



*Sveriges lantbruksuniversitet*

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för kliniska vetenskaper

# Transport av häst till ny miljö och dess påverkan på ett kombinerat glukos- och insulintoleranstest

Jessica Hedenskog

*Uppsala*

*2012*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet*

*ISSN 1652-8697  
Examensarbete 2012:10*



# Transport av häst till ny miljö och dess påverkan på ett kombinerat glukos- och insulintoleranstest

Jessica Hedenskog

*Handledare: Johan Bröjer, Institutionen för kliniska vetenskaper*

*Examinator: Bernt Jones, Institutionen för kliniska vetenskaper*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2012  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för kliniska vetenskaper  
Kurskod: EX0239, Nivå X, 22,5 hp*

*Nyckelord: Ekvint Metabolt Syndrom, EMS, Glukos, Insulin, CGIT*

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>  
ISSN 1652-8697  
Examensarbete 2012:10*



## INNEHÅLL

SAMMANFATTNING .....	1
SUMMARY .....	2
INLEDNING.....	3
Ekvint Metabolt Syndrom.....	3
Insulinresistens .....	3
Diagnosticering av insulinresistens .....	4
Metoder för forskning .....	4
Fasteprov för insulin och glukos .....	4
Dynamiska tester .....	4
SYFTE.....	6
MATERIAL OCH METODER .....	7
Hästar.....	7
Varmblodiga travhästar.....	7
Islandshästar .....	7
Transporthästar .....	7
Studiedesign .....	8
CGIT .....	8
Analyser .....	9
Blodprovsanalyser .....	9
Statistiska analyser och beräkningar.....	9
RESULTAT .....	10
DISKUSSION .....	15
KONKLUSION .....	17
LITTERATURFÖRTECKNING.....	18

## SAMMANFATTNING

Ekvint metabolt syndrom (EMS) introducerades 2002 av Johnson som menade att det fanns ett samband mellan fetma, fång och insulinresistens (IR) hos häst. Det är därför viktigt att få fram en bra metod att diagnosticera IR. Det finns idag ett flertal tester att välja mellan. Det mest använda testet är det kombinerade glukos- och insulintoleranstestet (CGIT), vilket idag används framförallt på kliniker. Detta innebär att hästen måste transporteras till en klinik någon dag innan testet ska genomföras. Transport till ny miljö orsakar stress, vilket kan ge en tillfällig insulinresistens och därmed ett falskt positivt svar på CGIT.

Vid ett CGIT tas ett blodprov för fastställande av fasteglukos och fasteinsulin. Därefter injiceras en glukoslösning intravenöst direkt följt av insulin varefter blodprover tas efter ett bestämt schema. Samtliga blodprover analyseras för koncentrationerna av glukos och insulin och glukoskoncentrationerna plottas mot tiden. Vid tidpunkten 45 minuter efter glukosinjektion ska en frisk hästs glukoskoncentration ha sjunkit under sitt fastevärde och insulinkoncentrationen vara  $< 100$  mU/l i annat fall diagnosticeras hästen som IR.

I den här studien fick 18 friska hästar genomgå ett CGIT-test i två omgångar med tre veckors intervall. Tiden till dess glukoskurvan skar sin baslinje ( $PFD_{glu}$ ), insulin nådde koncentrationen 100 mU/l ( $DIK_{100}$ ) samt arean under kurvan för glukos ( $AUK_{glu}$ ) respektive insulin ( $AUK_{ins}$ ) beräknades och jämfördes mellan de två testomgångarna. Ingen signifikant skillnad kunde ses mellan testomgångarna ( $p < 0,05$ ). Reproducerbarheten uttryckt som variationskoefficienten (CV) för ovanstående parametrar beräknades mellan testomgångarna och var för  $PFD_{glu}$  44,9 %,  $DIK_{100}$  7,0 %,  $AUK_{glu}$  14,6 % och  $AUK_{ins}$  7,7 %. Variationskoefficienten för  $PFD_{glu}$  visar en stor dag till dagvariation och en häst bör därför inte diagnosticeras med IR enbart med avseende på denna parameter.

Åtta av de 18 deltagande hästarna fick genomgå en tredje testomgång ytterligare två veckor senare. Denna gång efter att ha transporterats under 60 minuter till en ny miljö dagen innan testet genomfördes. Samma parametrar som ovan beräknades och jämfördes med de två testomgångarna i hästarnas hemmiljö.

De båda glukoskurvorna (baserade på medelvärdet) från testomgång 1 och 2 var inte signifikant skilda åt. De hade båda en positiv fas följt av en negativ fas. Glukoskurvan från testomgång 3 (efter transport) hade endast en positiv fas och ingen negativ fas. Signifikant skillnad från de båda tidigare testomgångarna sågs i tidpunkterna 15 – 150 minuter.  $AUK_{glu}$  och  $PFD_{glu}$  var signifikant högre i tredje testomgången. Ingen signifikant skillnad kunde ses på insulinkurvan i tredje testomgången jämfört med de båda tidigare testomgångarna och inte heller sågs någon skillnad för  $AUK_{ins}$  eller  $DIK_{100}$ .

Resultatet visar att transport av en häst till en ny miljö dagen innan ett CGIT genomförs påverkar glukosresultatet och testet bör därför med fördel genomföras i hästens hemmiljö.

## SUMMARY

Equine metabolic syndrome (EMS) was introduced to veterinary medicine in 2002 by Johnson, who suggested that there was a connection between regional adiposity or obesity, laminitis and insulin resistance (IR) in horses. It is thus important to use a good method for diagnosing IR. The most used test today is the combined glucose and insulin tolerance test (CGIT), which is used primarily in the clinic. This implies that the horse has to be transported to a clinic before the test is to be conducted. Transportation to a new environment causes stress, which in turn can give a temporary IR and therefore a false positive result of the CGIT.

When a CGIT is performed a blood sample is taken to determine the horse's baseline of glucose and insulin. Thereafter, glucose is injected intravenously immediately followed by administration of insulin i.v. Blood samples are taken after a fixed schedule. Glucose and insulin are analysed in the blood samples and the concentrations are plotted against time. Forty five minutes after the glucose injection the plasma glucose concentration should be lower than the baseline of glucose and the insulin concentration should be below 100 mU/L; otherwise the horse is diagnosed with IR.

In the present study, 18 healthy horses underwent a CGIT twice with three weeks between tests. The duration until the glucose concentration curve crossed the baseline of glucose concentration ( $PPD_{glu}$ ), the duration until the insulin concentration reached 100mU/L ( $DIC_{100}$ ) as well as the area under the curve for glucose ( $AUC_{glu}$ ) and insulin ( $AUC_{ins}$ ) were determined. There were no significant differences between the two tests ( $p < 0.05$ ). The inter day variability expressed as the coefficient of variation (CV) was calculated for  $PPD_{glu}$  (44.9 %),  $DIC_{100}$  (7.0 %),  $AUC_{glu}$  (14.6 %) and  $AUC_{ins}$  (7.7%). The high CV for  $PPD_{glu}$  suggests that a diagnosis of IR should not solely be diagnosed based on this parameter.

