



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

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

Reproducerbarhet hos oralt glukostoleranstest för diagnostisering av insulinresistens hos häst

Ida Askerfelt

*Uppsala
2015*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2015:35*

Reproducerbarhet hos oralt glukostoleranstest för diagnostisering av insulinresistens hos häst

Repeatability of the oral glucose tolerance test for diagnosing insulin resistance in horses

Ida Askerfelt

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: 2015

Delnummer i serie: Examensarbete 2015:35

ISSN: 1652-8697

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

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

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

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Ekvint metabolt syndrom är ett relativt nytt begrepp där drabbade hästar kan karaktäriseras av ökad generell och regional fettansättning, rubbningar i glukos- och fettmetabolismen, insulinresistens samt ibland klinisk eller subklinisk fång. Just insulinresistens är av intresse då det i flera studier visats att fång kan framkallas ensamt av höga insulinnivåer. Möjligheterna att diagnosticera insulinresistens i fält – och därmed kunna förebygga fång eller följa behandlingen av en redan drabbad häst – har varit begränsade då fasteglukos och -insulin ej är tillförlitliga metoder och övriga tester kräver en mer avancerad utrustning. År 2013 presenterades en ny variant av oralt glukostoleranstest (OGT) där djurägaren ger hästen sockersirap i munnen varpå ett blodprov tas efter 60-90 minuter av en veterinär. Plasmainsulin och -glukos analyseras och hästen klassificeras därefter som insulinkänslig, intermediärt insulinresistent eller insulinresistent. OGT har validerats mot euglykemisk hyperinsulinemisk clamp (EHC, *gold standard* för att kvantifiera insulinresistens) och korrelerade väl. Veterinärer i Sverige har redan börjat använda testen i praktiken, med mycket positivt gensvar. Syftet med denna studie var att undersöka reproducerbarheten hos OGT hos kliniskt friska hästar.

I försöket ingick 15 stycken kliniskt friska hästar av raserna islandshäst, shetlandsponny och minishetlandsponny. Hästarna gavs glykossirap oralt (Dansukker, Nordic Sugar), doserat till 0,2 ml/kg kroppsvikt, efter tolv timmars fasta. Innan sockergivan togs ett nollprov för analys av plasmaglukos och -insulin. Glukos- och insulinresponsen följdes med blodprovtagning varje halvtimme under tre timmar via permanentkateter i jugularvenen. Samma försök upprepades efter åtta dagar, utan att utfodring, miljö eller träning ändrades, för att undersöka testets reproducerbarhet. De resultat som utvärderades var AUC och maxvärde för insulin- och glukoskoncentrationerna, samt insulinnivåerna vid 60 och 90 minuter. Skillnaden mellan OGT 1 och OGT 2 för de respektive variablerna undersöktes med variationskoefficient (CV%) och parat t-test.

Det orala glukostoleranstestet hade en god reproducerbarhet både avseende insulin- och glukosrespons när resultatet från de två testerna jämfördes. *P*-värdet varierade från 0,216 till 0,866 ($\alpha = 0,05$) när OGT1 och OGT2 jämfördes i ett parat t-test. Det fanns inte heller någon signifikant skillnad mellan medelvärdena för plasmaglukos respektive plasmainsulin mellan OGT 1 och OGT 2 vid någon provtagningstidpunkt. Medelvärdet för CV% för de olika undersökta variablerna var 7-31%.

Studien visar att resultat av ett OGT är tillförlitligt så till vida att upprepade OGT verkar ge en snarlik bild av insulinkänslighet hos kliniskt friska hästar. Detta gör att OGT kan användas till exempel för att följa en insulinresistent individ som genomgår förändringar i utfodring och träning med mål att förbättra insulinkänsligheten. Vidare bör ytterligare studier med fler hästar och försök med kliniskt insulinresistent hästar utföras för att fortsatt utvärdera och eventuellt justera gränsvärdena för insulin för att ge testet än större tillförlitlighet.

SUMMARY

Equine Metabolic Syndrome is a relatively new concept where affected horses are characterized by generalized and/or regional obesity, disturbance in the glucose metabolism, dyslipidemia, insulin resistance and an increased risk of laminitis. The insulin resistance seem to have a big impact on whether laminitis will develop, with several studies demonstrating how laminitis can occur by induced hyperinsulinemi. The possibilities to diagnose insulin resistance in the field setting – and thereby prevent laminitis or monitor the treatment of a patient – have been limited and include basal blood glucose and basal blood insulin which have low reliability and repeatability. Other diagnostic tests require more advanced equipment. In the year 2013 a new kind of oral glucose tolerance test (OGT) was presented. In the new OGT the horse owner gives the horse sugar syrup and the veterinarian can arrive after 60-90 minutes to take blood samples. Blood insulin and blood glucose are analyzed and the horse can then be classified as insulin sensitive, intermediate insulin resistant or insulin resistant. The OGT has been compared with the euglycemic hyperinsulinemic clamp (EHC, gold standard for quantifying insulin sensitivity) and found to have good correlation for assessment of insulin sensitivity. Veterinarians in Sweden are already using the OGT in practice, with positive feedback. The aim of this study was to examine the repeatability of the OGT using clinically healthy horses.

Fifteen clinically healthy horses; 8 Icelandic horses, 4 Shetland ponies and 3 mini Shetland ponies were used in the study. The horses were given 0,2 mL/kg sugar syrup (Dan Sukker Glykossirap) after 12 hours of starvation. The glucose and insulin responses were monitored with a blood sample from a permanent jugular catheter every 30 minutes during 3 hours. The same procedure was repeated 8 days later, without changing feed, environment or exercise, to study the repeatability.

The OGT had a good repeatability regarding both the insulin response and glucose response when the results from the two OGT were compared. The p -value varied between 0,216 and 0,866 ($\alpha=0,05$) when OGT 1 and OGT 2 were compared with a paired t-test. There were no significant differences of the mean values of plasma glucose or plasma insulin at any sampling time between OGT 1 and OGT 2. The coefficient of variation, a mean value from the coefficient of variation of each individual between OGT 1 and OGT 2, varied between 7,2 and 31 % among the studied variables.

