



Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för kliniska vetenskaper

Förändringar i serumglukos och plasmainsulin vid experimentell endotoxinemi hos häst

Anna Sundström

Uppsala

2011

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2011:36*

Förändringar i serumglukos och plasmainsulin vid experimentell endotoxinemi hos häst

Anna Sundström

Handledare: Johan Bröjer, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Bernt Jones, Institutionen för kliniska vetenskaper

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2011
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper
Kurskod: EX0239, Nivå X, 30hp*

Nyckelord: häst, glukos, insulin, endotoxinemi, insulinresistens, hyperglykemi

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2011:36*

INNEHÅLL

SAMMANFATTNING.....	1
SUMMARY	2
INLEDNING.....	3
BAKGRUND	3
Endotoxinemi.....	3
Glukosmetabolism och insulineffekt	4
Akut insulinresistens och hyperglykemi.....	4
Diagnostik av insulinresistens.....	5
MATERIAL OCH METODER	6
Försöksupplägg	6
Hästar	6
Instrumentering och förberedelser	6
Endotoxin.....	6
Provtagning	7
Analys	8
Utvärdering av glukosmetabolism med hjälp av proxies.....	8
Statistik	8
Kliniska symptom	8
RESULTAT	9
Kliniska symptom	9
Glukos och insulin	11
Insulinkänslighet.....	13
DISKUSSION.....	14
REFERENSER	18

SAMMANFATTNING

Hästar riskerar att drabbas av endotoxinemi framförallt vid olika typer av kolik men även vid andra sjukdomstillstånd. Stressen och inflammationen som uppstår vid endotoxinemi, liksom vid vissa andra typer av akuta skador eller allvarliga sjukdomstillstånd, kan leda till utvecklandet av insulinresistens, glukosintolerans och hyperglykemi. Dessa metaboliska rubbningar är i sig skadliga och inom humanvården behandlas intensivvårdspatienter vid behov med insulin för att förbättra tillfrisknande och överlevnad.

För att inhämta mer kunskap om de metaboliska rubbningarna, som sker hos hästar med endotoxinemi gjorde vi en prospektiv experimentell försöksstudie av hästar som infunderades med endotoxin och provtogs för analys av serumglukos och plasmainsulin.

De 8 hästarna som användes i försöket infunderades med *Escherichia coli* endotoxin (*SigmaAlderich L5418, O55:B5*) i en total dos på 500 ng/kg kroppsvikt under 6 timmar. Provtagning och analys av glukos och insulin skedde från och med ett dygn innan endotoxininfusionen och upp till 36 timmar efter dess start.

Hästarna undersöktes kliniskt under och efter endotoxininfusionen och samtliga uppvisade symtom på endotoxinemi. Ökad andnings- och hjärtfrekvens, minskade buklyd, förhöjd kroppstemperatur, nedsatt aptit och tecken på smärta var symtom som noterades hos samtliga hästar. Även färgförändringar i munslemhinnan utvecklades hos alla hästar från och med cirka en timme efter endotoxininfusionens start.

Resultaten visar att hästarna under infusionen drabbades av hyperglykemi och hyperinsulinemi vid provtagningen 2 timmar efter endotoxininfusionens start. Insulinvärdet var signifikant förhöjt även vid tiden 16 till 24 timmar efter endotoxininfusionens start och nedsatt insulinkänslighet kunde ses under hela provtagningsperioden efter endotoxininfusionens slut. Insulinkänsligheten utvärderades med hjälp av beräkning av *proxies* (QUICKI, RISQI) och genom beräkning av MIRG bedömdes den uppkomna insulinresistensen som icke-kompenserad.

SUMMARY

Horses are at risk of developing endotoxemia, particularly when suffering from different types of colic. The stress and inflammation initiated by endotoxins or other types of acute injuries or serious pathologic conditions can lead to development of insulin resistance, glucose intolerance and hyperglycemia. These metabolic disorders are harmful and human intensive care patients are treated with insulin to improve recovery and survival.

To obtain more knowledge about the metabolic disorders that occur in horses with endotoxemia we conducted a prospective experimental trial in which horses were infused with endotoxin and repeated blood samples were taken for analyses of serum glucose and plasma insulin.

The eight horses included in the experiment were infused with *Escherichia coli* endotoxin (SigmaAldrich L5418, O55: B5) comprising a total dose of 500 ng/kg bw for 6 hours. Blood samples for analyses of glucose and insulin were obtained during the day before the endotoxin infusion and over 36 hours after the start of the endotoxin infusion.

Clinical examination of the horses during and after the endotoxin infusion revealed clinical signs of endotoxemia. Increased respiration and heart rate, decreased abdominal sounds, elevated body temperature, loss of appetite and signs of pain were noted in all horses. Color changes in the oral mucosa developed in all horses approximately one hour after the start of the endotoxin infusion.

The results show that the horses developed hyperglycemia and hyperinsulinemia 2 hours after the start of the endotoxin infusion. The plasma insulin concentrations were also significantly elevated at 16 to 24 hours after the endotoxin infusion. Reduced insulin sensitivity could be seen throughout the sampling period after the end of the endotoxin infusion. Insulin sensitivity was evaluated using estimates of proxies (QUICKI, RISQI). By calculating MIRG we assessed the insulin resistance as non-compensated.

INLEDNING

Hästar riskerar att drabbas av endotoxemi, det vill säga endotoxinförekomst i blodet, framförallt vid olika typer av kolik men även vid andra sjukdomstillstånd (Reed *et al.* 2010). Stressen och inflammationen som uppstår vid endotoxemi, liksom vid vissa andra typer av akuta skador eller allvarliga sjukdomstillstånd, kan leda till utvecklandet av insulinresistens, glukosintolerans och hyperglykemi (Langouche & Van den Berghe 2006). Endotoxiner har använts i försök både på människor och djur för att framkalla och studera akut insulinresistens och hyperglykemi (Agwunobi *et al.* 2000, Tóth *et al.* 2009).

Inom humanvården är det sedan länge känt att kritiskt sjuka patienter riskerar att drabbas av akut insulinresistens och hyperglykemi (Van den Berghe *et al.* 2001). Traditionellt har akut hyperglykemi setts som ett sätt för kroppen att tillgängliggöra energi för vävnader och organ utan insulinberoende glukosupptag, och en måttlig hyperglykemi har tolkats fördelaktig för patienten (Langouche & Van den Berghe 2006). Under senare år har studier tvärtemot tidigare uppfattning visat att patienter som insulinbehandlades även vid lindrig hyperglykemi hade ett bättre tillfrisknande än patienter som behandlades enligt konventionellt sätt (Van den Berghe *et al.* 2001).

Inom veterinärmedicinen är akutsjukvården inte lika utvecklad som inom humanvården och kunskap om insulinresistens hos hästar bygger framförallt på studier kring utvecklandet av fång. Hästar kan dock även drabbas av akut insulinresistens och hyperglykemi vid akut sjukdom, vilket setts både i försökssammanhang och i kliniska studier (Hollis *et al.* 2007, Tóth *et al.* 2008). Om hästar, liksom människor, skulle gynnas av att insulinbehandlas vid akut insulinresistens och hyperglykemi är okänt i dagsläget.

Den här studien utfördes för att studera dynamiken i plasmainsulin och serumglukos vid akut sjukdom, i detta fall endotoxemi hos hästar. Målet med studien är att bidra med kunskap, som kan förbättra intensivvården av sjuka hästar.

BAKGRUND

Endotoxemi

Endotoxin är en strukturell cellkomponent hos gramnegativa bakterier bestående av värmestabila lipopolysackarider. Vid bakterietillväxt och framför allt vid bakteriedöd frisätts endotoxiner i stora mängder (Quinn *et al.* 2002).

