Baserat på varianskomponenter från REML räknades CV_I , CV_G och CV_A ut med formeln (Cole 2000):

$$CV (\%) = \sqrt{\exp(SD^2(\ln x)) - 1} * 100$$

Reference change values (RCV) för ett 95 % konfidensintervall räknades ut med formeln (Røraas *et al.* 2016):

$$RCV (\%) = 100 \exp(\pm 1,96 \sqrt{2(SD_I^2(\ln x) + SD_A^2(\ln x))})$$

I formeln är SD_I^2 och SD_A^2 estimat av variansen inom häst och mellan duplikat på log-skalan.

Index of individuality (II) räknades ut med formeln (Freeman *et al.* 2017):

$$II = \frac{CV_G}{\sqrt{CV_I^2 + CV_A^2}}$$

Resultat

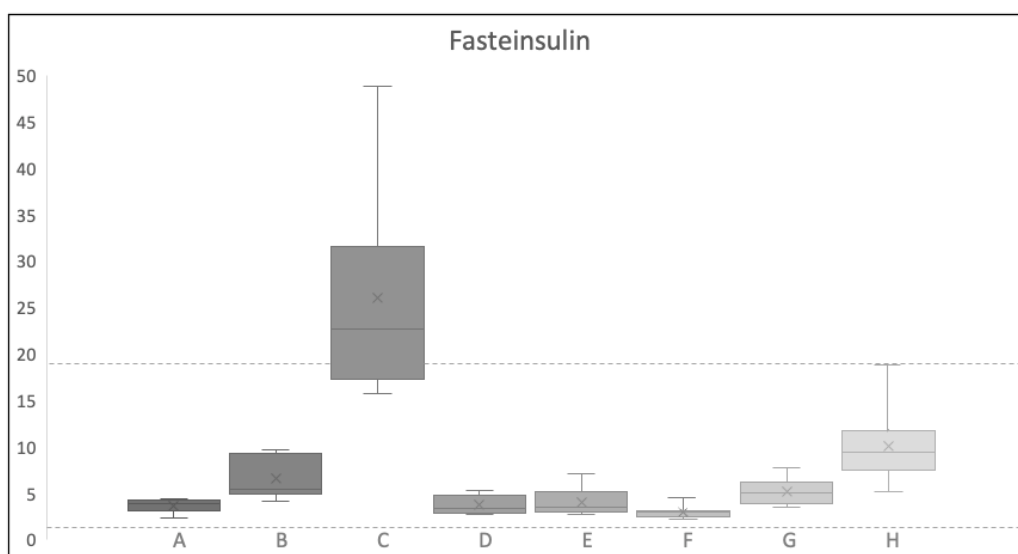
4.1 Hästar och provtagningar

Efter första provtagningstillfället analyserades utvalda kemiparametrar hos hästarna (SAA, albumin, protein, gallsyror, GLDH och kreatinin). Tre hästar uppvisade avvikelser på dessa. Två hade förhöjda nivåer av GLDH och blev uteslagna från fortsatt deltagande i studien. En häst hade en lindrig stegring av SAA. Då avvikelserna var utan klinisk relevans togs ett uppföljande SAA-värde en vecka senare, som då låg inom referensintervallet, och hästens tilläts fortsätta delta i studien. Hästar som uteslöts ur studien ersattes och resulterade i att åtta hästar genomgick fem blodprovstagningar var.

Hästen vars SAA var normaliserat vid andra provtagningen uppvisade vid ett senare tillfälle avvikelser på allmän klinisk undersökning med nedsatt allmäntillstånd, förhöjd hjärt- och andningsfrekvens och lindrigt ökad kroppstemperatur. Denna häst provtogs inte vid detta tillfälle det gick därför 13 dagar mellan två av provtagningstillfällena för denna häst. Övriga hästar provtogs med 6–8 dagars mellanrum enligt plan.

4.2 Insulinkoncentrationer

Figur 1 visar individuella insulinkoncentrationer under provtagningsperioden för de åtta hästarna. Sju av hästarna låg inom referensintervallet <20 mU/L vid alla provtagningar. En häst (häst C i Figur 1) översteg 20 mU/L vid tre tillfällen och låg inom referensintervallet övriga två tillfällen. Denna individ låg tydligt högre i insulinkoncentration än övriga hästar genomgående under provtagningarna. Ett av proverna på denna häst visade ett fasteinsulin på 48 mU/L vilket är ett värde som ligger långt över referensintervall. Detta är samma häst som hade lindrigt förhöjt SAA vid studiens början samt som fick hoppa över en provtagning på grund av avvikelser vid klinisk undersökning.



Figur 1. Koncentrationer av fasteinsulin (mU/L) över fem provtagningstillfällen för åtta hästar. På x-axeln visas individer och på y-axeln visas insulinkoncentration (mU/L). Boxarna markerar 25e till 75e kvartilen av mätvärden och de vertikala strecken utanför boxarna markerar högsta och lägsta mätvärdet. De horisontella strecken i boxarna markerar medianvärden och kryssen markerar medelvärden. Streckade linjer visar undre och övre gräns för det referensintervall för insulin som används på Klinisk kemiska laboratoriet, SLU (1,5–19 mU/L).