This study shows that the result from an OGT is reliable in the sense that a repeated OGT shows similar image of insulin sensitivity in clinically healthy horses. This makes the OGT suitable to monitor the treatment of insulin resistant horses. Furthermore, studies with insulin resistant horses are required to continue to evaluate and adjust the OGT.

INNEHÅLL

INLEDNING	1
SYFTE.....	1
LITTERATURÖVERSIKT.....	2
Ekvint metabolt syndrom	2
Insulinresistens och fång	2
Diagnostik av insulinresistens	4
MATERIAL OCH METODER.....	5
Hästarna.....	5
Studiedesign	5
Blodanalyser.....	6
Statistiska analyser och beräkningar	6
RESULTAT.....	6
DISKUSSION	9
Felkällor	10
KONKLUSION.....	11
REFERENSER.....	11

INLEDNING

Välfärdssjukdomar som fetma och insulinresistens är, precis som hos människor, ett ökande problem i hästuppopulationen. Många hästar är drabbade av insulinresistens, vilket kan leda till fång som är mycket smärtsamt för hästarna och i vissa fall i förlängningen leder till avlivning. Möjligheterna att diagnostisera insulinresistens i fält har varit begränsade då tidigare tester med fasteglukos och -insulin har låg tillförlitlighet och övriga tester kräver klinikvistelse.

SYFTE

Att på ett tillförlitligt och smidigt sätt kunna diagnostisera insulinresistens ute i fält är av stor vikt då både förbyggande åtgärder kan vidtas och terapeutiska resultat kan följas, vilket medför ett minskat lidande för hästarna. År 2013 presenterade Schuver *et al.* en ny variant av oralt glukostoleranstest (OGT) att använda i fält, som därefter applicerats till svenska förhållanden efter byte av sockerkälla. Testet har korrelerat väl mot mätningar av hästars insulinkänslighet med euglykemisk hyperinsulinemisk clamp (EHC), som räknas som *gold standard* metod för att kvantifiera insulinresistens (Berggren, 2014). I ett pågående försök valideras OGT mot EHC på hästar som är insulinresistenta. Syftet med denna studie är att undersöka reproducerbarheten av insulin- och glukosresponsen vid ett OGT. En god reproducerbarhet av ett diagnostiskt test ökar dess tillförlitlighet.

LITTERATURÖVERSIKT

Ekvint metabolt syndrom

Ekvint metabolt syndrom (EMS) är ett relativt nytt begrepp som togs upp år 2002 av Philip Johnson och kopplar samman fetma, insulinresistens och fång hos hästar. *Metabolt syndrom* är sedan en längre tid känt på humansidan där det beskriver endokrina och metabola förändringar som leder till ökad risk för hjärt- och kärlsjukdomar samt diabetes typ 2 (Reaven 1988).

Hästar som lider av EMS karaktäriseras av ökad generell och/eller regional fettansättning, rubbningar i glukos- och fettmetabolismen, insulinresistens samt en ökad risk för fång. De flesta hästar som drabbas är mellan 5-15 år gamla och raser som arabiska fullblod, quarter- och morganhästar samt diverse ponnyraser är överrepresenterade. Observationen att EMS är vanligare inom vissa raser tyder på att även en genetisk faktor spelar roll, utöver hästens miljö och utfodring. (Johnson 2002)

Behandlingen av EMS består framför allt av förändringar i utfodring och aktivitet (Carter *et al.* 2009b; Geor 2008). Andelen energi och mängden lättlösliga kolhydrater bör minskas i fodret och den fysiska aktiviteten bör ökas. Senare studier har visat att den generella fetman är sekundär och kan utvecklas samtidigt som – eller till följd av – insulinresistensen, snarare än att det är fetman i sig som orsakar insulinresistens (Geor 2008). Bete under sommaren innebär ett foderintag av stora mängder energi och lättlösliga kolhydrater och ska därför reduceras eller helt undvikas. Om hästen redan drabbats av akut klinisk fång blir hanteringen givetvis en annan då fånganfallet först och främst ska avhjälpas.

Farmakologisk behandling av EMS med levothyroxin inducerar viktnedgång och ger en ökad insulinkänslighet på såväl kort som lång sikt (Frank *et al.* 2005; Frank *et al.* 2008). Levothyroxin används ej i någon större utsträckning till häst i praktiken då det är förhållandevis dyrt. Metformin är ett annat läkemedel som används på humansidan för att kontrollera hyperglykemi och öka insulinkänsligheten vid diabetes mellitus. Forskning på hästar har dock påvisat en låg oral biotillgänglighet (Tinworth *et al.* 2010). Metformin har visat sig ge en ökad insulinkänslighet på kort sikt, men har ej givit signifikant ökad insulinkänslighet vid långtidsbehandling (Vick *et al.* 2006; Tinworth *et al.* 2012; Durham *et al.* 2008).

Insulinresistens och fång

Insulin är ett peptidhormon som produceras och frisätts från betacellerna i de Langerhanska öarna i pankreas. Sekretionen stimuleras främst av hyperglykemi och en ökad koncentration aminosyror i blodet, till exempel efter en måltid. Insulin är ett anabolt hormon som ökar glukos- och aminosyraupptaget till celler, stimulerar glykogen-, triglycerid- och proteinsyntesen samtidigt som det minskar glukoneogenesen. Insulin stimulerar glukosupptaget i insulinkänslig vävnad, genom att aktivera glukostransportmolekyler (GLUT-4) som faciliterar upptaget. (Sjaastad *et al.* 2003)

Insulinresistens innebär att insulinkänslig vävnad (skelettmuskulatur och fettväv) har en nedsatt förmåga att svara på normala insulinnivåer. Detta leder till att pankreas ökar sin insulininsöndring vilket ger en hyperinsulinemi. Till skillnad från människor kan hästar i de flesta fall under en lång tid kompensera sin insulinresistens genom en ökad insulinkoncentration så att hyperglykemi inte uppstår. Insulinresistens är en viktig del i sjukdomskomplexet EMS.

Den kliniska bilden vid EMS inkluderar ofta betesrelaterad fång. Fånganfallen uppstår inte sällan efter en period med väderlek som givit näringsrikt gräs. Hästar med benägenhet att utveckla EMS har, vid utfodring med stor andel lättlösliga kolhydrater, högre insulinnivå i blodet jämfört med friska hästar på

samma diet. Hästar med EMS har tio gånger högre risk att drabbas av fång jämfört med friska hästar (Trieber *et al.*, 2006).

