



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

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

Endogent förhöjda plasmakortisolnivåer vs fång.

Angelika Dahlberg

*Uppsala
2015*

Kandidatarbete 15 hp inom veterinärprogrammet

Kandidatarbete 2015:59

Endogent förhöjda plasmakortisolnivåer vs fång

Increased endogenous plasma cortisol levels vs laminitis

Angelika Dahlberg

Handledare: Ove Wattle, institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Eva Tydén, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Kandidatarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: grund nivå, G2E

Kurskod: EX0700

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2015

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen / Sveriges lantbruksuniversitet,
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Delnummer i serie: Kandidatarbete 2015: 59

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

Nyckelord: PPID, fång, kortikosteroider, häst

Key words: PPID, laminitis, corticosteroids, equine

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Material och metoder.....	3
Litteraturoversikt.....	3
Hypofysens anatomi.....	3
Patofysiologi Cushings syndrom - PPID.....	4
Symptom PPID.....	5
Diagnostisering PPID.....	6
Endogen plasma ACTH koncentration eller α -MSH koncentration.....	6
Blodglukoskoncentration.....	6
Kortisol-/ kreatininkvot i urin.....	6
Insulin.....	6
Kortisol.....	7
Dexametasonhämningstest (DT).....	7
ACTH-stimulering.....	7
Tyrotropinfrisättande hormon (TRH) stimuleringstest.....	7
Kombinerat DT/TRH- test.....	7
Röntgen, CT och MRI.....	8
Sekundära eller parallella sjukdomsproblem vid PPID.....	8
Glukokortikoider/insulin vs. Fång.....	8
Glukokortikoider och fettma.....	10
Gaffelbandsdegeneration.....	10
Behandling.....	10
Diskussion.....	11
Litteraturförteckning.....	12

SAMMANFATTNING

Syftet med detta arbete är att ge en översikt om vad som publicerats avseende patogenes, symptom och diagnosticering av PPID samt översiktligt korrelera PPID till patogenes och behandling vid fång.

Hypofysen delas in i neurohypofysen och adenohypofysen, som i sin tur är uppdelad i pars distalis, pars intermedia och pars tuberalis. Hypotalamus reglerar en del av hypofysens hormonproduktion, genom frisättning av corticotropin releasing hormone (CRH) och dopamin som transporteras via hypofysstjälk och blodkärl. I Hypofysen initieras respektive hämmas syntesen av hormon som ACTH. ACTH stimulerar i sin tur frisättning av kortisol från endokrina celler i binjurebarken. Kortisol fungerar sedan som en negativ feedback signal som inhiberar både sekretionen av CRH och ACTH. Pituitary Pars Intermedia Dysfunction (PPID, ofta inkorrekt kallat Cushing's Syndrome) är rapporterat hos hästar över 12 år, med ökad incidens hos hästar över 20 år. Orsaken till PPID hos häst anses vara att hypotalamus inte producerar tillräckligt med dopamin vilket i sin tur får hypofysens pars intermedia att växa och bli överaktiv. Pars intermedias ökade produktion av pro- opiomelanocortins (POMCs) anses vara en av orsakerna till de kliniska tecknen hos hästar med PPID, vilka inkluderar hirsutism, ökad risk för fång (eventuellt till följd av insulinresistens) och infektioner (kortisolets inverkan på immunförsvar), ökad törst (via hormonet ADH) med mera. Vid sidan av kliniska symptom används framförallt två metoder för PPID diagnostik: Dexametasonhämningstest och ACTH-test. För att inte inkludera falskt positiva eller negativa i testresultaten måste man vid diagnosställande ta hänsyn till årstid samt andra eventuella sjukdomar och fysiologiska faktorer. Behandling av PPID som sker via livslång tillförsel av dopaminreceptoragonisten Pergolid, är ofta effektiv.

Hästar med PPID har ökad risk för att utveckla sjukdomen fång som uppkommer av att hovens lamellager fått en så nedsatt mekanisk hållfasthet att det inte längre kan bära hästens vikt ens i vila. Hur PPID ökar risken för fång är inte klarlagd men det finns teorier om att kortisonets inverkan på glukosomsättning och insulin alternativt cellers differentiering och blodkärlens tonus kan vara de predisponerande faktorerna. Även med pergolidbehandling kommer hästar som redan fått fång fortsatt vara predisponerade då tidigare skador i lamellagret gör det lättare för nya att uppstå.

Många hästar drabbas av både PPID och fång och ytterligare forskning behövs för att klargöra patogenesen vid respektive sjukdom, sambandet mellan sjukdomarna och för att få säkrare diagnostiska metoder.

SUMMARY

The purpose of this work is to provide an overview of what is published regarding pathogenesis, symptoms and diagnosis of PPID and clearly correlate PPID to the pathogenesis and treatment of laminitis.

