



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

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

Plasmaendotelin och blodtryck hos hästar med dietinducerad fetma

Ellen Winqvist

*Uppsala
2014*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2014:17*

Plasmaendotelin och blodtryck hos hästar med dietinducerad fetma

Plasma endothelin and blood pressure in horses with diet induced obesity

Handledare: Katarina Nostell, institutionen för Kliniska Vetenskaper

Biträdande handledare: Sanna Truelsen Lindåse, institutionen för Kliniska Vetenskaper

Examinator: Johan Bröjer, institutionen för Kliniska Vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå,
A2E **Kurskod:** EX0736

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2014

Delnummer i serie: Examensarbete 2014:17

ISSN: 1652-8697

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

Nyckelord: Endotelin, EMS, ekvint metabolt syndrom, blodtryck, insulinresistens, fetma, häst

Key words: Endothelin, EMS, equine metabolic syndrome, blood pressure, insulin resistance, obesity, equine, horse

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska Vetenskaper

SAMMANFATTNING

Fetma är ett tillstånd som har visat sig öka risken för utvecklandet av metabolt (MS) syndrom hos människa. MS karaktäriseras av fetma (framförallt bukfetma), insulinresistens (IR), diabetes mellitus och högt blodtryck. Idag anses fetma även vara en av orsakerna till utvecklandet av ekvint metabolt syndrom (EMS) som ses hos hästar. EMS liknar till stor del den sjukdomsbild som ses hos människor med metabolt syndrom. Förutom fetma är regionala fettansättningar och IR vanligt förekommande hos dessa hästar som ofta även utvecklar fång. Till syndromet MS kopplas hos människa även utvecklandet av hypertension. Författare har diskuterat sambandet mellan IR och hypertension och har föreslagit att förhöjda nivåer av endotelin-1 i plasma (ET-1) kan vara en bidragande faktor.

Syftet med denna prospektiva studie var att studera om dietinducerad fetma och betesgång bidrar till störd kärlfunktion hos häst, vilket i sin tur kan utgöra en riskfaktor för utvecklandet av fång. I studien undersöktes om en förändring kunde ses av blodtryck och plasmaendotelinnivåer i samband med fetma och betesgång. Studien utfördes under 29 veckor på nio kliniskt friska varmblodiga travare. Viktuppgång och hullökning bedömdes genom rutinmässig vägning samt genom hullbedömning med hjälp av *body condition score* (BCS) och *cresty neck score* (CNS). Hästarnas grad av IR bedömdes efter genomförandet av en euglykemisk hyperinsulinemisk clamp (EHC) som gjordes tre gånger under försöksperioden, en gång vid starten (före viktuppgång), en gång efter viktuppgång samt en gång efter betesperioden. I samband med EHC:n togs även blodprover för analys av bland annat glukos, insulin och ET-1 samt genomfördes blodtrycksmätningar. Mellan EHC:erna togs även en så kallad metabolprofil, där blodprover för analys av glukos, insulin och ET-1 togs samt mätning av blodtrycket utfördes. Hästarna som inkluderades i studien var alla måttligt insulinresistenta (enligt EHC 1).

Resultaten visade ingen påvisbar ökning av IR efter viktökningsperioden. Dock observerades en ökning av medelblodtrycket under och efter viktökningsperioden. Det medelarteriella trycket var vid studiens start i medel $82 \text{ mmHg} \pm 13$ och hade vid studiens slut procentuellt stigit med 12 %. Även viktökningen var signifikant för perioden efter bete jämfört med vid studiens start. Vid studiens slut var hästarnas medelvikt $545 \text{ kg} \pm 44$, jämfört med $497 \text{ kg} \pm 44$ vid studiens start. Då en generell ökning av ET-1-nivåerna i plasma inte kunde detekteras i denna studie skulle en möjlig orsak till den blodtrycksökning som sågs kunna vara förhöjda alternativt sänkta nivåer av blodfetter så som till exempel kolesterol. I den aktuella studien har ET-1-nivåerna lokalt i kärlbädden inte undersökts, vilket medför att det inte helt går att utesluta att lokalt förhöjda ET-1-nivåer skulle kunna utgöra en faktor till det ökade blodtrycket. Då få studier är gjorda på ET-1-koncentrationen i plasma på häst finns ännu inga bra referensvärden för en normalpopulation hästar.

Fler studier skulle behöva göras för att referensvärden för ET-1 i plasma hos häst ska kunna bestämmas. Den ökning som sågs av blodtrycket tycks i detta fall vara kopplad direkt till fetma och inte till IR. Sambandet däremellan är inte helt klart men skulle kunna bero på ökade blodfettnivåer av till exempel kolesterol. Vidare studier skulle behöva göras på området för att klargöra detta.

SUMMARY

Obesity is a condition that has been shown to increase the risk of developing metabolic syndrome in human (MS). Today, obesity is considered to be involved in the development of equine metabolic syndrome (EMS), which is seen in horses. EMS has many similar features with metabolic syndrome in humans. Besides obesity, regional adiposity and insulin resistance (IR) are also commonly observed in these horses. The syndrome is also closely associated with the development of laminitis in horses. Many authors have discussed the relationship between IR and hypertension, and it has been suggested that elevated levels of endothelin-1 (ET-1) may be a contributing factor to the hypertension seen in humans with MS. It has also been suggested that elevated ET-1 levels could be a possible risk factor in the development of the complex syndrome of laminitis.

The aim of the present study was to investigate whether a correlation could be seen between diet induced obesity and signs of vascular dysfunction. The effect of grazing on plasma ET-1 levels and blood pressure was also investigated.

Nine clinically healthy Standardbred Horses were used in this prospective study that was conducted during a period of 29 weeks. Weight, Body Condition Score (BCS), and Cresty Neck Score (CNS) were assessed. Insulin sensitivity was measured using an Euglycemic Hyperinsulinemic Clamp (EHC) three times during the experimental period; at the start, after weight gain and after the grazing period. During the EHC, blood pressure was measured (using a non-invasive oscillometric method) and blood samples were collected for glucose, insulin, and ET-1 analysis. The same parameters were measured in between the three EHCs to follow gradual changes. The horses that were included in this study were intermediately IR (according to EHC 1).

A significant increase in mean body weight was observed in the grazing period compared at the start of the study. At the end of this study, the horses weighted $545 \text{ kg} \pm 44$, compared with $497 \text{ kg} \pm 44$ at the start of the study. The results showed no detectable increase in IR after the weight gain period. However, an increase in mean arterial pressure (MAP) was observed during and after the weight gain period. MAP was $82 \text{ mmHg} \pm 13$ at the start of the study, and had increased with 12 % at the end of the study. No significant changes in the plasma concentrations of ET-1 were observed after the weight gain period or after pasture. The increase in MAP was not associated to an increase in insulin resistance or plasma ET-1 concentrations, which might be explained by the fact that the horses in this study became less insulin resistant after weight gain and grazing. One possible reason for the increase in blood pressure observed in this study might be elevated, alternatively lowered, levels of blood fats such as cholesterol. In human medicine, cholesterol levels in blood are still considered to play a big part in blood pressure regulation. Since not many studies have been done on endothelin levels in horses, a reference range has not yet been established.

Further studies on mean ET-1 values in healthy horses are necessary. In the present study, weight gain was seen due to a diet rich fat. Elevated mean blood pressure values were seen after both the weight gain period and after the grazing period. The elevated blood pres-

sure seen in the end of this study appears to be associated with obesity and not with IR. Further studies are needed to clarify this relationship.

INNEHÅLL

1. Inledning	1
1.1 Syfte	2
2. Litteraturoversikt	3
2.1 Endotelin-1	3
2.2 Endotelinreceptorer	3
5.1 Kopplingen mellan endotelin och insulin	5
5.2 Endotelins lokala effekt	7
3. Material och metoder	9
3.1 Hästar	9
3.2 Insulinkänslighet	9
3.3 EHC – euglykemisk hyperinsulinemisk clamp	9
Försöksdesign	9
Foder	10
Förberedelser	10
EHC	10
Blodtryck	11
Metabol profil	11
Blodkemiska analyser	12
Statistisk analys	12
4. Resultat	13
4.1 Hullbedömning och vikt	13
4.2 Blodtryck	14
4.3 Endotelinvärden	15
4.4 Insulinresistens	16
5. Diskussion	19
5.1 Sammanfattningsvis	23
6. Referenser	25

FÖRKORTNINGSSIDA

ADH	antidiuretiskt hormon
ECE	<i>endotelin converting enzyme</i>
EHC	euglykemisk hyperinsulinemisk clamp
EMS	ekvint metabolt syndrom
ET(-1)	endotelin(-1)
IR	insulinresistens
MAP	medelartärtryck
NO	kväveoxid
NSC	icke-strukturella kolhydrater
P1-1	EHC 1, period 1
P2-1	Metabol profil 1, period 2
P2-2	Metabol profil 2, period 2
P2-3	EHC 2, period 2
P4-1	Metabol profil 3, period 4
P4-2	EHC 3, period 4
PPID	<i>pituitary pars intermedia dysfunction</i>
PVR	pulmonärt vaskulärt motstånd
RAAS	renin-angiotensin-aldosteron-systemet
smb rp	smältbart råprotein
SVR	systemsikt vaskulärt motstånd
TS	torrsubstans
WSC	vattenlösliga kolhydrater

1. INLEDNING

Fetma och insulinresistens är ett ökande hälsoproblem hos människor (Lev-Ran, 2001) och denna trend kan ses även hos våra hästar (Carter *et al.*, 2009). Sambandet mellan kost och fetma är ett högaktuellt debattämne i dagens samhälle. Det är känt att ett högt intag av lättlösliga kolhydrater ökar risken för utvecklandet av fetma hos så väl människor som hästar. Fetma har visat sig öka risken för att utveckla metabolt syndrom hos människa och anses även vara en bidragande faktor för uppkomsten av ett liknande tillstånd hos häst (ekvint metabolt syndrom, EMS) (Frank *et al.*, 2010; Grundy *et al.*, 2004; Grundy, 1999). EMS är ett sjukdomskomplex som förutom fetma och regional fettansättning även innefattar insulinresistens. Tecken finns även på ett samband till systemisk hypertension (det vill säga ett högt blodtryck som ofta är orsakat av ett ökat motstånd i kärlbädden) samt fång (Katz *et al.*, 2003).

Hos människor med metabolt syndrom har man kunnat visa att den systemiska hypertension som ses är kopplad till en nedsatt kärlfunktion (Reaven, 2005). Mycket tyder på att även hästar kan ha problem med nedsatta funktion i kärlen och att denna kan vara orsakad av en nedsatt funktion i endotelcellerna som bekläder kärlväggens insida. Endotelcellerna producerar och frisätter normalt sett ett ämne som kallas för endotelin-1 (ET-1) vilket ger upphov till så kallad vasokonstriktion (kärlsammandragning) (Reaven, 2005). Produktionen av ET-1 hämmas vid frisättning av kväveoxid (NO). Hämmning av ET-1 ger således upphov till vasodilatation (vidgning av kärlen). Hos en frisk individ stimulerar insulin frisättningen av både NO och ET-1 från endotelet.