Eight of the 18 horses underwent a third CGIT two weeks later. The third test was performed the day after the horses had been transported under 60 minutes to a new environment. The mean CGIT glucose curves from the two first tests had a positive and a negative phase, whereas the mean glucose curve from the third CGIT (after transportation) only had a positive phase and no negative phase. The third CGIT glucose curve was significantly different from the previously two CGIT glucose curves within time points 15 - 150 minutes.  $AUC_{glu}$  and  $PPD_{glu}$  were significantly higher in the third CGIT. There was no significant difference in the mean CGIT insulin curves, the  $AUC_{ins}$  or  $DIC_{100}$  between the three tests.

The result from the present study, indicate that transportation of a horse to a new environment the day before a CGIT is conducted influences the CGIT glucose curve and its calculated parameters. The CGIT should therefore ideally be performed in the horse's home environment.

## INLEDNING

### Ekvint Metabolt Syndrom

2002 introducerade Johnson begreppet Ekvint Metabolt Syndrom (EMS) där han menade att det fanns ett samband mellan fetma, insulinresistens och fång hos häst. Andra författare har senare beskrivit samma samband (Geor, 2008; Quinn *et al.*, 2008, Frank *et al.*, 2009).

En häst som diagnosticeras med EMS är vanligtvis i åldern 8-18 år och söker veterinärvård på grund av fång. Hos hästar med EMS är symtomen på fång milda och har ofta kommit smygande. Hästen är ofta överviktig med regional eller generell fetma. Hästägaren uppfattar hästen som "lättfödd" och det är svårt att hålla hästen i normalt hull endast genom foderrestriktioner (Johnson, 2002; Frank, 2011).

Den regionala fetman yttrar sig som subkutana fettdepåer längs mankammen, vid skuldrorna samt vid svansroten. *Body condition score* (BCS) enligt metod av Henneke (1983) är ofta mellan 7 och 9 (Johnson, 2002; Frank, 2011) och *cresty neck score* (CNS) enligt metod av Carter (2009) är ofta över 3 (Frank *et al.*, 2010; Frank, 2011). Vissa drabbade individer är dock smala, på gränsen till underviktiga med ett utdraget, smärtsamt tillstånd av fång (Johnson, 2002).

Vid klinisk undersökning finner man ofta tecken på kronisk fång (sänkt sula, breddad lamellrand och onormala tillväxtlinjer) (Johnson, 2002; Frank, 2011). Röntgen kan visa hovbensrotation eller hovbenssänkning (Johnson, 2002).

Symtomen som ses vid EMS liknar symtomen som ses vid hypoadrenokorticism (Cushing's syndrom). Ett dexametason-hämningstest eller ACTH-stimuleringstest kan särskilja de båda tillstånden då en häst med EMS visar normala värden vid de båda testmetoderna, vilket utesluter att hypofysens pars intermedia fungerar onormalt (Johnson, 2002).

Den viktigaste behandlingen för hästar med insulinresistens och EMS är minskat foderintag, framförallt intaget av kraftfoder/snabba kolhydrater samt viktminskning med hjälp av ökad motion. Det är däremot viktigt att inte utsätta hästen för ökad belastning/motion om hästen drabbats av fång innan den är helt utläkt (Johnson, 2002, Geor *et al.*, 2008).

### Insulinresistens

När plasmaglukoskoncentrationen stiger svara  $\beta$ -cellerna i pancreas med att insöndra insulin. Insulin har till uppgift att öka glukosupptaget i muskel- och fettceller samt minska produktionen av glukos i levern och fungerar därmed som den primära regulatören av blodglukoskoncentrationen och håller denna stabil. På cellnivå binder insulin till en specifik receptor på cellytan, vilket aktiverar en intracellulär kaskad av signaler. I skelettmuskulatur leder detta till att antalet GLUT-4 (glukos transport protein 4) receptorer på cellens yta ökar varvid mer glukos kan transporteras in i cellen (Saltiel *et al.*, 2001).

Om de perifera vävnaderna eller levern inte skulle svara på önskvärt sätt talar man om nedsatt insulinkänslighet eller insulinresistens.



## **Diagnostisering av insulinresistens**

### *Metoder för forskning*

Inom forskarvärlden används framförallt två metoder för att kvantitativt mäta graden av insulinresistens, *Euglycemic-hyperinsulinemic Clamp* (EHC) och *Frequently sampled intravenous glucose tolerance test* (FSIGT). Vid genomförande av EHC induceras och bibehålls en hyperinsulinemi via insulininfusion medan blodglukosnivån hålls konstant (normoglykemi) via en glukosinfusion. Negativ feedback från den exogena insulintillförseln gör att endogent glukos inte frisätts och den hastighet med vilken glukos infuseras för att upprätthålla normoglykemin motsvarar glukosupptaget av kroppens vävnader. Glukosinfusionens hastighet är därmed ett mått på vävnadernas känslighet mot exogent insulin. Vid FSIGT injiceras en glukoslösning vid tidpunkt noll och insulin vid tidpunkt 15 minuter. Emellan och efter dessa injektioner tas frekventa blodprover i vilka glukos- och insulinkoncentrationerna mäts. Värdena för glukos- och insulinkurvan analyseras därefter i ett matematiskt dataprogram och värden för bland annat vävnadens insulinkänslighet erhålls (Pratt *et al.*, 2005; Treiber *et al.*, 2006).

Både EHC och FSIGT är kvantitativa metoder, vilka ger ett mått på en eventuell insulinresistens. Båda metoderna är testade på häst men kräver omfattande arbete och tillgång till dyra dataprogram. Testerna används därför inte i kliniken.

### *Fasteprovn för insulin och glukos*

Det enklaste, snabbaste och billigaste sättet att indikera eventuell IR är att ta ett fastebloodprov och analysera glukos- och insulinkoncentrationerna. En insulinresistent häst visar ofta normalt blodglukos på grund av att pancreas kompenserar den minskade känsligheten för insulin i kroppens vävnader med att öka insöndringen av insulin. Hästen blir istället hyperinsulinemisk. Skulle hästen visa hyperglykemi med normoinsulinemi är det ett tecken på att insulinresistensen pågått under en längre period och pancreasinsufficiens utvecklats (Kronfeld *et al.*, 2006). Referensvärden för fastebloodprov ligger hos häst på < 6,1 mmol/l för glukos och < 20 mU/l för insulin (Frank *et al.*, 2009; Frank *et al.*, 2010; Frank, 2011).

Fasteprovn kan i vissa situationer vara missvisande. Det gäller hästar som av någon anledning är stressade eller utsätts för smärta, till exempel på grund av fång. Det gäller även när insulinresistensen är lindrig och insulinvärdena hamnar inom referensramen eller då pancreasinsufficiens utvecklats och insulinvärdena av den anledningen inte når över referensvärdena. I det sistnämnda fallet är dock glukoskoncentrationen förhöjd (Kronfeld *et al.*, 2006; Frank *et al.*, 2009; Frank *et al.*, 2010).

### *Dynamiska tester*

Förutom de ovan nämnda testerna finns några dynamiska tester, vilka kan användas på klinik. Det är oralt glukostoleranstest (OGTT), intravenöst glukostoleranstest (IVGT) och insulintoleranstest (ITT).