Endotoxemi kan uppkomma vid bakteriemi, vid lokala infektioner och vid tarmstörningar då endotoxiner från tarmfloras bakterier läcker ut i blodet. Endotoxemi är vanligt vid sepsis, bakteriell pneumoni och pleuropneumoni, endometrit, peritonit samt vid en rad gastrointestinala sjukdomar hos hästar. Eftersom alla hästar har en normalflora av bakterier i grovtarmen, som till stor del består av gramnegativa anaeroba bakterier, finns där en konstant produktion av endotoxiner. Intakt tarmvägg släpper normalt igenom små mängder av endotoxiner och dessa tas omhand av fagocyterande monocyter i levern och leder endast till en lokal aktivering av immunsystemet. I händelse av att tarmens slemhinnebarriär skadas kan stora

mängder endotoxiner läcka ut i blodomloppet och om leverns förmåga att ta hand om dessa överskrids hamnar hästen i ett kritiskt tillstånd (Reed *et al.* 2010).

Endotoxiner har negativ effekt på tarmmotiliteten och passage av ingestan försämras (Clark & Moore 1989). Den stora faran med endotoxinemi är dock att endotoxiner stimulerar stora delar av immunförsvaret och leder till en mängd förändringar och störningar av kroppsfunktioner (Quinn *et al.* 2002). Cytokiner från en rad olika celler leder till att kroppen försätts i ett katabolt tillstånd med kraftigt stresspåslag, som bland annat kan leda till insulinresistens (Reed *et al.* 2010).

Glukosmetabolism och insulineffekt

Glukosupptag till celler styrs hormonellt av insulin och glukagon. Upptaget sker med hjälp av membranbundna glukotransportörer (GLUT). De tre viktigaste är GLUT-1 som finns i en mängd organ och vävnader och står för basalupptag, GLUT-2 för upptag och frisättning från levern och GLUT-4 för insulinberoende glukosupptag i skelett- och hjärtmuskel samt fettvävnad (Saltiel & Pessin 2000, Gould 1997).

Det insulinberoende glukosupptaget regleras genom att insulin stimulerar till ökat antal glukotransportörer i plasmamembranet och därmed ökat glukosupptag till cellerna. Intracellulära vesikler med GLUT-4 fogas till plasmamembranet genom exocytos då cellen stimuleras av insulin (Saltiel & Pessin 2000, Gould 1997).

När insulin binder till sin receptor sker en kaskad av fosforylering, som leder till bildandet av signalmolekylen PI-3-kinas. PI-3-kinas stimulerar translokationen av GLUT-4 till plasmamembranet men påverkar även cellens metabolism i anabol riktning genom aktivering av glykogensyntes, proteinsyntes, lipogenes samt hämning av enzymer som stimulerar glukoneogenes (Langouche & Van den Berghe 2006).

Akut insulinresistens och hyperglykemi

Stressen och inflammationen, som uppstår vid akuta skador eller sjukdom, leder till utvecklandet av insulinresistens, glukosintolerans och hyperglykemi. Hepatisk produktion av glukos uppregleras trots höga glukosnivåer i blodet och förekomst av frisatt insulin. Förhöjda nivåer av cytokiner, tillväxthormon, glukagon och kortisol kan spela roll i den ökade glukoneogenesen och stimulerar lipolys och proteolys, vilket bidrar till substrat för glukoneogenes. (Langouche & Van den Berghe 2006)

Det insulinberoende upptaget av glukos försämras av flera anledningar. På grund av minskad fysisk rörelse vid sjukdom avstannar det normalt aktivitetsstimulerade glukosupptaget till skelettmuskelceller. Vid endotoxinemi sker ingen aktivering av PI-3-kinas, vilket leder till utebliven translokation av GLUT-4 och därmed utvecklad insulinresistens. Den insulinberoende transporten av glukos till skelettmuskel, hjärtmuskel och fettvävnad minskar och därmed finns risk för utveckling av hyperglykemi (Marik & Raghavan 2004).

Diagnostik av insulinresistens

En vanlig metod för att utvärdera insulinresistens hos häst i forsknings-sammanhang är den frekvent provtagna intravenösa glukostoleranstesten (*frequent sampling intravenous glucose tolerance test*, FSIGT). Metoden går ut på att man tillför glukoslösning intravenöst som en bolus, provtar hästarna kontinuerligt under 20 minuter och sedan tillför insulin vid tidpunkten 20 minuter. Provtagningen fortsätter därefter under tre timmar och proverna analyseras med avseende på glukos och insulin. Genom att sedan göra beräkningar i datorprogram enligt ”*minimal model*” går det att få ut värden för bland annat insulinkänslighet och pancreas betacellsfunktion (Tóth *et al.* 2008).

Nackdelen med toleranstester är att man påverkar kroppen med exogent tillfört glukos och insulin och därigenom troligen interfererar med den endogena produktionen. I och med detta kan man heller inte följa hästarnas glukos- och insulinkurvor och toleranstesterna blir en typ av punktkontroller vid vissa tidpunkter istället för kontinuerliga grafer.

För att diagnosticera insulinresistens hos häst utan att utföra toleranstester kan man istället använda sig av enkla provtagningar av glukos och insulin och genom formler sedan räkna ut approximerade värden för insulinresistens (eng. *proxies*). Genom dessa *proxies* kan man förutspå insulinkänslighet och pancreas betacellsfunktion och på så sätt få en bild av hästens glukosmetabolism (Treiber *et al.* 2005). Vid användandet av *proxies* istället för toleranstester kan man även följa hästarnas glukos och insulinvärden då inget exogent tillfört insulin eller glukos interfererar med provtagningarna.

Enligt Treiber *et al.* (2005), som utvecklade användandet av *proxies* hos häst, är beräkning av kombinationen *reciprocal of the square root of insulin* (RISQI) och *modified insulin-to-glucose ratio* (MIRG) fördelaktig då man genom dessa uträkningar kan förutspå insulinresistens men även få en bild av pancreas betacellsfunktion. Insulinkänsligheten representeras av RISQI, som är korrelerat till *insulin sensitivity index* (SI) vid *minimal model*, och är ett värde på hur effektivt insulin stimulerar till upptag av glukos från blodet. Värdet för MIRG går att jämföra med *acute insulin response to glucose* (AIRg), som fås vid uträkning av *minimal model*. Detta värde visar hur pancreas betaceller reagerar på exogent tillfört glukos och en höjning av värdet tyder på att betacellerna utsöndrar onormalt mycket insulin vid glukosstimulering och tyder alltså på kompensatorisk insulinresistens (Tóth *et al.*, 2008, Treiber *et al.* 2005).

MATERIAL OCH METODER

Försöksupplägg

Studien gjordes som en prospektiv experimentell försöksstudie under perioden september 2009 till mars 2010. Studien gick ut på att en grupp hästar infunderades med endotoxin och sedan provtogs med avseende på serumglukos och plasmainsulin. Etiskt tillstånd hade sökts innan försökets början (diarienummer C171/9).

Hästar

Åtta kliniskt friska varmblodiga travhästar, som ägdes av Institutionen för kliniska vetenskaper, Sveriges lantbruksuniversitet, ingick i studien. Hästarna bestod av fem ston och tre valacker i åldrarna 3 till 14 år med kroppsvikt från 403 till 570 kg. Under försökets gång hölls hästarna uppstallade i boxar men fick daglig utevistelse i sandpaddock förutom dagen för endotoxingivan och nästpåföljande dag. Hästarna utfodrades med hö tre gånger dagligen och de hade hela tiden fri tillgång till vatten.

