



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin  
och husdjursvetenskap**  
Institutionen för Kliniska vetenskaper

# Utvärdering av oralt glukostoleranstest för diagnosticering av insulinresistens hos häst

*Moa Berggren*

*Uppsala  
2014*

*Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet*

*ISSN 1652-8697  
Examensarbete 2014:50*



# Utvärdering av oralt glukostoleranstest för diagnosticering av insulinresistens hos häst

## Evaluation of an oral glucose tolerance test for diagnosing insulin resistance in horses

*Moa Berggren*

*Handledare: Johan Bröjer, Institutionen för Kliniska Vetenskaper*

*Biträdande handledare: Sanna Truelsen Lindåse, Institutionen för Kliniska Vetenskaper*

*Examinator: Inger Lilliehöök, Klinisk kemiska laboratoriet, UDS*

*Examensarbete i veterinärmedicin*

*Omfattning: 30 hp*

*Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E*

*Kurskod: EX0736*

*Utgivningsort: Uppsala*

*Utgivningsår: 2014*

*Delnummer i serie: Examensarbete 2014:50*

*ISSN: 1652-8697*

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

*Nyckelord: insulinresistens, oralt glukostoleranstest, ekvint metabolt syndrom, fång*

*Key words: insulin resistance, oral glucose tolerance test, equine metabolic syndrome, laminitis*

Sveriges lantbruksuniversitet

---

Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för Kliniska vetenskaper

## SAMMANFATTNING

Fång är ett ökande problem i hästpopulationen och ett samband mellan fetma, insulinresistens och en förhöjd risk för fång har setts i ett flertal studier. Fältdiagnostiken för påvisande av insulinresistens är idag mycket begränsad och de metoder som framför allt används, mätning av fasteinsulin- och fasteglukoskoncentrationer via blodprov, har visat sig ha låg tillförlitlighet och reproducerbarhet. Behovet av en enkel och pålitlig fältdiagnostisk metod för utvärdering av insulinkänslighet hos hästar är därför stort.

Studien syftade till att utvärdera ett oralt glukostoleranstest (OGT) som alternativ till dagens fältdiagnostiska metoder för detektion av insulinresistens hos häst. Genom att diagnosticera insulinresistenta hästar, samt de hästar som befinner sig i riskzonen för att utveckla insulinresistens, kan förebyggande åtgärder vidtas och en uppföljning av dessa åtgärder göras med hjälp av OGT, vilket kan leda till att hästarna på så sätt fortsättningsvis kan hållas friska.

14 kliniskt friska varmblodiga travare användes i försöket. Samtliga hästar genomgick, förutom det orala glukostoleranstestet, en euglykemisk hyperinsulinemisk clamp (EHC) för kvantifiering av deras insulinkänslighet.

I det orala glukostoleranstestet gavs försökshästarna glukossirap oralt i en dos på 0,2 ml/kg kroppsvikt och deras insulin- och glukosvar följdes därefter under tre timmar med provtagning varje halvtimme. Även triglycerider mättes vid tre tillfällen under OGT.

Vid den euglykemiska hyperinsulinemiska clampen gavs hästarna en kontinuerlig infusion av insulin (3 mU/kg/min) och en variabel glukosinfusion för att bibehålla euglykemin. Den tillförda mängden glukos som behövs för att upprätthålla hästarnas euglykemi vid steady state av hyperinsulinemin motsvarar upptaget av glukos i insulinkänslig vävnad (muskler och fettväv) och ger ett kvantitativt mått på insulinkänsligheten. Metoden används som en *gold standard* för kvantifiering av insulinresistens.

Korrelationen mellan EHC och OGT var god vid jämförelse av peakvärde för insulin och AUC för insulin vid OGT mot M/I-kvot (mängd metaboliserat glukos/tillförd insulinenhet) för EHC.

Studien är den första där resultat från OGT kvantifieras och korreleras mot EHC. OGT visade sig i studien ha en hög specificitet men lägre sensitivitet och kan användas för att diagnosticera hästar med nedsatt insulinkänslighet. Ytterligare studier med ett större testmaterial samt försök med kliniskt insulinresistenta hästar bör dock utföras för att ytterligare säkerställa resultaten samt för att utvärdera om justeringar i gränsvärdena för insulin krävs för att få testet ska få en större tillförlitlighet.

## SUMMARY

Laminitis is an increasing problem in horses and a connection between obesity, insulin resistance and a higher risk for laminitis has been shown in many studies. The methods used today by the field veterinarian for diagnosing insulin resistance in horses are limited and includes basal blood glucose and basal blood insulin values, measurements that have been shown to have low reliability and repeatability. A simple and reliable field diagnostic method is therefore needed.

The aim of this study was to evaluate if an oral glucose tolerance test (OGT) could be an alternative to the diagnostic methods used in the field practice today. By diagnosing horses with insulin resistance, and horses that are in the risk zone to develop insulin resistance, preventional management can be made and the result of the management can be measured by the OGT to check if their insulin sensitivity has increased. This can be of importance to keep the horses healthy.

14 clinically healthy Standardbred horses were used in the study. All horses underwent, in addition to the oral glucose tolerance test, an euglycemic hyperinsulinemic clamp (EHC) to quantify their insulin sensitivity.

In the oral glucose tolerance test, the horses were given an oral dose of glucose syrup (0,2 ml/kg bw) and their insulin and glucose response were measured during the three following hours, with blood samples collected every 30 minutes. Triglycerides were also measured three times during the OGT.

During the euglycemic hyperinsulinemic clamp, a constant infusion of insulin and a variable glucose infusion were given intravenously with the aim to obtain an euglycemic hyperinsulinemic steady state. The insulin sensitivity of the horse is determined by the rate of glucose infusion required to obtain an euglycemic state during the EHC. The method is used as a gold standard for quantifying insulin resistance.

There was a correlation between the EHC and the OGT when comparing the insulin peak value and the insulin AUC measured from the OGT to the glucose infusion rate and the M/I ratio (the amount of metabolised glucose/insulin unit) measured from the EHC.

To my knowledge, this is the first study where results from an OGT in horses are quantified and correlated to an EHC. The OGT was shown to have a high specificity but a lower sensitivity and can be used to diagnose horses with decreased insulin sensitivity. Further studies with a larger study population and with insulin resistant horses are required in order to verify the results of the study and to evaluate the cut off values for insulin in the OGT.

## INNEHÅLL

FÖRKORTNINGAR.....	1
INLEDNING.....	2
SYFTE.....	2
LITTERATURÖVERSIKT.....	3
Insulinresistens och fång.....	3
Ekvint metabolt syndrom.....	3
Patofysiologi vid insulinresistens.....	4
Metoder för diagnostik av insulinresistens.....	5
Fasteinsulin och fasteglukos.....	5
Orala och intravenösa glukostoleranstester.....	6
Kombinerat glukos- och insulintoleranstest (CGIT).....	7
Euglykemisk hyperinsulinemisk clamp (EHC).....	7
MATERIAL OCH METODER.....	9
Hästarna.....	9
Studiedesign.....	9
Oralt glukostoleranstest (OGT).....	10
Euglykemisk hyperinsulinemisk clamp (EHC).....	10
Blodanalyser.....	11
Statistiska analyser och beräkningar.....	11
RESULTAT.....	14
Euglykemisk hyperinsulinemisk clamp.....	14
Oralt glukostoleranstest.....	15
Korrelation av resultat från EHC och OGT.....	17
Triglycerider vid OGT.....	19
DISKUSSION.....	20
Tolkning av resultat från de kliniska försöken.....	20
EHC.....	20
OGT.....	20
Korrelation mellan resultat från EHC och OGT.....	21
Tillförlitlighet av OGT.....	22
Syftet med att använda OGT för diagnosticering av insulinresistens.....	23
Vidareutveckling av OGT för säkrare diagnostik.....	24

KONKLUSION..... 24

REFERENSER..... 26

## **FÖRKORTNINGAR**

<b>BCS</b>	Body condition score
<b>CGIT</b>	Combined glucose and insulin tolerance test
<b>CNS</b>	Cresty neck score
<b>EHC</b>	Euglykemisk hyperinsulinemisk clamp
<b>EMS</b>	Ekvint metabolt syndrom
<b>FSIGT</b>	Frequently sampling intravenous glucose tolerance test
<b>IM</b>	Intermediärt insulinresistent
<b>IR</b>	Insulinresistent
<b>IS</b>	Insulinkänslig
<b>IVGT</b>	Intravenöst glukostoleranstest
<b>OGT</b>	Oralt glukostoleranstest
<b>PPID</b>	Pituitary pars intermedia dysfunction
<b>SC</b>	Space correction
<b>WSC</b>	Water soluble carbohydrates



## INLEDNING

Allt fler hästar och ponnyer drabbas idag av fång och många får recidiv trots lång tids medicinering och konvalescensprogram. En stark koppling mellan nedsatt insulinkänslighet och fång finns, däremot är de diagnostiska möjligheterna för att konfirmera insulinresistens få. Mätning av fasteinsulin och fasteglukos har låg tillförlitlighet (Kronfeld *et al.* 2005; Treiber *et al.* 2005; Treiber *et al.* 2006; Firshman & Valberg 2007) och övriga metoder, så som CGIT (*combined glucose and insulin tolerance test*) och EHC (*euglycemic hyperinsulinemic clamp*), är tekniskt krävande och därmed inte alltid möjliga att genomföra.

## SYFTE

Studiens syfte var att utvärdera huruvida ett oralt glukostoleranstest kan appliceras på svenska förhållanden samt om detta test går att använda för att detektera insulinresistens hos häst. Genom att korrelera OGT mot EHC, som är en *gold standard* metod för kvantifiering av insulinkänslighet, skulle tillförlitligheten för det orala glukostoleranstestet kunna uppskattas. Det orala glukostoleranstestet skulle kunna fungera som ett enkelt och billigt alternativ till de tester som idag används för diagnostik av insulinresistens, tester som antingen har visat sig ha låg tillförlitlighet eller som kräver klinikvistelse och avancerad teknisk utrustning för genomförandet. Vid OGT skulle analys av ett enskilda blodprov, taget en viss tid efter att glukos tillförts hästen oralt, kunna räcka för att uppskatta insulinkänsligheten hos individen.

Att få tillgång till ett tillförlitligt och lättanvänt fältdiagnostiskt verktyg för att diagnosticera hästar med insulinresistens skulle ge en utökad möjlighet till såväl terapeutisk som förebyggande behandling, vilket i sin tur kan minska risken för uppkomst av fång och andra sjukdomar relaterade till en nedsatt insulinkänslighet.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Insulinresistens och fång

#### *Ekvint metabolt syndrom*

Begreppet ekvint metabolt syndrom (EMS) användes första gången år 2002 i en artikel av Philip Johnson för att definiera kopplingen mellan fetma, insulinresistens och fång hos hästar. Vid denna tidpunkt var *metabolt syndrom* redan ett allmänt vedertaget begrepp på humansidan, som där användes för att beskriva problematik med insulinresistens i kombination med två av följande faktorer: fetma, hyperglykemi, hypertoni, höga blodkolesterolnivåer och/eller höga blodnivåer av triglycerider. Ett samband mellan nedsatt insulinkänslighet och en ökad förekomst av fång hos hästar kunde redan under 1980-talet påvisas genom orala glukos- och intravenösa insulintoleranstester (Coffman & Colles 1983; Jeffcott *et al.* 1986). Studierna visade en signifikant ökad insulinresistens hos ponnyer med tidigare fångproblematik eller fetma i jämförelse med en kontrollgrupp bestående av friska ponnyer. I en nyare studie (Carter *et al.* 2009a) inducerades fetma hos 13 hästar under 30 veckor och deras insulinkänslighet bedömdes genom en kvantitativ testmetod: *frequently sampling intravenous glucose tolerance test* (FSIGT) såväl innan som efter viktökningen. Samtliga hästar uppvisade vid FSIGT utförd efter inducerad fetma, en nedsatt insulinkänslighet, vilket författarna kunde koppla till den ökade kroppsvikten. Insulinresistens har även i andra studier kunnat kopplas till fetma och ökad *body condition score* (BCS) (Frank *et al.* 2006; Vick *et al.* 2007). BCS är ett standardiserat system för att, genom utvärdering av hästens hull utifrån palpation och visuell bedömning, uppskatta mängden kroppsfett.