Vid OGTT och IVGT ges en glukoslösning antingen oralt via nässvalgsönd (1 g/kg) eller via intravenös kateter (0,5 mg/kg). Därefter tas blodprover efter ett förutbestämt schema och glukoskoncentrationen analyseras. Vid OGTT visar en frisk häst kraftigast hyperglykemi runt 90-120 minuter och är efter 4-6 timmar nere på normoglykemi igen (Firshman *et al.*, 2007; Ralston, 2002). Skulle glukosresponsen vara högre än normalt kan detta tyda på insulinresistens eller pancreasinsufficiens. Är däremot glukosresponsen lägre kan ökad insulinkänslighet, nedsatt absorption i tarmen eller försenad magsäckstömning vara orsaken (Ralston, 2002). Vid IVGT förväntas en kraftig hyperglykemi vid 15 minuter hos en frisk häst varefter hästen inom en timme nått normoglykemi igen. En häst med insulinresistens får en förlängd hyperglykemifas (Firshman *et al.*, 2007; Ralston, 2002).

Vid ITT ges istället för glukos en insulininjektion (0,1 IE/kg). Efter insulininjektionen tas blodprover var 30:nde minut i tre timmar och blodglukoskoncentrationen analyseras. Hos en frisk häst ska blodglukoskoncentrationen sjunka med 50 % inom 20-30 minuter efter insulininjektionen för att sedan stiga till normoglykemi igen vid 1,5-2 timmar. En häst vars glukoskoncentration inte nått under 50 % inom 30 minuter diagnosticeras som insulinresistent (Kaneko, 1989).

Genom att kombinera IVGT och ITT tog Eiler *et al.* fram ett kombinerat glukos- och insulintoleranstest (CGIT) 2005. Detta test går ut på att man efter att ha tagit ett nollprov på hästen injicerar glukos (150 mg/kg) direkt följt av insulin (0,1 IE/kg) varefter man tar blodprover vid tidpunkterna 1, 5, 15, 25, 35, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 och 150 minuter efter glukosinjektionen. Blodproverna analyseras för plasmainsulin och plasmaglukos och koncentrationerna av vardera glukos och insulin plottas mot tiden varvid en bifasisk kurva med en positiv fas följt av en negativ fas fås. Enligt författarna bör insulinresistens misstänkas i de fall kurvan inte följer samma bifasiska mönster antingen där kurvan är förskjuten åt höger eller där den negativa fasan uteblir. Baserat på artiklar av Frank *et al.*, 2009; Frank *et al.*, 2010 samt Frank, 2011 ska diagnosen insulinresistent ställas med hjälp av CGIT i de fall där insulinkoncentrationen är över 100 mU/l eller glukoskoncentrationen över sin basnivå vid tidpunkten 45 minuter efter glukosinjektionen.

Idag används CGIT på kliniker för att diagnosticera insulinresistens på misstänkta fall av EMS. För att genomföra testet krävs att hästen transporteras till kliniken någon dag innan. Att transport av häst är ett stressmoment har tidigare visats av Geor *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2009 och Schmidt *et al.*, 2010. Stress leder till en ökad frisättning av kortisol, vilket i sin tur kan leda till tillfällig insulinresistens. Det är därför viktigt att utvärdera huruvida ett CGIT kan genomföras efter att hästen har transporterats. Skulle det visa sig att värdena blir falskt positiva kan man behöva byta strategi och istället genomföra testet i hästens hemmiljö. CGIT är en diagnosmetod, som är praktiskt tillämpbar i en normal stallmiljö.

## **SYFTE**

Huvudsyftet med den här studien var att undersöka huruvida resultatet av ett kombinerat glukos- och insulintoleranstest på häst, genomfört i hästens hemmiljö skiljer sig från det resultat som fås efter att hästen har transporterats till en ny miljö.

Ett andra syfte med studien var att undersöka reproducerbarheten av testen då det finns få studier gjorda på detta.

## **MATERIAL OCH METODER**

### **Hästar**

Totalt 18 hästar användes i studien. Av dessa var nio varmblodiga travare och nio islandshästar. Samtliga hästar var friska och genomgick klinisk undersökning dagen innan försöket påbörjades. Den kliniska undersökningen inkluderade kontroll av allmäntillstånd, kroppstemperatur, slemhinnor och digitalpuls samt auskultation av hjärta, lungor och buk. För att säkerställa att hästarna inte var insulinresistent provtogs de med avseende på plasmainsulin och plasmaglukos innan försöket påbörjades (Frank, 2011). Studien pågick under våren 2011 och var godkänd av Centrala försöksdjursnämnden, diarienummer C27/11 Uppsala Djurförsöksetiska Nämnd.

### **Varmblodiga travhästar**

Sju ston och två valacker användes. Medelåldern var 15,0 år (6-20 år). Samtliga hästar ägdes av institutionen för kliniska vetenskaper, Sveriges lantbruksuniversitet och användes i undervisning av veterinärstudenter. Hästarna vistades normalt i hage dagtid och resterande del av dygnet i enskilda boxar med halm som strömedel. De utfodrades med hö tre gånger om dagen och en mindre mängd kraftfoder en gång per dag. Hästarnas medelvikt var 504 kg (418-586). Medeltalet av hästarnas BCS enligt Henneke *et al.* (1983) var 5,8 (5-6) och CNS enligt Carter *et al.* (2009) var 1,9 (1-3) (Tabell 1).

### **Islandshästar**

Sju ston och två valacker användes. Medelålder var 14,5 år (10-18 år). Samtliga ägdes av ett privatägt företag, vilka anordnar ridlektioner och turridning. De båda stona vistades normal i hage dagtid och stod uppstallade i box med spånbädd under natten. Valackerna gick på lösdrift med flertalet andra hästar i en 20 tunnland stor hage med ligghall. Alla hästarna utfodrades tre gånger per dag med hösilage. De hade fri tillgång på salt och vatten och fick mineralfoder dagligen. Hästarna reds 3-5 gånger i veckan, ca 1-1,5 timme per pass. Hästarnas medelvikt var 380 kg (326-445). Medeltalet av hästarnas BCS enligt Henneke *et al.* (1983) var 6,7 (5-7) och CNS enligt Carter *et al.* (2009) var 2,8 (2-3) (Tabell 1).

### **Transporthästar**

Av de totalt 18 hästarna användes åtta (fyra varmblodiga travhästar och fyra islandshästar) i en studie av transportens påverkan.

Av de fyra varmblodiga travhästar som användes var en valack och tre ston. Medelåldern var 13,0 år (6-19 år). Hästarnas medelvikt var 508 kg (425-586). Medeltalet av hästarnas BCS enligt Henneke *et al.* (1983) var 5,5 (5-6) och CNS enligt Carter *et al.* (2009) var 1,8 (1-3) (Tabell 2).

Av de islandshästar som användes var två ston och två valacker. Medelåldern var 14,0 år (10-18 år). Hästarnas medelvikt var 377 kg (326-412). Medeltalet av hästarnas BCS enligt Henneke *et al.* (1983) var 5,8 (5-8) och CNS enligt Carter *et al.* (2009) var 2,5 (2-3) (Tabell 3).