För att säkerställa att endast friska hästar ingick i försöket inkluderades endast hästar utan signifikanta avvikelser vid följande undersökningar:

- blodprov för hematologi maximalt tre dagar innan försöket
- endoskopering av övre luftvägarna tre dagar innan försöket
- klinisk undersökning dagen innan försöket

Instrumentering och förberedelser

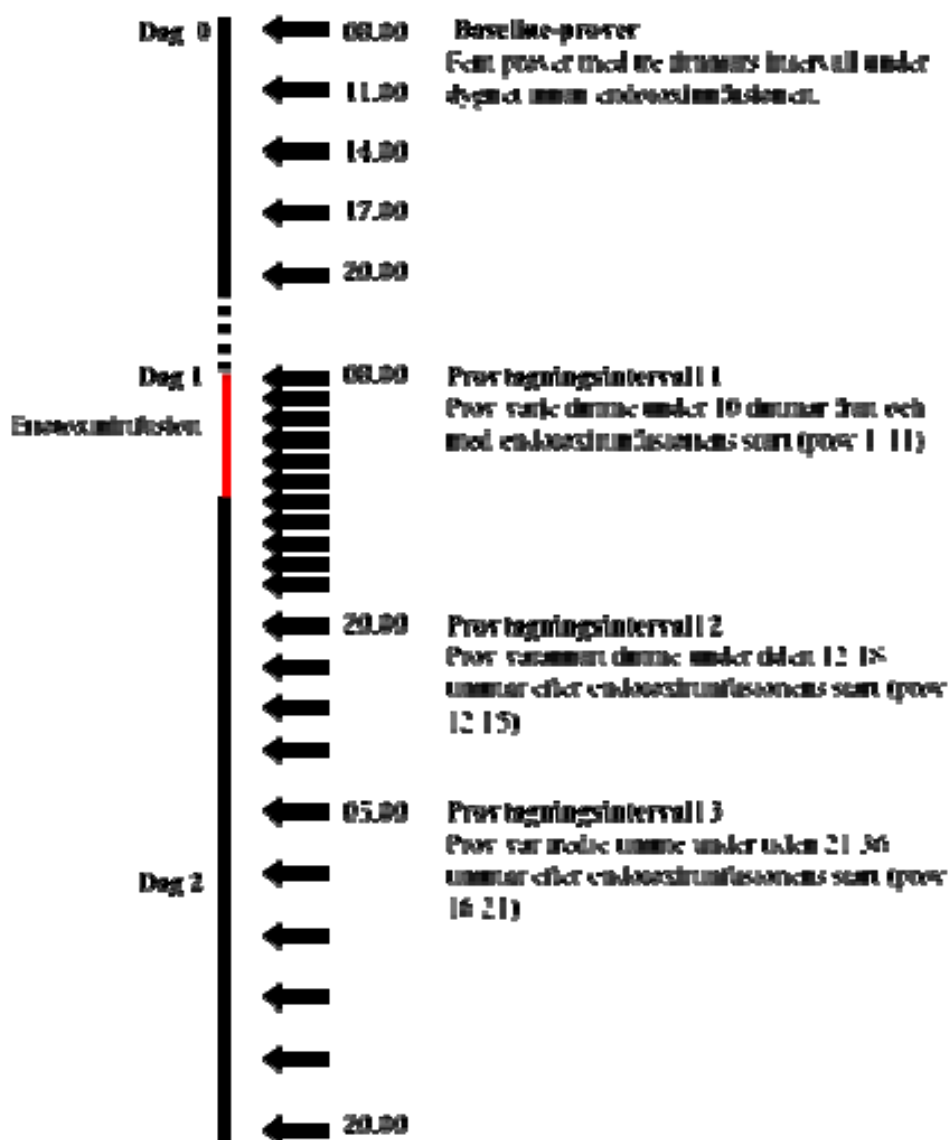
Dagen innan försöket vägdes hästarna och utrustades med permanentkatetrar i båda sidors jugularvenor för endotoxininfusion (*Intranule*, 2,0 x 105 mm, Vygon, Ecoen, France) respektive blodprovstagning (*Milacatch*, 1,3 x 13cm, 14 gauge x 5.25 inch, Mila International, Inc, Erlanger, KY, USA). Kateteriseringen skedde efter att huden rakats, steriltvättats och lokalbedövats (*Lidocain 2 %*, AstraZenicaAB, Södertälje, Sweden). Förlängningsslangar med trevägskranar kopplades till permanentkatetrarna och både permanentkatetrar och förlängningsslangar suturerades fast i huden.

Endotoxin

Hästarna gavs *Escherichia coli* endotoxin (*Sigma Alderich L5418, O55:B5*) i en total dos på 500 ng/kg kroppsvikt. Endotoxinet gavs som en jämn intravenös infusion i jugularvenen under sex timmar med start mellan klockan 08.00 och 09.00 på morgonen under försökets dag ett. Den enligt vikten uträknade mängden endotoxinlösning späddes med sterilt koksalt till en volym på 840 ml som infunderades med hastigheten 140 ml/timme under sex timmar, vilket motsvarar en endotoxingiva på 83,3 ng/kg/timme.

Provtagning

Blodprov för analys av glukos och insulin togs både före och efter endotoxingivan (figur 1). Hästarna fungerade som sina egna kontroller genom provtagning för baseline-värden klockan 08.00, 11.00, 14.00, 17.00 och 20.00 dagen innan endotoxingivan samt genom provtagning direkt innan endotoxininfusionens start. Från och med endotoxininfusionens start (klockan 08.00-09.00) provtogs hästarna under 36 timmar enligt följande schema; initialt en gång i timmen under tio timmar, därefter varannan timme under åtta timmar och sedan var tredje timme i femton timmar. Provtagnings-schemat inkluderade totalt 26 blodprover inklusive baseline-provtagningen.



Figur 1. Tidsaxel över provtagnings-schema., varje pil motsvarar ett provtagningstillfälle.

Blodproven togs från jugularvenen genom aspiration ur permanentkatetern och blodet fördes genast över till sterila 10 ml blodprovsvrör. Efter provtagning spolades permanentkatetern med steril 0,9 % NaCl-lösning. För insulinproverna användes rör preparerade med litiumheparin och till glukosproverna glasrör utan tillsats. Provrören med litiumheparin centrifugerades inom fem minuter efter provtagning (4°C, 906 G, 10 minuter) medan serumrören centrifugerades efter att blodet koagulerat (inom 30 minuter). Efter centrifugeringen avskildes serum respektive plasma, som sedan frystes i -80°C.

Analys

Inför analysen tinades proverna upp i rumstemperatur. Provrören centrifugerades ytterligare en gång och serum fördes över till glasrör som förvarades på is tills analysen skedde. Glukos analyserades vid Kliniska Kemiska avdelningen vid Akademiska Sjukhuset i en Architect c8000 från Abbott. Insulinproverna analyserades med hjälp av en djurslagsspecifik ELISA (*Equine Insulin ELISA*, Mercodia AB, Uppsala Sweden).

Utvärdering av glukosmetabolism med hjälp av proxies

Genom beräkning av RISQI och QUICKI utvärderades om hästarna efter endotoxininfusionen utvecklade insulinresistens. Beräkning av MIRG användes för att bedöma pancreas betacellsrespons. RISQI kalkylerades enligt formeln: $1/\sqrt{\text{insulin}}$, QUICKI kalkylerades enligt formeln: $(\log(\text{glukos} \times \text{insulin}))^{-1}$ och MIRG kalkylerades enligt formeln: $(800-0,3 \times (\text{insulin}-50)^2)/(\text{glukos}-30)$ (Treiber *et al.* 2005).