Patofysiologin kring hur insulinresistens orsakar fång är ej helt klarlagd. I en studie av Asplin *et al.* (2007) visas det hur friska ponnyer drabbas av klinisk fång efter 72 h av experimentellt inducerad hyperinsulinemi. Detta försök bevisar således att fång kan framkallas ensamt av höga insulinnivåer. Det finns flera hypoteser om vilka mekanismer som gör att insulinresistens orsakar fång. Mobasheri *et al.* (2004) hittade GLUT-4 proteiner i keratinocyter från häst, vilket skulle kunna indikera att det sker ett insulinberoende upptag av glukos även i hästens hovar och att dessa därmed skulle kunna drabbas vid insulinresistens. Senare forskning visar dock på att glukosupptaget i hoven framför allt sker via GLUT1, och därmed inte är beroende av insulin (Asplin *et al.* 2011).

En annan teori går ut på att insulinresistensen predisponerar för fång genom störningar i cirkulationen som försörjer lamellagret i hoven, som därmed skulle kunna bli mer mottagligt för skador. Tidigare studier på människor och andra arter har visat att vaskulärt endotel är känsligt för insulin och kan svara med både vasokonstriktion och vasodilatation (Kim *et al.* 2006). Insulin stimulerar kväveoxid som är vasodilaterande men stimulerar även frisättningen av endothelin-1 som är en potent vasokonstriktor. Vid insulinresistens hämmas stimuleringen av kväveoxid medan endothelin-1 fortsätter att frisättas ibland till och med i högre utsträckning än hos friska individer. Om detta även sker i det vaskulära endotelet i lamellagret skulle vasokonstriktionen kunna orsaka ischemi och därmed orsaka ett fånganfall. Hos människor med metabolt syndrom ses ofta hypertension, vilket tros vara kopplat just till dysfunktion i det vaskulära endotelet (Hansen *et al.* 2003 & Kim *et al.* 2006). En studie på insulinresistenta ponnyer med fång-historik tar upp att rubbningar i det vaskulära endotelet även kan vara en komponent i sjukdomskomplexet EMS (Bailey *et al.* 2008). En senare studie på detta (Winqvist, 2013) undersökte bland annat blodtryck, plasmaendotelin och insulinresistens hos hästar innan, under och efter en betesperiod med viktuppgång. Där sågs en ökning av hästarnas medelblodtryck som tycktes vara kopplad till viktuppgången snarare än till insulinresistens och förhöjda plasmaendotelinnivåer. Till skillnad från studien av Bailey *et al.* (2008), som använde ponnyer som haft återkommande betesrelaterad fång, användes i studien av Winqvist (2014) svenska varmblodstravare – en ras som inte är predisponerad för att utveckla metabola rubbningar. Detta kan vara en orsak till varför kopplingen mellan insulinresistens och ökat medelartärblodtryck inte kunde ses i den senare studien.

En tredje hypotes kring varför insulinresistens ger upphov till fång handlar om ett underliggande kronsikt, pro-inflammatoriskt tillstånd hos de drabbade hästarna. Studier på människor och andra arter har visat att behandling med högdos aspirin (acetylsalicylsyra) gav en förbättrad insulinkänslighet (Dandona *et al.* 2004), vilket talar för att inflammation spelar en stor roll vid insulinresistens. Vidare har det visats att det pro-inflammatoriska tillståndet hos insulinresistenta individer utgår från fettväven som producerar adipokiner (leptin, TNF- α , IL-1 β , IL-6 och IL-8) varav många är pro-inflammatoriska (Dandona *et al.* 2004). Vid fetma sker progressiv dysreglering i fettväven som gör att adipokinproduktionen ökar, vilket leder till störningar i insulinsignaleringen och utveckling eller förvärrad insulinresistens samt dysreglering av kärlendotel. I studier på häst finns evidens för att TNF- α och IL-1 β mRNA-uttryck var högre hos feta hästar och kunde identifieras som en risk för insulinresistens (Trieber *et al.* 2009 & Vick *et al.* 2007).

Diagnostik av insulinresistens

Det finns flera varianter av dynamiska tester som utförs på klinik och kan diagnostisera insulinresistens. Vid intravenöst glukostoleranstest (IVGT) ges hästar glukos intravenöst efter fasta över natten. Därefter mäts glukos- och insulinkoncentrationen i blodet över ett bestämt tidsförlopp.

Frequently sampling intravenous glucose tolerance test (FSIGT) är en variant av IVGT och används för att kvantifiera insulinresistens. Glukos tillförs intravenöst och efter 20 minuter ges en insulinbolus. Insulin- och glukoskoncentrationen i blodet mäts vid upprepad provtagning under tre timmar. Värdena sätts in i en matematisk modell (*minimal model*) för att standardisera och utvärdera pankreasfunktion och insulinkänslighet. FSIGT har använts som diagnostik av insulinresistens sedan mitten av 2000-talet. Problematiken med FSIGT är att den matematiska modellen gör många antaganden kring insulin- och glukoskinetik som inte alltid överensstämmer med verkligheten (Pratt *et al.* 2005). Testet kräver dock en mindre avancerad utrustning än till exempel euglykemisk hyperinsulinemisk clamp (EHC) varför FSIGT ibland föredras om större populationer ska undersökas. FSIGT har dock en lägre reproducerbarhet jämfört med EHC (Pratt *et al.* 2005).

Kombinerat glukos- och insulintoleranstest (CGIT) är ytterligare en variant av de dynamiska testerna och beskrevs första gången år 2005 av Eiler *et al.* Glukos eller dextros tillförs intravenöst under en minut varpå en insulininjektion ges sex sekunder efter avslutad glukostillförsel. Hos friska hästar återgår insulin- och glukosnivåerna till det normala inom 45 minuter, medan de hos insulinresistenta hästar kvarstår över det normala längre än 45 minuter.

Euglykemisk hyperinsulinemisk clamp (DeFronzo *et al.*, 1979) används även den för att kvantifiera insulinresistens och anses av många vara en *gold standard* metod. Genom att upprätthålla hyperinsulinemi via exogen tillförsel av insulin hämmas både den endogena insulinfrisättningen från pankreas samt kroppens glukoneogenes. Den tillförda glukosinfusionshastigheten för att upprätthålla ett euglykemiskt *steady state* blir då ekvivalent med glukosupptaget i insulinkänslig vävnad, och därmed ett mått på vävnadskänslighet för exogent insulin. Testet kräver speciell utrustning och används därför framför allt i forskningssammanhang.