4.3 Bearbetning av data

Inga outliers sågs mellan duplikat eller inom hästar. Baserat på värden mellan hästarna bedömdes en av hästarna som en outlier (Häst C i Figur 1) enligt Reeds criterion och är inte inkluderad i de statistiska beräkningarna.

Tabell 2 visar resultat för CV_I , CV_G och CV_A inklusive 95 % konfidensintervall.

Reference change value (RCV) beräknades till 226 % för ökning och 44 % för minskning av insulinkoncentrationer.

Index of individuality (II) beräknades till 1,3 vilket bedöms som intermediär individualitet (Freeman *et al.* 2017).

Tabell 2. Resultat av CV_I (inomhäst-variation), CV_G (mellanhäst-variation) och CV_A (analysvariation) av fasteinsulin med 95 % konfidensintervall.

	Resultat (%)	Konfidensintervall (95 %)
CV_I	25	15–32
CV_G	39	0–62
CV_A	16	13–21

Diskussion

I denna studie har insulinkoncentrationer och variation inom och mellan hästar studerats genom upprepade provtagningar på åtta islandshästar. Variationen av insulin hos hästarna undersöktes med hjälp av variansanalys med REML (*restricted maximum likelihood*) där den totala variationen delades upp i inom-hästvariation, mellanhäst-variation och analysvariation. Detta omvandlades sedan till variationskoefficient (CV) för inomhäst-variation (CV_I), mellanhäst-variation (CV_G) och analysvariation (CV_A). Att CV_I ligger på 25 % innebär att insulinkoncentrationerna i genomsnitt varierar 25 % inom en och samma häst mellan provtagningar. Detta är ungefär i samma nivå av inomhäst-variation som man tidigare sett då man uppmätt CV_I på 24 % (Lindåse *et al.* 2021). I den studien analyserades också fasteinsulin och samma analysmetod användes, men analysvariationen räknades inte bort i den studien så en direkt jämförelse kan inte göras. Pratt *et al.* (2009) hittade ett CV_I på 33 % vilket är tydligt högre än i detta examensarbete. Dock användes en annan analysmetod (RIA), hästarna hade tillgång till foder innan provtagning och analysvariation räknades inte bort i den statistiska modellen.

CV_G , det vill säga mellanhäst-variationen, ligger på 39 % vilket innebär att insulinkoncentrationer varierar i genomsnitt 39 % mellan de sju islandshästarna som var med i beräkningarna. Det saknas studier att jämföra med då man inte undersökt biologisk variation mellan hästar tidigare med liknande metod. Konfidensintervallet för mellanhäst-variationen är ganska stort (0–62 %) vilket beror på att antalet hästar som undersökts är få. Konfidensintervallet hade blivit mindre om fler hästar provtagits vilket inte var möjligt i denna studie då alla prov i så fall inte kunnat analyseras inom samma körning. Värdet på mellanhäst-variationen utifrån denna studie är därför relativt osäkert och behöver undersökas mer för att dra säkrare slutsatser. På grund av detta är CV_G från denna studie inte ett speciellt bra mått på spridning mellan hästar. För att tolka ett provsvar från en patient är det därför bättre att använda populationsbaserade referensintervall, som är baserade på ett större antal hästar.

CV_A , analysvariationen, låg på 16 % vilket är en högre variation än man tidigare sett vid analys av insulin med Mercodia Equine Insulin ELISA. Tidigare har man uppmätt analytisk variation på 2,0–6,5 % (Öberg *et al.* 2012), 2,2 % (Lindåse *et al.* 2017) och 1,9–4,6 % (Warnken *et al.* 2016). Att dessa skiljer sig kan bero av att insulinkoncentrationer hos provtagna studieobjekt skiljer sig mellan studierna och ligger lägre i denna studie jämfört med ovan nämnda studier. En större analysvariation påverkar uträkningarna på RCV (som blir större) och II (som minskar).

En häst låg tydligt högre än övriga hästar i insulinkoncentration och översteg referensintervall (20 mU/L) vid tre av fem tillfällen. Den bedömdes som en outlier

och exkluderades ur beräkningarna av biologisk variation. Det kan spekuleras i om insulinet påverkats av till exempel stress eller lindrig underliggande sjukdom och detta bidragit till förhöjda insulinkoncentrationer, speciellt med tanke på att detta är samma häst som vid ett tillfälle fick hoppa över en provtagning på grund av avvikelser på klinisk undersökning samt hade förhöjt SAA i blodet initialt. Alternativt kan denna häst ha EMS även om ingen tidigare fånghistorik finns och den inte uppvisade tydliga symtom på EMS (ingen generell och/eller regional fetma), vilket inte går att utesluta då ingen ytterligare diagnostik utförts. Det är intressant att hästen växlar mellan att ligga över och inom referensintervallet. Detta liknar resultatet i en studie där OST gjordes vid upprepade tillfällen under ett år och 41 % av hästarna växlade mellan att ligga under eller över referensintervallet för vad som klassas som EMS (Karikoski *et al.* 2022). Denna hästs provresultat stöder tidigare studier som visat att man även vid analys av faste-insulin kan riskera att feldiagnostisera hästar om man utgår från ett enskilt provresultat (Firshman & Valberg 2007; Olley *et al.* 2019).