## Studiedesign

Ett CGIT genomfördes på studiens samtliga 18 hästar i två testomgångar i hästarnas hemmiljö med tre veckors intervall. Därefter fick åtta av hästarna (fyra varmblod och fyra islandshästar) genomgå en tredje testomgång ytterligare två veckor senare. Den tredje testomgången genomfördes efter att hästarna transporterats till en för dem ny miljö. Transporten skedde i normalstor hästransport, dragen av personbil och tog 60 minuter. De varmblodiga travhästarna transporterades en och en medan islandshästarna åkte tillsammans, två och två.

Under testets genomförande var hästarna uppstallade i enskilda boxar. De fick svälta från kl. 17.00 dagen innan men med fri tillgång till vatten. Instrumentering av hästarna påbörjades kl. 06.00 på morgonen. Testet (CGIT) startade mellan kl. 08.00 och 08.40 och så snart testet var genomfört fick hästarna foder och återgick till normal aktivitet.

För varje testomgång genomfördes samma procedur som beskrivs nedan.

### **CGIT**

Permanentkatetrar<sup>1</sup> anlades i båda jugularvenerna efter lokalanestesi<sup>2</sup>. Katetrarna syddes fast med två stygn och en förlängningsslang<sup>3</sup> applicerades till katetrarna. Ena sidans kateter märktes med gul tejp för infusion medan andra sidans kateter märktes med grön tejp för provtagning. Provtagning för fastställande av hästarnas basnivå av insulin respektive glukos (nollprov) utfördes vid tidpunkterna 60, 40, 20 och 2 minuter innan CGIT påbörjades. Samtliga nollprover togs genom aspiration från katetern märkt provtagning (grön), vilken därefter spolades med 5 ml 0,9 % natriumklorid<sup>4</sup>.

En minut efter sista nollprovet injicerades glukoslösning (150 mg/kg)<sup>5</sup> under < 45 sekunder i katetern märkt infusion (gul) och tiden 0 sattes då glukosinjektionen var fulländad. Insulin (0,1 IE/kg)<sup>6</sup> utspädd i 3 ml 0,9 % natriumklorid injicerades direkt efter glukosinfusionen. Mellan glukos- och insulininfusionen samt efter insulininfusionen spolades katetern med 5 ml 0,9 % natriumklorid.

Blodprover togs vid tidpunkterna 1, 5, 15, 25, 35, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 och 150 minuter. Samtliga blodprover aspirerades från permanentkatetern märkt med provtagning (grön) med 20 ml spruta och fördes direkt över till Litium-heparinrör<sup>7</sup>. Innan provet togs aspirerades 5 ml blod, vilket kastades bort. Efter varje prov spolades katetern med 0,9 % natriumklorid. Proverna sattes på is och centrifugerades i kyla (+4°C) under 10 minuter i 906 g. Plasman överfördes till endendorfrör och frystes i -80°C i väntan på analys.

---

<sup>1</sup> Intranule, Vygon, Ecouen, Frankrike

<sup>2</sup> EMLA-krem, 25 mg/g, AstraZeneca AB, Södertälje, Sverige

<sup>3</sup> Discifix, B. Braun Medical AG, Schweiz

<sup>4</sup> B. Braun Medical AB, Danderyd, Sverige

<sup>5</sup> Glukos Baxter 500 mg/ml, Baxter Medical AB, Kista, Sverige

<sup>6</sup> Humulin Regular 100 IE/ml, Eli Lilly Sweden AB, Sverige

<sup>7</sup> BD Vacutainer, BD Plymouth, Storbritannien

## **Analyser**

### **Blodprovsanalyser**

Blodglukoskoncentrationen mättes på helblod vid de tidpunkter som hypoglykemi misstänktes (35, 45, 60, 75 minuter) för att snabbt kunna sätta in behandling vid behov.

Koncentrationen plasmaglukos analyserades med automatisk analysator<sup>8</sup> inom en månad på Akademiska laboratoriet (Uppsala Akademiska sjukhus, Uppsala, Sweden).

Koncentrationen plasmainsulin analyserades i duplikat med hjälp av ELISA<sup>9</sup> vilken nyligen validerats för hästinsulin enligt Öberg *et al.*, 2011.

### **Statistiska analyser och beräkningar**

För varje individuell CGIT plottades plasmaglukos- respektive plasmainsulin-koncentrationerna mot provtagnings-tidpunkterna med hjälp av dataprogrammet Sigma Plot 11,0<sup>10</sup>. Medelvärdet av varje tests baskoncentrationer (nollprov) av plasmaglukos respektive plasmainsulin vid tidpunkterna -60, -40, -20 och -2 minuter användes tillsammans med respektive kurva för kalkylering av positiva (PFD) respektive negativa (NFD) fasdurationen, arean under kurvan för glukos ( $AUK_{glu}$ ) och insulin ( $AUK_{ins}$ ), duration till dess insulinet nått koncentrationen 100 mU/l ( $DIK_{100}$ ) samt glukoskurvas *clearance rate*.

PFD motsvarar tiden från tidpunkt noll till dess glukoskurvan skar sin baslinje på väg från hyperglykemi till hypoglykemi. NFD motsvarar den tid det tog för kurvan att efter att ha skurit baslinjen första gången åter nådde sin baslinje (hypoglykemifasen).

$AUK_{glu}$  och  $AUK_{ins}$  beräknades med trapezoidmetoden i samma program som ovan. Resultaten av upprepade tester jämfördes med parat t-test eller ANOVA för upprepade mätningar med en faktor (tid) eller två faktorer (tid och testtillfälle).

Mätfelet för CGIT, uttryckt som variationskoefficienten (CV), beräknades genom att standardavvikelsen för varje par av mätvärde i testomgång 1 och 2 dividerades med mätvärdenas respektive medelvärde och slutligen multiplicerades med 100. Standardavvikelsen för de parade mätvärdena beräknades enligt Bland (2000).

Signifikansen sattes till  $P < 0,05$  och resultaten redovisades som medelvärdet och standardavvikelsen (SD).

---

<sup>8</sup> Architect ci8200, Abbott Scandinavia AB Diagnostics, Solna, Sverige

<sup>9</sup> Insulin ELISA, Mercodia AB, Uppsala, Sverige

<sup>10</sup> Systat Software UK Limited, London, Storbritannien

## RESULTAT

Ingen signifikant skillnad sågs i hästarnas vikt, BCS eller CNS för de tre testomgångarna. Samtliga hästarnas fasteprov visade normoinsulinemi (< 20 mU/l) och normoglykemi (6,1 mmol/l) (Frank *et al.*, 2009; Frank *et al.*, 2010; Frank, 2011) inför samtliga testomgångar förutom för en islandshäst som uppvisade hyperinsulinemi (värdet 23,9 mU/l) inför testomgång två (Tabell 1, 2 och 3). En av de varmblodiga travhästarna uppvisade 45 minuter in i första testomgången symtom på hypoglykemi i form av svettningar, onormala ögonblinkningar och muskelfascikulationer varvid testet avbröts och hästen behandlades med glukoslösning intravenöst till dess normoglykemi uppnått och symtomen försvunnit. Hästen deltog i testomgång två utan att uppvisa kliniska symtom på hypoglykemi. Ytterligare några hästar visade lindriga hypoglykemiska symtom såsom svettningar och onormala blinkningar men bedömdes kunna fortsätta testet utan behandling.