Patienter med metabolt syndrom är insulinresistenta och kan därmed inte svara normalt på insulin. Detta leder till en ökad ET-1-medierad vasokonstriktion samt till utvecklandet av hyperinsulinemi (onormalt höga nivåer av insulin i blodet) vilket i sin tur hämmar NO-produktionen (Cardillo *et al.*, 2004). På grund av att produktionen av NO hämmas, kvarstår en hög ET-1-produktion och därmed en bibehållen vasokonstriktion. Detta tycks även vara fallet hos hästar med EMS (Katz *et al.*, 2003) och kan vara en koppling till utvecklandet av fång.

Fång är ett allvarligt syndrom som framförallt ses hos ponnyer men som även kan drabba hästar av andra raser. Idag delas fång upp i endokrinopatisk fång, fång utvecklat till följd av inflammatoriska tillstånd så som endotoxinemi och fång till följd av ökad mekanisk belastning (Johnson *et al.*, 2004). Den endokrinopatiska fången är kopplad till EMS och PPID (*pituitary pars intermedia dysfunction*).

Etiologin och patogenesen bakom utvecklandet av fång är inte helt känt. Det ökade vaskulära motståndet (motståndet i kärlet) har tagits upp som en möjlig orsak till utvecklandet av fång (Katz *et al.*, 2003). Teorin är då att vasokonstriktionen är orsakad av förhöjda nivåer av endotelin. Man har kunnat visa att hästar med kliniska symptom på fång uttrycker ökade nivåer av ET-1 i bindväven i hoven, jämfört med kliniskt friska hästar (Katwa *et al.*, 1999).

1.1 Syfte

Denna prospektiva studie syftar till att studera om dietinducerad fetma och betesgång bidrar till störd kärlfunktion hos häst, vilket i sin tur kan utgöra en riskfaktor för utvecklandet av fång. Vår hypotes var att en stegring av endotelinnivåerna kan ses hos hästar som blir feta. Hypotesen undersöktes genom att se hur fetmainducerad insulinresistens påverkar endotelinnivåerna i blodet och vilka förändringar som kan ses vid mätning av blodtryck. Dessutom undersöktes hur dessa faktorer förändras hos hästen efter betesgång.

2. LITTERATURÖVERSIKT

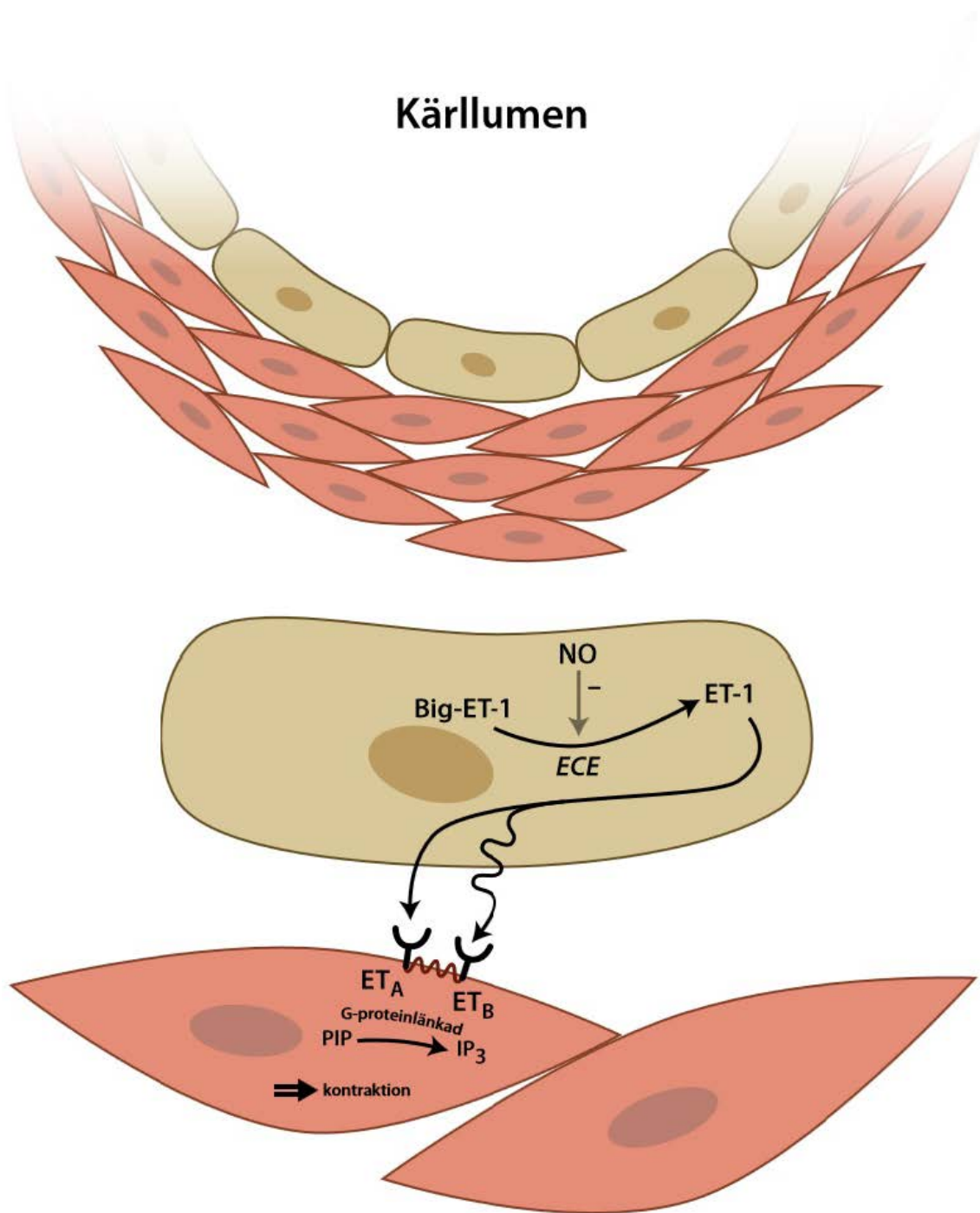
2.1 Endotelin-1

Endotelin är en peptidfamilj bestående av tre typer av endotelin; endotelin-1 (ET-1), endotelin-2 (ET-2) samt endotelin-3 (ET-3) (Levin, 1995). Endotelin-1 har visat sig vara en mycket potent vasokonstriktor som framförallt utövar en direkt effekt på kärlen. Effekterna av ET-2 är inte kända och ET-3 tros framförallt påverka delar av nervsystemet.

Huvuddelen av allt ET-1 produceras i endotelcellerna (Levin, 1995). Viss produktion sker också i njurar, CNS, hjärtat samt flera andra organ. Syntesen av ET-1 stimuleras av hypoxi och ischemi samt vid frisättning av angiotensin II och ADH (antidiuretiskt hormon). Med hjälp av ECE – *endotelin converting enzyme* (se Figur 1.) i endotelcellens cellmembran konverteras Big-ET-1 till ET-1. Frisättning av ET-1 sker inom några minuter vid närvaro av stimuli så som hypoxi och ischemi. Halveringstiden ($T_{1/2}$) för ET-1 i plasma är cirka 4-7 minuter. ET-1 i plasma reduceras framförallt med hjälp av ventilation genom lungorna. Huvuddelen, uppemot 75 % av det ET-1 som frisätts, utsöndras mot de glatta muskelcellerna i kärlväggen (och når alltså inte blodbanan). Därmed utövar ET-1 framförallt en lokal effekt på de glatta muskelcellerna i kärlväggen. En viss del av det ET-1 som produceras kommer dock att passera ut i kärlumen och därmed vara detekterbart i blodet/plasman.

2.2 Endotelinreceptorer

Studier har kunnat identifiera och klonat två typer av receptorer för ET; ET_A samt ET_B (Levin, 1995; Clozel *et al.*, 1992). ET_A -receptorn är G-proteinlänkad och finns bland annat i kärlens glatta muskelceller. Stimuli av denna receptor ger upphov till vasokonstriktion. ET_B -receptorerna finns, förutom i de glatta muskelcellerna, sannolikt även i endotelcellerna. Verhaar *et al.* (1998) har visat att det lokala kärlsvaret vid infusion av en selektiv ET_A -receptorantagonist leder till vasodilatation. Detta tycks till största del bero på ökad ET_B -receptormedierad NO-frisättning. Stimuli av receptor B anses därmed leda till bland annat vasodilatation.



Figur 1. Schematisk bild över endothelinsyntesen (Ellen Winqvist & Jan-Åke Winqvist).

5.1 Kopplingen mellan endotelin och insulin

Flera tidigare studier visar på en koppling mellan förhöjda nivåer av ET-1 lokalt i hoven och utvecklandet av fång. I en studie av Katwa *et al.* (1999) mättes ET-1-uttrycket i hovar från hästar med akut stärkelseinducerad fång respektive hästar med naturligt förekommande kronisk fång. Dessa jämfördes med ET-1-uttrycket i friska hästars hovar. Koncentrationen av ET-1 var förhöjt i den lamellära bindväven i båda fånggrupperna jämfört med gruppen med friska hästar. Det har i tidigare studier visats att endotelin inte lagras i endotelcellerna (Nakamura *et al.*, 1990). Då man såg en ökad närvaro av ET-1 i detta fall, dels i akutfasen dels i den kroniska fasen, tolkades detta därför som att det sker en uppreglering av ET-1 i samband med fång (Katwa *et al.*, 1999).

ET-1 skulle kunna vara en faktor i utvecklandet av fång oavsett ”typ” av fång. Enligt författarens vetenskap har man inte heller kunnat särskilja de patologiska förändringarna som ses i hoven vid endokrinopatisk fång och fång uppkommen till följd av gastrointestinala störningar, vilka ofta förlöper med endotoxemi. Ett högt sockerintag leder dels till en omedelbar förhöjning av blodsockret, men kan vid stor konsumtion också leda till feljäsning i grovtarmen och till gastrointestinala störningar så som exempelvis colit (grovtarmsinflammation). Endotoxiner finns i gramnegativa bakteriers membran (Toth *et al.*, 2008). Frisättning sker i samband med bakteriell död eller hastig bakteriell tillväxt. Hos friska hästar skyddas kroppen från endotoxinupptag från tarmen genom tarmens mucosa (slemhinna). Vid gastrointestinala störningar kan en rubbad balans av normalfloran i tarmen och en ökad gramnegativ bakterietillväxt ses. Tidigare studier har visat att insulinresistens kan uppstå sekundärt till endotoxemi hos bland annat människor (Agwunobi *et al.*, 2000). Möjligen kan ett liknande samband ses hos våra hästar.