För att på ett enklare sätt mäta insulinresistens under fältmässiga förhållanden har fasteglukos och fasteinsulin använts. Detta är en icke-dynamisk test och korrelationen mellan fastevärdena av insulin och kvantitativa metoder för mätning av insulinkänslighet är låg (Kronfeld *et al.* 2005; Trieber *et al.* 2005; Firshman & Valberg 2007). Ett annat problem med denna diagnostik är att den endogena variationen är okänd och värdena därmed lätt kan feltolkas som patologiska. Det går inte heller att uttala sig om ifall en hyperglykemi beror på nedsatt insulinutsöndring från pankreas eller insulinresistens i målorganen.

Orala glukostoleranstester (OGT) har använts under flera årtionden inom hästmedicinen, initialt för att diagnostisera malabsorption (Robert & Hill 1973). Testet har därefter utvecklats till att kunna uppskatta insulinresistens genom att även analysera insulin. Precis som vid de tidigare beskrivna dynamiska testerna fastas hästen över natten, därefter tillförs glukoslösning via nässvalgsond. Glukos- och insulin mäts vid upprepad blodprovstagning.

En ny variant av OGT utformades 2013 av Schuver *et al* och går ut på att glukoslösningen ges peroralt med spruta. Detta gör att djurägaren självy, efter noggranna instruktioner, kan ge hästen glukoslösningen och att veterinären kan komma ut senare och ta blodprov 60-90 minuter efter sockergivan. Som glukoskälla i studien av Schuver *et al* (2013) används Karo Corn Syrup®, en produkt som ej går att få tag på i Sverige. För att kunna applicera denna variant av OGT på svenska förhållanden har därför testets tillförlitlighet studerats med DanSukker glykossirap från Nordic Sugar

som glukoskälla. Resultatet av OGT jämfördes med resultatet från EHC (*gold standard*) från samma hästar och visade på god korrelation (Berggren 2014).

MATERIAL OCH METODER

Hästarna

Av de 17 hästar som användes i försöket var åtta stycken islandshästar, fem stycken shetlandsponnyer och fyra stycken minishetlandsponnyer. Hästarna var i åldrarna x till x år, med ett medelvärde på $x \pm x$ år där sex var valacker, sju ston och fyra hingstar. Samtliga hästar var privatägda och uppgavs av sina respektive ägare vara friska. De vistades i hage dygnet runt med tillgång till ligghall. Islandshästarna fodrades med hösilage två gånger per dygn och hade övrig tid fri tillgång på halm. Shetlandsponnyerna och minishetlandsponnyerna hade fri tillgång till hösilage.

Kvällen före försöken stallades hästarna in på box med torv eller spån, vägdes och genomgick en allmän klinisk undersökning. Hästarna var kliniskt friska, islandshästarnas medelvikt var 342 ± 20 kg och shetlandsponnyerna och minishetlandsponnyernas medelvikt var $x \pm x$ kg. Hullet uppskattades enligt hullbedömningsskalorna *body condition score* (BCS) och *cresty neck score* (CNS) (Henneke *et al.* 1983; Carter *et al.* 2009b). Inklusionskriterierna för studien innefattade att hästarna skulle vara kliniskt friska samt ha en BCS <7 och CNS ≤ 3 .

Försöket är godkänt av *Uppsala Djurförsöksetiska nämnd* (diarienummer). Samtliga hästar tolererade försöket väl – inga tecken på komplikationer av kanylläggningen, fasta, glukostillförsel eller provtagning kunde noteras.

Studiedesign

Studien var prospektivt utformad och bestod, för varje häst, av två försökstillfällen med samma försöksupplägg mellan vilka reproducerbarheten undersöktes. Det var åtta dagar mellan de två försökstillfällena, under vilka utfodring, miljö och träning var fortsatt de samma. Försöken utfördes i hästarnas hemmiljö.

Kvällen innan försöken anlades en intravenös jugular permanentkateter^{1,2} efter rakning, lokalbedövning med EMLA³ samt steriltvätt. Hästarna stod inne på box över natten med fri tillgång på vatten och salt. Tolv timmar innan försöket togs fodret ut ur boxarna och hästarna stod på svält över natten. Efter försöket avlägsnades permanentkatetrarna och hästarna fick gå ut i hagen och äta.

Samtliga blodprover aspirerades via permanentkatetern efter att 5 ml blod dragits ut. Efter varje blodprovstagning spolades katetern med 10 ml natriumklorid. Nollprov togs fem minuter före den orala glykosgivan. Därefter togs prover 30, 60, 90, 120, 150 och 180 minuter efter glykosgivan. Blodproverna samlades i lithium-heparinrör och centrifugerades i 906g under 10 min i omedelbar anslutning till provtagningen och förvarades därefter på is tills dess att plasma pipetterades av till eppendorfrör inom 5 minuter. Proverna transporterades i fryn in till laboratoriet, där de sedan förvarades i -80°C fram till analys.

Som glukoskälla användes Dansukker glykossirap från Nordic Sugar. Glykossirapen doserades till 0,2 ml/kg kroppsvikt och administrerades via 60- eller 20-ml sprutor direkt i munnen.

¹ Intranule, Vygon, Ecoeu, Frankrike ²Intraflon 2,1x80 ³ AstraZeneca, vit kräm, aktiva substanser lidokain 25mg/g, prilokain 25mg/g

Blodanalyser

Insulin analyserades i dubbelprov med Mercodia Equine Insulin ELISA (artikelnr 10-1205-01) och beräknades i ng/L. Alla prover från samma häst analyserades på samma platta förutom häst C, F, L och P. Som kontroll användes prov från en insulinkänslig häst samt, till ELISA-plattorna medföljande, kit-kontroll. Plasmaglukos analyseras i dubbelprov med en membranbunden enzym-elektrodmeter, YSI 2300 STAT Plus Glucose & Lactate Analyzer™ (Yellow Springs, Ohio, USA).