Genom att observera uppmätta insulinkoncentrationer ser det ut som att det hos den provtagna hästen med höga insulinkoncentrationer finns en större variation jämfört med dem som ligger lägre. Detta är det motsatta till vad som sågs i studien av Pratt *et al.* (2009) där hästen med hyperinsulinemi hade mest konstanta mätvärden. Båda studierna har dock relativt få studieobjekt vilket gör att inga säkra slutsatser om detta kan dras. På människa har man sett en högre CV_I för IR mätt med HOMA-IR (*homeostasis model assessment for insulin resistance*), en algoritm för bedömning av IR som baseras på fastevärden av glukos och insulin, hos personer med diabetes typ 2 jämfört med friska kontrollpersoner (Jayagopal *et al.* 2002). En annan studie har inte sett signifikant skillnad i CV_I hos fasteinsulin mellan insulinresistenta människor med högre insulinkoncentrationer och friska kontroller (Rizi *et al.* 2016).

Reference change values (RCV) är ett mått på hur stor procentuell skillnad man behöver ha mellan två provtagningar för att förändringen ska vara kliniskt signifikant, det vill säga att det sannolikt inte endast beror på normal variation (Freeman *et al.* 2017). Då RCV i denna studie baserades på logaritmerade värden får man olika RCV för ökning och minskning av koncentrationerna. I detta examensarbete beräknades en RCV för ökning på 226 % och minskning på 44 % för ett 95 % konfidensintervall. Till exempel innebär det att om en häst vid ett tillfälle har en insulinkoncentration på 4,4 mU/L så krävs en ökning med 9,9 mU/L (226 % av 4,4 mU/L) vilket innebär ett nytt värde på 14,3 mU/L för att det med 95 % sannolikhet ska vara en kliniskt signifikant ökning. För att en minskning från 4,4 mU/L ska vara kliniskt signifikant krävs ett nytt värde på 2,5 mU/L. Viktigt att komma ihåg är att dessa värden räknats ut baserat på hästar som befunnit sig inom referensintervallet för insulin (då hästen med hyperinsulinemi inte inkluderades i de statistiska analyserna). Man bör därför inte direkt applicera dessa

värden på hästar med högre insulinkoncentrationer utan vidare studier då möjligheten finns att värdet på RCV ser annorlunda ut hos dessa.

Reference change value kan användas för att bedöma förändringar i analysvar och är framför allt användbart för analyter med hög individualitet där populationsbaserade referensintervall är mindre användbara. Det kan dock vara svårt att använda RCV kliniskt då det kräver att minst två prov tas för att kunna tolka en förändring. Det kan däremot vara användbart för att följa upp patienter över tid. Om skillnaden mellan två provtagningar hos en häst överskrider RCV talar det för en klinisk signifikant förändring, även om värdena vid båda tillfällena ligger inom referensintervallet.

Index of individuality (II) beräknades i denna studie utifrån värden på biologisk variation för att bedöma individualiteten för insulin hos häst. Resultatet var att $II=1,3$ vilket räknas som intermediär individualitet enligt Freeman *et al.* (2017) då det ligger mellan 0,7-1,7. En låg individualitet betyder att populationsbaserade referensintervall fungerar bra då det är stor likhet mellan värden hos olika individer. En hög individualitet innebär att vad som är normalt för en individ är individuellt och populationsbaserade referensintervall fungerar därför dåligt. Ett värde kan i dessa fall vara onormalt för en individ och ändå ligga inom det populationsbaserade referensintervallet eller tvärtom. I de fallen med hög individualitet är det därför mer användbart med RCV för att bedöma om ett värde är onormalt för en individ. En intermediär individualitet som insulin uppvisade i denna studie innebär att populationsbaserade referensintervall inte anses fungera optimalt, men är inte heller olämpliga att använda.

Kunskap om biologisk variation kan vara till nytta av fler anledningar utöver att kunna beräkna RCV och II. Till exempel kan man använda värden på biologisk variation när man ska sätta kvalitetsspecifikationer för analysmetoder (Fraser 2001). Värden för biologisk variation kan användas för att räkna ut hur stor bias (systematiska fel) som är acceptabelt för en analysmetod. Man kan även utgå från biologisk variation för att beräkna vilken precision (slumpmässig analysvariation) som är önskvärd då den helst ska vara $<0,5$ av CV_I (Fraser 2001).