Statistik

Hantering av analysresultat och statistiska beräkningar skedde i programvaran *Sigmaplot 11.0*. Medelvärdet av RISQI, QUICKI och MIRG kalkylerades för fem olika tidsperioder: baseline (5 provtagningstillfällen), 1 – 6 timmar (5 provtagningstillfällen), 8 – 12 timmar (3 provtagningstillfällen), 15 – 21 timmar (3 provtagningstillfällen) samt 24 – 30 timmar (3 provtagningstillfällen) efter endotoxininfusionens slut. Skillnader i koncentrationen av glukos, insulin och medelvärden av RISQI, QUICKI och MIRG analyserades med one way repeated measures analysis of variance (ANOVA). Då variansanalysen visade ett signifikant resultat utfördes ett post hoc test (Holm-Sidak) för att påvisa skillnader i koncentration mellan enskilda tidsperioder. Vid ett P värde på $< 0,05$ ansågs statistiskt signifikanta skillnader föreligga.

Kliniska symptom

Hästarna övervakades kontinuerligt genom undersökning av fysiologiska parametrar såsom allmäntillstånd, beteende, hjärtfrekvens, andningsfrekvens, kroppstemperatur, slemhinnefärg, buklyd, avföring och urinering. Status kontrollerades en gång i halvtimmen under infusionen samt under fyra timmar efter infusionens slut. Därefter

kontrollerades status minst var tredje timme under det första dygnet efter infusionens slut och efter detta minst två gånger per dygn.

RESULTAT

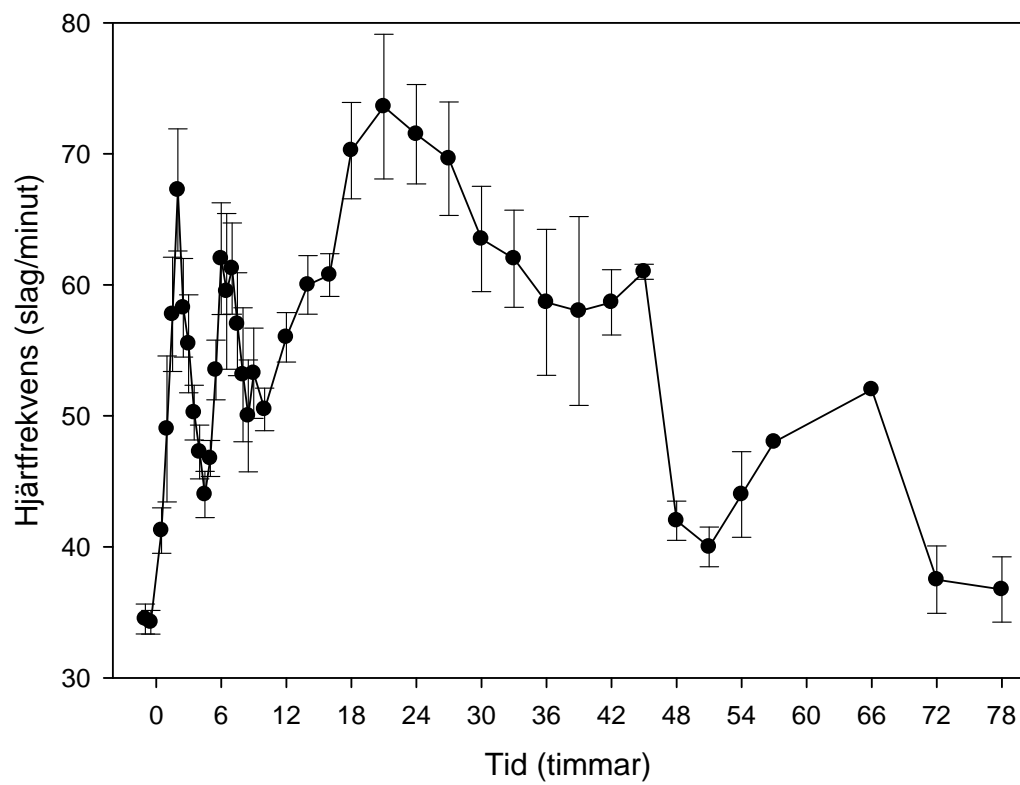
Kliniska symptom

Ökad andnings och hjärtfrekvens (figur 2), minskade buklyd, förhöjd kroppstemperatur (figur 3), nedsatt aptit och tecken på smärta noterades hos samtliga hästar. Färgförändringar i munslemhinnan utvecklades hos samtliga hästar från och med cirka en timme efter endotoxininfusionens start.

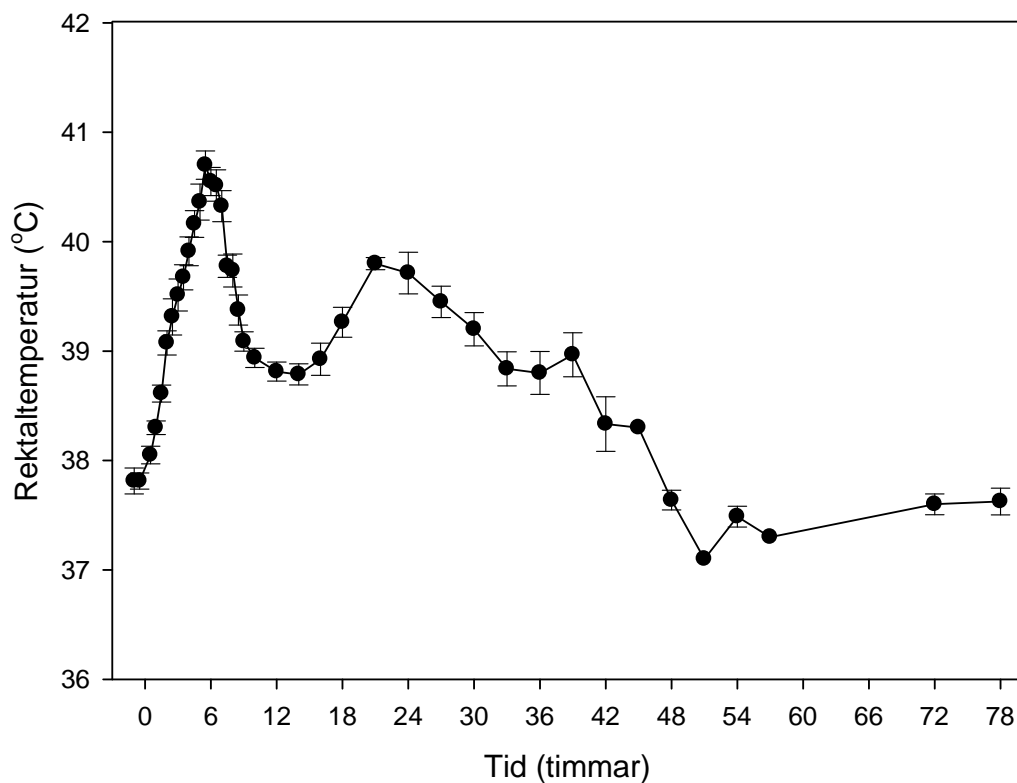
Ileus utvecklades hos alla hästar, vilket påvisades genom kraftigt minskade tarmljud från och med cirka en timme efter infusionens start. Tarmljuden återkom gradvis från och med några timmar efter infusionens slut hos alla förutom en häst där tarmljuden återkom först vid 2,5 dygn efter infusionens slut.

Alla hästar visade något tecken på smärta eller obehag under första delen av infusionen. Tecken som noterades var att hästarna gäspade, tuggade eller skakade med huvudet, skrapade med hovarna, lyfte bakbenen mot buken och drog upp buken. Av hästarna hade 5/8 onormalt lös avföring under endotoxininfusionen.