Hästar som lider av ekvint metabolt syndrom är oftast mellan 8-18 år gamla (Johnson 2002). De är vanligtvis överviktiga och anses av djurägarna vara mycket lätta att hålla i hull och svåra att få ned i vikt (Johnson 2002; Frank *et al.* 2006). Kliniskt misstänks ekvint metabolt syndrom mycket oftare hos ponnyer än hos hästar och visst evidens finns för att en genetisk komponent kan ligga bakom en ökad predisposition bland vissa raser (Jeffcott & Field 1986; Rijnen & Kolk 2003; Elliott & Bailey 2006; Treiber *et al.* 2006a). Hästar med ekvint metabolt syndrom har vanligtvis haft en eller flera episoder av fång, dock är dessa hästars fånganfall oftast mycket mildare än vid akut klinisk fång (Frank 2011).

Behandlingen av EMS består idag framför allt av att utfodra hästen med en strikt grovfoderdiet bestående av en låg andel lättlösliga kolhydrater, i kombination med en ökad mängd motion (Carter *et al.* 2009a). Målet är att få ned hästen i vikt samt öka insulinkänsligheten och därmed återställa glukoshomeostasen, vilket i sin tur kan minska risken för nya fångepisoder. Utöver utfodring och motion har även medicinsk behandling med metformin eller levothyroxin diskuterats, substanser som hos människa används för att minska blodnivåer av insulin och glukos. Viss ekvin forskning har kunnat påvisa en ökad insulinkänslighet vid behandling med metformin hos insulinresistenta hästar (Durham *et al.* 2008). Nyare studier har dock, i motsats till ovan nämnd forskning av Durham *et al.* (2008), inte kunnat visa en signifikant effekt av metforminbehandling hos hästar för att öka deras insulinkänslighet (Vick *et al.* 2006; Tinworth *et al.* 2012), något som bland annat har kopplats till en låg biotillgänglighet av läkemedlet (Tinworth *et al.* 2010). Vid forskning kring långtidsbehandling med metformin har ingen effekt på insulinkänslighet kunnat påvisas (Durham *et al.* 2008).

Levothyroxin fungerar däremot för att på såväl kort som lång sikt hjälpa till att öka insulinkänsligheten hos hästar (Frank *et al.* 2005; Frank *et al.* 2008). Om långtidseffekten beror på en direkt verkan av medicineringen eller om viktnedgången, som induceras initialt av läkemedlet, ger den

ökade insulinkänsligheten är dock oklart. Levothyroxin är dyrt och används därför endast i begränsad utsträckning inom hästmedicinen (Durham 2012).

### **Patofysiologi vid insulinresistens**

Insulin är ett peptidhormon som syntetiseras i de Langerhanska öarnas betaceller i endokrina pankreas. Hormonet utsöndras huvudsakligen som ett svar på hyperglykemi, vanligtvis efter födointag. Insulinets huvudsakliga funktion är att reglera blodglukosnivån och möjliggöra eller underlätta transport av glukos in i den insulinkänsliga vävnaden, vilken främst består av muskler och fettväv. På så sätt kan en glukoshemostas upprätthållas i samtliga vävnader. Insulin har även som funktion att öka triglycerid-, protein- och glykogensyntes, att minska glukoneogenes samt att öka upptag av aminosyror i flertalet celltyper. Sammanfattningsvis är det ett mycket viktigt anabolt hormon. (Sjaastad *et al.* 2003)

Insulinreceptorn består av två alfa- och två betasubenheter som länkas samman av disulfidbryggor. Receptorn är belägen i cellens membran; alfsubenheterna sitter extracellulärt medan betasubenheterna har såväl transmembranösa som intracellulära domäner. Bindningen av insulin till alfsubenheterna leder till en autofosforylering av receptorn och en intracellulär signaleringskaskad startar. De intracellulära processerna leder till en frisättning av GLUT-4, ett insulinresponsivt glukostransportprotein, från intracellulära vesiklar. GLUT-4 tar sig upp till cellmembranet där det möjliggör, alternativt underlättar, intrasport av glukos till celler belägna framför allt i skelettmuskulatur och fettväv. Nedbrytningen av insulin sker framför allt i levern och njuren via klyvning av hormonets disulfidbryggor. En viss mängd insulin bryts dock ner i målcellerna efter att det har bundit till sin receptor och förflyttats intracellulärt. (Sjaastad *et al.* 2003)

Insulinresistens definieras som en nedsatt effekt av insulin på dess målvävnader. Detta tillstånd kan uppstå på grund av defekter i insulinreceptorn eller i de intracellulära signalsystemen samt vid fel i syntes eller funktion av GLUT-4. Insulinresistens kan uppstå såväl centralt i levern som i perifer vävnad; till exempel i skelettmuskulatur och fettvävnad (Johnson 2002). Såväl kompenserad som dekompenenserad insulinresistens förekommer. Vid kompenserad insulinresistens ses en hyperinsulinemi på grund av en ökad utsöndring av insulin för att upprätthålla glukoshemostas, glukosnivåerna i blodet är då normala. När insulinresistensen är dekompenenserad ses däremot en normoinsulinemi med samtidig hyperglykemi (Frank 2011), något som exempelvis kan ses vid diabetes mellitus typ 2.

Det är inte helt klarlagt varför insulinresistens kan ge en ökad risk för fång, men en stark koppling mellan endokrinopati och fång har kunnat påvisas. Endokrina sjukdomar med ökad insulinresistens, så som såväl PPID (*pituitary pars intermedia dysfunction*) som EMS, har kunnat diagnosticeras hos upp till 70-90 % av hästar som lider av klinisk fång, vilket innebär att hästar med fångproblematik med mycket stor sannolikhet lider av en underliggande endokrin sjukdom som kan ha gett upphov till en insulinresistens (Donaldson *et al.* 2004; Karikoski *et al.* 2011). Vid inducering av hyperinsulinemi under 48-72 timmar, med samtidigt upprätthållande av euglykemi, har klinisk fång kunnat framkallas hos helt friska ponnyer och hästar (Asplin *et al.* 2007; de Laat *et al.* 2010). Hästarna i dessa försök har inte haft någon känd endokrinopati så som PPID eller EMS, de har inte heller tidigare lidit av fång

eller varit insulinresistenta. Dessa resultat tyder på att fång även kan induceras av hyperinsulinemi, oberoende av nedsatt insulinkänslighet, något som de Laat *et al.* (2010) diskuterar kan kopplas till en toxicitet gentemot ett ökat upptag av glukos i hovens lamellager.

Elliot & Bailey studerade år 2006 tarmfloras roll gällande predisposition för och samband med fång. Studien visade att mängden monoaminer som bildas i grovtarmen, framför allt vid intag av lättlösliga kolhydrater, har ett samband med en ökad risk för uppkomst av fång eftersom monoaminer påverkar perfusionen av blod till hovarna. Ett högt intag av lättlösliga kolhydrater ger en snabb höjning av monoaminer, vilket är svårt för en insulinresistent individ att hantera på grund av nedsatt förmåga till proteinsyntes. Elliot & Bailey konkluderade att skillnader i tarmväggens svar vid pH-förändringar hos olika individer och raser kan påverka hur stor risk hästarna har att drabbas av fång. Studier har även visat att insulinresistens ger en minskad endotelfunktion (Cersosimo & DeFronzo 2006). Nedsatt insulinkänslighet kan därmed ge en direkt påverkan på endotelets förmåga att reglera kärlen vid vasokonstriktion, så som vid inflammatoriska tillstånd i hovarna.

## **Metoder för diagnostik av insulinresistens**

### ***Fasteinsulin och fasteglukos***

Att mäta fasteinsulin och fasteglukos har genom tiderna använts som enkla metoder för att detektera insulinresistens hos såväl människa som djur. Höga insulinvärden, tillsammans med höga värden på BCS, CNS (*cresty neck score*, bedömning enligt Carter *et al.* 2009b), samt fasteleptin, har visat sig vara säkra riskfaktorer för uppkomst av klinisk fång (Carter *et al.* 2009c). Kritik har dock riktats mot denna form av diagnostik då den endogena variationen av insulin och glukos inte kan kontrolleras vid provtagningen varpå normala individuella variationer i glukoshomeostasen därför kan se ut som patologiska förändringar i provresultaten (Kronfeld & Treiber 2005; Treiber & Kronfeld 2005; Treiber *et al.* 2006b; Firshman & Valberg 2007). Carter *et al.* visade i en studie från 2009 (a) att samtliga hästar med ökade insulinnivåer förblev euglykemiska, vilket påvisar en stor risk för feltolkning av ett normalt fasteglukosvärde om detta inte kombineras med provtagning av insulin. Vid mätning av fasteglukos kan en påvisad fastehyperglykemi dessutom inte särskilja huruvida det är en otillräcklig utsöndring av insulin från pancreas betaceller eller en minskad insulinkänslighet i målorganen som orsakat det förhöjda glukosvärdet (Kronfeld & Treiber 2005).

Frank *et al.* diskuterade i en studie från 2006 huruvida fasteglukosvärden kunde räknas som en tillförlitlig diagnostisk metod för att mäta insulinsvar, då glukosvärdet kan påverkas av omgivningsfaktorer så som stress. Däremot ansåg författarna att fasteinsulin samt glukos-/insulinkvot var av värde vid screeningtester av insulinresistens. Frank menade dock att hänsyn bör tas till provtagningstidpunkt vid tolkning av fasteinsulinnivåer, då provtagning vid olika årstider samt vid olika tider på dygnet har visat sig påverka resultaten. Dessutom kan en hyperinsulinemi utebli hos vissa insulinresistenta hästar och ett falskt negativt värde fås då vid provtagning av fasteinsulin.

Att använda sig av formler för att få mer standardiserade, och därmed säkrare, värden vid mätning av fasteinsulin och fasteglukos, har visat sig ge en större tillförlitlighet och rekommenderas av vissa forskare exempelvis vid studier över större populationer (Treiber *et al.* 2005).

## **Orala och intravenösa glukostoleranstester**

### **Orala glukostoleranstester**

Orala glukostoleranstester har använts inom hästmedicinen sedan 1970-talet, initialt för att diagnosticera malabsorption på grund av tunntarmslidande samt nedsatt pankreasfunktion i form av diabetes mellitus eller till följd av neoplasier (Robert & Hill 1973; Jacobs & Bolton 1982). Testet utökades därefter till att användas för uppskattning av presumtiv insulinresistens genom detektion av hyperinsulinemi (Jeffcott *et al.* 1986).