En begränsning i denna studie är studiepopulationens storlek. Endast åtta hästar deltog varav en av dessa uteslöts från de statistiska beräkningarna då den betraktades som en outlier. Vilken storlek som behövs på studiepopulationen för att få säkra resultat beror på faktorer som antal prover per individ, kvoten $CV_A:CV_I$ och antal replikat som analyseras per prov (Røraas *et al.* 2012; Freeman *et al.* 2017). Optimalt ska CV_A vara $<0,5$ av CV_I vilket den inte är i denna studie, då CV_A låg ovanligt högt jämfört med tidigare studier då man använt samma analysmetod. Om CV_A legat på samma nivåer som tidigare studier ($<6,5\%$) hade CV_A varit $<0,5$ av CV_I . I dessa fall är det rekommenderat med 10-15 studieobjekt som provtas vid 4-6 tillfällena (Freeman *et al.* 2017). Om CV_A ligger $>0,5$ av CV_I är ännu fler studieobjekt att föredra för att få en säkrare beräkning av CV_I och RCV

och en högre statistisk styrka (Røraas *et al.* 2012). Fler studieobjekt hade i detta fall inneburit att alla prover inte kunnat analyseras inom samma körning vilket inte rekommenderas. Detta då analysvariation mellan körningar generellt är större än variationen inom körningar (Öberg *et al.* 2012).

Under provtagningsperioden hölls hästarna i samma miljö och provtagning skedde vid samma tidpunkt varje gång efter en lika lång period av fasta. Vissa förändringar i utfodring och motionsintensitet kan ha förekommit mellan provtagningsstillfällena. Detta är faktorer som i tidigare studier visat sig kunna ha påverkan på insulinkänsligheten (Powell *et al.* 2002; Pratt *et al.* 2006). Då hästarna fastat innan provtagning bör mindre förändringar i utfodring inte haft någon betydande effekt på insulinkoncentrationer vid provtagning.

En annan begränsning av studien är att prover endast togs på en ras (islandshäst) och i ett relativt snävt åldersspann (7–15 år). Det var ett medvetet val att endast provta en ras för att få en mer homogen grupp och för att variation mellan hästarna inte skulle bero på skillnader i insulinkänslighet hos olika raser. Det är möjligt att variationen inom och mellan hästar skiljer sig åt mellan olika raser och därför behöver mer forskning genomföras innan man kan konstatera hur den biologiska variationen ser ut hos en större population där fler raser inkluderas.

Då provtagning i denna studie endast skett på fastande hästar kan man inte dra några slutsatser om hur biologisk variation av insulinkoncentrationer ser ut postprandiellt eller efter glukostoleranstest. Det är möjligt att variationen av insulin vid dessa tillfällen skiljer sig från variation av fasteinsulin. Ytterligare en viktig aspekt att notera är att framtagna värden i denna studie är baserade på analys med Mercodia Equine Insulin ELISA och insulinkoncentrationer och analysvariation kan skilja sig vid användandet av andra analysmetoder. Man kan däremot använda CV_I och CV_G från denna studie även vid användandet av andra analysmetoder då den statistiska metoden separerar analysvariationen och biologisk variation. Till exempel kan andra laboratorier använda denna studies värde på CV_I , samt använda CV_A för sin analysmetod, för att beräkna RCV för deras egna provsvar.

5.1 Konklusion

Utifrån denna studie på en grupp av friska islandshästar sågs i snitt en biologisk variation av insulin inom häst på 25 % och mellan hästar på 39 %. För att en förändring av insulinkoncentration ska anses kliniskt signifikant krävs en ökning med 226 % eller en minskning med 44 %. Vid tolkning av insulin hos häst är inte populationsbaserade referensintervall optimala att använda men de kan heller inte anses oanvändbara. Dessa resultat är baserat på en ganska liten grupp hästar vilket gör att stora slutsatser inte kan dras för hela hästuppopulationen. Tidigare studier om biologisk variation av insulin hos hästar saknas och resultaten i denna studie ger en initial bild av hur denna variation ser ut. Detta kan vara till hjälp vid tolkning

av provsvar genom att RCV kan vägleda i hur stor skillnad i koncentration av insulin som är kliniskt signifikant vid uppföljande provtagningar.