Avsaknad av aptit och törst sågs hos samtliga hästar från och med infusionens start. Aptiten återkom hos en häst redan under slutet av infusionen, hos fyra hästar 0,5 – 4 timmar efter infusionens slut, hos två hästar ett dygn efter infusionens slut och hos en häst vid 40 timmar efter infusionens slut.



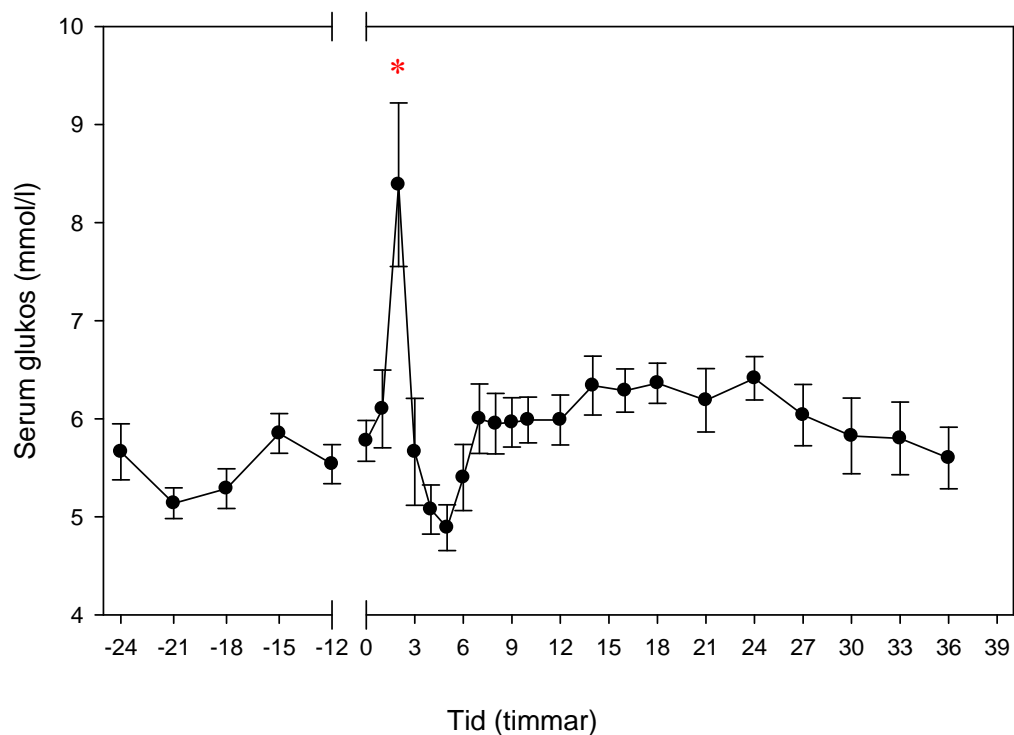
Figur 2. Graf över hästarnas hjärtfrekvens (medelvärde och standardfel för medelvärde) under 78 timmar med början vid endotoxininfusionens start (=tid 0).



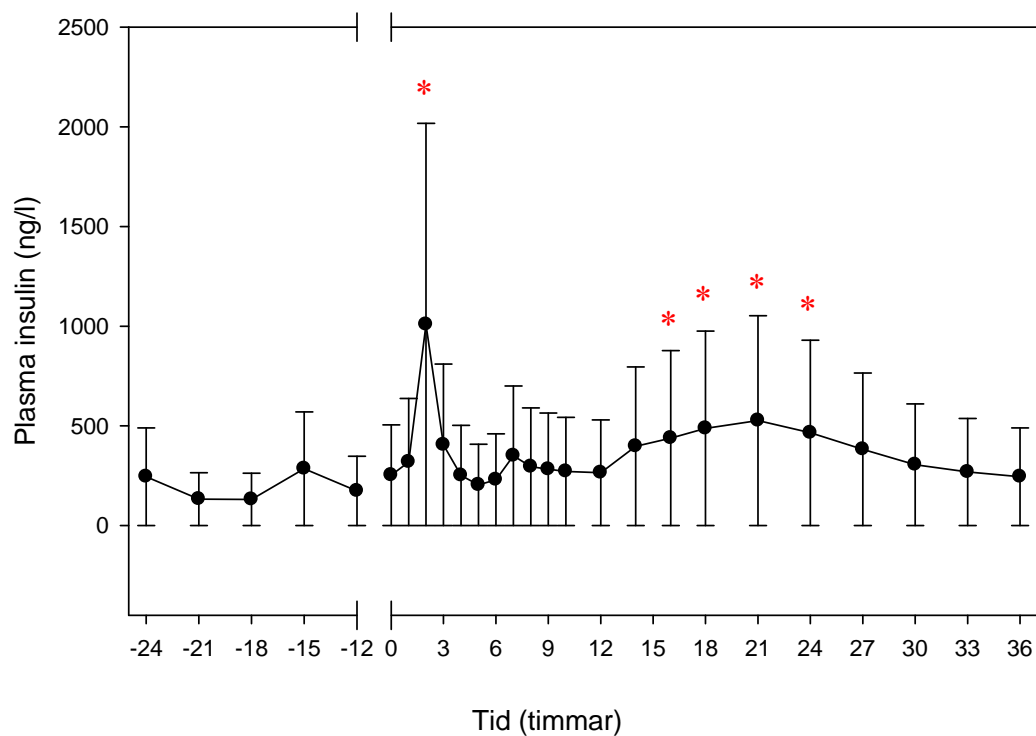
Figur 3. Graf över hästarnas rektaltemperatur (medelvärde och standardfel för medelvärde) under 78 timmar med början vid endotoxininfusionens start (=tid 0).

Glukos och insulin

Hästarna utvecklade en snabbt övergående hyperglykemi (figur 4) och hyperinsulinemi (figur 5) under endotoxininfusionen. Vid provtagningen två timmar efter endotoxininfusionens start skiljde sig värdet för både plasmainsulin och serumglukos signifikant från alla baseline-värden. Ytterligare en signifikant, mer långvarig men lindrig insulinstegring skedde vid 16 till 24 timmar efter endotoxininfusionens start.



Figur 4. Graf över serumglukoskoncentrationerna (medelvärde och standardfel för medelvärde) under tiden före (baseline) och efter endotoxininfusionens start (tiden 0). Röd stjärna markerar signifikant skillnad mot baseline-prover ($P < 0,001$).



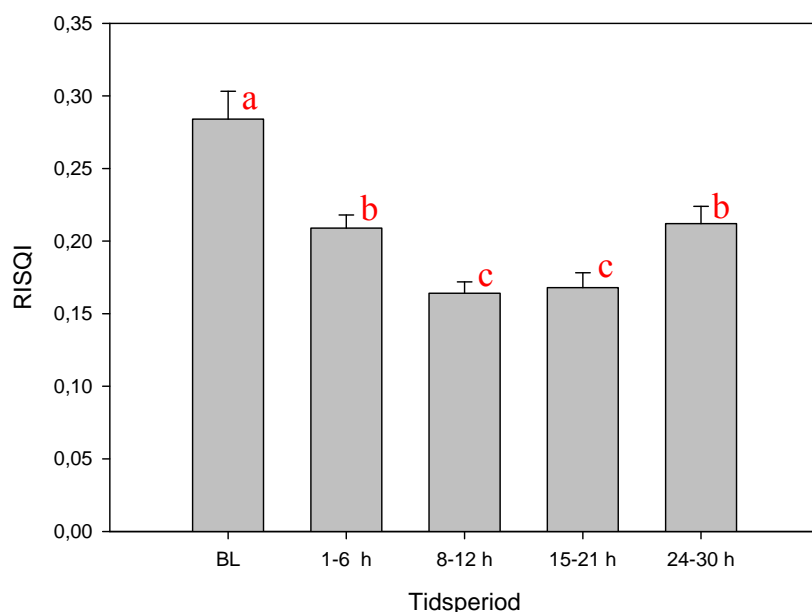
Figur 5. Graf över plasmainsulinkoncentrationerna (medelvärde och standardfel för medelvärde) under tiden före (baseline) och efter endotoxininfusionens start (tiden 0). Röd stjärna markerar signifikant skillnad mot baseline-prover ($P < 0,001$).