Hästar som ska genomgå ett oralt glukostoleranstest (OGT) lämnas fastande över natten och förbereds med permanentkateter. Efter nässvalgsondning av en glukoslösning till magsäcken mäts glukos- och insulinivåer över tid via upprepad blodprovstagning. Vid normal insulinkänslighet ska hästens insulin- och glukosvärden återgå till normala nivåer inom en timme (Firshman & Valberg 2007). Risk för stor variation i provresultat på grund av individuella variationer i magsäckstömning och absorption i tunntarmen samt stress vid nässvalgsondning har diskuterats som möjliga felkällor vid denna typ av diagnostik (Kronfeld *et al.* 2005; Firshman & Valberg 2007). Även skillnader i typ av grovfoderdiet har visat sig ge olika resultat på OGT vid jämförelse mellan hästar som gått på bete och hästar utfodrade med hö (Jacobs & Bolton 1982). Hästar på bete hade ett högre peakvärde för glukos, och återgick långsammare till basala glukosnivåer, trots att båda försöksgrupperna hade fastat under 12 timmar före försökets start.

En förenklad version av OGT har utformats i USA och används som fältdiagnostisk metod i vissa länder. En glukoslösning bestående av Karo Corn Syrup® ges av djurägaren peroralt till hästen via spruta och veterinär utför mellan 60-90 min efter glukosgivan en blodprovstagning av hästen (Schuver *et al.* 2013). Insulin och glukos analyseras därefter för detektion av insulinresistens. OGT har korrelerat väl med resultat från IVGT vid jämförelse av dessa två metoder (Schuver *et al.* 2013). I Storbritannien används en alternativ metod för OGT där dextropulver används som glukoskälla och en annan dos glukos ges, i övrigt är metoden likadan som den amerikanska (pers.med Andy Durham).

### **Intravenösa glukostoleranstester**

Vid ett intravenöst glukostoleranstest (IVGT) kan faktorer som påverkar resultatet vid ett OGT, så som spill vid glukostillförsel, individuella skillnader i magsäckstömningshastighet samt absorptionshastighet av glukos från tarmen, bortses ifrån eftersom glukoslösningen ges direkt i blodet (Kronfeld *et al.* 2005). Testet utförs, på hästar som fastat under natten, genom att glukos tillförs intravenöst och en upprepad blodprovstagning sker över tid, med analys av glukos- och insulinkoncentrationer i blodet.

FSIGT med analys via *minimal model*, en diagnostisk metod liknande IVGT, har sedan mitten av 2000-talet använts inom forskningen för att kvantifiera insulinresistens hos hästar (Hoffman *et al.* 2003). Glukos tillförs intravenöst, tjugominuter senare följs detta av en insulinbolus och insulin- samt glukoskoncentrationer mäts genom frekvent blodprovstagning under totalt tre timmar. De erhållna värdena används i en matematisk modell, en så kallad *minimal model*, för att standardisera och

utvärdera pankreasfunktion samt individens insulinkänslighet. Testet anses kunna differentiera mellan dekompenenserad och kompenenserad insulinresistens och ska på så sätt kunna utreda grundorsaken till en nedsatt insulinkänslighet (Hoffman *et al.* 2003). Insulinsvaret som fås är dock inte alltid korrekt i förhållande till det glukos som getts, vilket ger en risk för felaktiga testresultat. Dessutom görs i den matematiska modellen många antaganden gällande insulin- och glukoskinetik, vilka inte alltid är applicerbara på verkligheten (Pratt *et al.* 2005). FSIGT med analys via *minimal model* är lättare att utföra än EHC och kräver mindre teknisk utrustning varför metoden ibland föredras, exempelvis vid större populationsstudier. Vid jämförelse med EHC har FSIGT dock visat sig ha en sämre reproducerbarhet och anses därför inte vara en lika tillförlitlig metod för kvantifiering av insulinresistens (Pratt *et al.* 2005).

### **Kombinerat glukos- och insulintoleranstest (CGIT)**

Ett dynamiskt test för mätning av glukos- och insulinsvar vid exogen tillförelse av både glukos och insulin studerades för första gången hos häst år 2005 av Eiler *et al.* Testet visade sig ha en god tillförlitlighet vid diagnostik av insulinresistens. CGIT har sedan dess använts såväl kliniskt som i forskningssyfte och har visat sig tolereras bra av hästarna samt vara enkelt att utföra (Eiler *et al.* 2005; Chamero 2010). Att genomföra ett CGIT under stress kan dock påverka testresultaten, varför det rekommenderas att hästen inte provtas samma dag som transport sker (Eiler *et al.* 2005; Bröjer *et al.* 2013).

Vid ett CGIT ges hästar, som fastats under natten, en dextros- eller glukoslösning intravenöst (150 mg/kg kroppsvikt) under en minut varefter en insulininjektion på 0,1 U/kg kroppsvikt ges intravenöst inom sex sekunder efter avslutad glukostillförelse. Blodprovstagningar sker därefter upprepade gånger under de kommande 150 minuterna och analys av insulin och glukos sker från samtliga prover (Eiler *et al.* 2005; Chamero 2010). En förkortad version av den ursprungliga CGIT-metoden där analys av insulin enbart sker vid 0 respektive 45 minuter används också kliniskt. Hos hästar med normal insulinkänslighet återgår såväl insulin- som glukosvärden till respektive utgångsnivåer efter 30 minuter medan en fördröjning ses hos insulinresistenta hästar, där det tar över 45 minuter innan basnivåerna är återställda (Chamero 2010). Av denna anledning används glukos- och insulinivåerna vid 45 minuter som referensvärden vid uppskattning av insulinkänslighet genom CGIT. Repeterbarheten av glukosvärdena vid CGIT har visat sig vara låg. Däremot har insulinivåerna en hög repeterbarhet och anses därför kunna användas för ett säkert testresultat (Bröjer *et al.* 2013).

### **Euglykemisk hyperinsulinemisk clamp (EHC)**

Den euglykemiska hyperinsulinemiska clampen används för att kvantifiera insulinresistens. Testet är tekniskt krävande och används därför framför allt i forskningssammanhang där det för många ses som en *gold standard* metod. EHC har, i jämförelse med FSIGT i kombination med analys via *minimal model*, en hög reproducerbarhet (Pratt *et al.* 2005).

Genom att upprätthålla en hyperinsulinemi via exogen tillförelse av insulin och därefter mäta vilken mängd glukos som krävs för att bibehålla en euglykemi kan insulinresistens detekteras och kvantifieras. Målet är att under försöket helt och hållet slå ut den endogena regleringen av insulinproduktion- och frisättning för att få en korrekt uppskattning av det tillförda insulinets effekt på målvävnaderna, utan endogen påverkan. Att testet på så sätt blir ofysiologiskt och därmed inte

nödvändigtvis speglar individens sanna insulin- och glukosbalans, har diskuterats begränsa dess tillförlitlighet (Treiber *et al.* 2006b).

## **MATERIAL OCH METODER**

### **Hästarna**

I det kliniska försöket för utvärdering av det orala glukostoleranstestet med påföljande kvantifiering av insulinkänslighet genom en euglykemisk hyperinsulinemisk clamp användes 14 vuxna varmlodiga travare; tolv ston och två valacker i åldrarna 5-20 år (medelvärde  $13,2 \pm 4,6$ ). Samtliga hästar i studien var ägda av Institutionen för kliniska vetenskaper vid Sveriges Lantbruksuniversitet. Försöken genomfördes i hästarnas ordinarie stall.

Försökshästarna var uppstallade på box, utfodrades med hösilage tre gånger per dag, hade fri tillgång till vatten genom vattenkopp/-hink och vistades dagtid i grushagar. Samtliga hästar användes före och efter försöken i undervisning vid Sveriges Lantbruksuniversitet. De motionerades varken före, under eller efter försöken.

Kvällen före det första försöket, det orala glukostoleranstestet, vägdes hästarna och genomgick en allmän klinisk undersökning. Hästarna var kliniskt friska och hade inför OGT en medelvikt på  $500,4 \pm 50,1$  kg (429-595). Hästarna vägdes även samma dag som de genomgick EHC för att korrekta insulinkoncentrationer skulle kunna beräknas till varje individ. Deras medelvikt var då  $494,3 \pm 49,8$  kg. Hullet uppskattades inför EHC hos varje individ enligt hullbedömningsskalorna BCS och CNS (Henneke *et al.* 1983; Carter *et al.* 2009). Hästarnas BCS uppskattades till  $5,2 \pm 0,7$  och deras CNS till  $2,2 \pm 0,5$ , värden som speglar ett normalt hull och en normal fettansättning i nackområdet.

Hästarna förbereddes kvällen inför OGT med en intravenös jugular permanentkateter efter rakning, lokalbedövning med EMLA (minst 20 minuters kontakttid innan kanylläggning) samt steriltvätt. Inför EHC lades två permanentkatetrar; en i vardera jugularven. Den ena permanentkatetern användes under clampen för infusion av glukos och insulin och den andra katetern användes för blodprovstagning.

Samtliga försökshästar fastades inför försöken med en total fastetid på cirka tolv timmar. Fri tillgång till vatten fanns under hela fastan samt under det orala glukostoleranstestet.

### **Studiedesign**

Försöket är godkänt av Uppsala Djurförsöksetiska nämnd (diarienummer C269/12).

Studien var icke randomiserad och prospektivt utformad. Anledningen till att försökshästarna inte randomiserades var att samtliga hästar kontinuerligt användes i undervisning, vilket styrde urvalet av hästar till de olika försöksdagarna.

Studien bestod, för varje försökshäst, av två delar; ett oralt glukostoleranstest och en euglykemisk hyperinsulinemisk clamp. Det orala glukostoleranstestet genomfördes först och en till två veckor senare genomgick hästarna en EHC.



## Oralt glukostoleranstest (OGT)

Det orala glukostoleranstestet utfördes under två dagar i december 2012. Tio hästar studerades under första dagen och fyra hästar under dag två.

Dansukker glukossirap från Nordic Sugar användes som glukoskälla vid försöket. Glukossirapen doserades efter vikt (0,2 ml/kg kroppsvikt) och administrerades via 60-ml sprutor direkt i munnen. Doseringen med 0,2 ml glukossirap motsvarar ett totalt sockerinnehåll av 216 mg/kg, varav 92,4 mg/kg var enklare sockerarter (maltos, maltotrios och glukos). Mängden rent glukos var 33,6 mg/kg kroppsvikt (pers.med. Marie Karlsson, Nordic Sugar).

Samtliga blodprover aspirerades via permanentkatetern efter att 5 ml blod dragits ur från katetern. För nollprov togs blodprov fem minuter före den orala glukosgivan, därefter togs prover 30, 60, 90, 120, 150 samt 180 minuter efter att glukosgivan skett. Blodproverna samlades direkt i litium-heparinrör och förvarades på is fram tills dess att centrifugering skedde inom en timme efter provtagning. Centrifugering skedde under tio minuter i 4 °C temperatur och 906 G. Efter centrifugering pipetterades plasma av, överfördes till eppendorfrör och förvarades i frys i -80 °C fram tills analys av proverna skedde.

Samtliga hästar tolererade försöket väl. Inga tecken på komplikationer av kanylläggning, fasta, glukostillförsel eller provtagning noterades.

## Euglykemisk hyperinsulinemisk clamp (EHC)

Den euglykemiska hyperinsulinemiska clampen utfördes enligt Firshman *et al.* (2008) för kvantifiering av försökshästarnas insulinresistens. Innan försöket började togs två nollprover vid -10 och -1 minut för mätning av blodglukos och -insulinnivåer.

Volymetriska infusionspumpar användes under försöket för kontinuerlig tillförsel av insulin<sup>1</sup> och glukos<sup>2</sup>. Koncentrationen av insulin i den tillförda lösningen baserades på hästens individuella kroppsvikt (3 mU/kg/min).