Tabell 1. Grunddata för 18 hästar (9 varmblodiga travhästar och 9 islandshästar), vilka deltog i genomförandet av ett kombinerat glukos- och insulintoleranstest (CGIT) i två omgångar.

Variabler	Varmblodiga travare (n=9)		Islandshästar (n=9)	
	Testomgång 1	Testomgång 2	Testomgång 1	Testomgång 2
Vikt (kg)	505,8 ± 46,3	504,6 ± 47,7	379,1 ± 36,7	381,2 ± 34,7
BCS (1-9)	5,2 ± 0,4	5,2 ± 0,4	5,9 ± 0,8	5,7 ± 0,7
CNS (1-5)	1,9 ± 0,3	1,9 ± 0,3	2,7 ± 0,5	2,8 ± 0,4
Fasteglukos (mmol/l)	4,4 ± 0,6	4,6 ± 0,3	4,3 ± 0,5	4,4 ± 0,5
Fasteinsulin (mU/l)	8,4 ± 4,5	7,2 ± 2,0	10,2 ± 4,2	12,9 ± 10,5

Body condition score (BCS), bedöms enligt en skala på 1 (mager) – 9 (fet). Cresty neck score (CNS) bedöms enligt en skala på 0 (ingen palperbar vävnad ovanför nackligamentet) – 5 (så mycket vävnad ovanför nackligamentet att mankammen faller över på ena sidan). Samtliga värden är redovisade som medelvärdet ± standardavvikelsen.

Tabell 2. Grunddata för 4 varmblodiga travhästar, vilka deltog i genomförandet av ett kombinerat glukos- och insulintoleranstest (CGIT) i tre omgångar varvid den sista skedde efter transport till ny miljö.

Variabler	Varmblodiga travare (n=4)		
	Testomgång 1	Testomgång 2	Testomgång 3 (efter transport)
Vikt (kg)	510,3 ± 64,2	506,5 ± 65,8	506,5 ± 68,4
BCS (1-9)	5,5 ± 0,6	5,5 ± 0,6	5,5 ± 0,6
CNS (1-5)	1,8 ± 0,5	1,8 ± 0,5	2,0 ± 0,8
Fasteglukos (mmol/l)	4,3 ± 0,6	4,8 ± 0,3	4,4 ± 0,5
Fasteinsulin (mU/l)	8,8 ± 4,2	7,3 ± 2,7	6,2 ± 1,2

Body condition score (BCS), bedöms enligt en skala på 1 (mager) – 9 (fet). Cresty neck score (CNS) bedöms enligt en skala på 0 (ingen palperbar vävnad ovanför nackligamentet) – 5 (så mycket vävnad ovanför nackligamentet att mankammen faller över på ena sidan). Samtliga värden är redovisade som medelvärdet ± standardavvikelsen.

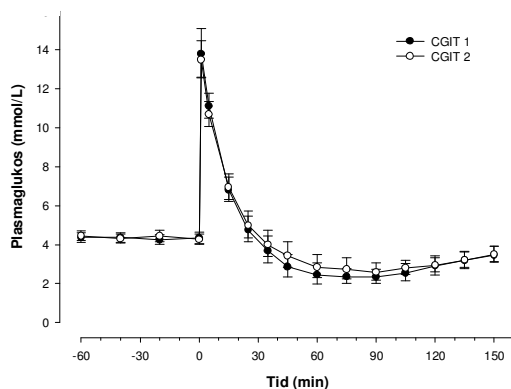
Tabell 3. Grunddata för 4 islandshästar, vilka deltog i genomförandet av ett kombinerat glukos- och insulintoleranstest (CGIT) i tre omgångar varvid den sista skedde efter transport till ny miljö.

Variabler	Islandshästar (n=4)		
	Testomgång 1	Testomgång 2	Testomgång 3 (efter transport)
Vikt (kg)	379,3 ± 38,3	381,3 ± 37,2	372,8 ± 35,3
BCS (1-9)	6 ± 1,2	5,8 ± 1,0	5,8 ± 1,0
CNS (1-5)	2,5 ± 0,6	2,5 ± 0,6	2,5 ± 0,6
Fasteglukos (mmol/l)	4,3 ± 0,3	4,4 ± 0,4	4,6 ± 0,6
Fasteinsulin (mU/l)	10,2 ± 4,1	7,8 ± 3,3	10,7 ± 5,4

Body condition score (BCS), bedöms enligt en skala på 1 (mager) – 9 (fet). Cresty neck score (CNS) bedöms enligt en skala på 0 (ingen palperbar vävnad ovanför nackligamentet) – 5 (så mycket vävnad ovanför nackligamentet att mankammen faller över på ena sidan). Samtliga värden är redovisade som medelvärdet ± standardavvikelsen.

Ingen signifikant skillnad sågs i glukos- eller insulinkoncentrationerna under CGIT inom de olika tidpunkterna mellan testomgång 1 och 2 (Fig.1).

A



B

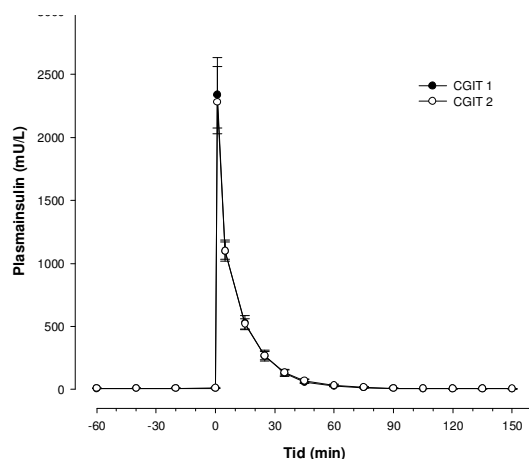


Fig 1. Medelvärdena av glukos- (A) och insulin- (B) koncentrationerna vid två upprepade testomgångar av ett kombinerat glukos- och insulintoleranstest (CGIT) genomfört på 18 friska hästar. Ingen statistisk skillnad sågs vid någon tidpunkt mellan de båda koncentrationerna av glukos respektive insulin ( $P < 0,05$ ).



Medelvärdet av variationskoefficienten (CV) för hela blodglukoskoncentrationskurvan från de två första testomgångarna beräknades till  $17,6 \pm 5,3$  %. Vid beräkning av CV för glukoskoncentrationen för var tidpunkt för sig sågs en skillnad mellan de olika tidpunkterna (Tabell 4).

Tabell 4. Reproducerbarheten uttryckt som variationskoefficienten (CV) för plasmaglukos och plasmainsulin vid olika provtagningstidpunkter under ett CGIT genomfört på 18 friska hästar (9 varmblodiga travhästar och 9 islandshästar). Medelvärden för glukos och insulinkoncentrationerna vid de olika provtillfällena redovisas i figur 1.

Provtagningstid (min)	CV (%)	
	Plasmaglukos	Plasmainsulin
- 60	9,1	50,2
- 40	8,1	60,0
- 20	11,7	37,0
0	10,8	46,0
1	13,0	18,8
5	8,1	7,0
15	14,0	10,0
25	17,1	16,4
35	24,7	19,6
45	29,7	22,6
60	31,9	32,1
75	31,9	43,1
90	26,0	54,0
105	20,1	69,5
120	18,5	58,9
135	16,8	50,6
150	12,0	72,0

CV, variationskoefficient. Beräknad på samtliga hästars värde vid de olika tidpunkterna.