The pituitary is divided into the anterior lobe and the posterior lobe, which in turn is divided into the pars distalis, pars intermedia and pars tuberalis. The hypothalamus regulates some of pituitary hormone production, by the release of corticotropin releasing hormone (CRH) and dopamine transported by the pituitary stalk and blood vessels. In the pituitary gland the synthesis of the hormone ACTH is initiated and inhibited. ACTH in turn stimulates the release of cortisol from endocrine cells in the adrenal cortex. Cortisol then acts as a negative feedback signal that inhibits both the secretion of CRH and ACTH. Pituitary Pars Intermedia Dysfunction (PPID, often incorrectly called Cushing's syndrome) is reported in horses over 12 years, with increased incidence in horses for over 20 years. The cause of PPID in horses is considered to be that the hypothalamus does not produce enough dopamine, which in turn makes the pituitary pars intermedia to grow and become overactive. The increased production of pro- opiomelanocortins (POMCs) in pars intermedia is considered one of the causes of the clinical signs in horses with PPID, which include hirsutism, increased risk of laminitis (possibly as a result of insulin resistance) and infections (the effect of cortisol on the immune system), increased thirst (via the hormone ADH) etc. Aside from clinical symptoms, primarily two methods for PPID diagnostics are used: dexamethasone suppression test (DST) and ACTH test. In order not to include false positive or negative in the test results, one must take seasonal variation into consideration as well as other possible diseases and physiological factors. Treatment of PPID made through lifelong administration of the dopamine receptor agonist pergolide, is often effective.

Horses with PPID are at increased risk for developing the disease laminitis which is caused by the hoof lamellar having such reduced mechanical strength that it can no longer bear the horse's weight even at rest. How PPID increases the risk of laminitis is not clear but there are theories that cortisone effect on glucose metabolism and insulin alternatively cell differentiation and the tone of blood vessels may be the predisposing factors. Even with pergolide treatment the horses who have already received laminitis continued to be predisposed as previous injuries in the lamellae makes it easier for new ones to emerge.

Many horses suffer from both PPID and laminitis and further research is needed to clarify the pathogenesis of each disease, the relationship between the diseases and to obtain more reliable diagnostic methods.

INLEDNING

Pars Pituitary Intermedia Dysfunction (PPID), ofta kallat Cushing's Syndrome, är en kronisk progressiv sjukdom med okänd patogenes som rapporterats hos hästar över 7 år, med ökad incidens hos hästar över 18 år (Schott 2002). PPID drabbar 10 % (McGowan 2005) till 30 % (McFarlane 2011) av alla hästar över 15 år. Orsaken anses vara att hypotalamus inte producerar tillräckligt med dopamin vilket i sin tur får hypofysens pars intermedia att växa och bli överaktiv (Millington *et al.* 1988; McGowan 2005). Enligt Frank *et al.* (2006) hade 40 % av vuxna hästar med medelåldern 15 år, som donerats till veterinärutbildningar av en rad olika skäl, mikro- eller makroadenom i hypofysens pars intermedia. Pars intermedias ökade produktion av pro-opiomelanocortins (POMCs) ansvarar delvis för den kliniska bilden samt inducerar dysfunktion av binjurebarken och en ökning av plasmakoncentrationen kortisol (Schott 2002). Ingen köns- eller raspreponderans har dokumenterats men ponnyer och Morganhästar verkar löpa större risk (McCue 2002; Schott 2002). Hästar med PPID drabbas ofta av fång, vilket kan resultera i avlivning såvida inte behandling mot PPID sätts in (McGowan, 2005). Syftet med detta arbete är att översiktligt beskriva vad som publicerats avseende patogenes, symptom och diagnostisering av PPID i korrelation till patogenes och behandling vid fång.

MATERIAL OCH METODER

Jag har använt mig av databaserna PubMed och Google scholar, samt Physiology of Domestic Animals (Sjaastad *et al.* 2010) och personlig kommunikation med veterinärer på våning 5 VHC. Sökord: PPID, laminitis, corticosteroids, equine.