Den euglykemiska hyperinsulinemiska clampen pågick i totalt tre timmar varav den första timmen fungerade som en inställningsfas. Därefter eftersträvades steady state med kontinuerlig euglykemi och samtidig hyperinsulinemi. Blodglukosnivåerna eftersträvades att bibehållas på  $5,0 \pm 0,2$  mmol/L. För att säkerställa att normala blodglukosnivåer hela tiden upprätthölls skedde under hela clampen

---

<sup>1</sup> Humulin Regular, Eli Lilly Sweden AB, Solna, Sverige

<sup>2</sup> Glucose 500mg/ml, Fresenius Kabi AB, Uppsala, Sverige

blodprovstagning var femte minut för direkt analys av glukos med hjälp av glukometer<sup>3</sup>. Utefter de blodglukosvärden som erhöles justerades vid behov infusionshastigheten av glukos. Samtliga blodprover aspirerades via permanentkatetern efter att 5 ml blod dragits ur från katetern.

Blodproverna togs i litium-heparinrör, som hölls kylda på is direkt efter provtagningen. Proverna centrifugerades därefter under tio minuter i 4 °C temperatur, 906 G. Efter centrifugeringen pipetterades plasma av, överfördes till eppendorfrör och förvarades i frys i -80 °C fram tills analys av proverna skedde.

Provtagning för laboratorieanalys gjordes var tjugonde minut för insulin och var tionde minut för glukos. *Space correction* (SC) räknades ut för samtliga erhållna blodglukosvärden, vilket korrigerar för de mindre fluktuationer som uppstår i plasmaglukoskoncentrationen under steady state (De Fronzo *et al.*, 1979). *Space correction* representerar den hastighet med vilken glukos tillförs eller försvinner från distributionsvolymen av glukos. *Space correction*<sup>4</sup> beräknades enligt följande formel:

$$\text{Space correction (mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}) = (G1 - G2) \times 0,019$$

## Blodanalyser

Insulinet i blodproverna från EHC analyserades med Mercodia Insulin ELISA (artikelnummer: 10-1113-01) och beräknades i mU/L. Proverna från OGT avseende insulin analyserades med Mercodia Equine Insulin ELISA (artikelnummer: 10-1205-01) och beräknades i ng/L. Anledningen till att två olika analysmetoder för insulin användes är att insulinet som analyseras vid EHC till allra största del är det tillförda exogena insulinet (humant) och därför kräver en human ELISA medan insulinet som mäts vid OGT är endogent och därmed med fördel analyseras med en hästspecifik ELISA.

Glukos vid såväl EHC som OGT analyserades med YSI 2300. Triglycerider analyserades vid klinisk kemiska laboriet på Universitetsdjursjukhuset på Clinical Chemistry Architect c4000 (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA), med metodologi glycerolfosfatoxidase.

## Statistiska analyser och beräkningar

För bedömning av insulinkänslighet vid det orala glukostoleranstestet användes peakvärde för insulin samt AUC (area under kurvan). AUC är ett mer fysiologiskt mått på insulinkänsligheten då det speglar dynamiken under hela försökets gång, men är mindre användbart kliniskt eftersom provtagning varje halvtimme under tre timmars tid inte är praktiskt möjlig. I kliniska sammanhang blir därför peakvärdet för insulin ett bra alternativ till AUC, under förutsättning att de korrelerar väl.

---

<sup>3</sup> Accu-Check Aviva

<sup>4</sup> G1: blodglukosvärde vid föregående provtagning, G2 = blodglukosvärde vid efterföljande provtagning

För att sätta cut-off nivåer för insulin vid det orala glukostoleranstestet användes samma referensvärden som vid studie av Schuver *et al.* (2013). Schuver *et al.* använde sig dock av en annan analysmetod för insulin med enheten mU/L medan vår analysmetod mäter insulin i ng/L. Cut-off nivåerna för insulin omvandlades därför från mU/L till ng/L enligt princip framtagen av Öberg *et al.* (2011).

Gränsvärdena för insulinpeak sattes i studien till följande:

< 400 ng/L                                 insulinkänslig

400-700 ng/L                             intermediärt insulinresistent

>700 mU/L                                insulinresistent

AUC beräknades enligt trapezoidmetoden. Så kallade *missing values* (mätvärden som avviker signifikant från övriga motsvarande mätvärden) ersattes med ett uträknat medelvärde av de, vid samma tidpunkt, uppmätta värdena från resterande försökshästar.

Vid den euglykemiska hyperinsulinemiska clampen beräknades samtliga värden som användes vid de statistiska analyserna utifrån den sista timmen av clampen, då det under denna tidsperiod var störst sannolikhet att steady state hade uppnåtts hos samtliga hästar.

Materialet definierades utifrån hästarnas individuellt uppmätta M-värden (M = mängd tillförd glukos - SC i mg/kg/min) under EHC. Att definiera insulinkänslighet genom glukosflöde är väl validerat och M-värden är enkla att relatera mot andra studier då värdena inte skiljer sig åt mellan olika analysmetoder. M/I-kvoten (metaboliserat glukos/insulinenhet) är ett mer exakt mått på insulinkänslighet, men på grund av att analysmetoden för mätning av insulin påverkar vilka värden som uppnås kan kvoten inte användas vid jämförelse mellan olika studiers resultat. M/I-kvoten användes däremot som definition av insulinresistens vid jämförelse mellan värden inom studien. Referensområdena för M sattes till följande:

>4 (mg/kg/min)                            insulinkänslig

2-4 (mg/kg/min)                           intermediärt insulinresistent

<2 (mg/kg/min)                            insulinresistent

Linjär regression användes för att jämföra peakvärden för glukos, AUC för glukos och triglyceridnivåer vid 90 min från OGT med M/I-kvoten från EHC. Dessutom användes linjär regression för att jämföra peaknivåer av insulin med AUC för insulin. Icke linjär regression användes för att jämföra M/I-kvoten från EHC med peakvärden för insulin och AUC för insulin från OGT. Signifikansen sattes till  $P < 0,05$ . Data analyserades med statistikprogrammet JMP version 9,2.

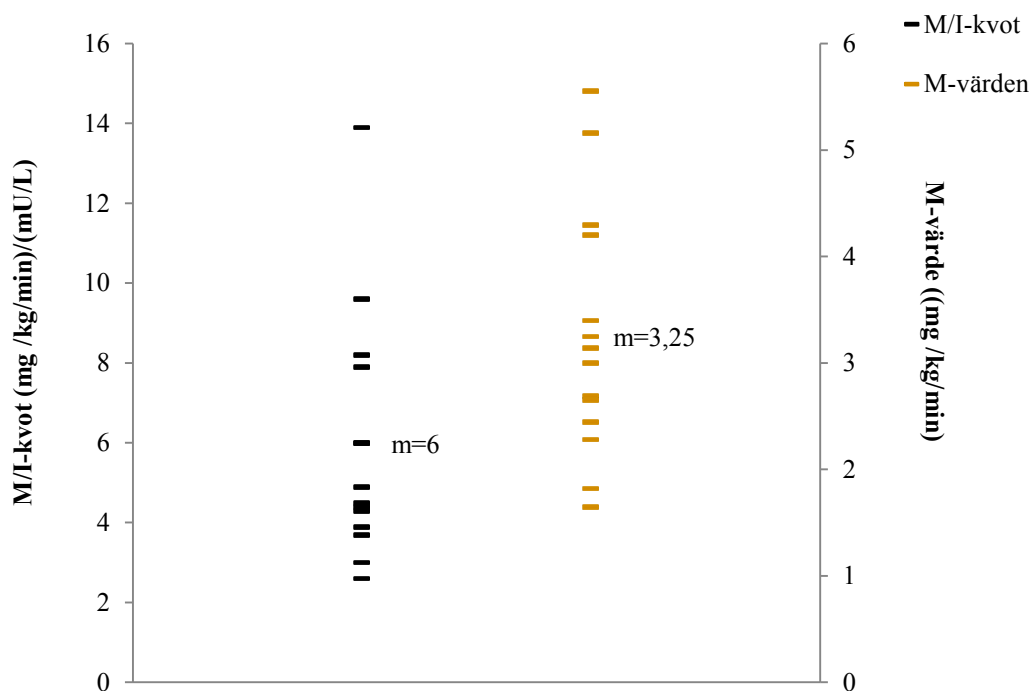
## RESULTAT

### Euglykemisk hyperinsulinemisk clamp

Samtliga hästar som genomgick EHC bedömdes vara fullt friska och i normalhull, inga tecken på endokrinopati fanns. Fastevärdena vid nollprovtagning för insulin och glukos var hos samtliga hästar normala. Medelvärdena vid nollprovtagningen av insulin var  $7,0 \pm 2,5$  mU/L (vid provtagning -10 min) och  $6,7 \pm 2,4$  mU/L (vid provtagning -1 min). Medelglukosvärdena från såväl första som andra nollprovtagningen (-10 respektive -1 minut) var  $5,1 \pm 0,4$  mmol/L.

Genom EHC kunde försökshästarnas insulinkänslighet kvantifieras. Den euglykemiska hyperinsulinemiska clampen gav en bra spridning på resultatmaterialet med variationer i glukosflöden (M) hos de olika individerna beroende på deras insulinkänslighet. M-värdena varierade mellan 1,65 - 5,16 mg/kg/min med ett medelvärde på  $3,25 \pm 1,17$  mg/kg/min (figur 1). Två hästar som ingick i det kliniska försöket definierades som insulinresistenta med M-värden på 1,65 respektive 1,82 mg/kg/min. Åtta hästar uppnådde M-värden mellan 2,8 - 3,25 mg/kg/min (medelvärde  $2,9 \pm 0,4$ ) och definierades därmed som intermediärt insulinresistenta. Resterande fyra försökshästar hade normal insulinkänslighet med glukosflöden på 4,2 - 5,56 mg/kg/min (medelvärde  $4,8 \pm 0,7$ ).

Hästarnas M/I-kvoter låg i intervallet 2,6 - 13,9 (mg/kg/min)/(mU/L) med ett medelvärde på  $5,9 \pm 3,1$  (figur 1). De hästar som utefter M-värden definierats som insulinkänsliga hade samtliga en M/I-kvot på över 7 (mg/kg/min)/(mU/L).