Insulinkänslighet

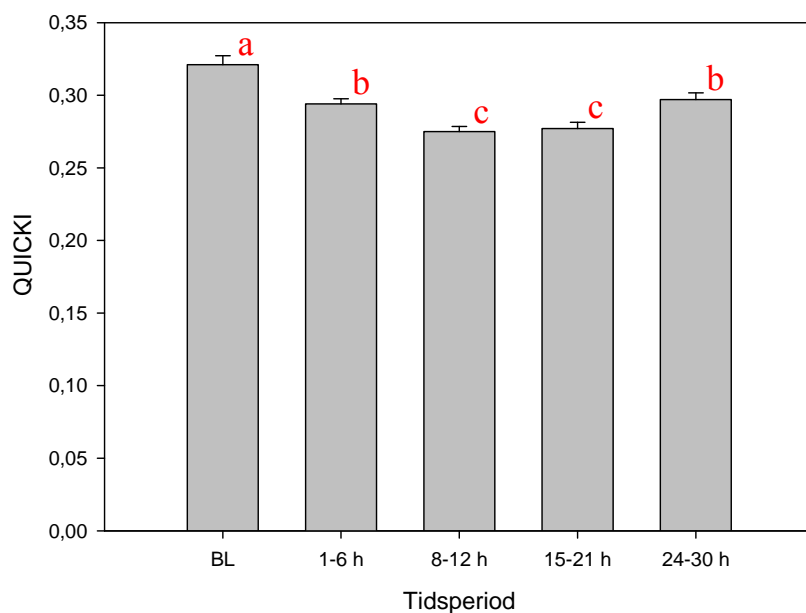
Beräkning av RISQI (figur 6) och QUICKI (figur 7) utfördes för att utvärdera insulinkänsligheten. Medelvärdet för baseline-provtagningarna jämfördes med medelvärdet för prover tagna under fyra andra tidsintervall. Beräkningar av *proxies* för perioden då endotoxininfusionen skedde gjordes inte då svängningarna i glukos och insulin under denna period var väldigt stora men kortvariga och inte representerar kroppens insulinkänslighet utan mer är en akut, övergående stressreaktion.

Hästarnas insulinkänslighet sjönk från och med endotoxininfusionens slut och de drabbades av insulinresistens som var mest uttalad under tidsperioden 8-21 timmar efter endotoxininfusionens slut. Därefter steg insulinkänsligheten, men normaliserades inte under provtagningsperioden som pågick upp till 30 timmar efter endotoxininfusionens slut.

Statistiskt fanns inga signifikanta förändringar i MIRG över tid, vilket tyder på att hästarna inte kompenserade för den nedsatta insulinkänsligheten. Se bilaga 1 för grafer över RISQI, QUICKI och MIRG.



Figur 6. RISQI under baseline och vid fyra andra provtagningsintervall efter endotoxininfusionens slut. Provtagningsintervall med olika bokstäver är signifikant skilda från varandra, ($P < 0,05$).



Figur 7. QUICKI under baseline och vid fyra andra provtagningsintervall efter endotoxininfusionens slut. Provtagningsintervall med olika bokstäver är signifikant skilda från varandra, ($P < 0,05$).

DISKUSSION

Genom en 6 timmar lång intravenös infusion med *E. coli* endotoxin (O55:B5) med dosen 500 ng/kg gjordes i denna studie ett försök att simulera en verklig klinisk endotoxinemi. De åtta hästarna som ingick i studien uppvisade symtom som hypertermi, takykardi, takypné, kolik, inappetens, diarré och toxiskt färgförändrade slemhinnor. Genom blodprovstagning och analys av serumglukos och plasmainsulin kunde förändringar i dessa värden ses. Proxies för insulinkänslighet och pancreas betacellsrespons beräknas. Hästarna drabbades av hyperglykemi och hyperinsulinemi under endotoxininfusionen, och drabbades efter infusionen av insulinresistens i upp till 30 timmar efter endotoxininfusionens slut. Ingen ökad betacellsrespons från pancreas sågs och insulinresistensen tolkades därmed som okompenserad.

De kliniska symtom som utvecklades hos hästarna stämmer väl överens med resultat i studier på både hästar och människor (Agwunobi *et al.* 2000, Clark & Moore 1989, Tóth *et al.* 2008, Tóth *et al.* 2009). Hästar med olika typer av gastrointestinala besvär och symtom på kolik drabbas ofta av endotoxinemi, men endotoxinemin kan i sig ge koliksymtom. I en studie (Clark & Moore 1989) där man fokuserade på tarmkontraktilitet och blodflöde till tarmen gavs sju hästar endotoxin i en dos på 30 ng/kg under 60 minuter. Hästarna drabbades av takykardi, takypné, hypertermi, nedsatt allmäntillstånd, muskelfascikulationer, färgförändringar i slemhinnorna och milda tecken på kolik. Genom att instrumentellt mäta kontraktilitet i både duodenum, colon och cecum kunde man se nedsatt kontraktilitet i delar av colon och cecum under de 6 timmarna som man följde hästarna efter endotoxingivan. Man kunde även se

minskat arteriellt blodflöde och ökat blodtryck i artärer till cecum och colon (Clark & Moore 1989). Även i vår studie kunde man kliniskt se tecken på minskad tarmmotorik genom minskning och i vissa fall totalt bortfall av tarmljud efter endotoxingivan. Risken med ileus hos häst är att tarmen skadas och endotoxinemin förvärras, vilket skulle kunna förklara den andra temperaturstegringen och förhöjningen av hjärtfrekvensen som sågs hos hästarna i vår studie vid tiden runt 24 timmar efter endotoxininfusionens start. Då ingen analys av endotoxinmängden i blodet hos hästarna gjordes kan inte detta resonemang styrkas och troligen finns även andra förklaringar till denna reaktion.

Att hästar utvecklar insulinresistens efter endotoxingiva är känt då det setts i andra studier. Tóth *et al.* (2008) studerade dynamiken av insulin och glukos vid endotoxemi i ett försök där 16 hästar gavs en endotoxindos på 20 ng/kg under 30 minuter. Av hästarna visade 13/16 koliksymtom och de drabbades även av hypertermi, takykardi och takypné. Insulinkänsligheten utvärderades genom FSIGT och minimal model-beräkningar vid 24 och 48 timmar efter infusionen. Man kunde påvisa minskad insulinkänslighet vid 24 timmar efter endotoxingivan, vilket stämmer väl överens med vad vi såg i vår studie. Vid 48 timmar kunde inte någon statistiskt signifikant förändrad insulinkänslighet längre ses. Eftersom vi i vår studie använde en annan metod för att utvärdera insulinkänsligheten går graden av insulinresistens inte att jämföra, däremot durationen. För att klargöra hur lång tid hästarna i vår studie hade förändrad insulinkänslighet hade det krävts provtagning under en längre tid efter endotoxininfusionen. Vid det sista provtagningsintervallet 24-30 timmar efter infusionen var insulinkänsligheten fortfarande sänkt, men värdet hade höjts jämfört med perioden innan. Detta kan tyda på insulinkänsligheten började normaliseras, vilket den hade gjort vid 48 timmar i studien av Tóth *et al.* (2008).