Man har även observerat att ET-1 fungerar som en viktig mediator i patofysiologin kring den ischemi (syrebrist) som uppstår i samband med gastrointestinala strangulationer eller obstruktioner hos bland annat människa (Battistini & Dussault, 1998). Det finns anledning att tro att detta även gäller vid strangulationer och obstruktioner hos hästar. Ramaswamy *et al.* (2002) undersökte plasmakoncentrationen av ET-1 hos friska hästar och jämförde den med ET-1-koncentrationen hos hästar med naturligt förekommande gastrointestinala störningar (störningar som inte uppkommit till följd av utfodring med lättlösliga kolhydrater). Denna studie ger en fingervisning om att ET-1-koncentrationen i blodet ökar i samband med gastrointestinala störningar. Även Myhre *et al.* (1993) visar på ett samband mellan förhöjda koncentrationer av endotelin (hos grisar) vid cirkulatoriska störningar så som endotoxemi och SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*). Troligtvis finns det en koppling mellan de förhöjda nivåer som ses av endotelin och insulin i samband med bland annat gastrointestinala störningar. Endotelin skulle då kunna utgöra en koppling mellan gastrointestinala störningar och utvecklandet av fång.

Flera studier har visat på sambandet mellan fång och endotoxinemi. Sprouse *et al.* (1987) såg förhöjda endotoxinnivåer hos majoriteten (11 av 13) av hästarna som undersöktes i samband med kolhydratinducerade fånganfall. Toth *et al.* (2008) diskuterar kopplingen mellan fång och gastrointestinala störningar. De anser att insulinresistens till följd av endotoxinemi kan vara en viktig del i sjukdomsutvecklingen. Insulinresistens skulle kunna orsaka minskat glukosupptag i hoven och därmed bidra till utvecklandet av fång.

Thompson *et al.* (1995) visar på förändringar i balansen i syntesen av endotelin och NO i samband med ischemi. Förändringarna leder till nedsatt produktion av NO och ökad känslighet för ET-1. Detta skulle kunna förklara den förlängda effekten av ischemiska tillstånd i tarmen med nedsatt blodflöde till följd av vasokonstriktion. ET-sekretionen och insulinsensitiviteten påverkas också av andra mediatorer så som TNF α och IL-1 (Vick *et al.*, 2007). Vissa typer av fettväv har visats kunna bidra till låggradig inflammation i kroppen. Adipokiner (proinflammatoriska substanser vilka produceras i fettväven) så som till exempel leptin har också visat sig kunna uppreglera produktionen av ET-1 i endotelceller (Quehenberger *et al.*, 2002). Detta stärker ytterligare sambandet mellan fetma och förhöjda nivåer av ET som möjlig förklaring till den förhöjning som ses i blodtrycket hos överviktiga individer.

Insulinresistens hos människor är ett ökande hälsoproblem. Johnson *et al.* (2004) tar upp likheterna mellan insulinresistens hos människor och hästar och tar upp frågan om inte detta kan vara en orsak till fång hos hästar. Treiber *et al.* (2006) visar på ett samband mellan hyperinsulinemi och utvecklandet av fång. I studien som gjordes på 160 ponnyer tittade författarna på förekomsten av naturligt förekommande fånganfall vid betessläpp. Vissa av ponnyerna hade haft dokumenterade fall av fång tidigare. Under perioden som sträckte sig från mars till maj mättes bland annat BCS, nivåer av glukos, insulin och triglycerider i plasma. Dessutom analyserades betet med avseende på bland annat stärkelseinnehållet. Resultatet från studien visar på ett ökande stärkelseinnehåll i gräset under den undersökta tidsperioden. Gruppen av hästar som tidigare utvecklade fång och den grupp som utvecklade fång i den aktuella studien hade ökande nivåer av plasmainsulin. Detta tyder på en koppling mellan stärkelseupptag och nivåerna av plasmainsulin. I studien finns även resultat som stödjer teorin om genetisk predisposition för utvecklande av fång.

Hästens hovar har ett mycket högt glukosbehov (Wattle & Pollitt, 2004). Pass *et al.* (1998) har visat att lamellärlig separation uppstår i hovar där glukosbrist råder eller där man tillsatt en glukoshämmare. Då det har föreslagits att hovens glukosupptag kan vara insulinberoende finns det anledning att tro att glukosupptaget i hoven sker med hjälp av en annan mekanism (Asplin *et al.*, 2007). Asplin *et al.* (2007) föreslår att insulintoxicitet är den orsakande faktorn i utvecklandet av betesrelaterad endokrinopatisk fång, inte insulinresistensen i sig. I denna studie utvecklar nio friska unga ponnyer fång till följd av en period av hyperinsulinemi i samband med en förlängd EHC under 72 timmar. I detta fall orsakade den inducerade hyperinsulinemin fång utan höjning av blodglukos och utan att ponnyerna var känt insulinresistenta.

Detta ger en ytterligare indikation på att lättlösliga kolhydrater verkar vara en riskfaktor i utvecklandet av fång. Högt kolhydratintag leder till ökning av blodglukos som i sin tur ger förhöjda nivåer av insulin i blodet. Detta kan på sikt leda till nedsatt insulinkänslighet och insulinresistens. En kraftig förhöjning av insulinnivåerna ses hos insulinresistenta hästar till följd av utfodring med högt innehåll av lättlösliga kolhydrater. Asplin *et al.* (2007) tar också upp möjligheten att fång kan utvecklas till följd av direkt glukototoxicitet i hoven. I regel är dock inte insulinresistenta hästar hyperglykemiska (Treiber *et al.*, 2006).

Juan *et al.* (2004) har visat att hyperinsulinemi till följd av en kontinuerlig insulininfusion kan stimulera till ökad ET-1-produktion. I studien (som gjordes på råttor) såg man också att ET-1 fungerar som en viktig faktor i utvecklandet av hypertension. Detta skulle i sin tur kunna ge upphov till hypoperfusion i lamellerna i hoven. Den vasokonstriktion och hypoxi som då uppstår skulle kunna vara en orsakande faktor i utvecklandet av fång. Ökade insulinnivåer har *in vitro* visat sig öka genuttrycket för ET-1 (Oliver *et al.*, 1991). I en annan studie (human) har ökade insulinnivåer även givit upphov till en ökad ET-1-frisättning (Ferri *et al.*, 1995). På samma sätt tyder humanstudier på en koppling mellan hyperinsulinemi och förhöjda ET-1-nivåer i plasma (Ferri *et al.*, 1995). Sambandet mellan hyperinsulinemi och förhöjda nivåer av ET-1 har även studerats omvänt. Studier *in vitro* (Juan *et al.*, 1996) och *in vivo* (Juan *et al.*, 1999) tyder på att förhöjda nivåer av ET-1 i sin tur kan inducera insulinresistens. Dessa resultat ger en indikation på att sambandet mellan insulinresistens och förhöjda nivåer av ET-1 leder till en ond cirkel som föder sig själv.

5.2 Endotelins lokala effekt

Katz *et al.* (2003) visar på en ET-1-inducerad vasokonstriktion av både digitalartärerna och digitalvenerna från friska hästar. I studien som gjordes *in vitro* sågs en signifikant ökad känslighet i digitalvenerna jämfört med digitalartärerna. Författarna menar att orsaken till detta skulle kunna vara att den glatta muskulaturen kring digitalvenerna har ett större antal ET-receptorer. Man föreslår även att de orsaker som ligger bakom utvecklandet av fång även skulle kunna förändra uttrycket av ET-receptorer så att detta ökas. En annan tänkbar orsak som författarna tar upp är frånvaron av funktionella ET-receptorer i hästens digitalkärl. ET-1 aktiverar ET_B-receptorer direkt vilket resulterar i bildandet av NO som ger en dilatation av kärnen (Ahlborg & Lundberg, 1997). I studien av Katz sågs nästan inget vasokonstriktivt svar vid tillsättande av en ET_B-receptoragonist vilket forskarna tolkade som frånvaro av funktionella ET_B-receptorer i digitalkärlens glatta muskulatur. I och med att tillsättandet av en ET_A-receptorantagonist hämmade ET-1s effekt på digitalkärlen gjorde författarna tolkningen att ET_A-receptorerna stod för vasokonstriktionen i digitalkärlen.

Det är möjligt att de förhöjda nivåerna av ET-1 som observerats i samband med fång skulle kunna ge upphov till en konstriktion av kärnen i hoven. Vasokonstriktionen kan i sin tur leda till ischemiska skador i hovens lamellära vävnad. Den exakta signaleringen genom ET_A- och

ET_B-receptorerna är ännu inte helt kända. Fång skulle dels kunna orsakas av en förändring i ET-1-syntesen, dels i uttrycket av ET-1-receptorerna.

Det är inte helt lätt att avgöra vad som är hönan eller ägget. Det som sammanfattningsvis kan sägas är att förhöjda plasmanivåer av ET-1 ses i samband med endotoxinemi, gastrointestinala störningar samt ökade insulinnivåer. Vid fall av akut stärkelseinducerad fång och fall med naturligt förekommande kronisk fång har förhöjda ET-1-nivåer kunnat uppmätas i hovens lamellära vävnad. Det är troligt att förhöjda nivåer även kan ses i plasma i dessa fall.

Kväveoxid kan ha som funktion att hämma bildandet av ET-1 och därmed verka som en vasodilator (Ahlborg & Lundberg, 1997). ET-1 stimulerar dock bildandet av NO genom aktivering av ET_B-receptorn. I den nämnda studien av Ahlborg and Lundberg (1997) gavs försökspersonerna en kväveoxidsyntashämmare. Personerna i studien fick sänkt hjärtfrekvens och *cardiac output*, men förhöjd MAP (medel artärtryck) så väl som förhöjd SVR (systemsikt vaskulärt motstånd) och PVR (pulmonärt vaskulärt motstånd). Infusionen av den hämmande substansen gav upphov till ökad koncentration av ET-1 inom 20 minuter.

Cardillo *et al.* (2004) visar i sin studie att den vasokonstriktiva effekten av ET-1 hos feta patienter är oberoende av blodtrycksnivåerna. Detta beror på att effekten var densamma vid administration av exogent ET-1 till patienter som var normotensiva som de som var hypertensiva. Författarna tolkar det som att det inte är en ökad känslighet för ET-1 hos dessa individer som orsakar ökat blodtryck. Resultaten tyder istället på en ökad ET-1-produktion som orsak till blodtrycksförändringarna.