LITTERATURÖVERSIKT

Hypofysens anatomi

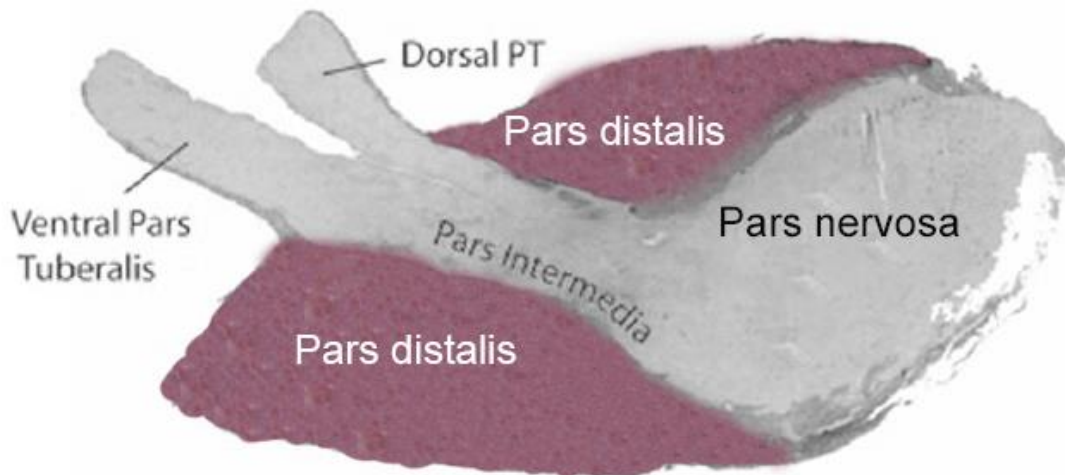
Hypofysen består av en större främre lob (adenohypofysen), som i sin tur är uppdelad i pars distalis, pars intermedia och pars tuberalis samt en mindre bakre lob (neurohypofysen) som delas upp i pars nervosa, infundibulärstjälken och eminentia mediana (figur 1). Den är belägen under synnerven vid basen av hjärnan och står i förbindelse med hypotalamus genom hypofysstjälken (Schott 2002) (figur 2). Hypotalamus utsöndrar neurohormoner som "corticotropinreleasing hormone" (CRH) som via blodet förs till adenohypofysen där de initierar en syntes och insöndring av hormon som adrenokortikotropiskt hormon (ACTH). ACTH stimulerar i sin tur frisättning av kortisol från endokrina celler i binjurebarken. Kortisol fungerar sedan som en negativ feedback signal som efter inbindning till framförallt receptorer i pars distalis, inhiberar både sekretionen av CRH och ACTH (Sjaastad *et al.* 2010). Hypotalamus hämmar också hypofysens produktion av vissa hormoner via frisättning av dopamin, se nedan.

Adenohypofysen utgör 80-85 % av körtelvikten och både syntetiserar och lagrar även hormoner som tillväxthormon (GH), prolaktin, follikelstimulerande hormon (FSH), luteiniserande hormon (LH) och tyroideastimulerande hormon (TSH) (Schott 2002). I pars distalis finns kortikotrofer som producerar pro-opiomelanocortin (POMC) som är en hormonprekursor och som via prohormonkonvertaser (PC1) framförallt bearbetas till ACTH men även β -lipoprotein som blir till β -endorfin och γ -lipoprotein, vilka är endogena opioidagonister (Schott 2002; McFarlane 2011). I en frisk häst produceras nästan all ACTH i pars distalis (Wilson *et al.* 1982). Pars intermedia är uppbyggd av melanotrofer, som även de producerar POMC som omvandlades av PC1 till ACTH (McFarlane 2007) och av prohormonkonvertas 2 (PC2) till melanocytstimulerande hormon (α -MSH) som i sin tur har en roll i metabolism och som antiinflammatoriska. ACTH omvandlas också till corticotropin-like intermediär lobe peptide (CLIP) (Schott 2002) som stimulerar frisättning av insulin från β -celler hos gnagare (McFarlane 2011). Pars intermedia är direkt innerverad av de dopaminerga neuronerna från periventrikulära nukleus i hypotalamus. PC-aktivitet i pars intermedia blir inhiberad av dopamin och stimulerad av tyrotropinfrisättande hormon (TRH) hos möss (Saiardi & Borrelli 1998). Det är troligt att det finns andra oidentifierade reglerande faktorer utöver dopamin och TRH som spelar in vid PPID (McFarlane

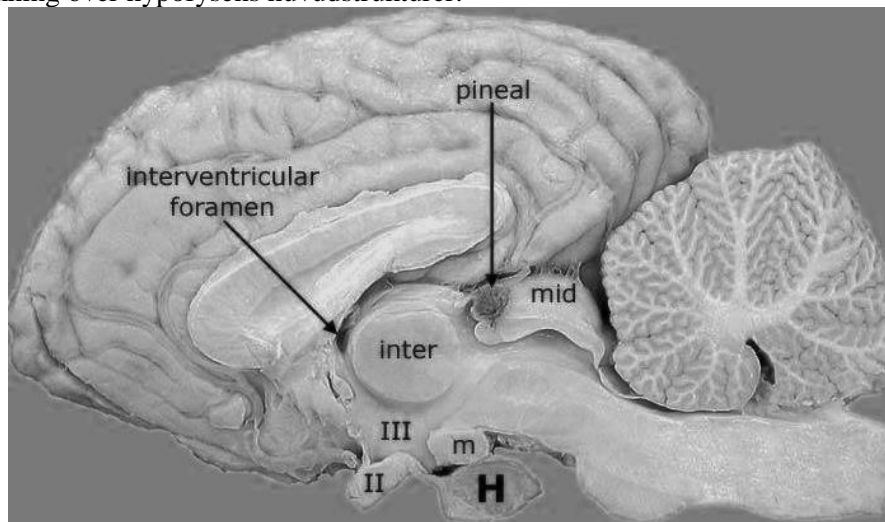
2011). Skillnaden i hämning av PC1 och PC 2 kan förklara varför PPID hästar får ökad produktion av ACTH eftersom PC1 aktiviteten ökar mer än PC 2 aktiviteten i frånvaro av dopamin (McFarlane 2011). Pars tuberalis innehåller även den melanotrofer vilket tyder på att denna del av hypofysen kan ha en fotoperiodisk funktion (Logan & Weatherhead, 1980).