Statistiska analyser och beräkningar

För att beräkna reproducerbarheten av det orala glukostoleranstestet avseende både insulin- och glukosresponsen användes arean under kurvan (AUC), peakvärden samt insulinconcentrationen vid 60 respektive 90 minuter. AUC utgick från baseline-värdet hos respektive häst och beräknades med trapezoidmetoden. Resultaten redovisas som medelvärde \pm standardavvikelse. AUC_{insulin} , AUC_{glukos} , $Peak_{\text{insulin}}$, $Peak_{\text{glukos}}$, [Insulin]-60 och [Insulin]-90 från de två OGT-omgångarna jämfördes med variationskoefficient (CV) och parat t-test. Gränsvärde för statistisk signifikans sattes till $p < 0,05$.

Variationskoefficienten (CV%) för respektive variabel (AUC_{insulin} , AUC_{glukos} , $Peak_{\text{insulin}}$, $Peak_{\text{glukos}}$, [Insulin]-60 och [Insulin]-90) räknades ut genom att först dividera standardavvikelsen med medelvärdet för OGT 1 och OGT 2 för respektive häst och variabel. Variationskoefficienten för hela variabeln är medelvärdet av de individuella hästarnas variationskoefficienter i. Medelvärdet av insulin- respektive glukosconcentrationen i varje provtagningstidpunkt jämfördes även via analys av varians (ANOVA för upprepade mätningar) mellan OGT 1 och OGT 2.

RESULTAT

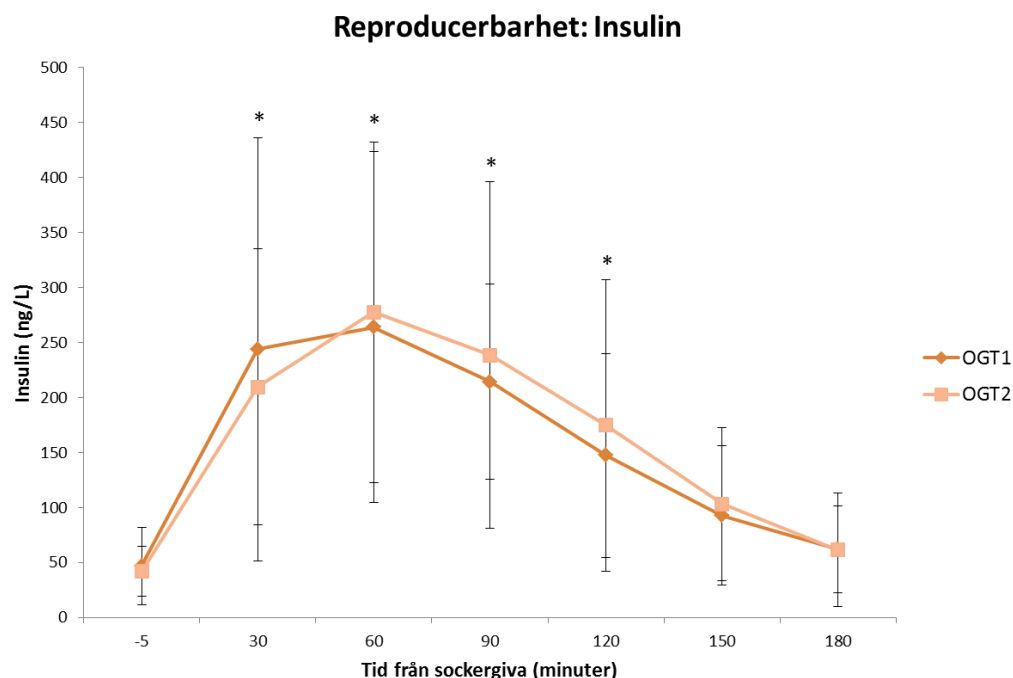
Två av hästarna (häst K och N) uppfyllde ej inklusionskriterierna vad gällde BCS och CNS och uteslöts därmed från studien. Övriga 15 hästar uppfyllde inklusionskriterierna. BCS uppskattades till $5,8 \pm 0,5$ och CNS till $2,6 \pm 0,3$. Samtliga hästar tolererade försöket väl – inga tecken på komplikationer av kanylläggningen, fasta, glukostillförsel eller provtagning kunde noteras.

Det fanns ingen signifikant skillnad mellan de två OGT-försöken då AUC_{insulin} , AUC_{glukos} , $Peak_{\text{insulin}}$, $Peak_{\text{glukos}}$, [Insulin]-60 och [Insulin]-90 analyserades i ett parat t-test (p -värden från 0,216 till 0,866). Medelvariationskoefficienten för dessa variabler låg mellan 7,2 till 31,0 %. (CV% tabell 1.)

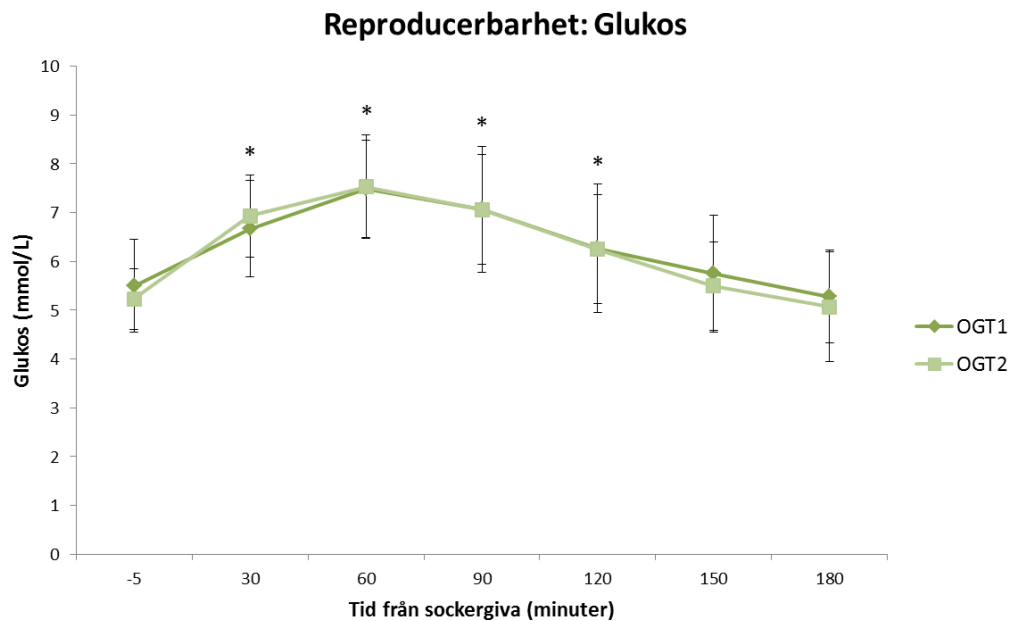
Variabler	OGT 1	OGT 2	P-värde	CV %
AUC _{insulin} (x10 ³ ng/L/min)	23,9 ± 11,9	24,9 ± 14,0	0,665	20,0
AUC _{glukos} (mmol/L/min)	202,2 ± 94,8	233,6 ± 94,0	0,216	31,0
Peak _{insulin} (ng/L)	306,8 ± 184,4	312,5 ± 152,2	0,866	16,2
Peak _{glukos} (mmol/L)	7,7 ± 0,9	8,0 ± 0,8	0,224	7,2
[Insulin]-60 (ng/L)	263,8 ± 159,6	277,6 ± 154,9	0,580	14,3
[Insulin]-90 (ng/L)	214,2 ± 88,5	238,4 ± 157,6	0,395	25,5