CV för  $AUK_{glu}$ ,  $DIK_{100}$ , och  $AUK_{ins}$  var under 20 % medan övriga variabler ( $PFD_{glu}$ ,  $PFCI_{glu}$  och  $NFCI_{glu}$ ) låg mellan 35 – 45 % (Tabell 5).

Tabell 5. Medelvärdet ( $\pm SD$ ) för beräknade variabler och mätvärden och deras reproducerbarhet vid ett kombinerat glukos- och insulintoleranstest (CGIT) genomfört på 18 friska hästar (9 varmblodiga travhästar och 9 islandshästar) i två testomgångar.

Variabel	Testomgång 1	Testomgång 2	CV (%)
$PFD_{glu}$ (min)	$33,9 \pm 14,7$	$40,2 \pm 22,1$	44,9
$PFCI_{glu}$ (mmol/l/min)	$0,34 \pm 0,16$	$0,30 \pm 0,14$	37,3
$NFCI_{glu}$ (mmol/l/min)	$0,043 \pm 0,019$	$0,039 \pm 0,016$	37,8
$AUK_{glu}$ (mmol/l · min)	$591,6 \pm 93,1$	$617,1 \pm 112,8$	14,6
$DIK_{100}$ (min)	$40,3 \pm 7,8$	$40,7 \pm 6,2$	7,0
$AUK_{ins}$ (mU/l · min)	$25\ 230 \pm 4\ 193$	$25\ 287 \pm 4\ 025$	7,7

$PFD_{glu}$ , positiva fasdurationen för glukoskurvan;  $PFCI_{glu}$ , Clearance rate för glukos under den positiva fasen;  $NFCI_{glu}$ , negativa fasdurationen för glukoskurvan;  $AUK_{glu}$ , arean under kurvan för glukos;  $DIK_{100}$ , duration till dess insulinkoncentrationen nått 100 mU/L;  $AUK_{ins}$ , arean under kurvan för insulin; CV, variationskoefficienten; Ingen statistisk skillnad kunde påvisas för någon variabel mellan testomgång 1 och 2.

I tredje testomgången (efter transport) blev hästarna aldrig hypoglykemiska utan koncentrationerna av plasmaglukos sjönk endast ner till sin basnivå eller något under (Fig 2). Glukoskoncentrationen inom varje tidpunkt i tidsintervallet 25–135 minuter är signifikant högre i tredje testomgången jämfört med de båda testomgångarna i hästarnas hemmiljö.

Ingen signifikant skillnad sågs i insulinkoncentrationerna inom de olika provtagningstidpunkterna mellan de tre testomgångarna (Fig. 2).

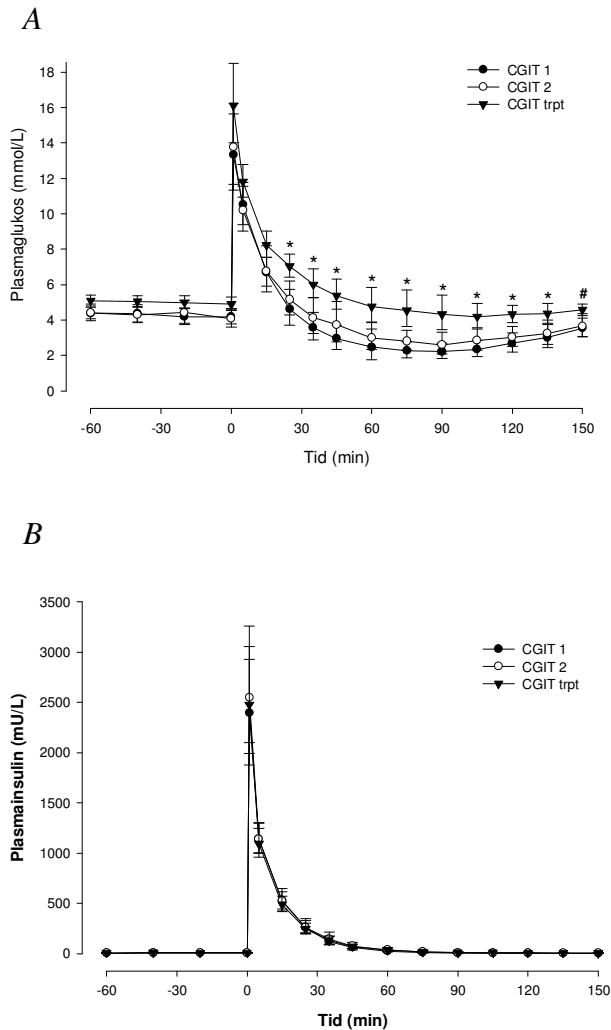


Fig 2. Medelvärdena av glukos- (A) och insulin- (B) koncentrationerna vid tre upprepade testomgångar av ett kombinerat glukos- och insulintoleranstest, varav det tredje efter transport till ny miljö, genomfört på 8 friska hästar (4 varmlodiga travhästar och 4 islandshästar). \* koncentrationen av plasmaglukos skiljer sig signifikant inom en tidpunkt från testomgång 1 och 2 (CGIT 1 & 2). # koncentrationen av plasmaglukos skiljer sig signifikant inom en tidpunkt från testomgång 1 (CGIT 1). Ingen skillnad sågs i insulinkoncentrationerna vid de olika testomgångarna.  $P < 0,05$ .

Tredje testomgången (efter transport) visade en kortare *clearance rate* för glukos jämfört med de tidigare två testomgångarna. Den positiva fasdurationen för glukos kunde inte beräknas då hästarna inte gick ner och korsade sin basnivå under provtagningstiden. Av samma anledning kunde den negativa fasdurationen inte beräknas.  $AUK_{glu}$  var större i tredje testomgången jämfört de två tidigare testomgångarna men ingen skillnad sågs för  $AUK_{ins}$ . Det sågs heller inte någon skillnad i duration till dess insulinvärdet var under 100 mU/l mellan de tre testomgångarna (Tabell 6).

Tabell 6. Medelvärdet ( $\pm SD$ ) för beräknade variabler i ett kombinerat glukos- och insulintoleranstest (CGIT) genomfört på 8 friska hästar (4 varmlodiga travhästar och 4 islandshästar) i tre testomgångar varav den sista efter transport till ny miljö.

Variabel	Testomgång 1	Testomgång 2	Testomgång 3 (efter transport)
$PFD_{glu}$ (min)	30,5 $\pm$ 8,2	42,9 $\pm$ 16,5	N/A
$PFCI_{glu}$ (mmol/l/min)	0,35 $\pm$ 0,18	0,28 $\pm$ 0,12	0,18 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>
$AUK_{glu}$ (mmol/l · min)	559,4 $\pm$ 53,7	648,5 $\pm$ 53,7	848,8 $\pm$ 111,7 <sup>a</sup>
$DIK_{100}$ (min)	40,0 $\pm$ 7,6	42,4 $\pm$ 7,7	41,1 $\pm$ 6,1
$AUK_{ins}$ (mU/l · min)	25 626 $\pm$ 4 929	26 801 $\pm$ 4 626	25 467 $\pm$ 3 456

$PFD_{glu}$ , positiva fasdurationen för glukoskurvan;  $PFCI_{glu}$ , Clearance rate för glukos under den positiva fasen;  $AUK_{glu}$ , arean under kurvan för glukos  $DIK_{100}$ , duration till dess insulinconcentrationen nått 100 mU/L;  $AUK_{ins}$ , arean under kurvan för insulin; N/A, *Not Applicable* (har ej kunnat beräknas). <sup>a</sup>  $P < 0,05$  för testomgång 3 jämfört testomgång 1 och 2. <sup>b</sup>  $P < 0,05$  för testomgång 3 jämfört med testomgång 1.