Neurohypofysen består av modifierade gliaceller och axon, vars neuron ligger i hypotalamus (Sjaastad *et al.* 2010), och är ett lagringsorgan för ADH och oxytocin (Schott 2002).

ACTH sekretionen hos hästar varierar under dygnet, den är som högst mot slutet av natten och tidigt på morgonen och som lägst sent på kvällen. Kortisolproduktionen visar samma dygnsrytm. Stress inducerar i sig ökad sekretion av kortisol, vilket får den ACTH inducerade dygnsvariationen i plasmakortisol att bli mindre uttalad eller helt försvinna. Kronisk stress ger kontinuerligt höga plasmakoncentrationer av ACTH vilket ökar binjurebarkens massa. ACTH nivåerna varierar också under året och är som högst under sensommar och höst (McGowan 2005).



Figur 1: Teckning över hypofysens huvudstrukturer.



Figur 2. Hjärnan i genomskäring. H = hypofysen, inter = interthalamic adhesion, III = tredje ventrikeln. Den tredje ventrikeln står i förbindelse med de ventrala ventriklarna genom interventricular foramen. II = chiasma opticum, m = mamillarkropp, pineal = tallkottkörtel, mid = rostral colliculus.

Patofysiologi Cushings syndrom - PPID

PPID är en dopaminerg neurodegenerativ sjukdom som delar patologiska likheter med Parkinsons sjukdom (McFarlane 2007). Syndromet orsakas av hyperplasi, hypertrofi eller adenom i hypofysens pars intermedia, vanligen orsakad av minskad dopaminerg inhibering av pars intermedias melanotrofer, vilket lett till ökad produktion av POMC och POMC-deriverade peptider. Den ökade

mängden POMC leder till hyperplasi, adenombildning och PPID (McGowan 2005). Hästar med PPID kan ha åtta gånger mindre dopamin och dopaminmetaboliter i pars intermedia jämfört med åldersmatchade kontroller (Millington *et al.* 1988). Hästar med PPID har visats sig ha en sexfaldig minskning av dopaminerga nervterminaler i pars intermedia och 50 % minskning av periventrikulära cellkroppar (McFarlane *et al.* 2007). Plasmakoncentrationen av POMC-deriverade peptider sjunker vid administrering av en dopaminagonist (McFarlane 2011).

På hästar med PPID har det förutom ACTH orsakad diffus adrenokortikal hyperplasi, i 44 % av histologiska binjuresektioner från hästar med PPID, visats signifikant mer svullna och vakuoliserade hepatocyter, bronkiolit, mild proliferativ glomerulopati och tendens till myokardiell lipofuscin och fibros (Glover *et al.* 2009). Trots att hästar generellt anses relativt resistent mot steroidinducerad hepatopati, så kan öknings i leverenzymerna och leverförändringarna överensstämmer med de som ses vid steroidinducerad hepatopati återfinnas hos hästar med PPID. Även bronkointerstitiell inflammation har diagnosticerats oftare hos hästar med PPID eventuellt som en konsekvens av en inflammatorisk dysreglering. Alternativt kan orsakssambandet vara det omvända, det vill säga kronisk luftvägsinflammation kan vara en bidragande faktor till utvecklingen av PPID eftersom kronisk inflammation och oxidativ stress har associerats med neurodegeneration i ett antal olika sjukdomar såsom Parkinsons sjukdom och Alzheimers sjukdom. Den milda proliferativ glomerulopati som kan ses hos hästar med PPID kan vara ett resultat av en kronisk hyperglykemi. Man tror att hyperglykemiinducerad oxidativ stress kan aktivera inflammatoriska mediatorer, vilket i sin tur leder till renal vävnadsskada. Skador av fria radikaler, lipid peroxidation och vävnadsskada i hjärtan från hästar med PPID kan tyda på att exponering för systemisk oxidativ stress sker vid PPID. Trots att tecken på oxidativ skada har setts i hypofysen hos hästar med PPID, så har man inte lyckats påvisa systemisk oxidativ stress hos hästar med PPID (Glover *et al.* 2009). Den enda indikatorn på systemisk oxidativ stress som har setts hos hästar med PPID är en mild minskning av plasma thiol-nivåer (McFarlane 2011). Det övergripande patologimönstret kan ses som skador orsakade av inflammation och oxidativ stress. De höga plasmakoncentrationerna av antiinflammatoriska hormoner hos hästar med PPID indikerar att dessa förändringar är associerade med utvecklingen av PPID snarare än att vara ett resultat av sjukdomen (Glover *et al.*, 2009).