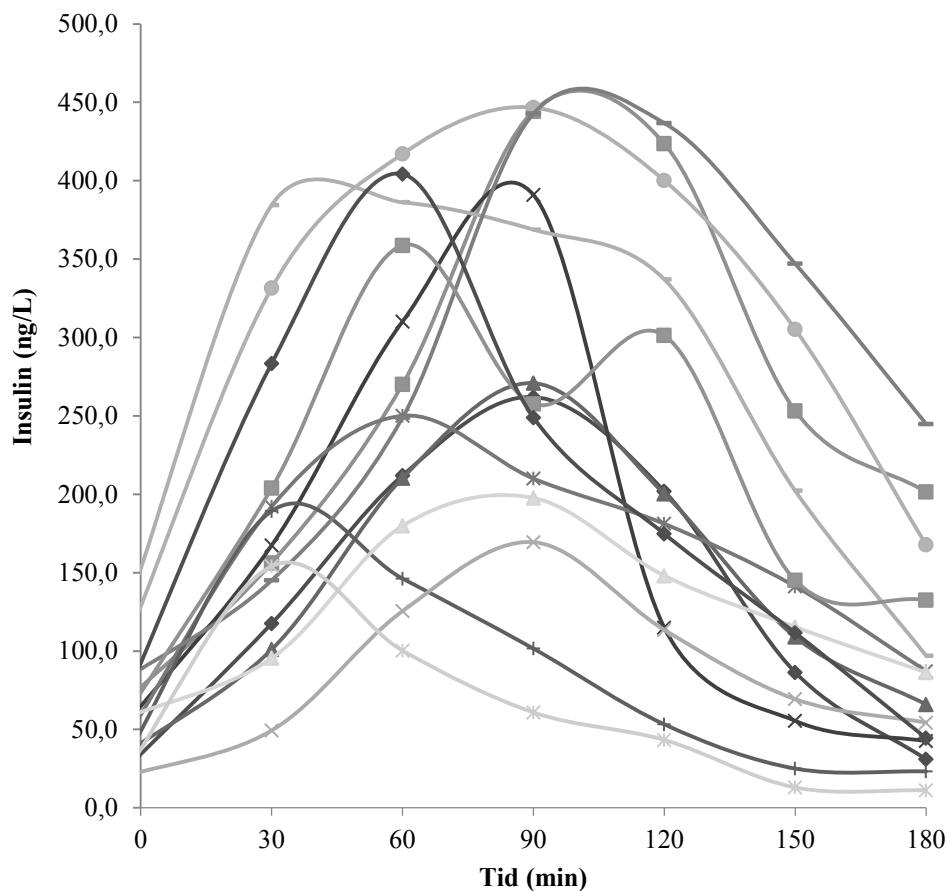


Figur 1: M-värde samt M/I-kvot hos varje individ under den sista timmen av EHC. Medelvärdet av M var 3,25 mg/kg/min och medelvärdet av M/I-kvot var 6 (mg/kg/min)/(mU/L).

## Oralt glukostoleranstest

Fyra hästar fick avvikande höga fasteglukosvärden vid nollprovtagningen (12,3 - 24,8 mmol/L), dessa värden bedömdes som *missing values*. I övrigt var samtliga glukos- och insulinvärden vid nollprovtagningen normala.

Samtliga försökshästarnas glukos- och insulinkurvor följde varandra och samma dynamik sågs oavsett hästarnas glukos- och insulinnivåer (*figur 2*). Åtta av hästarna nådde sin insulinpeak vid 90 minuter och sex hästar nådde sin insulinpeak vid 60 minuter. Två hästar avvek mer från de övriga och hade en peak redan vid 30 minuter.

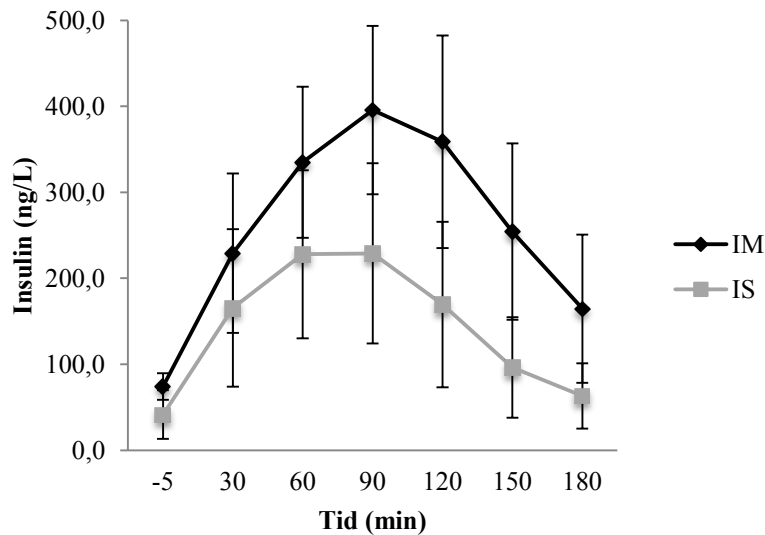


Figur 2: De individuella insulinnivåerna hos samtliga hästar under OGT.

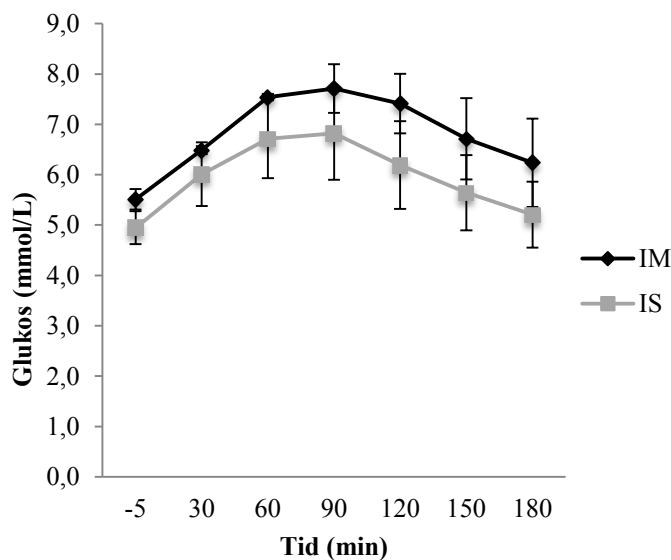
Vid jämförelse mellan AUC av insulin och peakvärde för insulin sågs ett positivt samband ( $r^2=0,86$ ), ju högre peakvärde för insulin desto större värde på AUC.

Fyra hästar hade insulinnivåer som någon gång under försöket översteg 400 ng/L och bedömdes därmed som intermediärt insulinresistenta (IM). Resterande tio hästar låg under 400 ng/L vilket

definierade dem som insulinkänsliga (IS). Inga hästar definierades genom OGT som insulinresistenta (IR). Vid jämförelse mellan insulindynamiken i de två grupperna (IM och IS) sågs generellt en högre insulinrespons hos de hästar identifierade som intermediärt insulinresistenta, skillnaden mellan grupperna redovisas som medelvärde och standardavvikelse i *figur 3*. De fyra hästar som vid mätning av insulin definierades som IM hade även generellt något högre glukosnivåer än resterande tio hästar (*figur 4*). Hästarna med högre insulinvärden (IM) återgår inte, till skillnad från de insulinkänsliga (IS), till baslinjen vid försökets slut (180 minuter) (*figur 3*).



Figur 3: Medelvärden  $\pm$  SD av insulinivåer under OGT, jämförelse mellan insulinkänsliga (IS) och intermediärt insulinresistenta (IM) hästar utefter cut-off värden satta för OGT. IM=4, IS=10



Figur 4: Medelvärden  $\pm$  SD av glukosnivåer under OGT, jämförelse mellan insulinkänsliga (IS) och intermediärt insulinresistenta (IM) hästar utefter cut-off värden satta för OGT. IM=4, IS=10.

## Korrelation av resultat från EHC och OGT

Insulinpeakvärdena vid OGT identifierade fyra hästar som intermediärt insulinresistenta (IM). Två av dessa hästar var korrekt identifierade och två av dem var enligt M-värden insulinresistenta (IR) (tabell 1). Ytterligare sex hästar definierades enligt M-värden som intermediärt insulinresistenta, dessa identifierades dock som insulinkänsliga (IS) vid bedömning av insulinvärden vid OGT.

Tabell 1. Gradering av samtliga försökshästar efter insulinresistens i fallande ordning baserat på insulinkänslighet vid EHC. IR= insulinresistent, IM= intermediärt insulinresistent, IS= insulinkänslig

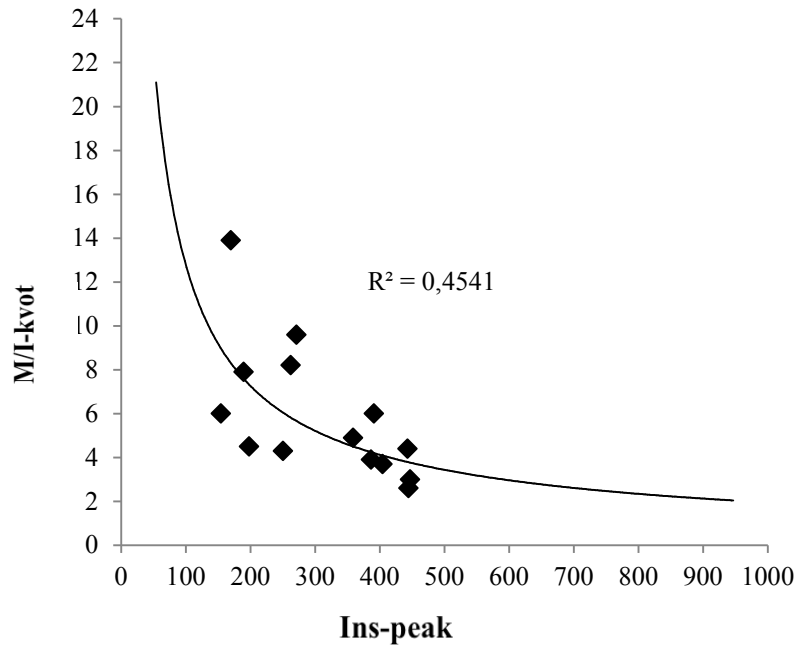
Häst	M-värde	IR/IM/IS	Ins-peak	Ins-AUC
B	1,65	IR	444,4	50405
F	1,82	IR	446,6	60932
K	2,28	IM	404,3	38250
E	2,45	IM	250,1	31101
J	2,65	IM	442,7	53483
H	2,69	IM	386,2	53487
D	3	IM	391	32531
M	3,14	IM	197,7	24228
S	3,25	IM	154,1	11558
L	3,4	IM	358,8	40770
G	4,2	IS	189,3	16166
A	4,3	IS	262	27173
C	5,16	IS	270,9	28209
P	5,56	IS	169,5	16919

Falskt negativ på OGT

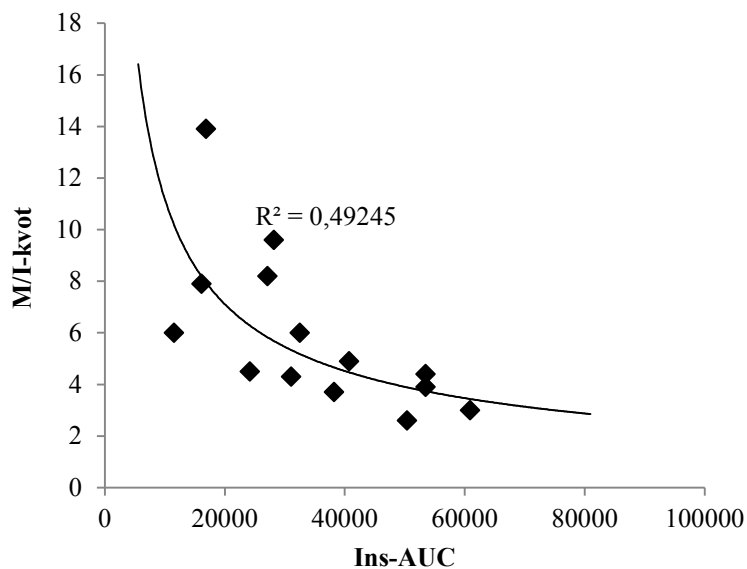
Definierad som IM på OGT



M/I-kvoten vid EHC korrelerade väl med insulinpeakens nivå vid det orala glukostoleranstestet. Ju lägre M/I-kvot hästen hade desto högre insulinpeak sågs vid OGT (*figur 5*). Ett negativt samband sågs även mellan insulin-AUC vid OGT och M/I-kvot vid EHC. Hästarna med låg M/I-kvot uppvisade generellt högre insulin-AUC vid OGT. (*figur 6*). Sambanden mellan M/I-kvot och insulin-AUC respektive M/I-kvot och peakvärde för insulin var hyperbola (*figur 5 och 6*).