3. MATERIAL OCH METODER

3.1 Hästar

I studien ingick nio varmblodiga travarston med en medelålder på 17 ± 3 år (intervall 12-21 år). Samtliga hästar bedömdes vid studiens start vara i normalhull enligt viktbedömningsskalorna BCS (Henneke *et al.*, 1983) och CNS (Carter *et al.*, 2009). BCS var vid studiens start i snitt $5.5 \pm 0,6$ (intervall 4.5-6.5) och CNS var i snitt 2.4 ± 0.4 . (intervall 1.5-3.0) Hästarna tränades inte utan är så kallade *sedentary*. Före studiens start genomgick hästarna en noggrann klinisk undersökning, där samtliga bedömdes som friska. Hästarna tillhör *Institutionen för kliniska vetenskaper* vid *Sveriges Lantbruksuniversitet*. De är inhysta i universitetets häststall där de står i boxar med utevistelse dagtid i hagar. Under betesperioden flyttas hästarna till ett annat stall med utevistelse i stora beteshagar dygnet runt (efter invänjning). Studien är godkänd av *Uppsala djurförsöksetiska nämnd*.

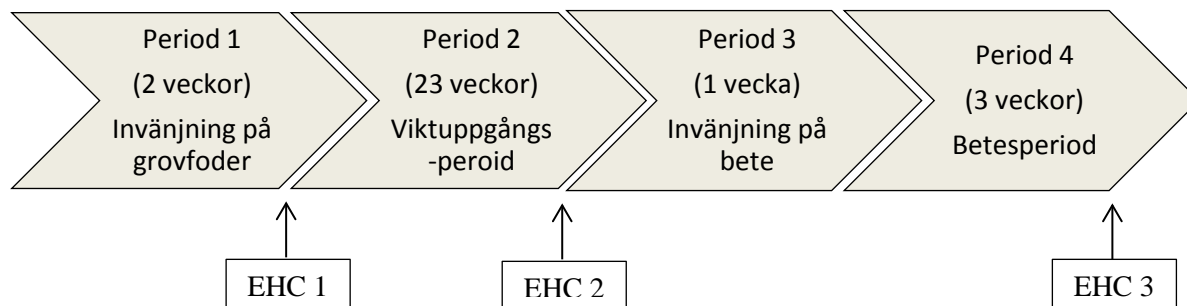
3.2 Insulinkänslighet

En selektion har gjorts i urvalet av hästar som ingår i studien. För att inkluderas i studien krävdes att hästarna hade en glukosinfusionshastighet på mellan 2-4 mg/kg/minut. Detta bedömdes motsvara måttlig insulinresistens.

3.3 EHC – euglykemisk hyperinsulinemisk clamp

Hästarnas insulinkänslighet mättes med hjälp av en metod som kallas euglykemisk hyperinsulinemisk clamp (EHC). Detta är en metod som anses vara "golden standard" för diagnostik av insulinresistens på häst (Firshman & Valberg, 2007).

Försöksdesign



Figur 2. Schematisk bild över försöksdesignen

Studien var uppdelad i fyra perioder (se Figur 2.):

- Period 1 (vecka nummer 48-50): Hästarna vandades in på den nya grovfoderstaten.
- Period 2 (vecka nummer 50-21): Samtliga hästar var vid periodens start i normalhull. Under periodens första vecka genomfördes en EHC. Hästarna fodrades sedan successivt upp med en foderstat bestående av hög andel fett och låg andel lättlösliga kolhydrater. Hästarna vägdes två gånger i veckan. Var tredje vecka gjordes en bedömning av

hästarnas hull med hjälp av BCS och CNS. I samband med hullbedömningen togs blodprover för metabol profil. Perioden avslutades med en ny EHC.

- Period 3 (vecka nummer 22): Hästarna vandades successivt till bete.
- Period 4 (vecka nummer 23-26): Hästarna släpptes på bete där de gick dygnet runt. Var fjärde dag togs blodprover för analys av metabol profil. Efter tre veckors bete genomfördes en tredje EHC.

Foder

Foder- och betesprover togs sex gånger under stallperioden samt var fjärde dag under betesperioden. Fodret (hösilage, olja och linfrökaka) bestod av ett energi- och proteinrikt innehåll.

Tabell 1. Näringsinnehåll i de fodermedel som använts i studien

Fodermedel	TS (%)	MJ	Näringsinnehåll per kg foder			
			smb rp (g)	WSC (g)	Stärkelse (g)	NSC (WSC + stärkelse)
Hösilage	52	4,7	29,3	38	0	38
Olja	100	33	0	0	0	0
Lucern	90	8,4	84	46	74	120
Halm	90	5,7	0	0	0	0
Linfröpellets	90	9,8	255			

TS –torrsubstans, smb rp –smältbart råprotein, WSC –vattenlösliga kolhydrater, NSC –icke-strukturella kolhydrater

Förberedelser

Hästarna fastades under cirka ett halvt dygn inför EHC:n. Detta för att möjliggöra mer korrekta jämförbara mätvärden i och med att hästen inte har fritt socker i blodet tillgängligt som kan störa tolkningen av EHC:n.

Efter rakning och steriltvätt, anlades permanentkanyler i vardera jugularven hos hästen. På permanentkanylerna fästes förlängningar¹ med trevägskorsningar för att förenkla administrationen av infusionslösningarna samt blodprovstagningen senare under försöket.

Hästen vägdes och därefter beräknades insulinlösningens koncentration.

Strax före starten av EHC:n togs fastenivåprover för analys av glukos, insulin och endotelin.

EHC

Principen för metoden är att genom en kontinuerlig infusion av insulin² (3 mU/kg/min) skapa hyperinsulinemi där hästens egen insulinproduktion slås ut. En samtidig glukosinfusion³

¹ Discofix B. Braun Medical AG, Schweiz (250 mm)

² Humulin Regular, Eli Lilly Sweden AB, Solna, Sverige

(50%-glukoslösning → 5 mmol/L) med kontinuerlig mätning av blodglukosnivåerna gör det möjligt att bibehålla en euglykemisk nivå. Infusionshastigheten av glukoslösningen ger en bild av hur väl hästen metaboliserar glukos och därmed även hur mycket insulin hästen kan använda sig av. På så sätt går det att bedöma hästens insulinkänslighet.

Infusionen av insulinlösningen och glukoslösningen skedde genom hästens ena permanentkanyl. Blod till mätning av bland annat blodglukosnivåer drogs från den andra permanentkanalen, där de första 5 ml kasserades.

EHC:n pågick under tre timmar, där den första timmen fungerade som en inställningsfas. Under inställningsfasen svarar kroppen på det tillförda glukoset och insulinet. Därefter eftersträvas *steady-state* där hästen ligger på euglykemiska nivåer. För att säkerställa detta och för att ställa in hastigheten på glukosinfusionen togs blodprov var femte minut för analys av glukos med hjälp av en glukometer⁴. Detta gjordes under hela EHC:n. Var tionde minut togs blodprov för labbanalys av glukos- och insulinnivåer. Blodproverna togs i ETDA-rör och kylades omedelbart efter provtagning. Proverna centrifugerades (i +4°, 406 g under 10 minuter) och plasman förvarades sedan i eppendorfrör i -80 grader. I början och slutet av varje EHC togs blodprov för analys av glukos, insulin samt endotelin i plasma. Proverna togs i EDTA- samt serumrör och hanterades på samma sätt som tiominutersproverna.

Blodtryck

Hästarnas blodtryck mättes en gång strax före starten för varje EHC samt i slutet av varje EHC (under de sista 30 minuterna av EHC:n). Blodtrycket mättes med hjälp av en icke-invasiv oscillometrisk metod med High Definition Oscillometry Memo Diagnostic-device av hästmodell 1.35.00. Därutöver mättes blodtrycket även i mitten av perioderna 1 och 2. Vid varje mättillfälle gjordes fem mätningar per häst. Därefter räknades den mätning med högst respektive lägst systoliska mätvärde bort och ett medelvärde beräknas på kvarvarande tre mätningar.

Vid blodtrycksmätningarna justerades kuffens omfång noggrant för att passa hästen och ge så korrekta mätningar som möjligt. Det ansågs dessutom vara viktigt att justera kuffen för att mätningarna från de olika tillfällena skulle bli jämförbara med varandra. Kuffen placerades cirka ½ till 1 decimeter nedanför svansroten beroende på respektive hästs individuella anatomiska utformning. Blodtrycket mättes med hästen ståendes i sin box.

Metabol profil

Under period 2 togs blodprov var tredje vecka för analys av så kallad metabol profil. Detta innebär fasteprover genom blodprovstagning med EDTA- och serumrör för analys av glukos, insulin och endotelin. Provrören kylades omedelbart efter provtagning. Strax därefter centrifu-

³ Glucose 500 mg/ml, Fresenius Kabi AB, Uppsala, Sverige

⁴ Point of Care glukometer Accu-Check Aviva, Roche Diagnostics Scandinavia AB, Bromma, Sverige

gerades provrören och plasma respektive serum pipetterades av och frystes i eppendorfrör i -80 grader.

Under period 4 togs blodprover var fjärde dag. Provhanteringen var densamma som under period 2.

Blodkemiska analyser

Plasmaendotelin-1-nivåerna mättes med hjälp av ett ELISA-kit som är tidigare använt på häst. Analyserna utfördes på *Klinisk kemi*, SLU.

Statistisk analys

Av de fem blodtrycksmätningarna som genomförts på varje häst vid varje mättillfälle, exkluderades den högsta respektive lägsta mätningen baserat på det systoliska trycket. Ett medelvärde beräknades av de kvarvarande tre mätningarna – ett medelvärde för det systoliska trycket, ett för det diastoliska trycket och ett för MAP. Värdena fördes in i JMP Pro 9.0.2 och beräknades med hjälp av en envägs-ANOVA och ett så kallat Tukey-Kramer test (som motsvarar t-test).

Även vikterna, BCS och CNS fördes in i statistikprogrammet och beräknades med en envägs-ANOVA och ett så kallat Tukey-Kramer test.

Medelvärdet för metaboliserat glukos vid *steady state* redovisas som M-värde. Värdet beräknas utifrån att det inte sker någon exogen glukosproduktion. Under EHC:n motsvarar glukosinfusionen, vid *steady state*, den mängd glukos som flyttas från det extracellulära utrymmet in i cellerna (DeFronzo *et al.*, 1979). Även dessa värden fördes in i ovan nämnda statistikprogram och beräknades med en envägs-ANOVA och jämfördes med ett Tukey-Kramer test.

Medelvärdena benämndes som $mean \pm SD$ och signifikansnivån sattes till $p < 0.05$.