Ökad mängd av lipofuscinpigment har setts, i pars nervosa och i de bindvävssepta som separerar kluster av melanotrofer, hos hästar med PPID. I detta område finns de hypotalmatiska periventrikulära dopaminerga neuronerna som innerverar pars intermedia. Lipofuscin kan ses som en markör för skada uppkommen av exempelvis oxidativ stress. En ackumulering, om än inte signifikant sådan, av den oxidativa stressmarkören 3-nitrotyrosine har påvisats i hypofysen hos hästar med PPID (Glover *et al.* 2009). Pigmentet har setts ackumuleras i neuron hos individer med neurodegenerativa sjukdomar (Riga *et al.* 2006).

Symptom PPID

PPID har ett brett symptompektra, varav hirsutism är vanligast följt av, trötthet, muskelförtvining/viktminskning och kronisk fång. Onormal fettansättning, hyperhidros, polyuri/polydipsi, reproduktionsstörningar, ökad mottaglighet för infektioner, försämrad sårhäkning, kramper, pseudolaktation, och beteendeförändringar förekommer också. Många drabbade hästar avlivas på grund av fång men alla hästar med PPID utvecklar inte fång (McCue 2002; McGowan 2005). Symptomen beror till största delen på hyperadrenocorticism och klinisk förbättring kan ses vid användning av kortisolinhämmare (McGowan & Neiger, 2003). Ökning av plasmakoncentrationerna av POMC-deriverade peptider samt tryck på hypotalamus och/eller synnerligen tros även ligga bakom en del av symptomen (McGowan 2005; McFarlane 2007). Men, kopplingen mellan de olika kliniska symptomen och patofysiologin hos PPID är fortfarande under utredning (McGowan & Neiger 2003).

Uttalad hirsutism anses patognomont för PPID och utvecklas successivt efter initieringen av sjukdomsförloppet. Tidiga förändringar kan omfatta utveckling av områden med långa hår, ofta längs benen eller under mandibula och en tendens till att vinterpälsen kommer tidigare och faller senare än normalt alternativt inte faller helt och att hårremmen blir ljusare (McCue, 2002; McFarlane, 2011). Orsaken till hirsutism är okänd men ökad produktion av testosteron alternativt kronisk ökning av α -MSH peptider som påverkar hudceller, inklusive melanocyter har framförts som möjliga orsaker

(Schott 2002). Hyperhidros kan bero på att hirsutismen hämmar värmeavgivning (McCue 2002), ett direkt resultat av ökade POMC-peptider (Schott 2002) eller ett resultat av fysiskt tryck på värmeregleringscentrum i hypotalamus (McCue 2002). Muskelatrofi/sarcopeni drabbar främst epaxial- och glutealmuskulaturen men dylik atrofi kan även ses hos åldrade friska individer. Histologiskt påvisade muskelförändringar hos hästar med PPID är atrofi av typ 2 fibrer, sarkoplasmatisk fettackumulering, ökad myofiberstorlek och subsarkolemmal ackumulering av svullna mitokondrier. Dessa fynd överensstämmer med bilden vid glukokortikoidöverskott hos andra arter, men andra hormonförändringar som insulinresistens och kronisk inflammation kan också orsaka sarcopeni (McFarlane 2011). Proteinkatabolism orsakad av ökad kortisolaktivitet leder också till förlust av muskelmassa (Schott 2002). Vid studier av olika muskelgrupper, med hjälp av elektromyografi så kunde inte någon statistisk skillnad ses mellan PPID-hästar och kontrollgrupp. Däremot hade hästar med PPID en högre procent av Typ 1 fibrer än kontrollgruppen och en lägre procent av Typ 2B fibrer. Dessutom var typ 2A och typ 2B fibrernas tvärsnittsarea signifikant mindre i glutealmuskulaturen hos hästar med PPID (Aleman *et al.*, 2006). Onormal fett分布 ses hos 15-30 % av hästar med PPID och då ofta längs nackkammen, kring svansroten, runt juver eller som supraorbitala fettkuddar. Det är oklart om fettdeposition sker som ett resultat av PPID eller om fettackumulering predisponerar för utveckling av PPID. Fetma och insulinresistens orsakar kronisk inflammation och försämrad mitokondriefunktion vilket kan resultera i en oxidativ stress som i sin tur kan ha en roll i utvecklingen av PPID (McFarlane 2011).

Diagnostisering PPID

Kliniskt ställs diagnosen PPID ofta på sjukdomshistoria och kliniska tecken, men det kan vara vanskligt under vinterhalvåret eller när hästar blivit klippta (McCue 2002; McGowan 2005). ”Gold standard” för diagnosticering av PPID är post mortem undersökning av hypofysen, så möjligheten att jämföra blodprovstester med gold standard är begränsad (McGowan 2005). Om man testar för PPID på hösten så är risken för falskt positiva testresultat stor oavsett vilken av metoderna nedan som används, speciellt om inte referensramarna är anpassade efter säsong, dessutom är det vanligt med falskt negativa resultat tidigt i sjukdomsförloppet (McFarlane 2011). Smärta, stress och andra sjukdomar kan också påverka provresultat. För närvarande så vet vi alldeles för lite för att avgöra vilken diagnostisk metod som är den bästa i olika steg i sjukdomsförloppet (McFarlane, 2011).