Figur 5: Korrelation mellan M/I-kvot (EHC) och peakvärde för insulin (OGT).

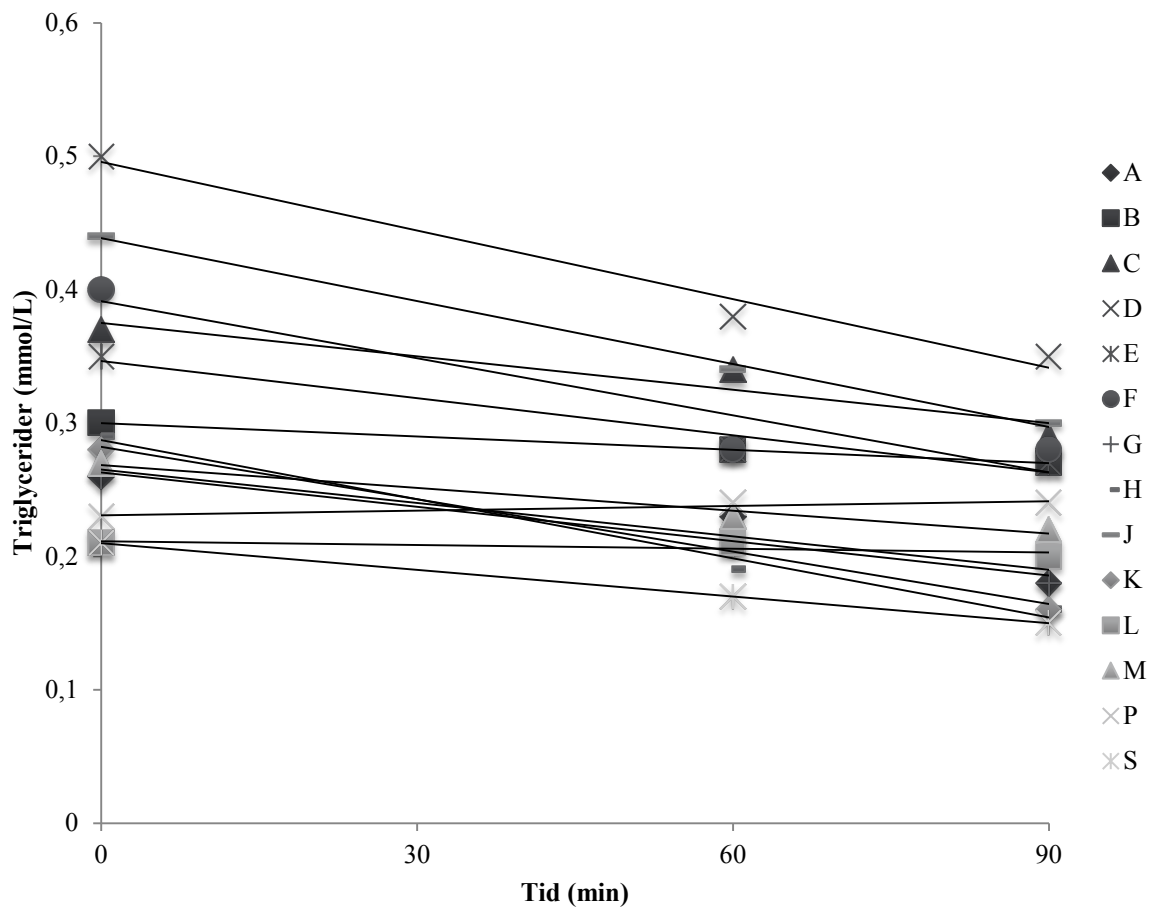


Figur 6: Korrelation mellan M/I-kvot (EHC) och AUC för insulin (OGT).

Vid jämförelse mellan peakvärden samt AUC för glukos vid det orala glukostoleranstestet mot de M/I-kvoter som uppnåddes vid EHC kunde ingen korrelation ses.  $R^2$ -värdet för det linjära sambandet mellan M/I-kvot och AUC för glukos var 0,23 och  $r^2$ -värdet för det linjära sambandet mellan M/I-kvot och peaknivå för glukos var 0,14.

### Triglycerider vid OGT

Triglycerider (TG) analyserades från blodprover tagna vid -5, 60 och 90 minuter vid det orala glukostoleranstestet. Resultatet redovisas i diagram nedan (*figur 7*). Medelvärdena för TG var  $0,31 \pm 0,09$  mmol/L (-5 min),  $0,26 \pm 0,06$  mmol/L (60 min) och  $0,23 \pm 0,06$  mmol/L (90 min). Hos samtliga hästar sjönk triglyceriderna under försökets gång. Ingen korrelation mellan uppmätta triglyceridnivåer vid 90 minuter under OGT och M/I-kvot från EHC fanns ( $r^2=0$ ).



Figur 7: Individuella triglyceridnivåer vid de tre provtagningstillfällena under OGT för samtliga försökshästar.

## DISKUSSION

### Tolkning av resultat från de kliniska försöken

#### **EHC**

De M-värden som användes som cut-off värden för att klassificera insulinkänslighet var rimliga för våra kliniskt friska försökshästar utifrån de få studier av EHC som gjorts på hästar (Tiley *et al.* 2008; Firshman *et al.* 2008). De friska hästar som medverkade i vår studie hade relativt låga värden på M och fler hästar klassificerades som insulinresistenta eller intermediärt insulinresistenta trots frånvaro av en klinisk bild på insulinresistens (enligt bedömning genom BCS och CNS) jämfört med tidigare studier på friska hästar (Tiley *et al.* 2008; Firshman *et al.* 2008) vilket kan bero på inaktivitet då hästar som inte motioneras har visats ha en större risk att utveckla insulinresistens än sådana som motioneras (Quinn *et al.* 2008).

#### **OGT**

För att bestämma doseringen av glukossirap utgick vi ifrån tidigare studie av Schuver *et al.* 2013. I studien av Schuver *et al.* (2013) gavs vid det orala glukostoleranstestet Karo Corn Syrup i en dosering av totalt 0,15 ml Corn Syrup per kilogram kroppsvikt, vilket motsvarar en total sockergiva av 150 mg sockerarter per kilogram kroppsvikt. Hur stor del av Karo Corn Syrup som består av vatten, samt vilka typer av sockerarter som ingår i produkten och andelen av dessa var dock okända eftersom tillverkaren inte vill lämna ut specifika uppgifter om innehållet i produkten (Schuver *et al.* 2013). Därmed går det inte att veta de exakta andelarna av mono-, di- respektive polysackarider i Karo Corn Syrup. Fördelningen av sockerarter är av vikt vid ett OGT då nedbrytningen i kroppen tar olika lång tid beroende på sockerkedjornas längd, därmed bör andelen långa respektive korta sockerkedjor kunna påverka testresultatet. I Nordic Sugars Dansukker glukossirap var innehållet i produkten känt med ett totalt glukosinnehåll på 77 % och fördelningen av sockerarter följande: glukos ca 12 %, maltos ca 11 %, maltotrios ca 10 % och övriga kolhydrater ca 44 % (Nordic Sugar Glucose Syrup product specification, PS 236654-1.3EN). För att inte riskera att få en för liten mängd enklare sockerarter (glukos, maltos och maltotrios) och samtidigt få en enklare dosering valdes i vårt försök därför dosen 0,2 ml/kg kroppsvikt, vilket gav ett totalt sockerinnehåll på 216 mg/kg kroppsvikt, en dos som även innefattade längre kedjor av sockerarter. Om enbart de enklare sockerarterna glukos, maltos och maltotrios inkluderas blev doseringen sockerarter 92,4 mg/kilogram kroppsvikt. Detta innebär att vår totala dos socker (216 mg/kg kroppsvikt) är högre än den som givits vid studie av Schuver *et al.* (2013) (150 mg/kg), vilket skulle kunna ha givit en högre insulinrespons i vår studie. I vår studie såg vi emellertid inte en kraftigare insulin- och glukosrespons hos de kliniskt friska hästarna jämfört med resultaten hos de normala hästarna i Schuver och medarbetares (2013) studie. Risken att vår dosering kan ha inneburit en lägre koncentration av enklare sockerarter är också liten då en så pass stor höjning av doseringen gjordes jämfört med tidigare studie (Schuver *et al.* 2013).

De osannolikt höga glukoskoncentrationerna (n=4) som uppmättes vid nollprovtagningen för glukos vid det orala glukostoleranstestet uppstod förmodligen på grund av kontaminering av provtagningsmaterial före eller under provtagning alternativt vid hantering av provmaterialet efter provtagning. Dessa värden anses inte ha betydelse för tolkningen av resultatet och påverkade därmed inte studiens tillförlitlighet.

Den euglykemiska hyperinsulinemiska clampen kan påverka resultaten på OGT om OGT utförs inom några dagar efter EHC på grund av att de höga insulinkoncentrationerna som uppnås vid en EHC kan resultera i en kortvarig insulinresistens. Denna risk kunde genom studiens utformning bortses ifrån eftersom OGT genomfördes innan EHC. De glukosmängder som tillförs vid ett OGT är mycket låga och ska därmed inte kunna påverka kvantifieringen av insulinkänsligheten i samband med EHC.

### *Triglycerider*

Tillförseln av glukos vid OGT gav generellt lägre nivåer av triglycerider hos samtliga hästar. Detta beror på att insulinsvaret som stimuleras vid belastningen ger ett högre upptag av triglycerider från cirkulationen till framför allt fettvävnaden (Suagee *et al.* 2013). Riktvärden för tolkning av triglyceridkoncentration i samband med ett OGT måste därmed vara lägre än efter fasta.

Att lägga till TG för diagnostik av insulinresistens ökar säkerheten av det orala glukostoleranstestet. I en studie av Pleasant *et al.* från 2013 sågs ett klart samband mellan förhöjda triglycerider och fäng hos såväl normal- som överviktiga hästar. Inga hästar i vår studie fick en signifikant ökning av sina triglyceridnivåer på grund av att de hade möjlighet till kompensation genom ökad insulinfrisättning vilket i slutändan gav ett normalt upptag av triglycerider.

### **Korrelation mellan resultat från EHC och OGT**

Vid jämförelse mellan AUC för insulin från OGT och M/I-kvot från EHC sågs däremot en god korrelation med ett hyperbolt samband (*figur 6*) där de hästar med låg insulinkänslighet fick en högre AUC på OGT. Orsaken till detta är sannolikt att hästar som är insulinresistenta kompenserar detta genom ett högre insulinsvar, vilket är resultatet av en kombination av högre insulinfrisättning från pankreas tillsammans med en minskad nedbrytning av insulin i levern. Denna kompensation ger sammantaget ett långsammare clearance av insulin i kroppen. Det kompensatoriska tillståndet ger en högre insulinrespons på en standardiserad glukosgiva, vilket ses som ett högre clearance vid EHC och en högre AUC vid OGT. Det hyperbola sambandet är dock inte komplett eftersom ingen insulinresistent häst med uttalat minskad insulin-clearance deltog i försöket och därmed kan tesen att ett hyperbolt samband mellan insulinresistens och höga värden på insulin vid OGT inte styrkas fullkomligt. Ett liknande hyperbolt samband har setts vid ett flertal humana studier med ett tydligt exponentiellt avtagande samband mellan minskande insulinkänslighet och ökande insulinrespons (Bergman *et al.*, 2002); Bergman 2007; Hücking *et al.*, 2008). Det är därmed rimligt att anta att förhållandet mellan insulinkänslighet och insulinrespons är exponentiellt avtagande även hos häst. Vid jämförelse mot en tidigare genomförd studie av Schuver *et al.* (2013) kan dessutom en hel del samband som styrker tesen ses. Kontrollhästarna i vår studie ligger lika i AUC vid jämförelse med Schuver och medarbetares (2013) studie, om vi bortser ifrån att metoderna som använts är något olika till utformningen. De hästar i Schuver's studie (2013) som har en ytterst hög insulinrespons skulle, om de innefattades i vår studie, hamna mycket högt i AUC och i diagrammet som jämför insulin-AUC med M/I-kvot (*figur 6*) skulle dessa hästar ha en mycket låg insulinkänslighet, vilket förflyttar dem långt åt höger på x-axeln. Genom denna jämförelse kan antagandet att kurvan är hyperbol ytterligare styrkas. Vilken betydelse dessa fynd har för diagnostiken av insulinresistens diskuteras vidare under rubriken "Syftet med att använda OGT för diagnostisering av insulinresistens".