4. RESULTAT

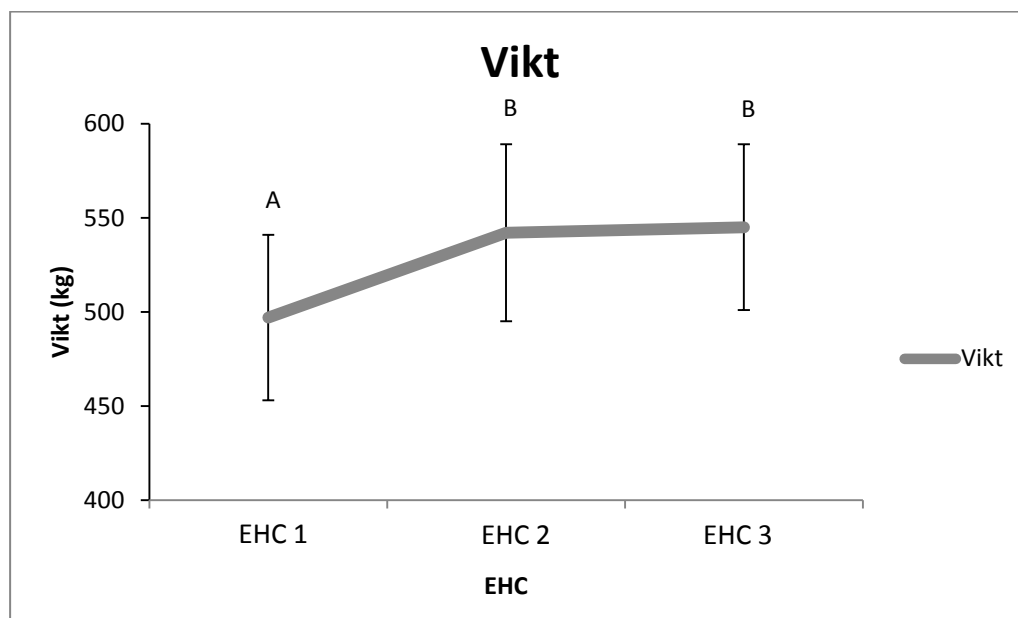
4.1 Hullbedömning och vikt

Vid studiens start var hästarnas medelvikt $497 \text{ kg} \pm 44$ (intervall 424-545 kg). Hästarnas BCS var i medel 5.5 ± 0.6 (intervall 4.5-6.5) och CNS var i medel 2.4 ± 0.4 (intervall 1.5-3.0). Vid studiens slut hade medelvikten i snitt ökat till $545 \text{ kg} \pm 44$ (intervall 482-617), BCS i snitt 7.2 ± 0.4 (intervall 6.5-8.0) och CNS i snitt 2.9 ± 0.3 (intervall 2.5-3.0). En statistiskt signifikant skillnad i medelvikt kunde ses mellan period 1 och 2 + 4. Skillnaden mellan period 2 och 4 var inte signifikant. Ingen signifikant skillnad kunde ses mellan perioderna vid bedömning av CNS. En signifikant skillnad i BCS kunde dock ses mellan perioderna 1 och 2 + 4 men inte mellan period 2 och 4. Vid studiens slut utfodrades hästarna med 250 % (± 10 %) av beräknat energiintag (beräknat på startvikten vid studiens början).

Tabell 2. Medelvärde (\pm SD) av hästarnas vikter (kg) samt hullpoäng bedömt efter BCS (skala 1-9) respektive CNS (skala 0-5) vid de tre EHC:erna

	Friska varmlodiga travare ($n = 9$)		
	Vid försökets start (EHC 1)	Efter vikt- ökningsperioden (EHC 2)	Efter betesperioden (EHC 3)
Vikt (kg)	497 ± 44	542 ± 47	545 ± 44
BCS (1-9)	5.5 ± 0.6	7.1 ± 0.4	7.2 ± 0.4
CNS (0-5)	2.4 ± 0.4	2.8 ± 0.3	2.9 ± 0.3

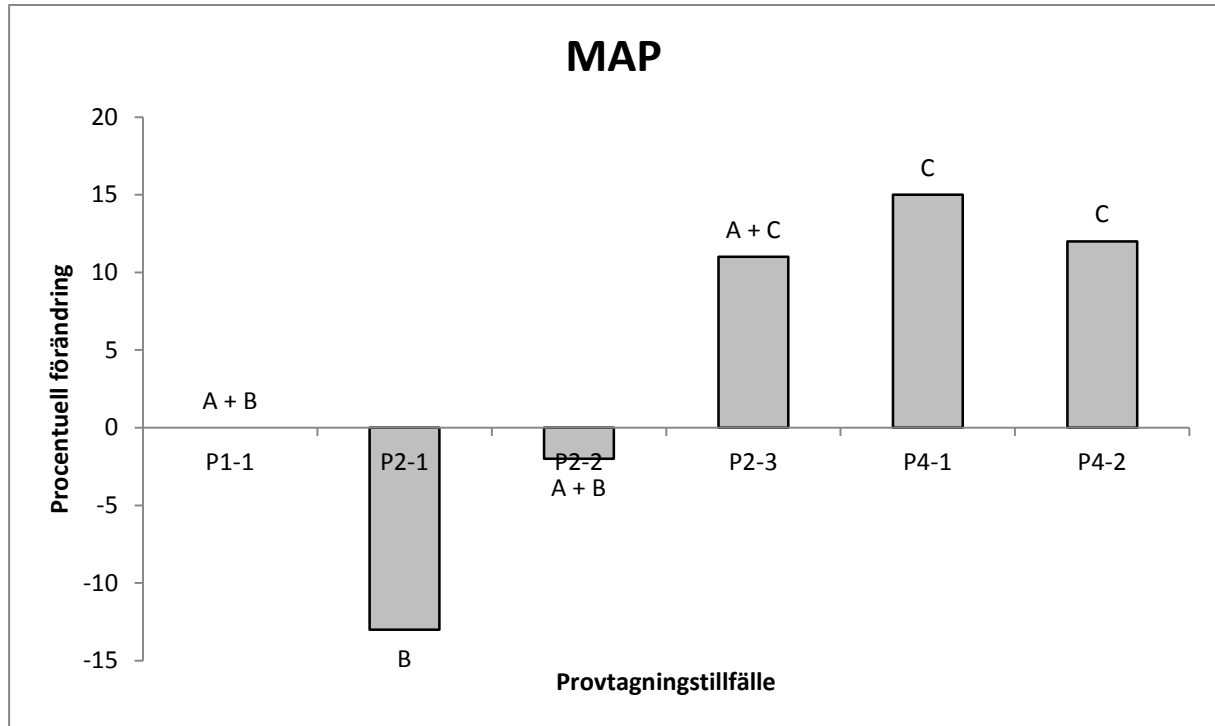
BCS –body condition score, CNS –cresty neck score, EHC –euglykemisk hyperinsulinemisk clamp.



Figur 3. Medelvärde (\pm SD) av hästarnas vikter (kg) vid de tre EHC:erna.

4.2 Blodtryck

Medelvärdet för det medelarteriella trycket (MAP) ökade successivt under viktökningsperioden och skilde sig signifikant mellan studiens start och perioden efter betessläpp. Medelvärdena för MAP presenteras i Figur 4 som en procentuell förändring över tid. Vid studiens start var MAP i medel 82 mmHg \pm 13. Vid studiens slut hade MAP stigit med 12 %, jämfört med vid studiens start.



Figur 4. Procentuell förändring av MAP (%) vid de två sista EHC:erna samt tre av de metabola profilerna jämfört med vid ECH 1 vid studiens start.

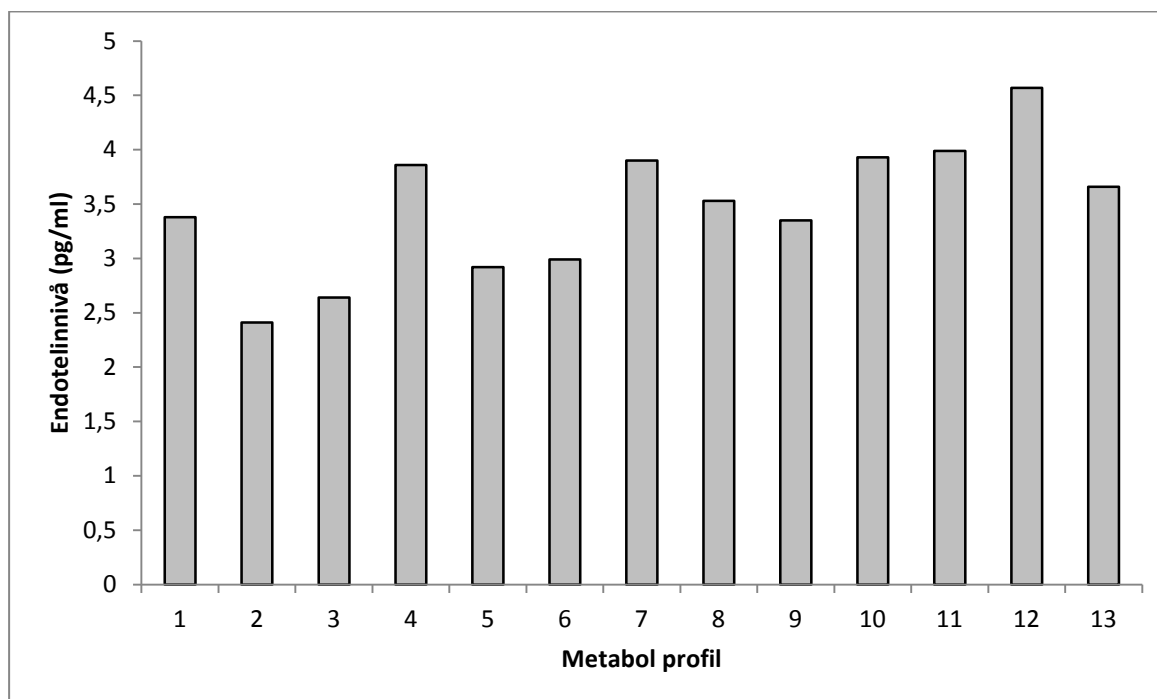
Teckenförklaring		
P1-1	EHC 1	Period 1
P2-1	Metabol profil 1	Period 2
P2-2	Metabol profil 4	Period 2
P2-3	EHC 2	Period 2
P4-1	Metabol profil 11	Period 4
P4-2	EHC 3	Period 4

4.3 Endotelinvärden

Endotelinkoncentrationerna varierade kraftigt mellan olika individer. Medelvärdet var 3.98 ± 0.08 (intervall 0.02 till 20.64) före viktuppgång, 2.53 ± 0.21 (intervall 0.02 till 8.63) under viktuppgångsperioden samt 4.71 ± 0.12 (intervall 0.02 till 22.43) under betesperioden. En signifikant ökning av ET-1-nivåerna efter viktökning och betessläpp kunde inte detekteras. Två av hästarna (häst D och häst M) hade generellt högre ET-1-nivåer än övriga hästar i studien. Medelendotelinvärdena vid EHC 1-3 presenteras i Tabell 3. Medelendotelinvärdena vid de metabola profilerna presenteras i Figur 5.