## DISKUSSION

Samtliga hästar som deltog i den här studien hade normalt hull, var friska vid den kliniska undersökningen och uppvisade normala fastevärden på såväl plasmaglukos som plasmainsulin. De glukoskurvor som plottades visade en tydlig positiv fas (hyperglykemi) följt av en negativ fas (hypoglykemi) vid de två testomgångarna i hästarnas hemmiljö. Vid den tredje testomgången (efter transport) uteblev den negativa fasen och det tog längre tid för hästarna att nå sitt fastevärde för glukos medan insulinkurvorna var desamma vid samtliga tre testomgångar.

När CGIT togs fram 2005 visade Eiler *et al.* att reproducerbarheten för testet uttryckt som medelvariationskoefficienten (CV) för hästarnas glukoskurvor (baserad på glukoskoncentrationerna vid kurvans samtliga tidpunkter) var på en acceptabel nivå ( $14,9 \pm 6,4$  %). I den här studien var CV för glukoskurvans samtliga glukoskoncentrationer (testomgång 1 och 2, på 18 hästar)  $17,6 \pm 5,3$  %, vilket är jämförbart med den tidigare studien. Att redovisa reproducerbarheten av ett CGIT enbart genom CV för kurvans samtliga glukoskoncentrationer är dock inte optimalt då glukoskoncentrationerna skiljer sig avsevärt genom testets gång (hyperglykemi följt av hypoglykemi). I denna studie valdes att studera CV vid varje tidpunkt, vilket gav ett mer rättvist resultat.

Eiler *et al.* valde 2005 att använda parametrarna  $PFD_{glu}$  samt insulinkoncentrationen vid tidpunkten 45 minuter för att ställa en diagnos.  $PFD_{glu}$  ska hos en frisk häst vara kortare än 45 minuter, det vill säga innan 45 minuter ska hästens glukoskoncentration ha sjunkit ner till sitt fastvärde eller under detta. Insulinkoncentrationen ska vid tidpunkt 45 minuter vara under 100 mU/l. Enligt författarna skulle diagnosen insulinresistent ställas om en av dessa parametrar var onormal.

Baserat på samtliga 18 hästar i denna studie och de två första testomgångarna har CV för  $PFD_{glu}$  beräknats till 44,9 % och CV för glukoskoncentrationen vid 45 minuter till 29,7 %. Båda dessa värden är höga, vilket visar att det råder en stor dag till dag variation för dessa parametrar. Eftersom reproducerbarheten är dålig för  $PFD_{glu}$  och för glukoskoncentrationen vid 45 minuter bör inte diagnosen IR ställas enbart baserat på dessa parametrar.

Variationskoefficienten för insulinkoncentrationen vid tidpunkten 45 minuter var lägre (22,9 %) jämfört med motsvarande värde för glukoskurvan (29,7%). Då författarna till CGIT valt att använda insulinkoncentrationen vid 45 minuter som parameter och att denna inte ska vara högre än 100 mU/l valdes att i denna studie även studera durationen till dess insulinet nådde samma koncentration ( $DIK_{100}$ ). För både testomgång ett och två var  $DIK_{100}$  i medeltal under 45 minuter och uppvisade en god reproducerbarhet (CV 7,0 %). Det låga CV-värdet för  $DIK_{100}$  i kombination med CV-värdet för insulinkoncentrationen vid 45 minuter gör att diagnosen IR istället bör baseras på  $DIK_{100}$  eller insulinkoncentrationen vid 45 minuter, eventuellt i kombination med onormal glukoskoncentration.

Reproducerbarheten för  $AUK_{glu}$  och  $AUK_{ins}$  var mycket goda (CV 14,6% respektive 7,7 %).  $AUK$  kan dock visa liknande värden trots att kurvorna ser helt

olika ut. Till exempel kan en häst med kraftig hyperglykemi under en kortare tid få samma värde som en häst med låg hyperglykemi under lång tid. Den första av dessa skulle klassas som frisk medan den andra skulle diagnosticeras med insulinresistens trots att deras areor under kurvan är desamma. AUK kan därför inte anses vara en tillförlitlig parameter att använda ensamt vid diagnosticering av insulinresistens.

Vid testomgång tre (efter transport) sågs en signifikant skillnad i glukoskoncentration jämfört med de båda tidigare testomgångarna i tidpunkterna 15 – 150 minuter.  $AUK_{glu}$  och  $PFD_{glu}$  var signifikant högre i tredje testomgången. En högre  $PFD_{glu}$  visar att hästarna hade en längre hyperglykemisk fas och det tog längre tid för dem att sjunka ner till fastvärdet för glukos. Detta ger indirekt ett högre värde även för  $AUK_{glu}$  samt ett lägre värde på clearance rate för glukos under den hyperglykemiska fasen. Ingen signifikant skillnad kunde ses på insulinkurvan i tredje testomgången jämfört med de båda tidigare testomgångarna och inte heller sågs någon skillnad för  $AUK_{ins}$  eller  $DIK_{100}$ . Oförändrat insulin i kombination med högre glukoskoncentration tyder på lägre insulinkänslighet och därmed viss insulinresistens.

Ingen av de åtta hästar som användes i tredje testomgången visade symtom på insulinresistens enligt den kliniska undersökning som genomfördes dagen innan varje testomgång. Ingen skillnad i vikt eller hull kunde ses varför en viktökning kan uteslutas som anledning till de högre värdena. Hästarnas foderstat har inte heller ändrats under den period då testet genomfördes och kan därmed också uteslutas som anledning till den lägre insulinkänsligheten, som sågs under testomgång tre.

Tidigare studier har visat att transport av hästar (Schmidt *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2010) och åsnor (Forhead *et al.*, 1995) uppfattas av djuren som stressande varvid de får en förhöjd kortisolnivå i blodet, vilket kan blockera insulinreceptorerna och orsaka en tillfällig insulinresistens. Likaså kan svält men även utfodring orsaka stress enligt tidigare studier (Forhead *et al.*, 1995). Anledningen till den till höger förskjutna glukoskurvan kan bero på stress i samband med transport, ny miljö, svält eller att hästarna är insulinresistenta, dock visade hästarna normala resultat vid de testomgångar som genomfördes i hästarnas normala vistelsemiljö, vilket gör att stress på grund av någon av ovanstående faktorer är mest trolig som orsak till den förskjutna kurvan.