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 (3), 530–535. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.07.003>
- Bailey, S.R., Habershon-Butcher, J.L., Ransom, K.J., Elliott, J. & Menzies-Gow, N.J. (2008). Hypertension and insulin resistance in a mixed-breed population of ponies predisposed to laminitis. *American Journal of Veterinary Research*, 69 (1), 122–129. <https://doi.org/10.2460/ajvr.69.1.122>
- 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>
- Bertin, F.R. & de Laat, M.A. (2017). The diagnosis of equine insulin dysregulation. *Equine Veterinary Journal*, 49 (5), 570–576. <https://doi.org/10.1111/evj.12703>
- Beythien, E., Wulf, M., Ille, N., Aurich, J. & Aurich, C. (2017). Effects of sex, pregnancy and season on insulin secretion and carbohydrate metabolism in horses. *Animal Reproduction Science*, 184, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.07.002>
- Borer, K.E., Bailey, S.R., Menzies-Gow, N.J., Harris, P.A. & Elliott, J. (2012). Use of proxy measurements of insulin sensitivity and insulin secretory response to distinguish between normal and previously laminitic ponies. *Equine Veterinary Journal*, 44 (4), 444–448. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2011.00475.x>
- 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 (6), 1543–1550. <https://doi.org/10.1111/jvim.12172>
- 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 (2), 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.02.029>
- Carter, R.A., Treiber, K.H., Geor, R.J., Douglass, L. & Harris, P.A. (2009b). Prediction of incipient pasture-associated laminitis from hyperinsulinaemia, hyperleptinaemia and generalised and localised obesity in a cohort of ponies. *Equine Veterinary Journal*, 41 (2), 171–178. <https://doi.org/10.2746/042516408X342975>
- Cole, T.J. (2000). Sympercents: symmetric percentage differences on the 100 loge scale simplify the presentation of log transformed data. *Statistics in Medicine*, 19 (22), 3109–3125. [https://doi.org/10.1002/1097-0258\(20001130\)19:22<3109::AID-SIM558>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1097-0258(20001130)19:22<3109::AID-SIM558>3.0.CO;2-F)
- Delarocque, J., Frers, F., Huber, K., Feige, K. & Warnken, T. (2020). Weight loss is linearly associated with a reduction of the insulin response to an oral glucose test in

- Icelandic horses. *BMC Veterinary Research*, 16 (1), 151.
<https://doi.org/10.1186/s12917-020-02356-w>
- Dunbar, L.K., Mielnicki, K.A., Dembek, K.A., Toribio, R.E. & Burns, T.A. (2016). Evaluation of four diagnostic tests for insulin dysregulation in adult light-breed horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30 (3), 885–891.
<https://doi.org/10.1111/jvim.13934>
- 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.
<https://doi.org/10.1111/jvim.15423>
- Firshman, A.M. & Valberg, S.J. (2007). Factors affecting clinical assessment of insulin sensitivity in horses. *Equine Veterinary Journal*, 39 (6), 567–575.
<https://doi.org/10.2746/042516407X238512>
- Frank, N., Elliott, S.B., Brandt, L.E. & Keisler, D.H. (2006). Physical characteristics, blood hormone concentrations, and plasma lipid concentrations in obese horses with insulin resistance. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228 (9), 1383–1390. <https://doi.org/10.2460/javma.228.9.1383>
- Frank, N., Geor, R. j., Bailey, S. r., Durham, A. e. & Johnson, P. j. (2010). Equine metabolic syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24 (3), 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 (1), 103–112. <https://doi.org/10.1111/evj.12169>
- Fraser, C.G. (2001). *Biological Variation: from Principles to Practice*. American Association for Clinical Chemistry. AACC Press.
- Freeman, K.P., Baral, R.M., Dhand, N.K., Nielsen, S.S. & Jensen, A.L. (2017). Recommendations for designing and conducting veterinary clinical pathology biologic variation studies. *Veterinary Clinical Pathology*, 46 (2), 211–220.
<https://doi.org/10.1111/vcp.12475>
- Geor, R. & Frank, N. (2009). Metabolic syndrome—From human organ disease to laminar failure in equids. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 129 (3), 151–154. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.11.012>
- Gordon, M.E. & McKeever, K.H. (2005). Diurnal variation of ghrelin, leptin, and adiponectin in Standardbred mares. *Journal of Animal Science*, 83 (10), 2365–2371. <https://doi.org/10.2527/2005.83102365x>
- Hart, K. a., Wochele, D. m., Norton, N. a., McFarlane, D., Wooldridge, A. a. & Frank, N. (2016). Effect of age, season, body condition, and endocrine status on serum free cortisol fraction and insulin concentration in horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30 (2), 653–663. <https://doi.org/10.1111/jvim.13839>
- 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 (4), 371–372. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1983.tb01826.x>