Tabell 3. Medelendotelinvärden (pg/ml) på individnivå vid de tre EHC:erna samt medelvärde på samtliga hästar vid varje EHC

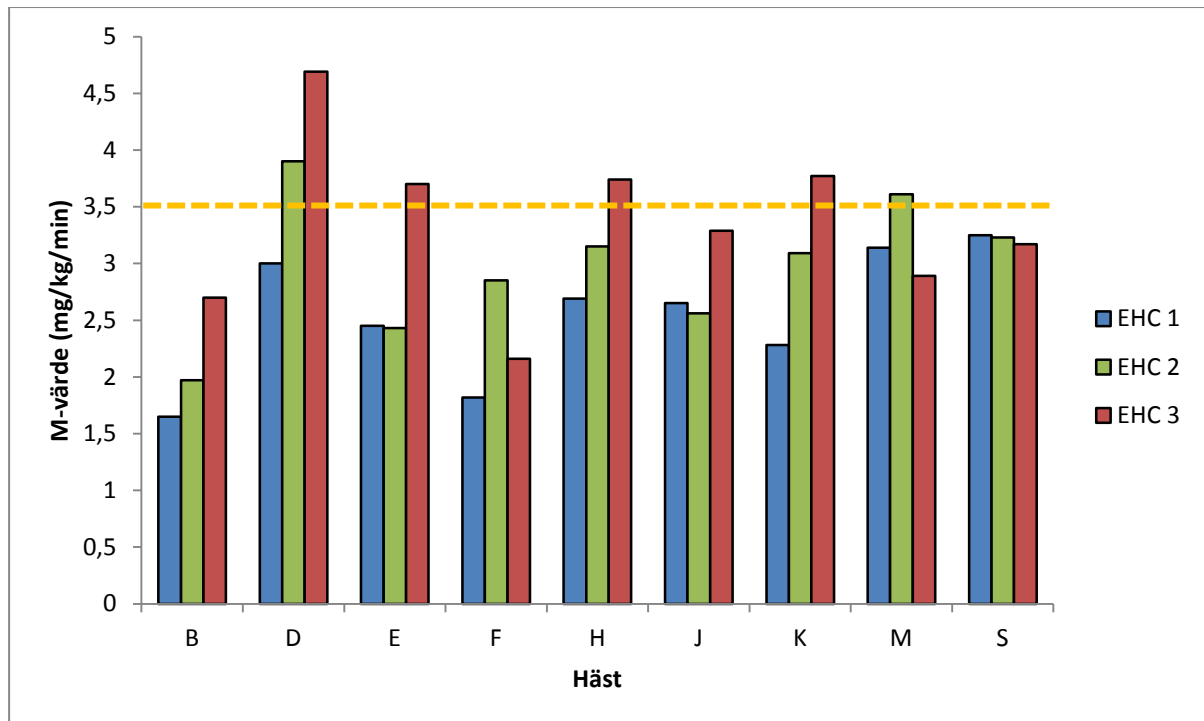
	EHC 1	EHC 2	EHC 3
B	0.02 ± 0	0.02 ± 0	0.02 ± 0
D	20.64 ± 1.51	Missing	22.43 ± 1.61
E	2.84 ± 0.25	3.15 ± 0.06	2.63 ± 0.09
F	0.02 ± 0	0.15 ± 0.11	0.06 ± 0.21
H	0.05 ± 0.04	0.44 ± 0.12	0.17 ± 0.21
J	1.7 ± 0.58	2.27 ± 0.03	2.15 ± 0.19
K	3.67 ± 0.21	2.9 ± 1.44	2.44 ± 0.45
M	6.03 ± 0.05	8.63 ± 0.13	8.95 ± 0.21
S	0.85 ± 0.23	2.68 ± 0.35	3.55 ± 0.23
Medelvärde	3.98 ± 0.08	2.53 ± 0.21	4.71 ± 0.12



Figur 5. Medelkoncentrationen endothelin i plasma (pg/ml) vid de metabola profilerna under period 2 och 4, d.v.s. under viktökningsperioden, under invänjningen till betet samt efter betessläpp. Provtagning 1-6 motsvarar period 2, provtagning 6 motsvarar period 3 och provtagning 8-13 motsvarar period 4.

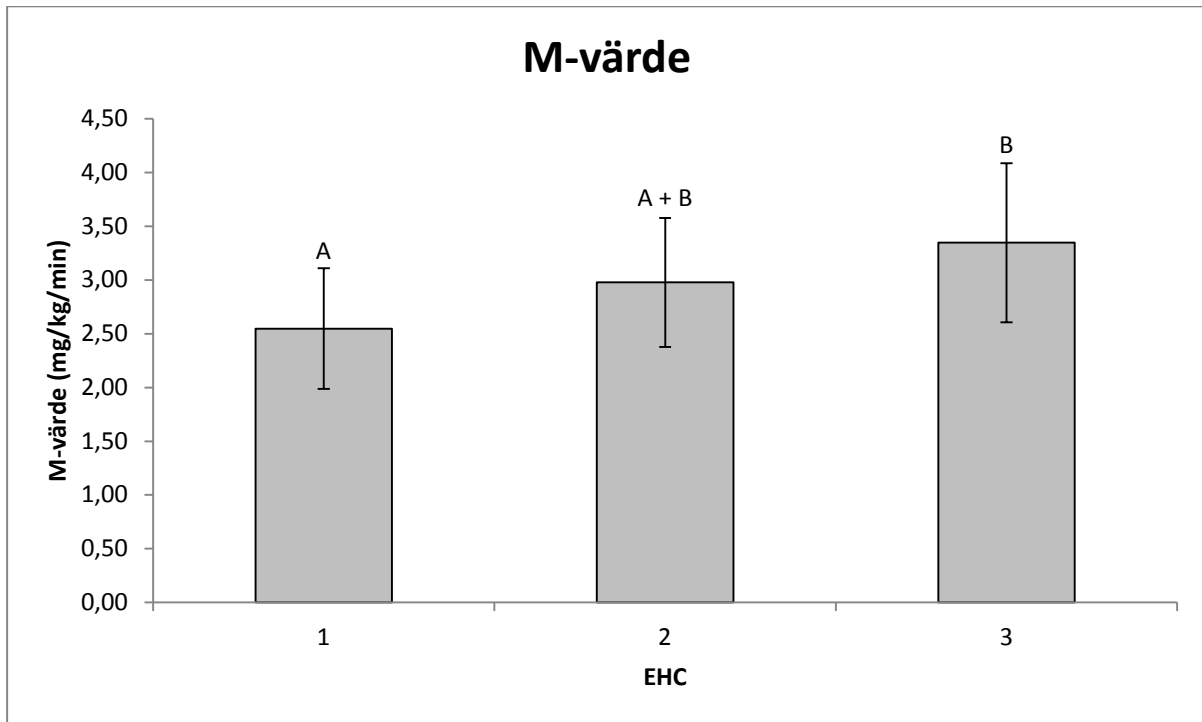
4.4 Insulinresistens

Hästarna som inkluderades i försöket låg på M-värden (medelvärde för metaboliserat glukos vid *steady state* per tillfälle och häst) inom intervallet 1.65- 3.25 vid första EHC:n. Gränsen för 3.5 är markerad med streckad linje i Figur 6.



Figur 6. M-värde = medelvärde för metaboliserat glukos (mg/kg/min) vid de tre EHC:erna presenterat för varje häst (som var och en representeras av en bokstav).

En signifikant skillnad kunde ses i medel-M-värde (medelvärde för metaboliserat glukos vid *steady state* (M-värde) för varje EHC) mellan EHC 1 och EHC 3. Medel-M-värdet hade ökat signifikant vid EHC 3, jämfört med värdet vid studiens start. Medel-M-värdena för EHC 1-3 presenteras i Figur 7.



Figur 7. Medel-M-värde = medelvärde för metaboliserat glukos (mg/kg/min) vid de tre EHC:erna. 1 motsvarar EHC 1, 2 motsvarar EHC 2 och 3 motsvarar EHC 3.

5. DISKUSSION

I den aktuella studien sågs en signifikant ökning av medelblodtrycket efter viktuppgång samt efter betesgång, jämfört med före viktökningen. Blodtrycksstegringen som sågs tycks i detta fall vara kopplad direkt till fetman (viktökning och ökat hull) och inte till ökad insulinresistens och förhöjda plasmaendotelinnivåer. En tidigare studie på ponnyer, som var predisponerade för att utveckla fång, har visat att de i samband med betesperioden fick högre blodtryck än kontrollponnyerna (Bailey *et al.*, 2008). I denna studie sågs en koppling mellan ökad insulinresistens och ökat medelblodtryck efter betesperioden. Detta styrker hypotesen om att det finns ett samband mellan blodtrycksstegring och insulinresistens. I studien av Bailey *et al.* (2008) mättes blodtrycket och insulinnivåerna endast vid två tillfällen; en gång under vintern och en gång under betet. I vår studie har vi gjort en kontinuerlig mätning av dessa parametrar genom upprepade provtagningar under hela studietiden. Den blodtrycksstegring som ses består av mätvärden från flera tillfällen och ger därför starka indikationer på att en successiv blodtrycksstegring sker och att denna stegring under betesperioden blir signifikant. Vår studie är utförd på svenska varmbloodstravare, vilket inte är en ras som är predisponerad för att utveckla metabola rubbningar. Trots detta var hästarna vid försökets start intermediärt insulinresistenta. Hade studien istället utförts på en eller flera ponnyraser hade utgången kan hända ändå blivit annorlunda. Hästarna hanterades på samma sätt under EHC:n efter betesperioden som vid tidigare EHC:er. Det finns således inget som tyder på att hästarna skulle varit mer stressade under EHC:n efter betesperioden jämfört med tidigare. Stress är därmed inte en trolig orsak till det förhöjda blodtrycket som sågs. Hästarna hölls i box minst 12 timmar inför EHC:n efter betesperioden, precis som vid tidigare EHC:er. Ökad motion eller rörelse kan därför inte ses som en trolig förklaring till ökat blodtryck efter betesperioden. Blodtrycksmanchetten monterades på samma sätt som vid de tidigare EHC:erna, och fem mätningar gjordes även här. Den blodtrycksökning som sågs var generell och utgörs av jämförelse mellan medelblodtrycksvärden för MAP.

Vi har i vår studie valt att mäta blodtrycket hos hästarna med en icke-invasiv oscillometrisk mätmetod. Denna mätmetod har tidigare visat tendens till att överskatta framförallt det systoliska blodtrycket (Meyer *et al.*, 2010). I den aktuella studien anses detta inte vara ett stort problem då vi använder blodtrycket som en indikator på generell förändring över en längre period med upprepade mättillfällen, där systoliska mätvärden jämförs med systoliska värden och MAP med MAP och så vidare. Blodtrycksmätning med hjälp av icke-invasiv oscillometrisk metod har tidigare visat ha en acceptabel dag-till-dag-variation (Soder *et al.*, 2012).