Endogen plasma ACTH koncentration eller α -MSH koncentration

Mätning av plasma ACTH koncentrationen är en ganska känslig metod (> 90 procent), fast testets specificitet är inte helt klarlagd. Nackdelen med ACTH är att hormonet ACTH absorberas av glas samt är labilt och separation och kylning inom tre timmar efter provtagning är att föredra. Blod samlas lämpligen i EDTA Vacutainer-rör, och efter centrifugering separeras plasman och kyls/frysas så fort som möjligt. Notera alltid hur länge provet varit okyld och när det kyldes. Tillförlitligheten hos en enda mätning av ACTH-koncentration har ifrågasatts och variation i vilo- ACTH koncentration har rapporterats förekomma när dubbla prover har samlats från hästar med några minuters mellanrum. Dubbla mätningar av ACTH-koncentration har dock inte visat någon fördel över en enda mätning. Varken ålder, ras eller kroppstyp tros påverka ACTH-koncentration hos friska hästar (Rendle *et al.*, 2015). Plasma – ACTH skall normalt ligga < 60 ng/l emedan cushingshästar ofta har värden > 100 ng/l) (McGowan, 2005).

Blodglukoskoncentration

Hästar med PPID har en hög risk att utveckla sekundär insulinresistens och hyperglykemi, men drabbar inte i alla fall av PPID, (McGowan, 2005). Man bör dock misstänka PPID om en rutinblodanalys av en äldre häst visar på hyperglykemi (McFarlane, 2011).

Kortisol-/ kreatininkvot i urin

Kvoten är generellt högre hos hästar med PPID, men har en låg sensitivitet och specificitet, så det rekommenderas inte för diagnosticering (McGowan, 2005).

Insulin

Förhöjda fasteserum-insulinkoncentration kan ses hos ca 60 % av PPID hästar enligt McFarlane (2011) > 90 % enligt McGowan (2005). Testet har dock visat sig ha en låg specificitet och falska

positiva i ponnyer med insulinresistens kan förekomma, särskilt om de är överviktiga (McGowan, 2005).

Kortisol

Basal serumkortisolkoncentrationen har inget diagnostiskt värde för PPID då det kan vara både lågt, normalt eller förhöjt hos hästar med sjukdomen. Några laboratorier har föreslagit mätning av serumkortisolkoncentrationen två gånger under 24 timmar för att avgöra om det föreligger en förlust av dygnsvariation hos hästar med PPID. Trots att en förlust av dygnsrytm är allmänt förekommande hos hästar med PPID, så varierar serum kortisol koncentrationen för mycket över 24 timmar för att skillnaden mellan två prover ska vara av diagnostisk värde (McGowan, 2005). Förlust av dygnsrytmen sker även med stigande ålder och vid andra sjukdomar (McFarlane, 2011).

Dexametasonhämningstest (DT)

Hos en normal häst leder dexametason giva till inhibering av ACTH frisättning från pars distalis och minskad kortisolfrisättning från binjurarna emedan hästar med PPID inte får minskad kortisolfrisättning (McFarlane, 2011). DT påverkas inte av tid på dagen, emellertid är det ofta praktiskt att ta ett 0-prov en eftermiddag, injicera 4mg/100 kg kroppsvikt dexametason och ta ett uppföljande blodprov 16 – 20 timmar senare, det vill säga på förmiddagen nästa dag. Nollprovet bör vara < 320 nml/l och uppföljningsprovet < 45 nmol/l. DT har den högsta sensitiviteten och specificitet för diagnos av PPID (McGowan, 2005). Vissa veterinärer och hästägare är oroliga över möjligheten att dexametason givan skall utlösa ett fånganfall. Inga negativa effekter har rapporterats efter tillförsel av dexametason till över 121 hästar (No *et al.* 1994). Dosen som ges är låg, mindre än en halv terapeutisk dos och ges endast en gång så riskerna med dexametasonhämningstest får anses minimala och fördelarna uppväger riskerna. Borer-Weir *et al.* (2013) utförde dexametasonhämningstest, på 7 normala ponnyer och 5 som tidigare haft fång under flera år, under olika årstider. De visade signifikanta skillnader mellan grupperna i insulin och kortisol koncentration post dexametason under vissa årstider, men inte alla år. Studiens konklusion var att den stora individuella variationen i respons begränsar användbarhet av ett dexametasonhämningstest för att förutsäga känslighet hos en individ att utveckla fång.