Peakvärdena för glukos som erhöles vid OGT korrelerade mycket dåligt med M-värden vid EHC, vilket innebär att glukosvärden inte går att använda för direkt diagnostik av insulinresistens vid ett OGT. Däremot är glukosvärdena ändå av värde vid OGT för att utreda huruvida en dekompenenserad insulinresistens eller typ 2 diabetes mellitus föreligger hos den provtagna patienten. Vid dessa sjukdomstillstånd är hyperglykemi i många fall det enda säkra tecknet på insulinresistens föreligger eftersom en hyperinsulinemi då inte alltid förekommer på grund av att kroppen inte längre klarar av att kompensera sina höga glukosnivåer genom en ökad frisättning av insulin från pankreas tillsammans med minskad nedbrytning av insulin i levern (Frank 2011). Det ska tilläggas att inga referensnivåer finns för att bedöma ökade glukosnivåer efter ett OGT, vi kan dock anta att hästar som inte klarar av att kompensera sina höga glukosnivåer kommer att få högre glukosvärden jämfört med hästar som kompenserar den initiala hyperglykemin och därmed håller normala glukosnivåer även efter ett OGT.

### **Tillförlitlighet av OGT**

Detta är första gången som OGT hos häst kvantifieras, och tillförlitligheten av testet uppskattas, med hjälp av EHC. Att använda sig av en kvantitativ, väl validerad, diagnostisk metod som EHC för bedömning av insulinkänslighet är det enda sättet att få en säker utvärdering av huruvida det orala glukostoleranstestet är tillförlitligt nog att användas i klinisk verksamhet.

Resultaten från de kliniska försöken visar att OGT har låg sensitivitet men hög specificitet, dock är testmaterialet för litet för att kunna uttala sig med total säkerhet om sensitivitet och specificitet. Två hästar var insulinresistenta (IR) enligt EHC och dessa identifierades som intermediärt insulinresistenta (IM) på OGT. Flera av de sant intermediärt insulinresistenta hästarna blev falskt negativa på OGT (*tabell 1*). Orsaken kan vara att OGT inte är tillräckligt sensitivt för att identifiera hästar med IR förrän det finns en kraftig kompensation i form av en minskad nedbrytning av insulin eller en ökad frisättning av insulin från pankreas. Mer omfattande kliniska studier med ännu bättre spridning på materialet (eg. fler insulinresistenta hästar) krävs för att utvärdera detta resonemang. Resultaten från vår studie visar att risken för falskt positiva resultat vid OGT är liten, vilket innebär att de hästar som genom OGT diagnosticeras som insulinresistenta med säkerhet är korrekt identifierade, utifrån de referensnivåer för insulin som använts i denna studie.

Möjliga felkällor vid ett oralt glukostoleranstest är att skillnader i magsäckstömning, hur snabbt glukossirapen tillförs samt tarmens förmåga till upptag kan ge falskt positiva eller falskt negativa svar hos vissa individer. Fysiologiska variationer är dock alltid något att vara medveten om vid orala dynamiska tester och ingenting som helt går att bortse ifrån i varje enskilt fall. Genom att hästarna fastades inför testet kan risken för felkällor minskas då detta leder till en större standardisering av testmaterialet.

Resultaten vid OGT korrelerar i studien därmed väl med EHC. R-värdet vid jämförelse mellan uppnådda peakvärden av insulin och respektive M/I-kvoter ( $r^2=0,45$ ) samt r-värdet vid korrelation mellan insulinets AUC och M/I-kvoter ( $r^2=0,49$ ) var acceptabla. Dessa resultat innebär att det orala glukostoleranstestet ger en generellt mycket högre tillförlitlighet än fastevärden av insulin och glukos, vilka i ett flertal studier har visat sig ha låg tillförlitlighet för diagnostik av insulinresistens (Firshman

& Valberg 2007; Treiber, Kronfeld & Geor 2006; Treiber & Kronfeld 2005; Kronfeld & Treiber 2005).

### **Syftet med att använda OGT för diagnosticering av insulinresistens**

Idag finns inget tillförlitligt diagnostiskt verktyg att använda sig av för att fältmässigt diagnosticera insulinresistens. Fastevärden av insulin och glukos är, som nämnt ovan, opålitliga och en stor normalvariation finns mellan individer. Ett stort behov av att hitta en alternativ diagnostisk metod finns därmed.

Ingen av de hästar som användes i studien hade vid OGT eller EHC kliniska tecken på insulinresistens och skulle fenotypiskt inte bedömas befinna sig i riskzonen för att vara insulinresistenta. Dessa hästar skulle då med stor sannolikhet aldrig provtas genom OGT eftersom ingen misstanke om insulinresistens skulle föreligga. Trots detta gav såväl OGT som EHC utslag på intermediär insulinresistens hos flera individer i studien. Detta säger oss att en stor andel hästar, som saknar kliniska symptom på insulinresistens, ändå kan ligga i riskzonen att drabbas av fång eftersom de är delvis insulinresistenta subkliniskt. Eftersom vi efter tolkning av studieresultaten kan anta att kurvan för kvantifiering av insulinresistensen är hyperbol och att hästarna vid en specifik punkt går över gränsen från att vara intermediärt insulinresistenta utan kliniska symptom till att bli kliniskt insulinresistenta hästar skulle man genom OGT kunna hitta de hästar som befinner sig i riskzonen för att passera denna gräns. Genom management skulle dessa hästar därefter kunna hållas på rätt sida av gränsen genom att inte utsätta dem för riskfaktorer, vilket i praktiken innebär utfodring med höga WSC-halter, något som skulle kunna få dessa hästar att bli sjuka i akut fång. Vid tolkning av det hyperbola sambandet som ses i vår studie (*figur 5 och 6*) kan vi anta att en liten förbättring av insulinkänsligheten ger en uttalad sänkning av insulinresponsen efter sambandet är exponentiellt avtagande. Det orala glukostoleranstestet är därmed kliniskt intressant då vi genom testet på ett enkelt sätt kan utvärdera responsen och följa den över tid genom upprepade tester. Testet ger därmed en möjlighet att följa hästarnas insulinkänslighet och hur den förändrar sig efter insatta åtgärder för att öka insulinkänsligheten.

Det går inte att avgöra vid vilken specifik punkt, eller vid vilket specifikt insulinvärde vid en OGT, som resultatet blir kliniskt relevant, eftersom vi inte vet vilka insulinnivåer de intermediärt insulinresistenta hästarna kan komma upp till då de t.ex. släpps på bete eller genomgår ett plötsligt foderbyte. Även om en häst på OGT visar sig vara intermediärt insulinresistent finns det inget som talar om hur kraftigt insulinsvar just den individen får vid exponering för höga nivåer av WSC. Genom ytterligare forskning kring detta skulle mer specifika riktlinjer kunna fås gällande hur testresultaten vid OGT ska tolkas för att på bästa sätt kunna återspegla den kliniska relevansen. Det ska alltid tas i beaktande att det är en stor variation i insulinsvar mellan individer och en otydlig gräns mellan grupperna, vilket gör det omöjligt att få en helt säker testmetod, falskt negativa/positiva kommer alltid att finnas till viss grad.

Det orala glukostoleranstestet kan bli en viktig del i utvecklandet av en strategi för diagnostik och påföljande management av insulinresistenta hästar. Att genom en enkel och lättillgänglig metod kunna diagnosticera insulinresistenta hästar kan fungera som motivation för djurägare för att genomföra

dietära åtgärder och motionera sin häst mer. Uppföljande provtagning kan göras efter behandling och tillsammans med vägning/mätning av omfång och klinisk undersökning bekräfta att behandlingsresultat har nåtts och insulinkänsligheten har ökat.

### **Vidareutveckling av OGT för säkrare diagnostik**

I många kliniska situationer kommer provtagning för OGT utföras i samband med ett återbesök hos en häst med klinisk fång. Dessa hästar kommer ofta att stå på, eller precis ha avslutat, behandling med NSAID (*non steroid inflammatory drugs*). Det skulle därför vara intressant att jämföra hästar under behandling med hästar som inte har behandlats för att se om någon statistisk signifikans kan ses mellan dessa två grupper. Studier har nämligen visat att smärta leder till ökad insulinresistens på grund av en ökad utsöndring av kortisol som i sin tur bland annat försämrar funktionen av proteiner involverade i insulinsignalering (Bailey & Elliott 2007; Tiley *et al.* 2008) och därmed bör det utredas huruvida detta är av klinisk betydelse vid OGT och kan ge falskt positiva testresultat på grund av tillfällig insulinresistens till följd av ökade kortisolnivåer. Även utvärdering av hur stress påverkar testresultaten vore av värde då stress i tidigare studier har visats påverka testresultat vid CGIT (Bröjer *et al.* 2013). OGT kommer dock i de allra flesta fall att utföras i hästarnas hemmiljö utan påtaglig stress, men provtagning är i sig alltid en stressfaktor och testet kan även komma att användas för patienter på klinik eller djursjukhus.

Att jämföra en grupp hästar med föregående fångepisoder med en frisk kontrollgrupp för att se om skillnader förekommer som är signifikanta mellan grupperna vore av värde för ytterligare validering av metoden, än så länge är enbart kliniskt friska hästar testade. Dessutom bör smärtpåverkade hästar drabbade av fång genomgå ett OGT och därefter jämföras med sina egna resultat på ett OGT då smärta ej längre förekommer för att få en utvärdering av huruvida smärta hos hästar sjuka i fång påverkar resultatet för individer vid ett OGT. Genom att göra denna jämförelse kan man avgöra huruvida det spelar någon roll om OGT genomförs under det akuta, smärtsamma, stadiet av sjukdomen eller ej. Dock ska risken med att tillföra en större bolus av glukos till hästar som är sjuka i klinisk fång alltid beaktas då glukosgivan kan ge upphov till en hyperglykemi och en uttalad hyperinsulinemi vilket kan förvärra symptomen. Glukosdosen som tillförs hästen vid det orala glukostoleranstestet är dock relativt låg och borde därmed utgöra en mycket liten risk.

### **KONKLUSION**

Det orala glukostoleranstestet är ett bra alternativ till mätning av blodnivåer av fasteinsulin och fasteglukos som diagnostisk metod av insulinresistens i fält.