Vid mer långvariga tillstånd av insulinresistens kan pancreas betaceller anpassa sig och kompensatoriskt utsöndra mer insulin än normalt vid glukosstimulering, vilket då betecknas kompensatorisk insulinresistens. Detta kompensatoriska tillstånd har setts i en tidigare studie (Tóth *et al.* 2008) men kunde inte ses i vår studie. Orsaker till skillnaden mellan studierna är svår att förklara, men i jämförelse var endotoxingivan i ovan nämnda studie (Tóth *et al.* 2008) endast 4 % av vad hästarna i presenterat material utsattes för. Skillnaden i resultat skulle kunna tänkas bero på de olika metoderna för beräkning av betacellsresponsen, men även på faktiska skillnader i hästarnas svar på olika höga endotoxigivor och under hur lång tid endotoxinerna gavs. Tidsfaktorn borde gynna en kompensation i vår studie där endotoxininfusionen pågick under en betydligt längre tid. Den uteblivna förändringen i betacellsresponsen beror därför sannolikt inte på tiden. Om endotoxinerna däremot har en direkt funktionsnedsättande effekt på pancreas betaceller är det däremot logiskt att en högre endotoxingiva gav sämre betacellsrespons.

Exakt vad som orsakar insulinresistens vid akut sjukdom och i detta fall, vid endotoxemi, är fortfarande inte klarlagt. På vävnadsnivå ger kontinuerlig endotoxingiva färre insulinreceptorer, och uteblivet svar på receptorbindning på grund av förändringar i den intracellulära fosforyleringskaskaden (Tóth *et al.* 2008). Vid experimentellt inducerad endotoxemi hos människa har man visat att hormonerna kortisol, glukagon och tillväxthormon stiger inom några timmar efter endotoxingivan (Agwunobi *et al.* 2000). Endotoxiner har även visats höja kortisolnivåerna hos ponnyer och i *in vitro* studier har man sett att insulinmedierat glukosupptag hämmas i adipocyter vid förbehandling med glukokortikoider (Tóth *et al.* 2008).

Tillväxthormon förvärrar insulinresistens och hyperglykemi och fördubblar mortaliteten hos kritiskt sjuka genom större risk för sepsis och multiorgansvikt (Van den Berghe *et al.* 2001). Svårigheter ligger dock i att utesluta eller bekräfta att ett eller ett annat ämne bidrar eller orsakar insulinresistensen. I en humanstudie där man följde patienter som genomgick abdominell kirurgi kunde man påvisa insulinresistens under minst fem dagar efter operationen. Hos dessa patienter sågs förhöjning av glukos, noradrenalin och glukagon dagen efter operationen men oförändrade nivåer av insulin, tillväxthormon, kortisol och adrenalin, vilket tyder på att den utvecklade insulinresistensen inte berodde på dessa hormoner (Thorell *et al.* 1994). Detta talar egentligen inte emot att insulinresistens utvecklas vid hormonell påverkan från till exempel kortisol, adrenalin och tillväxthormon utan tyder på att det även kan finnas andra orsaker till akut insulinresistens.

Effekten av katekolaminer vid endotoxinemi studerades i ett försök där man genom användning av adrenerga receptorantagonister kunde blockera den adrenerga effekten (Virkamäki & Yki-Järvinen 1994). Man kom fram till att katekolaminer inte är direkt kopplat till utvecklingen av insulinresistens. Däremot sågs vid blockad av adrenerga receptorer bortfall av hyperglykemin, som annars ses akut vid endotoxinemi. Då man vid $\alpha\beta$ -blockad samtidigt såg en signifikant förhöjning av glukosåtgången drog slutsatsen att bortfallet av hyperglykemin berodde på ökad glukosanvändning. Katekolaminer har en viktig skyddsmekanism mot hypoglykemi vid endotoxinemi och sepsis genom att katekolaminer inducerar sänkning av glukosanvändningen (Virkamäki & Yki-Järvinen 1994). I en humanstudie där man experimentellt inducerade endotoxinemi sågs heller ingen förhöjning av adrenalin och noradrenalin efter endotoxingiva, trots utvecklandet av insulinresistens (Agwunobi *et al.* 2000). Studiemetoden att blockera ett visst hormon för att undersöka effekten jämfört med en kontrollgrupp är sannolikt en bra väg att gå för att komma vidare i att identifiera orsakerna till utvecklandet av insulinresistens, men då det krävs många studier och stora studiematerial kommer det troligen att dröja länge innan frågan är upplärd.

Vid endotoxinemi sker förutom hormonellt stresspåslag även en massiv frisättning av olika cytokiner och proinflammatoriska mediatorer. Vid human endotoxinemi har man påvisat förhöjningar av cytokinerna TNF och IL-6 (Agwunobi *et al.* 2000). Inflammationsfaktorerna IL-1, TNF α och TNF β undersöktes i en studie av hästar med insulinresistens och fetma. I studien visades att TNF α var den inflammationsfaktor som gav mest påverkan på insulinkänsligheten, vilket stöder flera andra studier på andra arter där man sett att TNF α är kopplat till fetma och leder till insulinresistens (Vick *et al.* 2007). TNF α hos hästar har även setts vid experimentell induktion av endotoxinemi (Barton *et al.* 2004, Vick *et al.* 2008).

Hos gnagare har man sett att TNF inhiberar insulinstimulerad aktivering av den intracellulära kaskaden vid receptorbindning och därmed translokationen av GLUT-4 (Tóth *et al.* 2008). Det är troligt att TNF α är en av orsakerna till insulinresistens vid endotoxinemi, men fler studier behövs för att klargöra om det finns fler bidragande faktorer. Troligt är att akut insulinresistens orsakas av kombinationen av inflammationsfaktorer, cytokiner och stresshormoner, vilket gör det svårt att identifiera riskfaktorer och möjlighet att behandla i förebyggande syfte.

Utvecklandet av akut insulinresistens hänger ofta ihop med utveckling av hyperglykemi då kroppens celler inte förmår att svara på insulin. Hyperglykemi på grund av nedsatt insulinkänslighet vid akuta sjukdomstillstånd är en risk både vad

gäller överlevnad och komplikationer. Tidigare har man ansett att en viss grad av hyperglykemi gynnade intensivvårdspatienter för att kroppen då hade energi tillgänglig, men detta har man inom humanvården ändrat uppfattning om. Risken med hyperglykemi är både att cellerna med insulinberoende glukosupptag får sänkt energitillgång, men framförallt att celler med insulinberoende upptag med GLUT-1 drabbas av glukostoxicitet (Marik & Raghavan 2004).