- Hoffman, R.M., Boston, R.C., Stefanovski, D., Kronfeld, D.S. & Harris, P.A. (2003). Obesity and diet affect glucose dynamics and insulin sensitivity in Thoroughbred geldings. *Journal of Animal Science*, 81 (9), 2333–2342. <https://doi.org/10.2527/2003.8192333x>
- Jayagopal, V., Kilpatrick, E.S., Jennings, P.E., Hepburn, D.A. & Atkin, S.L. (2002). Biological variation of homeostasis model assessment-derived insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 25 (11), 2022–2025. <https://doi.org/10.2337/diacare.25.11.2022>
- Jeffcott, L.B., Field, J.R., McLean, J.G. & O’dea, K. (1986). Glucose tolerance and insulin sensitivity in ponies and Standardbred horses. *Equine Veterinary Journal*, 18 (2), 97–101. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1986.tb03556.x>
- Karikoski, N.P., Box, J.R., Mykkänen, A.K., Kotiranta, V.V. & Raekallio, M.R. (2022). Variation in insulin response to oral sugar test in a cohort of horses throughout the year and evaluation of risk factors for insulin dysregulation. *Equine Veterinary Journal*, 54 (5), 905–913. <https://doi.org/10.1111/evj.13529>
- Karikoski, N.P., Horn, I., McGowan, T.W. & McGowan, C.M. (2011). The prevalence of endocrinopathic laminitis among horses presented for laminitis at a first-opinion/referral equine hospital. *Domestic Animal Endocrinology*, 41 (3), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2011.05.004>
- Kasuga, M. (2006). Insulin resistance and pancreatic β cell failure. *The Journal of Clinical Investigation*, 116 (7), 1756–1760. <https://doi.org/10.1172/JCI29189>
- 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 (5), 712–719. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.712>
- 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 (1), 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 (2), 238–243. <https://doi.org/10.1111/evj.12579>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2018.03.006>
- Lindåse, S., Nostell, K., Bergsten, P., Forslund, A. & Bröjer, J. (2021). Evaluation of fasting plasma insulin and proxy measurements to assess insulin sensitivity in horses. *BMC Veterinary Research*, 17 (1), 78. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02781-5>
- 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 (5), 1541–1550. <https://doi.org/10.1111/jvim.14799>
- Macon, E.L., Harris, P., Barker, V.D. & Adams, A.A. (2022). Seasonal insulin responses to the oral sugar test in healthy and insulin dysregulated horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 113, 103945. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2022.103945>
- Mcgowan, T.W., Pinchbeck, G.P. & McGowan, C.M. (2013). Prevalence, risk factors and clinical signs predictive for equine pituitary pars intermedia dysfunction in aged horses. *Equine Veterinary Journal*, 45 (1), 74–79. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2012.00578.x>
- Meier, A.D., de Laat, M.A., Reiche, D.B., Pollitt, C.C., Walsh, D.M., McGree, J.M. & Sillence, M.N. (2018). 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>
- Menzies-Gow, N.J., Harris, P.A. & Elliott, J. (2017). Prospective cohort study evaluating risk factors for the development of pasture-associated laminitis in the United Kingdom. *Equine Veterinary Journal*, 49 (3), 300–306. <https://doi.org/10.1111/evj.12606>
- Mercodia (2023). *Mercodia Equine Insulin ELISA*. [Directions for use, 10-1205-01]. Mercodia AB.
- Olley, R.B., Carslake, H.B., Ireland, J.L. & McGowan, C.M. (2019). Comparison of fasted basal insulin with the combined glucose-insulin test in horses and ponies with suspected insulin dysregulation. *The Veterinary Journal*, 252, 105351. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.105351>
- Petersen, M.C. & Shulman, G.I. (2018). Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiological Reviews*, 98 (4), 2133–2223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>
- Place, N.J., McGowan, C.M., Lamb, S.V., Schanbacher, B.J., McGowan, T. & Walsh, D.M. (2010). Seasonal variation in serum concentrations of selected metabolic hormones in horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24 (3), 650–654. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0500.x>
- Pleasant, R.S., Suagee, J.K., Thatcher, C.D., Elvinger, F. & Geor, R.J. (2013). Adiposity, plasma insulin, leptin, lipids, and oxidative stress in mature light breed horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27 (3), 576–582. <https://doi.org/10.1111/jvim.12056>
- Pollit, C.C. (2011). Chapter 34 - Laminitis. I: Ross, M.W. & Dyson, S.J. (red.) *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. 2nd ed. W.B. Saunders. 366–386. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-6069-7.00034-1>
- Powell, D.M., Reedy, S.E., Sessions, D.R. & Fitzgerald, B.P. (2002). Effect of short-term exercise training on insulin sensitivity in obese and lean mares. *Equine Veterinary Journal*, 34 (S34), 81–84. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2002.tb05396.x>
- Pratt, S.E., Geor, R.J. & McCutcheon, L.J. (2005). Repeatability of 2 methods for assessment of insulin sensitivity and glucose dynamics in horses. *Journal of*