Tabell 1. AUC_{insulin}, arean under insulin/tid-kurvan; AUC_{glukos}, arean under glukos/tid-kurvan; Peak_{insulin}, den maximala plasmainsulinkoncentration; Peak_{glukos}, den maximala plasmaglukoskoncentrationen; [Insulin]-60, plasmainsulinkoncentrationen 60 minuter efter sockergiva; [Insulin]-90, plasmainsulinkoncentrationen 90 minuter efter sockergiva. Variablerna uttryckt som medelvärde ± standardavvikelse.

Det fanns inte heller någon signifikant skillnad mellan medelvärdena för plasmaglukos respektive plasmainsulin i någon provtagningsstidpunkt, men insulinnivåerna varierade mycket mellan hästarna (fig. 1 och 2).



Figur 1. Medelvärdet med standardavvikelser av alla hästars plasmainsulinkoncentrationer vid varje provtagning vid OGT 1 respektive OGT 2. *Plasmainsulinkoncentrationen skiljer sig signifikant från nollprovet.



Figur 2. Medelvärde med standardavvikelse av plasmaglukoskoncentrationer vid varje provtagning vid OGT 1 respektive OGT 2. *Plasmaglukoskoncentrationen skiljer sig signifikant från nollprovet.

Av de 30 orala glukostoleranstesterna som utfördes i studien uppträdde insulinpeaken 30 minuter efter sockergivan i sju tester, efter 60 minuter i tolv tester, efter 90 minuter i åtta tester, efter 120 minuter i två tester och vid ett test uppträdde insulinpeaken 150 minuter efter sockergivan. Detta innebär att i 19 av 30 utförda OGT observerades insulinpeaken 60 minuter efter sockergivan eller tidigare. I 20 av 30 tester uppträdde insulinpeaken i intervallet 60-90 minuter.

I denna studie visade totalt sex stycken OGT på intermediärt insulinresistent individer och ett test på insulinresistent med utgångspunkt från tidigare satta gränsvärden för insulinpeak (Schuver *et al.* 2013; Berggren 2014). Av 15 hästar hade 11 stycken samma kliniska bedömning vid båda provtillfällena. (tabell 2)

Insulinpeak	OGT 1	OGT 2
<400 ng/L Insulinkänsliga	häst A, B, C, D, E, F, H, J, L, M, P, S, T, U	häst A, B, C, D, E, H, M, P, S, T
400-700 ng/L Intermediärt insulinresistent	häst G	häst F, G, J, L, U
>700 ng/L Insulinresistent	häst L	

Tabell 2. Den kliniska bedömningen av hästarna i studien i OGT1 respektive OGT2.

DISKUSSION

Resultaten från de kliniska försöken visar att OGT har god reproducerbarhet både avseende insulinrespons och glukosrespons. AUC_{glukos} hade ett något högre CV-värde (31 %) och något lägre p -värde (0,216) än övriga parametrar, men har fortfarande ingen signifikant skillnad mellan OGT 1 och OGT 2. AUC räknades ut från baseline-värdet vid nollprovtagningen. I slutet av provtagningen gick glukoskurvan ner under baseline-värdet hos vissa hästar och då drogs den negativa arean av från den positiva arean. Det går dock inte att utläsa någon signifikant skillnad mellan OGT 1 och OGT 2 (fig. 2) vad gäller detta, varför det inte bör ha bidragit till ett högre CV-värde. Glukosvärdet vid ett OGT framför allt till för att bedöma om hästen har dekompenenserad insulinresistens alternativt typ 2 diabetes, eftersom insulinnivåerna i dessa tillstånd kan vara inom normala gränsvärden medan blodglukoset är onormalt högt. I en tidigare studie (Berggren 2014) uppskattades tillförlitligheten av OGT genom att mäta korrelationen mellan OGT och EHC. I denna studie gjordes observationen att glukoskurvan hade en sämre korrelation jämfört med insulinkurvan. Detta resultat, tillsammans med resultatet i denna studie, talar för att glukosresponsen hos friska hästar helt enkelt kan variera något ”från dag till dag”, men antagandet görs att om hästar med faktiskt patologiska glukosnivåer undersöks kommer glukosmätningarna ändå vara av nytta. En något sämre reproducerbarhet av glukoskurvan bör därför inte göra OGT mindre lämpligt att använda för diagnostisering av insulinresistens i fält.

De genomsnittliga CV-värdena (7,2-31,0 %) för de olika uppmätta variablerna som beräknades i studien får anses som acceptabla med tanke på testets oprecisa utformning; hästarna ges socker direkt i munnen, och även om de flesta accepterar sockret som smakar gott, så finns en risk för spill, även variationer i magsäckstömning och upptag från tarmen får ses som komponenter som möjliggör variation i testresultatet. I *tabell 2* som visar den kliniska bedömningen av hästarna vid OGT 1 och OGT 2 var det fyra hästar som bedömdes annorlunda mellan de två testerna. Dessa hästar låg dock relativt nära gränsvärdena vid OGT 1, så det krävdes inte så stor variation i insulinpeak för att de skulle hamna i en ny klinisk kategori vid OGT 2.