ACTH-stimulering

Administrering av ACTH resulterar i frisättning av kortisol från binjuren. Omfattningen av kortisolresponsen korrelerar till binjurens storlek. Därför ger en likvärdig dos ACTH större kortisolrespons i djur med hyperadrenocorticism än i normala djur. Detta test har utvärderats i 3 små studier som använde postmortemexaminering som golden standard. Testet hade 75 % sensitivitet i 2 av studierna, medan den tredje studien inte fann någon skillnad i ACTH-stimulerad kortisolrespons mellan PPID hästar och friska. Binjurehyperplasi ses endast i 20-30 % av hästar med PPID (McFarlane, 2011).

Tyrotropinfrisättande hormon (TRH) stimuleringstest

Blodprov tas och 1 mg TRH administreras intravenöst, ett andra blodprov samlas upp 30 minuter senare. Normala hästar visar ingen signifikant ökning av kortisolkoncentrationen, medan kortisolnivåer kan öka med 30-50 % hos hästar med PPID (McCue, 2002). Testet anses ha låg sensitivitet och specificitet, med falska positiva, särskilt hos hästar med initialt förhöjda plasma kortisolkoncentrationer eller hästar som är påverkade av andra sjukdomar (McGowan, 2005).

Mätning av ACTH-koncentration efter injektion av TRH har visats ha större diagnostisk noggrannhet än mätning av vilo - ACTH- koncentration. När en mätning av ACTH inte anses tillräcklig för diagnos av PPID, så skulle TRH-stimulering vara ett alternativ till att få ett medelvärde av ACTH-koncentration. Användningen av TRH till häst är inte licensierad och dessutom dyr (Rendle *et al.*, 2015).

Kombinerat DT/TRH- test

Den kombinerade DT och TRH-stimuleringstestet utvecklades i ett försök att öka sensitiviteten av TRH-stimulering genom att sänka kortisolnivåerna hos hästar med PPID till liknande nivå som friska hästar genom användning av dexametason före administrationen av TRH. Detta görs för att

hämna ACTH-insöndringen från pars distalis. Kortisolnivåerna mäts 30 minuter före och 30 minuter efter TRH-givan och 22-24 timmar efter dexametasoninjektionen. Hästar med PPID visar en ökning av plasmakortisolkoncentration som svar på TRH. Efter 24h har plasmakortisolkoncentrationen hos hästarna med PPID återgått till de normala, medan de hos de friska hästarna fortfarande är låga. Testet är lättare att tolka i stället för enbart DT, även om det inte är så stor skillnad i sensitivitet och specificitet. Nackdelen är att det tar lägre tid och kostar mer (McGowan, 2005).

Röntgen, CT och MRI

Man har lyckats dokumentera en förstoring av hypofysen hos häst genom ventro-dorsal röntgen och CT, men sensitivitet och specificitet har inte utvärderats på något större material. Metoden förväntas inte uppnå 100 %, då endast 68 % av hästarna hade rejält förstörade hypofyser (Schott, 2002). Risken och kostnaden med anestesi och undersökning är idag större än nyttan med erhållen information. Dessa metoder kan dock bli ett mer effektivt verktyg i framtiden, om operation blir ett alternativ.

Sekundära eller parallella sjukdomsproblem vid PPID

Typ 2-diabetes mellitus (icke-insulinberoende), har rapporterats förekomma hos 38 % av PPID hästar, kännetecknas av förhöjda plasma-glukos och insulin koncentrationer, hög insulinresistens och minskad utsöndring av insulin som svar på snabb intravenös administrering av glukos (Mc & J, 1986).

Hästar med PPID kan bli letargiska och har en minskad respons till smärtsamma stimuli som en följd av ökade nivåer av β -endorfiner (McCue 2002). Polydipsi kan ses hos ca 30 % av hästar med PPID (McFarlane 2011) och kan orsakas av faktorer som ökad vattenförlust till följd av hyperhidros, förlust av ADH-produktion pga. kompression av pars nervosa, osmotisk diures till följd av hyperglykemi och glukosuri, och ökad glomerulär filtrationshastighet samt en central stimulering av törst som en följd av ökade kortisolnivåer (McCue 2002).

Reproduktionsstörningar som rapporterats hos ston med PPID inkluderar onormal brunstaktivitet, brunst suppression, och fertilitetsproblem. Potentiell(a) orsak(er) till reproduktionsstörningarna hos ston med PPID kan vara gonadotrof atrofi i adenohipofysen på grund av kompression eller undertryckande av gonadotropinsekretion som ett resultat av förhöjda halter av glukokortikoider eller androgener producerade av binjurebarken (Garcia & beech 1986).

Hästar med PPID kan uppvisa kroniska infektioner i form av sinuit, pneumoni, parodontit och abscesser och de verkar mer mottagliga för endoparasiter (McCue 2002). De drabbas också oftare av subkliniska infektioner på grund av att förhöjd blodkoncentration av flera immunosuppressiva hormoner, exempelvis kortisol (McFarlane 2011). De löper också en ökad risk att utveckla fång men de kliniska symtomen på smärta kan ibland vara mindre, möjligen på grund av förhöjd smärttolerans sekundärt till ökad β -endorfinkoncentration.