För att säkerställa att ingen av hästarna är insulinresistent innan de ingår i en studie som denna skulle man kunna genomföra ett av de mer avancerade testerna (EHC eller FSIGT) innan försöksstarten. Detta skulle ge ett säkert svar på att endast friska hästar används. Dessa tester är dock både dyra och arbetskrävande varför det inte var möjligt att genomföra någon av dessa inför denna studie. Den kliniska undersökningen, fasteproverna och normala värden vid de båda testomgångarna i hästens hemmiljö får anses ge tillräcklig säkerhet på att hästarna är friska.

I denna studie fick hästarna svälta under natten till testdagen samt under testets genomförande för att blodglukoskoncentrationen inte skulle påverkas av annat än det glukos som injicerades. Inom forskarvärlden råder delade meningar om

huruvida hästarna ska svälta eller tillåtas äta mindre mängder grovfoder under testets genomförande. Forhead *et al.* visade 1995 att svält orsakade förhöjda kortisolvärden hos åsnor, vilket i sin tur kan leda till tillfällig insulinresistens. Samma studie visar även att utfodring av åsnor kan ge ett tillfälligt förhöjt kortisolvärde. Grovfodrets inverkan på ett glykemiskt index är heller inte ordentligt utvärderat. För att kunna fastställa huruvida den bästa metoden är att svälta hästarna eller utfodra dem med grovfoder krävs vidare studier på svältens påverkan på hästarna samt grovfodrets påverkan på det glykemiska indexet.

I denna studie genomfördes de båda testerna i hästens hemmiljö först och testomgången där hästarna transporterades efter dessa. Detta kan ha gjort att hästarna vid transportstudien redan visste vad som komma skulle och därmed stressade upp sig på grund av den anledningen. För att undvika detta kunde man ha slumpat ordningen av de tre testomgångarna. På grund av praktiska skäl var detta inte möjligt varför testomgången där hästarna transporterades genomfördes sist.

Urvalet av hästar till den tredje testomgången baserades på vilka hästar som fanns tillgängliga just den helg som testet planerades köras. Av de varmblodiga travhästarna valdes hästar ut som inte deltog i andra aktiviteter eller visade tecken på brunst. Av islandshästarna valde djurägaren ut de hästar som de visste inte skulle delta i andra aktiviteter och som de ansåg var lämpliga att transportera. Två utav dessa var vana att transporteras medan de andra två inte hade samma vana. Lastning och lossning av samtliga hästar skedde utan stress. De varmblodiga hästarna var något mer stressade vid ankomst och placering i den nya miljön jämfört med islandshästarna men samtliga acklimatiserades sig snabbt. En utav de varmblodiga travhästarna stressade upp sig under kanyllläggning på testdagen (i den nya miljön) men lugnade sig så snart han placerats i boxen igen. För övrigt har all hantering av hästarna skett under så lugna former som möjligt för att minimera stress som riskfaktor.

## **KONKLUSION**

Den här studien visade att det fanns en låg reproducerbarhet för  $PFD_{glu}$  i ett CGIT genomfört på 18 friska hästar varför diagnosen IR inte bör ställas enbart med avseende på denna parameter. Studien visade även att transport av häst till ny miljö dagen innan CGIT genomförs påverkar resultatet av glukoskurvan men inte insulinkurvan, vilket tyder på viss IR. Testet borde därför istället genomföras i hästens hemmiljö.

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Bland, M. (2000) An introduction to medical statistics. Third edition. 270-271.
- Carter, R. A., Geor, R. J., Staniar, W. B., Cubitt, T. A., Harris, P. A. (2009) Apparent adiposity assessed by standardised scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies. *The Veterinary Journal* 179, 204-210.
- Eiler, H., Frank, N., Andrews, F. M., Oliver, J. W., Fecteau, K. A., (2005) Physiological assessment of blood glucose homeostasis via combined intravenous glucose and insulin testing in horses. *AJVR*, 66 (9), 1598-1604.
- Frishman, A. M., Valberg, S. J., (2007) Factors affecting clinical assessment of insulin sensitivity in horses. *Equine Veterinary Journal*, 39 (6), 567-575.
- Forhead, A. J., Smart, D., Smith, R. F., Dobson, H. (1995) Transport-induced stress responses in fed and fasted donkeys. *Research in Veterinary Science* 58, 144-151.
- Frank, M. A., Frank, N. (2009) Pathology of Metabolic Related Conditions, Equine Metabolic Syndrome. *Kentucky Equine Research, Advances in Equine Nutrition* (4), 284-292.
- Frank, N., Geor, R. J., Bailey, S. R., Durham, A. E., Johnson, P. J., (2010) Equine Metabolic Syndrome. ACVIM Concensus statement, *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24, 467-475.
- Frank, N. (2011) Equine metabolic syndrome. *Veterinary Clinics of North America Equine Practice* 27, 73-92.
- Geor, R.J. (2008) Metabolic predispositions to laminitis in horses and ponies: obesity, insulin resistance and metabolic syndromes. *Journal of Equine Veterinary Science* 28 (12), 753-759.
- Henneke, D. R., Potter, G. D., Kreider, J. L., Yeates, B. F. (1983) Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Veterinary Journal* 15, 371-372.
- Johnson, P. J. (2002) The equine metabolic syndrome peripheral Cushing's syndrome. *Veterinary Clinics of North America Equine Practice* 18, 271-293.
- Kaneko, J. J. (1989) Carbohydrate metabolism and its diseases. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 4<sup>th</sup> ed, Editors: Kaneko, J. J., Harvey, J. W., Bruss, M. L. Academic Press Inc. San Diego. 45-80
- Kronfeld, D. S., Treiber, K. H., Hess, T. M., Splan, R. K., Byrd, B. M., Staniar, B., White, N. W. (2006) Metabolic syndrome in healthy ponies facilitates nutritional countermeasures against pasture laminitis. *The Waltham International Nutritional Sciences Symposia*.
- 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 Medicine* 19, 883-888.
- Ralston, S. L. (2002) Insulin and glucose regulation. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 18, 295-304.
- Saltiel, A. R., Kahn, C. R. (2001) Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806
- Schmidt, A., Biau, S., Möstl, E., Becker-Birck, M., Morillon, B., Aurich, J., Faure, J-M., Aurich, C. (2009) Changes in cortisol release and heart rate variability in sport horses during long-distance road transport. *Domestic Animal Endocrinology* 38, 179-189.

- Schmidt, A., Hödl, S., Möstl, E., Aurich, J., Müller, J., Aurich, C. (2010) Cortisol release, heart rate, and heart rate variability in transport-naïve horses during repeated road transport. *Domestic animal Endocrinology* 39, 205-213.
- Treiber, K. H., Kronfeld, D. S., Geor, R. J. (2006) Insulin resistance in equids: Possible role in laminitis. *The Waltham International Nutritional Sciences Symposia*.
- Quinn, R. W., Burk, A. O., Hartsock, T. G., Petersen, E. D., Whitley, N. C., Treiber, K. H., Boston, R. C., (2008) Insulin sensitivity in thoroughbred geldings: effect on weight gain, diet and exercise on insulin sensitivity in thoroughbred geldings. *Journal of Equine Veterinary Science* 28 (12), 728-738.
- Öberg, J., Lilliehöök, I., Wattle, O. (2011) Validation of a species specific enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of serum insulin in horses. (abstr) *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2009:23, 778-779.