En observation som gjordes i denna studie var att vid 19 av 30 utförda OGT kunde insulinpeaken uppmätas vid 60 min eller tidigare efter sockergivan. Tidigare studier på OGT (Schuver *et al.* 2013; Berggren, 2014) har indikerat att insulinpeaken sker vid 60-90 minuter, och det är även instruktionerna för provtagning i praktiken. I denna studie var det nästan lika många som uppvisade insulinpeak vid 30 minuter (sju stycken) som vid 90 minuter (åtta stycken).

När plasmainsulin och -glukos analyseras varje halvtimme under tre timmar, jämfört med det enda prov som tas vid OGT i praktiken, visas vilken stor inverkan tidpunkten för provet har. Det vill säga; insulinkurvorna kan variera mycket mellan individer. Två av hästarna (häst F och J) kunde identifieras som intermediärt insulinresistenta om provet togs 90 minuter efter sockergivan i OGT 2, men skulle ha klassats som insulinkänsliga om provet tagits efter 60 minuter. Häst L klassades som insulinresistent om provet togs efter 30 minuter i OGT 1, men hade bedömts som insulinkänslig om provet tagits 90 minuter efter sockergivan. Ovanstående information indikerar att det kan vara problematiskt med cut-off nivåer då hästarna ligger precis kring dessa gränsvärden. Det styrker också tidigare iakttagelser att OGT har en lägre sensitivitet (Berggren 2014). Ytterligare studier bör utföras på kliniskt insulinresistenta hästar för att undersöka deras insulinkurvor och säkerställa en hög specificitet.

Trots att hästarna i vår studie inte visade kliniska tecken på EMS eller insulinresistens kunde alltså flera individer identifieras som intermediärt insulinresistenta. Detta kan vara i enlighet med andra studier som indikerat att insulinresistens hos häst framför allt möjliggörs på grund av en genetisk predisposition snarare än på grund av fetma (Geor, 2008 & Trieber *et al.* 2006). Om dessa hästar hanteras utifrån detta provresultat vad gäller utfodring och träning kommer de troligen inte behöva drabbas av konsekvenserna av insulinresistens såsom fång. Detta understryker nyttan av att på ett

enkelt sätt kunna screena även kliniskt friska hästar på ett tillförlitligt sätt, vilket möjliggörs av det orala glukostoleranstestet.

Flera studier har indikerat att det finns en viss säsongsvariation vad gäller plasmainsulinkoncentrationer och insulinkänslighet (Jeffcott *et al.*, 1986; Bailey *et al.* 2008; Frank *et al.* 2010). Detta skulle potentiellt kunna påverka OGT såtillvida att referensvärdena för normalvariation av insulinkänslighet skiljer något över året i hästpopulationen. Det verkar dock som att den fluktuation i insulinkänslighet som sker över ett år endast är marginell, och att det inte kommer vara någon risk att felaktigt diagnosticera en insulinkänslig individ som resistent, eller tvärt om, endast på grund av säsongsvariation (Bailey *et al.* 2008). I denna studie provtogs islandshästarna (2/8 intermediärt insulinresistenta) under maj månad och shetlandspionnyerna (3/7 hade nedsatt insulinkänslighet) i månadsskiftet oktober-november. För att kunna dra några slutsatser angående säsongsvariation i insulinkänslighet, och hur det orala glukostoleranstestet påverkas av en eventuell sådan, skulle dock samma hästar behöva provtas vid flera tidpunkter under ett år. På grund av testets oprecisa utformning, som diskuterades ovan, kommer det dock troligen vara svårt att upptäcka dessa små säsongsvariationer.

Det är sedan tidigare känt att ponnyraser är predisponerade för EMS och insulinresistens i större utsträckning än varmblodiga hästar (Johnson 2002). I denna studie hade 33 % av ponnyerna nedsatt insulinkänslighet. Givetvis är det av intresse att undersöka vilka skillnader som finns i insulinkänslighet hos olika raser, inte minst för att vidare undersöka den genetiska faktorn som hittills kunnat definieras som en eller flera dominant gener med reducerad penetrans (Trieber *et al.* 2006). Troligen är skillnaden i normalvariation av insulinkänslighet mellan raser större, jämfört med en eventuell säsongsvariation, och därmed även av större intresse att vidare undersöka. Ponnyer drabbas dock av betesrelaterad fång i större utsträckning än varmblodiga hästar. Detta indikerar att insulinresistens predisponerar för fång, oavsett hästras. Det vill säga, en insulinresistent ponny har lika stor risk att drabbas av fång som en insulinresistent häst, även om det finns en predisposition för insulinresistens hos ponnyraser.

I denna studie har endast kliniskt friska hästar undersökts som inte varit predisponerade för EMS vad gäller BCS eller CNS. För att bedöma reproducerbarheten av OGT hos kliniskt sjuka individer krävs att en studie görs på sådana hästar. När studier på diagnostiska tester går från att utföras på en normalvariation till sjuka individer tenderar CV-värdena att öka, vilket därför är ett rimligt antagande att även CV för OGT kommer göra.

Felkällor

Hästarna som användes i studien gick i vanliga fall på lösdrift och brukade således inte stå inne över natten. Det fanns därmed en risk att installningen utgjorde en extra stressfaktor som skulle kunna påverka resultatet, samt att en viss tillvänjning skulle kunnat ske mellan OGT 1 och OGT 2. Tre av hästarna i studien var unghingstar som ej var hanterade i större utsträckning; även detta skulle kunna påverka resultatet då kanyliläggning och övrig hantering kan ha orsakat viss stress. Sett till studiens resultat verkar dock inte detta skett. Det går ej att se till exempel signifikant ökade plasmaglukoskoncentrationer vid det första testet jämfört med vid det andra testet, något som identifierats i en studie av Bröjer *et al.* (2013) där det undersöktes huruvida stress inverkar vid diagnostik av insulinresistens.