Blodtrycket som uppmäts är ett resultat av hjärtfrekvens (HF, hjärtslag/min) och *cardiac output* (CO som illustrerar den volym som hjärtat pumpar ut/min) samt den perifera resistensen (det vill säga det ökade motståndet i kärlbädden) (Vincent, 2008). Faktorer som påverkar HF och CO är framförallt stress och fysisk kondition. HF påverkas av nerver (sympaticus via autonoma nerver ger en stimulering som ökar HF, och parasympaticus via *nervus vagus*

minskar HF) och hormoner (som bland annat adrenalin och noradrenalin ökar HF). Stress kan ge ett sympaticuspåslag som leder till förhöjd HF. Ökad fysisk kondition, det vill säga en vältränad individ, ger ett ökat CO. Båda dessa faktorer skulle därmed kunna ge upphov till ökat blodtryck. I vår studie har vi noggrant kontrollerat förhållandena runt hästarna. De har under hela studien hanterats på samma sätt och undersökningarna har hela tiden utförts av samma personer. Hästarna har aldrig stått ensamma, utan har alltid stått tillsammans med minst en häst som försökshästen känner väl. Hästarna tränades inte överhuvudtaget, vare sig inför eller under försöket. Den eventuella ökning av motion som skulle kunna ske i samband med betesgång kan anses vara minimal jämfört med den motion hästarna fick i de rasthagar som de vistades i under viktökningsperioden och torde således inte vara tillräcklig för att ge en signifikant ökning av blodtrycket. Mer sannolikt är i detta fall att den ökning som sågs av blodtrycket under och efter betesgång kan kopplas till en ökad perifer resistens. Endotelin-1 (ET-1) är ett ämne som ger upphov till ökad vasokonstriktion och kan därmed öka det vaskulära motståndet. Förhöjda nivåer av ET-1 skulle därför kunna vara en möjlig orsak till en hypertoni (förhöjt blodtryck). I vår studie sågs inga förhöjda ET-1-nivåer i plasma, vilket gör att det i detta fall inte ses som en trolig förklaring till ökat vaskulärt motstånd.

Precis som hos människor, skulle kroniska tillstånd med förhöjt blodtryck naturligtvis kunna leda till följdproblem även hos hästar. Det är svårt att förutspå vikten av förhöjt blodtryck hos hästar i utvecklandet av följsjukdomar. Hos människor med förhöjt blodtryck ses ofta hypertension. Hypertension hos människa leder i många fall till hjärt- och kärlsjukdomar så som åderförkalkning, hjärtsvikt och ögon- och njurskador (DeFronzo & Ferrannini, 1991). Det är möjligt att systemisk hypertension skulle kunna leda till njur- och ögonskador även hos hästar. Utvecklandet av hjärtsvikt är hos häst mindre troligt, då hästar av naturen har ett större hjärta. Som nämnts tidigare i litteraturöversikten är det rimligt att anta att hypertension skulle kunna vara kopplad till andra problem, så som exempelvis utvecklandet av fång (Katz *et al.*, 2003). Hos människa har man sett en stark koppling mellan fetma och utvecklandet av förhöjt blodtryck (Boyd *et al.*, 2005; Must *et al.*, 1999). Man anser att detta dels beror på IR hos dessa patienter, vilket bland annat kopplats till förändrad fettmetabolism samt till förhöjda ET-1-nivåer. Hos människa anses det ökade vaskulära motståndet också kunna uppstå till följd av bland annat åderförkalkning som bland annat kan orsakas av förhöjda nivåer av blodfetter så som kolesterol.

I den aktuella studien sågs en ökning av fetma (vikt och hull) efter viktökningsperioden jämfört med vid studiens start. En signifikant ökning av medelvikten sågs under sista delen av studien strax före betesperioden. Medelvikten var fortsatt signifikant förhöjd efter betesperioden. Detta styrker också kopplingen mellan viktuppgången och det förhöjda blodtrycket. Blodtrycksstegringen blir signifikant vid den metabola profilen under betesperioden, vilket är strax efter att en signifikant ökning av kroppsvikten sågs. Troligtvis kan det finnas en viss fördröjningseffekt från att viktökning ses till att en stegring i blodtrycket ses. Även en signifikant skillnad i BCS kunde ses mellan studiens start och efter viktuppgångsperioden samt efter

betessläpp. Ingen signifikant skillnad kunde ses mellan perioderna vid bedömning av CNS. CNS är en femgradig skala och utgörs av fettansättningar i hästens nacke/mankam. En ökning av denna skala är mer specifik än en ökning av BCS och en större individuell variation sågs i CNS mellan de undersökta hästarna.

Som nämndes i litteraturoversikten finns det ett samband mellan insulinresistens, ökade plasmaendotelinnivåer och syndrom så som fång (Toth *et al.*, 2008; Asplin *et al.*, 2007; Treiber *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2004; Juan *et al.*, 2004). I vår studie sågs ingen ökning av hästarnas insulinresistens efter viktökning och betesgång. Hästarna uppvisade istället en ökad insulinkänslighet efter betesperioden. Vad detta beror på är svårt att avgöra. Troligvis är det flera faktorer som spelar in än de som vi har undersökt. Koppling mellan endotelin och insulinresistens har tidigare nämnts i flera studier (Juan *et al.*, 1999; Juan *et al.*, 1996). Intressant vore att undersöka kopplingen mellan fetma och insulinresistens samt plasmaendotelinnivåer hos fler andra raser, framförallt raser som tidigare visats vara mer insulinresistenta (Johnson *et al.*, 2004).

Det vi känner till idag är att endotelin-1 (ET-1) är en kraftfull peptid som framförallt utövar en lokal effekt, då det i huvudsak utsöndras mot de glatta muskelcellerna i kärlväggen (Levin, 1995). Den mängd av ämnet som hamnar i det cirkulerande blodomloppet är således en mindre del av det som produceras i endotelcellerna. Vilka systemiska effekter som ET-1 kan ha genom den andel som finns i blodcirkulationen är ännu inte helt känt. På humansidan ses problem med hjärt-och kärlsjukdomar i samband med förhöjda nivåer av ET-1 (Shah, 2007), något som inte observerats på samma sätt hos våra hästar. Halveringstiden för ämnet är hos människor kort (Levin, 1995). Inom några minuter kommer det endotelin som finns i blodbanan börja brytas ned. Förhöjda ET-1-nivåer förväntas därför inte ses i blodet mer än nära anslutning till den ökade ET-1-produktionen. Därmed torde förhöjda plasmanivåer av ET-1 i de flesta fall tyda på en kontinuerlig ökning av produktionen. En kortvarig ökning är mycket svårare att detektera.

I den aktuella studien sågs inga förhöjda nivåer av ET-1 i plasma. Detta beror troligtvis på att hästarna inte fick en ökad ET-1-produktion, vilket inte är oväntat i och med att de inte heller fick ökade insulinnivåer. Däremot sågs en individuell variation, där framförallt två av hästarna skiljde ut sig. Dessa två hästar låg generellt högre i plasmaendotelinnivå jämfört med resterande sju. Inget samband kunde ses mellan dessa två hästars generellt högre ET-1-nivåer och kraftigare insulinresistens (vilket skulle motsvaras av sänkta M-värden). De högre endotelinnivåerna kunde inte heller korreleras till ökade blodtrycksnivåer. Något som däremot observerades var att de två hästar som hade lägst ET-1-nivåer i plasma låg bland de hästar som i studien var mest insulinresistenta. Fler studier krävs för att utreda sambandet mellan insulinresistens och ökade ET-1-nivåer i plasma.

Med i litteraturoversikten nämnda studier (Ramaswamy *et al.*, 2002; Myhre *et al.*, 1993) till grund verkar det vara möjligt att detektera förhöjda nivåer av ET-1 i plasma. I dessa fall har plasmakoncentrationen av ET-1 i samband med försämrad blodcirkulation i hästens grovtarm och i samband med stimulans från inflammatoriska mediatorer studerats. De förhöjda nivåerna som setts skulle därmed kunna kopplas till både inflammatoriska tillstånd och tillstånd med ökad fettansättning. De ET-1-nivåerna som i studien av Katwa *et al.* (1999) var förhöjda i samband med fång uppmättes i hovens lamellära vävnad. Därmed går det inte säkert att säga att plasmanivåerna skulle varit förhöjda, även om detta inte tycks helt osannolikt. En koppling kan däremot göras mellan förhöjda endotelinnivåer och fång. Betydelsen av denna koppling är däremot fortfarande svår att avgöra. I den aktuella studien var hästarna kliniskt friska. Den fetma som sågs i vår studie verkar inte vara tillräcklig eller av en sådan grad att den gett upphov till ett proinflammatoriskt tillstånd som i sin tur gett upphov till ökad endotelinfrisättning. Möjligen kan det finnas ett tröskelvärde för fetman, för att hästarnas endotelinproduktion ska påverkas. Tidigare studier har visat att även ET-1-nivåerna i plasma har en acceptabel varians från dag till dag (Soder *et al.*, 2012).

Då få studier är gjorda på ET-1 på häst finns ännu inga bra riktlinjer för normalvärden. Inom de studier som gjorts har en stor individuell variation observerats. Så tycks även vara fallet i denna studie. I en studie av Benamou *et al.* (1998) om kopplingen mellan förhöjda ET-1-nivåer och RAO hade kontrollhästarna (5 st fullblod) ET-1-värden på 3.74 ± 0.52 pg/ml. I studien av Soder *et al.* (2012) sågs medelplasma-ET-1-nivåer på 1.5 ± 0.5 ($n = 9$). Vidare studier behövs för att fastställa referensvärden för plasmaendotelin och för att endotelinets effekter i kroppen bättre ska kunna studeras. I studien av Soder *et al.* (2012) sågs en rasvariation, vilket också är en faktor som bör tas i beaktande vid vidare studier.

Vi kan i vår studie inte säga något om en eventuell förändring av ET-1-nivåerna lokalt i kärlbädden, då detta inte undersöktes. Fler studier skulle behöva göras för att referensvärden ska kunna bestämmas för plasmaendotelinnivåer hos häst. Om referensvärden för plasmaendotelinnivåer hos häst kan fastställas och sambandet mellan insulinresistens och förhöjda plasmaendotelinnivåer hos häst kan stärkas skulle analysmetoden bli användbar i hästpraktiken. Plasmaendotelinprover skulle enkelt gå att ta under fältmässiga förhållanden, som är en viktig och stor del av hästpraktiken. Kostnaderna skulle därmed kunna minskas och ett större antal hästar skulle kunna undersökas, även de som inte kommer in till större hästkliniker. Veterinärer skulle enklare kunna upptäcka och identifiera hästar som befinner sig i riskzonen och därmed kunna fånga upp dessa individer innan utvecklandet av följsjukdomar som till exempel fång. Med mer forskning på området finns det potential att förenkla diagnosticeringen av ett stort antal hästar och därmed minska risken för utvecklandet av syndrom som kan ge upphov till stort djurlidande. Alternativt till analysering av ET-1 i plasma skulle analys av NO kunna göras. Även här behövs mer forskning för att validera mätmetoden.