Hepatocyter, gastrointestinala mukosaceller, pancreas betaceller, renala tubuliceller, endotelceller, immunceller och neuroner är oberoende av insulin för glukostransport, vilken sker konstant för att hålla jämvikt mellan glukosnivån i blodet och i cellerna (Langouche & Van den Berghe 2006). Cellerna har dock en skyddsmekanism mot hyperglykemi genom att nedreglera antalet glukostransportörer i plasmamembranet då blodglukoset höjs över det normala. Cytokiner, hypoxi och andra stress-inducerade faktorer som frisätts vid akut sjukdom uppreglerar uttryck och membranlokalisering av dessa glukostransportörer i flera celltyper. Denna uppreglering kan överstiga den normala nedreglering som sker vid hyperglykemi för att skydda cellerna mot glukostoxicitet. Glukosnivån i cellerna stiger till samma nivå som glukosnivån i blodet om glukostransportörer finns i tillräcklig mängd och hyperglykemin i cellerna leder till ökad oxidativ stress. Den ökade oxidativa stressen skadar mitokondrier och dessa typer av skador kan ge upphov till organsvikt, en vanlig orsak till dödsfall hos intensivvårdspatienter. Risken med hyperglykemi är även att glukos hämmar immunförsvaret genom glykosylering av globuliner och gör därmed patienten mer infektionskänslig (Langouche & Van den Berghe 2006). Trots att orsaken till hyperglykemin är insulinresistens är tillståndet behandlingsbart med just insulin. Patienterna lider av både hepatisk och muskulär insulinresistens och mekanismen hur insulinbehandling sänker blodglukos är inte helt klarlagd. Vid lever och muskelbiopsier har man sett att insulinbehandling sänker blodglukoset framför allt genom ökat insulinberoende upptag i muskelcellerna. Insulinbehandlingen höjer GLUT-4 och hexokinas-II, det hastighetsbestämmande enzymet i intracellulär insulinmedierad glukosmetabolism i skelettmuskulatur. Däremot ses ingen förändring i leverns uttryck av de hastighetsbestämmande enzymerna för glukosmetabolism, vilket tyder på att insulinresistensen i levern är total (Langouche & Van den Berghe 2006).

Inom humanvården är hyperglykemi hos intensivvårdspatienter relativt vanligt och tillståndet kräver inte sällan insulinbehandling. Den konventionella behandlingsstrategin har varit att tillåta en viss grad av hyperglykemi, men på senare år har flera studier visat att en mer strikt glukoskontroll gynnar patienterna (Van den Berghe *et al.* 2001). I en review där Derde *et al.* (2009) jämförde kliniska studier med olika grader av glukoskontroll fann man att fördelarna med intensiv insulinbehandling och strikt glukoskontroll var minskad mortalitet, färre infektioner samt mindre risk för njursvikt, leverdysfunktion och behov av mekanisk ventilering. Man såg även att patienterna krävde kortare tid på intensivvårdsavdelningarna och därmed minskades kostnaderna. Risken med insulinbehandling var ingen alls i vissa studier medan man i andra fall hade framkallat hypoglykemi hos patienterna.

I vår studie drabbades hästarna endast av en mycket kortvarig hyperglykemi vid två timmar efter endotoxininfusionens start. Att inleda insulinbehandling för att motverka hyperglykemin är ju givetvis inte nödvändig vid en så kortvarig blodglukosstegring men behovet av insulinbehandling av hästar med allvarliga sjukdomstillstånd kanske

trots detta finns. Hästarna i vår studie visade alla kliniska symtom på kolik, men ingen av hästarna fick kraftigt nedsatt allmäntillstånd eller visade kraftiga symtom vilket tyder på att endotoxingivan var relativt låg i förhållande till kliniska fall av endotoxemi. Att utföra försök med högre doser endotoxin är tveksamt ur etisk synvinkel, däremot finns alltid möjligheten att studera hästar med verklig sjukdom. I en studie där man undersökte blodglukos hos hästar som ankom till djursjukhus med kolik hade ungefär hälften hyperglykemi varav cirka 20 % hade extrem hyperglykemi (Hollis *et al.* 2007). Blodglukoskoncentrationen var kopplad till takykardi och takypné men ej till rektaltemperatur. Det man kom fram till i studien var att hyperglykemi vid ankomst eller upp till 48 timmar efter ankomst gav sämre överlevnad, vilket stöder användandet av blodglukos som en prognostisk parameter. Dessutom indikerar studien att behov av glukoskontroll även finns hos akut sjuka hästar (Hollis *et al.* 2007).

Sammanfattningsvis fann vi som väntat att hästarna drabbades av insulinresistens efter en infusion av endotoxiner. Insulinresistensen kvarstod i minst 30 timmar, men hästarna drabbades inte av någon ihållande hyperglykemi.

REFERENSER

- Agwunobi, Anselm O.; Reid, Clare; Maycock, Paula; Little, Roderick A. & Carlson, Gordon L. 2000. Insulin resistance and substrate utilization in human endotoxemia. *The journal of clinical endocrinology and metabolism* 85:10, 3770-3778.
- Barton, M. H.; Parviainen A.; Norton N. 2004. Polymyxin B protects horses against induced endotoxaemia in vivo. *Equine veterinary journal* 36:5, 397-401.
- Clark, E. Susan & Moore, J. N. 1989. The effects of slow infusion of a low dosage of endotoxin in healthy horses. *Equine veterinary journal supplement* 7, 33-37.
- Derde, Sarah; Vanhorebeek, Ilse & Van den Berghe, Greet. 2009. Insulin treatment in intensive care patients. *Hormone research* 71, 2-11.
- Gould, Gwyn W. 1997. Facilitative glucose transporters. R.G. Landes Company.
- Hollis, A.R; Boston, R.C. & Corley K.T.T. 2007. Blood Glucose in Horses with Acute Abdominal Disease. *Journal of veterinary internal medicine* 21, 1099-1103.
- Langouche, Lies & Van den Berghe, Greet. 2006. Glucose metabolism and insulin therapy. *Critical care clinics* 22, 119-129.
- Marik, Paul E. & Raghavan Murugan. 2004. Stress-hyperglycemia, insulin and immunomodulation in sepsis. *Intensive care medicine*. 30:5, 748-756.
- Quinn, P. J.; Markey, B. K.; Carter, M. E.; Donnelly, W. J.; Leonard, F. C. 2002. *Veterinary Microbiology and microbial disease*. Blackwell Science Ltd.

- Reed, S.M.; Bayly, W.M.; Sellon, D.C. 2010. *Equine Internal Medicine*. Third edition, Saunders Elsevier.
- Saltiel, Alan R. & Pessin, Jeffrey E. 2000. *Mechanisms of insulin action*. Landes Bioscience & Springer science.
- Thorell, A.; Efendic, S.; Gutniak, M.; Häggmark, T. & Ljungqvist O. 1994. Insulin resistance after abdominal surgery. *British journal of surgery* 81:1, 59-63.
- Tóth, Ferenc; Frank, Nicholas; Elliott, Sarah B.; Geor, Raymond J. & Boston, Raymond C. 2008. Effects of an intravenous endotoxin challenge on glucose and insulin dynamics in horses. *American journal of veterinary research* 69:1, 82-88.
- Tóth, F; Frank, N.; Chameroy, K.A. & Boston, R.C. 2009. Effects of endotoxaemia and carbohydrate overload on glucose and insulin dynamics and the development of laminitis in horses. *Equine veterinary journal* 41:9, 852-858.
- Van den Berghe, Greet; Wouters, Pieter; Weekers, Frank; Verwaest, Charles; Bruyninckx, Frans; Schetz, Miet; Vlasselaers, Dirk; Ferdinande, Patrick; Lauwers, Peter & Bouillon, Roger. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *The New England journal of medicine* 345:19, 1359–1367.
- Vick, M. M.; Adams, A. A.; Murphy, D. R.; Sessions, D. R.; Horohov, D. W.; Cook, R. F.; Shelton, B. J. & Fitzgerald, B. P. 2007. Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity in the horse. *Journal of animal science* 85, 1144-1155.
- Vick, Mandi M.; Murphy, Barbara A.; Sessions, Dawn R.; Reedy, Stephanie E.; Kennedy, Erin L.; Horohov, David W.; Cook, R. Frank & Fitzgerald, Barry P. 2008. Effects of systemic inflammation on insulin sensitivity in horses and inflammatory cytokine expression in adipose tissue. *American journal of veterinary research* 69:1, 130-139.
- Virkamäki, Antti & Yki-Järvinen, Hannele. 1994. Mechanisms of insulin resistance during acute endotoxemia. *Endocrinology* 134:5 2072-2078.

Bilaga 1.