Provtagningen på islandshästarna skedde i maj månad innan betessläpp. Även om hästarna gick i sin vinterhage där det ej fanns någon direkt tillgång till gräs så skedde provtagningen precis vid

tidpunkten då det började växa gräs. Detta kan därmed ha inneburit en viss ändring i foderstat mellan OGT 1 och OGT 2 vilket potentiellt skulle kunna påverka resultatet. Om detta har skett verkar det endast vara en marginell, ej mätbar, felkälla med tanke på den goda reproducerbarhet som testet fick i försöken.

Analysen av plasmainsulinet skedde för fem hästar på olika ELISA-plattor. Detta bör dock inte påverkat resultatet nämnvärt då plattorna upprätthåller en mycket jämn kvalitet enligt tidigare klinisk erfarenhet samt enligt tillverkaren (Mercodia, Uppsala, Sverige).

KONKLUSION

OGT visar på god reproducerbarhet både avseende insulin- och glukosrespons när samma kliniskt friska hästar provtas vid två upprepade tillfällen utan att yttre omständigheter ändras. Detta styrker testets tillförlitlighet och gör det lämpat att använda för att följa behandlingsresultatet hos hästar drabbade av EMS. Vidare bör ytterligare studier med kliniskt insulinresistenta hästar utföras för att utvärdera samt eventuellt justera testets gränsvärden. Insulinresponsen är viktig för om hästen utvecklar fång eller inte. Problemet idag är att det ej är helt utrett vid vilken nivå som fångrisken blir betydande. Det är även intressant att undersöka insulinkurvornas form hos insulinresistenta hästar; om de till exempel är förskjutna åt höger jämfört med friska hästar kanske provtagningen vid OGT bör ske 120 minuter efter sockergivan, trots att de friska och intermediärt insulinresistenta hästarna når sin insulinpeak vid 60-90 minuter. För att öka säkerheten av OGT skulle det också kunna bli aktuellt att provta vid fler än ett tillfälle efter sockergivan.

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.
- Asplin, K.E., Curlewis, J.D., McGowan, C.M., Pollitt, C.C. & Sillence, M.N. (2011). Glucose transport in the equine hoof. *Equine Veterinary Journal*, 43 (2), pp.196-201.
- Bailey, S.R., Habershon-Butcher, J.L., Ransom, K.J., Elliot, J. & Menzies-Gow, N.J. (2008). Hypertension and insulin resistance in a mixed-breed population of ponies predisposed to laminitis. *American Journal of Veterinary Research*, 69, pp. 122-129.
- Berggren, M. (2014). *Utvärdering av oralt glukostoleranstes för diagnosticering av insulinresistens hos häst*. Uppsala: Sveriges Lantbruksuniversitet. (Examensarbete inom institutionen för Kliniska Vetenskaper).
- 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.

- Dandona, P., Aljada, A. & Bandyopadhyay, A. (2004). Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends in Immunology*, 24, pp. 4-7.
- DeFronzo, R.A., Tobin, J.D. & Andres, R. (1979). Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 237(3), E214-23.
- Durham, A.E., Rendle, D. I. & Newton, J. R. (2008). The effect of metformin on measurements of insulin sensitivity and β 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.
- Firshman, A.M. & Valberg, S.J. (2007). Factors Affecting Clinical Assessment of Insulin Sensitivity in Horses. *Equine Veterinary Journal*, 39 (6), pp. 567–575.
- Frank, N. Elliott, S.B., Chameroy, K.A., Tóth, F., Chumbler, N.S. & McClamroch, R. (2010). Association of Season and Pasture Grazing with Blood Hormone and Metabolite Concentrations in Horses with Presumed Pituitary Pars Intermedia Dysfunction. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24 (5), pp. 1167-1175.
- Frank, N. (2011). Equine Metabolic Syndrome. *The Veterinary Clinics of North America Equine practice*, 27 (1), pp.73–92.
- Frank, N., Somardahl, 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. & 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.
- Funk, R.A., Wooldridge, A.A., Stewart, A.J., Behrend, E.N., Kemppainen, R.J., Zhong, Q. & Johnson, A.K. (2012). Seasonal changes in the combined glucose-insulin tolerance test in normal aged horses. *J Vet Intern Med* 26(4), 1035-41.
- 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), pp.753-759.
- Hansen, T.K., Thiel, S., Wouters, P.J., Christiansen, J.S. & Van Den Berghe, G. (2003). Intensive insulin therapy exerts anti-inflammatory effects in critically ill patients and counteracts the adverse effects of low mannose-binding lectin levels. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 88, pp.1082-1088.
- 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), pp. 371-372.
- Jeffcott, L.B., Field, J.R., McLean, J.G. & O'Dea, K. (1986). Glucose tolerance and insulin sensitivity in ponies and Standardbred horses. *Equine Vet J* 18(2), 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.

- Kim, J.K., Montagnani, M., Koh, K.K. & Quon, M.J. (2006). Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation*, 113, pp. 1888-1904.
- 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.
- Mobasheria, A., Critchlow, K., Clegg, P.D., Carter, S.D. & Canessa, C.M. (2004). Chronic equine laminitis is characterised by loss of GLUT1, GLUT4 and ENaC positive laminar keratinocytes. *Equine Veterinary Journal*, 36, pp. 248-254.
- 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.
- Reaven, G.M. (1988). Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37 (12), pp. 1595-1607.
- 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., Chameroy, 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.
- 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.S., Hess, T.M., Boston, R.C. & Harris P.A. (2005). Use of Proxies and Reference Quintiles Obtained from Minimal Model Analysis for Determination of Insulin Sensitivity and Pancreatic Beta-Cell Responsiveness in Horses. *American Journal of Veterinary Research*, 66 (12), pp. 2014-2021.
- Treiber, K., Kronfeld, D.S., Hess, T.M., Byrd, B.M., Staniar, W.B. & Splan, R.K. (2006). 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. 1538-1545.
- Treiber, K., Carter, R., Gay, L., Williams, C. & Geor, R. (2009) Inflammatory and redox status of ponies with a history of pasture-associated laminitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 15 (129), pp. 216-220.
- 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. (2007). Relationships among inflammatory cytokines, obesity and insulin sensitivity in the horse. *Journal of Animal Science*, 85, pp.1144-1155.

Winqvist, E. (2014). *Plasmaendotelin och blodtryck hos hästar med dietinducerad fetma*. Uppsala: Sveriges Lantbruksuniversitet. (Examensarbete inom institutionen för Kliniska Vetenskaper).