- Veterinary Internal Medicine*, 19 (6), 883–888. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2005.tb02782.x>
- Pratt, S.E., Geor, R.J. & McCutcheon, L.J. (2006). Effects of dietary energy source and physical conditioning on insulin sensitivity and glucose tolerance in Standardbred horses. *Equine Veterinary Journal*, 38 (S36), 579–584. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2006.tb05608.x>
- Pratt, S.E., Siciliano, P.D. & Walston, L. (2009). Variation of insulin sensitivity estimates in horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 29 (6), 507–512. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2009.04.194>
- Pratt-Phillips, S.E., Owens, K.M., Dowler, L.E. & Cloninger, M.T. (2010). Assessment of resting insulin and leptin concentrations and their association with managerial and innate factors in horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 30 (3), 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2010.01.060>
- Prentki, M. & Nolan, C.J. (2006). Islet β cell failure in type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 116 (7), 1802–1812. <https://doi.org/10.1172/JCI29103>
- Rizi, E.P., Baig, S., Toh, S.-A., Loh, T.P. & Khoo, C.M. (2016). Biological variation of glucose, insulin and lipids in lean, insulin-sensitive and obese, insulin-resistant Chinese males without diabetes. *Pathology*, 48 (5), 510–512. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2016.04.009>
- Røraas, T., Petersen, P.H. & Sandberg, S. (2012). Confidence intervals and power calculations for within-person biological variation: Effect of analytical imprecision, number of replicates, number of samples, and number of individuals. *Clinical Chemistry*, 58 (9), 1306–1313. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.187781>
- Røraas, T., Støve, B., Petersen, P.H. & Sandberg, S. (2016). Biological variation: The effect of different distributions on estimated within-person variation and reference change values. *Clinical Chemistry*, 62 (5), 725–736. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.252296>
- Sjaastad, Ø.V., Sand, O. & Hove, K. (2016). *Physiology of Domestic Animals*. 3rd ed. Scandinavian Veterinary Press.
- Tiley, H.A., Geor, R.J. & McCutcheon, L.J. (2007). Effects of dexamethasone on glucose dynamics and insulin sensitivity in healthy horses. *American Journal of Veterinary Research*, 68 (7), 753–759. <https://doi.org/10.2460/ajvr.68.7.753>
- 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 (2), 149–155. <https://doi.org/10.2746/042516409X478497>
- Treiber, K.H., Kronfeld, D.S., Hess, T.M., Boston, R.C. & Harris, P.A. (2005). Use of proxies and reference quintiles obtained from minimal model analysis for determination of insulin sensitivity and pancreatic beta-cell responsiveness in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 66 (12), 2114–2121. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.2114>

- Waller, A. p., Burns, T. a., Mudge, M. c., Belknap, J. k. & Lacombe, V. a. (2011). Insulin resistance selectively alters cell-surface glucose transporters but not their total protein expression in equine skeletal muscle. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25 (2), 315–321. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0674.x>
- Warnken, T., Huber, K. & Feige, K. (2016). Comparison of three different methods for the quantification of equine insulin. *BMC Veterinary Research*, 12 (1), 196. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0828-z>
- Williams, C.A., Kronfeld, D.S., Staniar, W.B. & Harris, P.A. (2001). Plasma glucose and insulin responses of Thoroughbred mares fed a meal high in starch and sugar or fat and fiber. *Journal of Animal Science*, 79 (8), 2196–2201. <https://doi.org/10.2527/2001.7982196x>
- 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 (6), 1291–1300. <https://doi.org/10.1007/s00580-011-1284-6>

Populärvetenskaplig sammanfattning

Insulin är ett hormon som har en viktig roll i kroppens ämnesomsättning. Det frisätts från bukspottskörteln när glukoskoncentrationen i blodet stiger efter födo-intag. För att glukos ska kunna användas som energikälla behöver det ta sig in i cellerna och detta kräver insulin. Insulinet binder till receptorer på celler och fungerar som en nyckel som släpper in glukos från blodet till cellerna. När glukoskoncentrationen sedan minskar i blodet kommer även insulinfrisättningen minska. På detta sätt fås en noggrann reglering av insulin- och glukoskoncentrationen i kroppen.

Ekvint metabolt syndrom (EMS) hos hästar är inte en sjukdom utan en samling av riskfaktorer som ger ökad risk för att en häst drabbas av fång. Symtom på EMS är fetma, regionala fettdepåer (lokala fettansamlingar på kroppen, ofta kring nacken) och insulindysreglering (ID). Insulindysreglering innebär att den vanligen välreglerade insulinbalansen i kroppen inte fungerar normalt och kännetecknas av insulinresistens och en förhöjd insulinkoncentration i blodet (så kallad hyperinsulinemi). Insulinresistens innebär att kroppens vävnader svarar sämre på insulin, det vill säga att det krävs högre insulinkoncentration för att nå samma effekt, vilket resulterar i att det frisätts mer insulin än normalt och hästen får då hyperinsulinemi. Höga insulinkoncentrationer i blodet kan resultera i utvecklandet av sjukdomen fång. Vid fång får hästen en inflammation i hovens lameller som binder samman hovbenet och hovkapseln. Fång orsakar stor smärta och kan resultera i att hovbenet roterar i förhållande till hovkapseln. Man har sett i studier att en förhöjd insulinkoncentration i blodet kan ge upphov till fång, men det saknas kunskap om mekanismerna bakom detta. Ekvint metabolt syndrom och andra hormonella sjukdomar som PPID (*pituitary pars intermedia dysfunction*) är de vanligaste bakomliggande orsakerna till fång. För att minska risken för att hästar drabbas av fång är det därför viktigt att kunna diagnostisera och hantera EMS och ID.