5.1 Sammanfattningsvis

I denna studie sågs en viktökning till följd av intag av fettrikt foder. Hästarna uppvisade förhöjda medelblodtrycksvärden efter viktökningsperioden samt efter betesperioden. En samtidig ökning av insulin och ET-1 kunde ha förväntats, men sågs i detta fall inte. Resultaten i denna studie ifrågasätter inte hypotesen att det finns ett samband mellan IR och förhöjda ET-1-nivåer, då dessa även i detta fall följs åt. Den ökning som sågs av blodtrycket tycks i detta fall vara kopplad direkt till fetma och inte till IR. Sambandet däremellan är inte helt klart men skulle kunna bero på ökade blodfettnivåer som till exempel kolesterol.

Sammanfattningsvis kan det sägas att denna studie uppvisar en signifikant viktökning och ökat MAP efter en period av viktökning och bete. Resultaten från studien indikerar att det finns ett samband mellan viktökning och ökat MAP. Den ökning som sågs av blodtrycket tycks i detta fall vara kopplad direkt till ökad fetma och inte till IR eller ökade nivåer av ET-1 i plasma. Vidare studier skulle behöva göra för att fastställa sambandet mellan ökat blodtryck och fetma och för att utreda vilka mekanismer som ligger bakom detta.

6. REFERENSER

- Agwunobi, A.O., Reid, C., Maycock, P., Little, R.A. & Carlson, G.L. (2000). Insulin resistance and substrate utilization in human endotoxemia. *J Clin Endocrinol Metab* 85(10), 3770-8.
- Ahlborg, G. & Lundberg, J.M. (1997). Nitric oxide-endothelin-1 interaction in humans. *J Appl Physiol* (1985) 82(5), 1593-600.
- Asplin, K.E., Sillence, M.N., Pollitt, C.C. & McGowan, C.M. (2007). Induction of laminitis by prolonged hyperinsulinaemia in clinically normal ponies. *Vet J* 174(3), 530-5.
- Bailey, S.R., Habershon-Butcher, J.L., Ransom, K.J., Elliott, J. & Menzies-Gow, N.J. (2008). Hypertension and insulin resistance in a mixed-breed population of ponies predisposed to laminitis. *Am J Vet Res* 69(1), 122-9.
- Battistini, B. & Dussault, P. (1998). The many aspects of endothelins in ischemia-reperfusion injury: emergence of a key mediator. *J Invest Surg* 11(5), 297-313.
- Benamou, A.E., Art, T., Marlin, D.J., Roberts, C.A. & Lekeux, P. (1998). Variations in systemic and pulmonary endothelin-1 in horses with recurrent airway obstruction (heaves). *Pulm Pharmacol Ther* 11(2-3), 231-5.
- Boyd, G.S., Koenigsberg, J., Falkner, B., Gidding, S. & Hassink, S. (2005). Effect of obesity and high blood pressure on plasma lipid levels in children and adolescents. *Pediatrics* 116(2), 442-6.
- Cardillo, C., Campia, U., Iantorno, M. & Panza, J.A. (2004). Enhanced vascular activity of endogenous endothelin-1 in obese hypertensive patients. *Hypertension* 43(1), 36-40.
- Carter, R.A., Geor, R.J., Burton Staniar, W., Cubitt, T.A. & Harris, P.A. (2009). Apparent adiposity assessed by standardised scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies. *Vet J* 179(2), 204-10.
- Clozel, M., Gray, G.A., Breu, V., Loffler, B.M. & Osterwalder, R. (1992). The endothelin ETB receptor mediates both vasodilation and vasoconstriction in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 186(2), 867-73.
- DeFronzo, R.A. & Ferrannini, E. (1991). Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 14(3), 173-94.
- 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.
- Ferri, C., Pittoni, V., Piccoli, A., Laurenti, O., Cassone, M.R., Bellini, C., Properzi, G., Valesini, G., De Mattia, G. & Santucci, A. (1995). Insulin stimulates endothelin-1 secretion from human endothelial cells and modulates its circulating levels in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 80(3), 829-35.
- Firshman, A.M. & Valberg, S.J. (2007). Factors affecting clinical assessment of insulin sensitivity in horses. *Equine Vet J* 39(6), 567-75.
- Frank, N., Geor, R.J., Bailey, S.R., Durham, A.E., Johnson, P.J. & American College of Veterinary Internal, M. (2010). Equine metabolic syndrome. *J Vet Intern Med* 24(3), 467-75.
- Grundy, S.M. (1999). Hypertriglyceridemia, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 83(9B), 25F-29F.
- Grundy, S.M., Brewer, H.B., Jr., Cleeman, J.I., Smith, S.C., Jr., Lenfant, C., American Heart, A., National Heart, L. & Blood, I. (2004). Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 109(3), 433-8.

- 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 Vet J* 15(4), 371-2.
- Johnson, P.J., Messer, N.T. & Ganjam, V.K. (2004). Cushing's syndromes, insulin resistance and endocrinopathic laminitis. *Equine Vet J* 36(3), 194-8.
- Juan, C.C., Fang, V.S., Huang, Y.J., Kwok, C.F., Hsu, Y.P. & Ho, L.T. (1996). Endothelin-1 induces insulin resistance in conscious rats. *Biochem Biophys Res Commun* 227(3), 694-9.
- Juan, C.C., Fang, V.S., Kwok, C.F., Perng, J.C., Chou, Y.C. & Ho, L.T. (1999). Exogenous hyperinsulinemia causes insulin resistance, hyperendothelinemia, and subsequent hypertension in rats. *Metabolism* 48(4), 465-71.
- Juan, C.C., Shen, Y.W., Chien, Y., Lin, Y.J., Chang, S.F. & Ho, L.T. (2004). Insulin infusion induces endothelin-1-dependent hypertension in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287(5), E948-54.
- Katwa, L.C., Johnson, P.J., Ganjam, V.K., Kreeger, J.M. & Messer, N.T. (1999). Expression of endothelin in equine laminitis. *Equine Vet J* 31(3), 243-7.
- Katz, L.M., Marr, C.M. & Elliott, J. (2003). Characterization and comparison of the responses of equine digital arteries and veins to endothelin-1. *Am J Vet Res* 64(11), 1438-43.
- Lev-Ran, A. (2001). Human obesity: an evolutionary approach to understanding our bulging waistline. *Diabetes Metab Res Rev* 17(5), 347-62.
- Levin, E.R. (1995). Endothelins. *N Engl J Med* 333(6), 356-63.
- Meyer, O., Jenni, R., Greiter-Wilke, A., Breidenbach, A. & Holzgreffe, H.H. (2010). Comparison of telemetry and high-definition oscillometry for blood pressure measurements in conscious dogs: effects of torcetrapib. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 49(4), 464-71.
- Must, A., Spadano, J., Coakley, E.H., Field, A.E., Colditz, G. & Dietz, W.H. (1999). The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA* 282(16), 1523-9.
- Myhre, U., Pettersen, J.T., Risoe, C. & Giercksky, K.E. (1993). Endothelin-1 and endotoxemia. *J Cardiovasc Pharmacol* 22 Suppl 8, S291-4.
- Nakamura, S., Naruse, M., Naruse, K., Demura, H. & Uemura, H. (1990). Immunocytochemical localization of endothelin in cultured bovine endothelial cells. *Histochemistry* 94(5), 475-7.
- Oliver, F.J., de la Rubia, G., Feener, E.P., Lee, M.E., Loeken, M.R., Shiba, T., Quertermous, T. & King, G.L. (1991). Stimulation of endothelin-1 gene expression by insulin in endothelial cells. *J Biol Chem* 266(34), 23251-6.
- Pass, M.A., Pollitt, S. & Pollitt, C.C. (1998). Decreased glucose metabolism causes separation of hoof lamellae in vitro: a trigger for laminitis? *Equine Vet J Suppl* (26), 133-8.
- Quehenberger, P., Exner, M., Sunder-Plassmann, R., Ruzicka, K., Bieglmayer, C., Endler, G., Muellner, C., Speiser, W. & Wagner, O. (2002). Leptin induces endothelin-1 in endothelial cells in vitro. *Circ Res* 90(6), 711-8.
- Ramaswamy, C.M., Eades, S.C., Venugopal, C.S., Hosgood, G.L., Garza, F., Barker, S.A. & Moore, R.M. (2002). Plasma concentrations of endothelin-like immunoreactivity in healthy horses and horses with naturally acquired gastrointestinal tract disorders. *Am J Vet Res* 63(3), 454-8.

- Reaven, G.M. (2005). Insulin resistance, the insulin resistance syndrome, and cardiovascular disease. *Panminerva Med* 47(4), 201-10.
- Shah, R. (2007). Endothelins in health and disease. *Eur J Intern Med* 18(4), 272-82.
- Soder, J., Brojer, J.T. & Nostell, K.E. (2012). Interday variation and effect of transportation on indirect blood pressure measurements, plasma endothelin-1 and serum cortisol in Standardbred and Icelandic horses. *Acta Vet Scand* 54, 37.
- Sprouse, R.F., Garner, H.E. & Green, E.M. (1987). Plasma endotoxin levels in horses subjected to carbohydrate induced laminitis. *Equine Vet J* 19(1), 25-8.
- Thompson, A., Valeri, C.R. & Lieberthal, W. (1995). Endothelin receptor A blockade alters hemodynamic response to nitric oxide inhibition in rats. *Am J Physiol* 269(2 Pt 2), H743-8.
- Toth, F., Frank, N., Elliott, S.B., Geor, R.J. & Boston, R.C. (2008). Effects of an intravenous endotoxin challenge on glucose and insulin dynamics in horses. *Am J Vet Res* 69(1), 82-8.
- Treiber, K.H., Kronfeld, D.S., Hess, T.M., Byrd, B.M., Splan, R.K. & Staniar, W.B. (2006). Evaluation of genetic and metabolic predispositions and nutritional risk factors for pasture-associated laminitis in ponies. *J Am Vet Med Assoc* 228(10), 1538-45.
- Verhaar, M.C., Strachan, F.E., Newby, D.E., Cruden, N.L., Koomans, H.A., Rabelink, T.J. & Webb, D.J. (1998). Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. *Circulation* 97(8), 752-6.
- 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. *J Anim Sci* 85(5), 1144-55.
- Vincent, J.L. (2008). Understanding cardiac output. *Crit Care* 12(4), 174.