Jämfört med CGIT är testet mindre tidskrävande och mindre invasivt, glukosgivan kan ges av djurägaren och veterinär kan därefter vara på plats i stallet för provtagning 60-90 minuter senare (då flest hästar uppnår sitt peakvärde för insulin). För att felkällor inte ska uppstå krävs noggranna skriftliga och muntliga instruktioner till djurägaren gällande föregående fasta under natten samt hur och när glukoset ska tillföras hästen. Glukossirapen är lättillgänglig och finns att köpa i vanliga matbutiker till en låg kostnad.

Studien inkluderade endast 14 kliniskt friska hästar och ytterligare utvärdering av OGT krävs därför. Utvärdering kan ske kontinuerligt genom att applicera metoden på fältmässiga förhållanden genom att låta kliniskt verksamma veterinärer använda OGT och därmed sammanställa vilka resultat som fås vid dessa tester. Cut-off nivåerna kan behöva justeras om det utökade provmaterialet visar på resultat som

gör detta befogat. Vissa provtagna hästar kan, om behov och intresse finns, kvantifieras med EHC för att kontrollera testresultaten, till exempel individer som är fenotypiskt insulinresistenta men som inte blir det på OGT. Det orala glukostoleranstestet är en del i att nå ökad kunskap och förståelse för den ökande fångproblematiken hos dagens hästpopulation och kan bli ett viktigt hjälpmedel vid utredning av metabol sjukdom hos häst.



## 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), pp. 530–535.
- Bailey, S.R. & Elliott, J. (2007). The Corticosteroid Laminitis story: 2. Science of If, When and How. *Equine Veterinary Journal*, 39, pp. 7–11.
- Bergman, R.N., Ader, M., Huecking, K. & Van Citters, G. (2002). Accurate Assessment of Beta-Cell Function, The Hyperbolic Correction. *Diabetes*, 51 (suppl.1), pp.8212-8220.
- Bergman, R.N. (2007). Orchestration of Glucose Homeostasis. *Diabetes*, 56, pp. 1489-1501.
- Bröjer, J., Lindåse, S., Hedenskog, J., Alvarsson, K. & Nostell, K. (2013). Repeatability of the Combined Glucose- Insulin Tolerance Test and the Effect of Stressor before Testing in Horses of 2 Breeds. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27 (6), pp. 1543-1550.
- Carter, R.A., McCutcheon, L.J., George, L.A., Smith, T.L., Frank, N. & Geor, R.J. (2009a). Effects of Diet-induced Weight Gain on Insulin Sensitivity and Plasma Hormone and Lipid Concentrations in Horses. *American Journal of Veterinary Research*, 70 (10), pp. 1250–1258.
- Carter, R.A., Geor, R.J., Staniar, W.B., Cubitt, T.A. & Harris, P.A. (2009b). Apparent Adiposity Assessed by Standardised Scoring Systems and Morphometric Measurements in Horses and Ponies. *The Veterinary Journal*, 179 (2), pp. 204–210.
- Carter, R.A., Treiber, K.H., Geor, R.J., Douglass, L. & Harris, P.A. (2009c). Prediction of Incipient Pasture-associated Laminitis from Hyperinsulinaemia, Hyperleptinaemia and Generalised and Localised Obesity in a Cohort of Ponies. *Equine Veterinary Journal*, 41 (2), pp. 171–178.
- Cersosimo, E. & DeFronzo, R.A. (2006). Insulin Resistance and Endothelial Dysfunction: The Road Map to Cardiovascular Diseases. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 22 (6), pp. 423–436.
- Chameroy, K. (2010). Diagnosis and Management of Horses with Equine Metabolic Syndrome (EMS). Diss. Tennessee: University of Tennessee.
- Coffman, J.R. & Colles, C.M. (1983). Insulin Tolerance in Laminitic Ponies. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 47, pp. 347–351.
- Donaldson, M.T., Jorgensen, A.J.R. & Beech, J. (2004). Evaluation of Suspected Pituitary Pars Intermedia Dysfunction in Horses with Laminitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224, pp. 1123–1127.
- Durham, A.E. (2012). Metformin in Equine Metabolic Syndrome: an Enigma or a Dead Duck? *Veterinary Journal*, 191 (1), pp. 17–18.
- Durham, A.E., Rendle, D.I. & Newton, J.R. (2008). The Effect of Metformin on Measurements of Insulin Sensitivity and Beta Cell Response in 18 Horses and Ponies with Insulin Resistance. *Equine Veterinary Journal*, 40 (5), pp. 493–500.

- Eiler, H., Frank, N., Frank, M.A., Oliver, J.W. & Fecteau, K.A. (2005). Physiologic Assessment of Blood Glucose Homeostasis via Combined Intravenous Glucose and Insulin Testing in Horses. *American Journal of Veterinary Research*, 66 (9), pp. 1598–1604.
- Elliott, J. & Bailey, S.R. (2006). Gastrointestinal Derived Factors Are Potential Triggers for the Development of Acute Equine Laminitis. *The Journal of Nutrition*, (suppl 2), pp. 2103–2107.
- Firshman, A.M. & Valberg, S.J. (2007). Factors Affecting Clinical Assessment of Insulin Sensitivity in Horses. *Equine Veterinary Journal*, 39 (6), pp. 567–575.
- Firshman, A.M., Valberg, S.J., Baird, J.D., Hunt, L. & DiMauro, S. (2008). Insulin Sensitivity in Belgian Horses with Polysaccharide Storage Myopathy. *American Journal of Veterinary Research*, 69 (6), pp. 818–823.
- Frank, N. (2011). Equine Metabolic Syndrome. *The Veterinary Clinics of North America Equine practice*, 27 (1), pp.73–92.
- Frank, N. (2012). Oral Sugar Test Used to Diagnose Insulin Resistance in Horses. *American Association of Equine Practitioners*, 58, p. 576.
- Frank, N., Somnardahl, C., Eiler, H., Webb, L.L., Denhart, J.W. & Boston, R.C. (2005). Effects of oral administration of levothyroxine sodium on concentrations of plasma lipids, concentration and composition of very-low-density lipoproteins, and glucose dynamics in healthy adult mares. *American Journal of Veterinary Research*, 66, pp. 1032–8.
- 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), pp. 1383–1390.
- Frank, N., Elliott, S.B. & Boston, R.C. (2008). Effects of Long-Term Oral Administration of Levothyroxine Sodium on Glucose Dynamics in Healthy Adult Horses. *American Journal of Veterinary Research*, 69 (1), pp. 76–81.
- De Fronzo, R.A., Tobin, J.D. & Andres, R. (1979). Glucose Clamp Technique: A Method for Quantifying Insulin Secretion and Resistance. *American Journal of Physiology*, 237 (3), pp. 214-223
- 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), ss. 371-372.
- 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, ss. 2333-2342.
- Hücking, K., Watanabe, R.M., Stefanovski, D. & Bergman, R.N. (2008). OGTT-Derived Measures of Insulin Sensitivity are Confounded by Factors Other than Insulin Sensitivity Itself. *Obesity*, 16 (8), pp.1938-1945.
- Jacobs, K. & Bolton, J. (1982). Effects of Diet on the Oral Glucose Tolerance Test in the Horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 180 (8), pp. 884–886.
- 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), pp. 97–101.
- Johnson, P.J. (2002). The Equine Metabolic Syndrome: Peripheral Cushing's Syndrome. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 18, pp. 271–293.

- 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), pp. 111–117.
- Kronfeld, D.S., Treiber, K.H., Geor, R.J. (2005). Comparison of Nonspecific Indications of Insulin Resistance in Horses and Ponies. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226(5), pp. 712-719.
- De Laat, M.A., McGowan, C.M., Sillence, M.N. & Pollitt, C.C. (2010). Equine Laminitis: Induced by 48 h Hyperinsulinaemia in Standardbred Horses. *Equine Veterinary Journal*, 42 (2), pp. 129–35.
- 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), pp. 576-582.
- 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 / American College of Veterinary Internal Medicine*, 19 (6), pp. 883–888.
- 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 of Weight Gain, Diet, and Exercise on Insulin Sensitivity in Thoroughbred Geldings. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28 (12), pp. 728-738.
- Rijnen, M. & van der Kolk, J.H. (2003). Determination of Reference Range Values Indicative of Glucose Metabolism and Insulin Resistance by Use of Glucose Clamp Techniques in Horses and Ponies. *American Journal of Veterinary Research*, 64 (10), pp. 1260–1264.
- Robert, M.C. & Hill, F.W.G. (1973). The Oral Glucose Tolerance Test in The Horse. *Equine Veterinary Journal*, 5 (4), pp. 171–173.
- Schuver, A., Frank, N., Chamero, K.A. & Elliott, S.B. (2013). Assessment of Insulin and Glucose Dynamics by Using an Oral Sugar Test in Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073708061300590X>
- Sjaastad, O.V., Hove, K. & Sand, O. (2003). *Physiology of Domestic Animals*. 1 ed. Scandinavian Veterinary Press, Oslo.
- Suagee, J.K., Corl, B.A., Swyers, K.L., Smith, T.L., Flinn, C.D. & Geor, R.J. (2013). A 90-day Adaptation to a High Glycaemic Diet Alters Postprandial Lipid Metabolism in Non-Obese Horses without Affecting Peripheral Insulin Sensitivity. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97, pp. 245-254.
- Tiley, H., Geor, R.J. & McCutcheon, J. (2008). Effects of Dexamethasone Administration on Insulin Resistance and Components of Insulin Signaling and Glucose Metabolism in Equine Skeletal Muscle. *American Journal of Veterinary Research*, 69 (1), pp. 51–58.
- Tinworth, K.D., Edwards, S., Harris, P., Sillence, M.N., Hackett, L.P., Nobel, G.K. (2010). Pharmacokinetics of Metformin after Enteral Administration in Insulin-Resistant Ponies. *American Journal Of Veterinary Research*, 71, pp. 1201–1206.
- Tinworth, K.D., Boston, R.C., Harris, P.A., Sillence, M.N. & Raidal, S.L. (2012). The Effect of Oral Metformin on Insulin Sensitivity in Insulin-Resistant Ponies. *The Veterinary Journal*, 191 (1), pp. 79–84.

- Treiber, K., Kronfeld, D., 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), pp. 2014-2021.
- Treiber, K.H., Kronfeld, D.S., Hess, T.M., Byrd, B.M., Splan, R.K. & Staniar, W.B. (2006a). Evaluation of Genetic and Metabolic Predispositions and Nutritional Risk Factors for Pasture-Associated Laminitis in Ponies. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228 (10), pp. 1538-45.
- Treiber, K.H., Kronfeld, D.S. & Geor, R.J. (2006b). Insulin Resistance in Equids : Possible Role in Laminitis 1 – 3. *The Journal of Nutrition*, 136, pp.2094–2098.
- Vick, M.M., Sessions, D., Murphy, B.A., Kennedy, I.L., Reedy, S.E. Fitzgerald, B.P. (2006). Obesity is Associated with Altered Metabolic and Reproductive Activity in the Mare: Effects of Metformin on Insulin Sensitivity and Reproductive Cyclicity. *Reproduction Fertility and Development*, 18, pp. 609–617.
- Vick, M.M., Adams, A.A., Murphy, B.A., Sessions, D.R., Horohov, D.W., Cook, R.F., Shelton, B.J. & Fitzgerald, B.P. (2007). Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity in the horse. *Journal of animal science*, 85 (5), pp. 1144–1155.
- Öberg, J., Bröjer, J., Wattle, O. & Lilliehöök, I. (2011). Evaluation of an Equine-Optimized Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serum Insulin Measurement and Stability Study of Equine Serum Insulin. *Comparative Clinical Pathology*. DOI 10.1007/s00580-011-1284-6.