För att ställa diagnosen EMS/ID kan man mäta insulinkoncentrationen i blodet för att se om den är förhöjd. Ett problem med denna metod är att insulinfrisättning påverkas av en mängd faktorer och det är därför svårt att bestämma ett referensintervall över vilket insulinkoncentrationen räknas som förhöjd. En viktig faktor som påverkar insulinfrisättning är födo-intag då insulin normalt sett frisätts efter att hästen ätit. För att förhindra påverkan av födo-intag tas ofta fasteinsulin-prover, det vill säga att man provtar efter att hästen stått utan tillgång till foder under ett visst antal timmar. Problemet med detta är att alla hästar med EMS/ID inte har tydligt förhöjd insulinkoncentration vid fasta och man riskerar därför att missa sjuka hästar. För att säkrare hitta hästar med ID kan man därför i stället ta blodprov efter födo-intag, oftast genom någon form av standardiserat test där man kan ge en bestämd mängd glukossirap i hästens mun en viss tid innan provtagning.

Detta ger ett säkrare resultat men det kan ändå finnas ett visst överlapp mellan friska och sjuka hästar.

Det finns en biologisk variation av insulinfrisättning inom varje individ och mellan individer. Denna biologiska variation är till stor del slumpmässig och innebär att man vid upprepade prover över tid kommer att se skillnad i insulin-koncentration i blodet även hos friska hästar. Det är viktigt att veta storleken på denna variation för att till exempel avgöra om en skillnad i insulinfrisättning mellan två olika provtagningar beror på en skillnad i sjukdomsstatus eller bara är en normal variation. Det saknas utförligare studier kring hur stor denna normala variation av insulin är hos hästar.

Detta examensarbete hade som syfte att närmare undersöka den biologiska variationen av insulinfrisättning inom och mellan hästar, för att bidra till en säkrare tolkning av provsvar. För att undersöka detta togs blodprover för insulin från åtta friska islandshästar vid fem tillfällen med ca en veckas mellanrum. Blodprover togs på morgonen innan utfodring för att minska fodrets inverkan på insulinfrisättning. Hästarna som deltog i försöket var friska och hade ingen historik av EMS, PPID eller fång.

Resultatet visade att de olika individerna hade olika stor variation av insulin mellan provtagningstillfällen. Sju av åtta hästar låg inom referensintervallet för fasteinsulin (<20 mU/L) vid alla provtagningar. En häst låg över referensintervallet vid tre tillfällen och inom referensintervallet vid två tillfällen. Detta skulle kunna bero på att hästen har ID (trots att ingen fånghistorik finns), eller att insulinfrisättningen påverkats av andra faktorer som till exempel stress eller lindrig sjukdom. Oavsett så innebär resultatet att denna häst skulle riskera att bli feldiagnostiserad utifrån endast ett blodprov då den växlar mellan att ligga inom och över referensintervallet.

Beräkningar utifrån resultatet visade att insulin i genomsnitt varierar 25 % inom samma individ och 39 % mellan individer. Utifrån detta kan man beräkna hur stor skillnad som krävs mellan två provtagningar för att det ska bero på en sann förändring, och att skillnaden inte bara beror på normal biologisk variation. Det krävs en ökning av insulinkoncentrationen med 226 % eller en minskning med 44 % för att förändringen ska anses kliniskt signifikant. Ytterligare en slutsats från denna studie är att populationsbaserade referensintervall (som är baserade på prover från en stor grupp hästar) inte är optimala att använda vid tolkning av insulinkoncentrationer hos häst, men de fungerar tillräckligt väl för att de inte ska anses olämpliga att använda. Att de inte är optimala att använda beror på att insulinkoncentrationer skiljer relativt mycket mellan individer så ett provsvar som är onormalt för en individ ändå kan ligga inom referensintervallet, eller tvärtom.

Resultatet från denna studie är av värde då det ger en hjälp i tolkning av provsvar, till exempel för att veta vilken förändring av insulin mellan två provtagningar som innebär en kliniskt signifikant förändring. Det ger också en hjälp i

tolkningen av hur mycket man kan förlita sig på de referensintervall som finns. Begränsningar som finns i studien är att den endast är gjord på en liten grupp hästar av samma ras. Dessutom har endast fasteinsulin undersökts och det är möjligt att variationen av insulin ser annorlunda ut om man provtar efter födointag då koncentrationerna ligger högre. Denna studie ger dock en initial bild av den biologiska variationen av insulin hos friska hästar vilket det saknas tidigare forskning kring.

Tack

Stort tack till alla er som lånat ut sina hästar för deltagande i detta examensarbete och stort tack till er som bidragit med hjälp i samband med provtagningarna! Detta hade inte varit möjligt att genomföra utan er hjälp!

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU kan publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver i sådana fall godkänna publiceringen. I samband med att du godkänner publicering kommer SLU även att behandla dina personuppgifter (namn) för att göra arbetet sökbart på internet. Du kan närsomhelst återkalla ditt godkännande genom att kontakta biblioteket.

Även om du väljer att inte publicera arbetet eller återkallar ditt godkännande så kommer det arkiveras digitalt enligt arkivlagstiftningen.

Du hittar länkar till SLU:s publiceringsavtal och SLU:s behandling av personuppgifter och dina rättigheter på den här sidan:

- <https://libanswers.slu.se/sv/faq/228316>

☒ JA, jag har läst och godkänner avtalet för publicering samt den personuppgiftsbehandling som sker i samband med detta

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