Glukokortikoider/insulin vs. Fång

Hovkapselns vägg består av 3 lager: stratum externum, stratum medium och stratum internum. Stratum internum är den epidermala delen av lamellagret och utgörs av förhornade primära lameller som i sin tur utlinjeras av levande celler arrangerade i och mellan sekundära lameller. Dessa levande celler kan med hjälp av sin förankring, utåt i den förhornade delen av kapseln och inåt i lamelläderhuden, bära hela hästens vikt. Hoven utsätts för stora krafter både i vila och vid arbete och hovens levande celler behöver en kontinuerlig energiförsörjning för att upprätthålla sin funktion och sambandet mellan kött hov och hornkapsel. Glukos är den viktigaste energikällan för kroppens celler. Hovens vävnader kan inte lagra socker i form av glykogen, utan tar upp glukos via insulinberoende glukotransportprotein 1 (GLUT1) och upptaget styrs av antalet GLUT1 proteiner i cellmembran och hästens aktuella blodglukosnivå. Hovarna har i vila en glukoskonsumtion som överskrider den i hästens huvud (Wattle & Pollitt, 2004). Odlade keratinocyter kräver relativt höga koncentrationer av glukos i mediet för att inte tappa strukturen (French *et al.*, 2000). Utan glukos började de epidermala och dermala lamellerna att separera, dvs. in vitro fång. Dessa observationer har lett till teorier om att fång kan uppkomma då keratinocyterna i hoven inte får tillgång till för lite alternativt för mycket glukos. (Johnson *et al.* 2004; Wattle & Politt, 2004).

Vid fång har lamellagrets mekaniska egenskaper försämrats i en sådan omfattning att vävnaden inte ens klarar av hästens vikt fördelad på 4 ben i vila. Följden av försvagningen blir att kötthovens lameller slits isär från hornkapselns dito (figur 3).



Figur 3. I fånghoven har lamellagret tänjts ut och hovbenet har ökat sitt avstånd till tådelens hornkapsel längs hela sin utsträckning = hovbenssänkning. Hovbenets dorsala yta är inte längre parallell med dorsala hovväggen = hovbensrotation.

Endokrinopati och förhöjda seruminsulinkoncentrationer anses predisponera för fång. Man kan till och med framkalla fång med höga seruminsulinkoncentrationer (Keen *et al.* 2013). Störd metabolism och aktivering av proinflammatoriska cytokiner och matrix metalloproteinaser (MMPs) är troliga orsaker till den försvagning och därefter nedbrytning av lamellagret och dess basalmembran som ses vid fång (Wattle & Pollitt 2004; Johnson *et al.* 2004).

Hästar med PPID och/ eller equint metaboliskt syndrom (EMS) har ökad risk för förhöjda koncentrationer av endogent kortisol och insulinresistens. Kortison påverkar blodnivåerna av glukos och insulin och båda dessa ämnen har visat sig kunna påverka kärlreaktivitet. Administrering av höga koncentrationer av insulin (1000 μ IU/ml) inducerade akut fång i ponnyer och hästar och intravenös infusion av höga koncentrationer av glukos kan framkalla histopatologiska förändringar i lamellagret som liknar de som ses vid fång. Effekterna av kortisol och insulin på in vitro-kontraktilitet hos isolerade små vener från lamelläderhuden från friska hästar har undersökts med tråd myography (Keen *et al.*, 2013). I närvaro av kortisol ökade det maximala kontraktilitetssvaret hos de laminära venerna till vasokonstriktorerna NA och 5-HT emedan ET-1 minskade den maximala kontraktionen. Insulin minskade PE och ET-1 kontraktilitets effekt. Resultaten indikerar att hormoner som är involverade i kontrollen av glykemisk status har effekt på laminära veners svar på vasoaktiva medel, vilket kan tänkas bidra till den ökade risk för fång som ses vid insulinresistens och glukokortikoid behandling (Keen *et al.* 2013). Glukokortikoider påverkar också proliferation och differentiering hos keratinocyter och fibroblaster, med förtunning av epidermis, minskad kollagensyntes och ett försvagat strukturellt stödjande matrix som resultat, vilket i sig kan leda till hudatrofi och försämrad sårhäkning. Exponering av förhöjda glukokortikoidkoncentrationer med resulterande försvagning i dermal och epidermal gränsyta har framförts som en möjlig patogenes för fång hos hästar med PPID och/eller EMS (Cornelisse & Robinson, 2013). Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) är en viktig komponent i hudstrukturernas sårhjälningsprocess. Det har föreslagits att en lokalt ökad kortisolnivå i lamellagret skulle kunna leda till en försvagning av lamellagrets bärighet samt hämma IGF-1 och försämma läkning vid ett fånganfall. (Johnson *et al.* 2004). Lokal vävnadskoncentration av kortisol bestäms av nettobalansen av aktiviteten hos två isoformer av enzymet 11 β -hydroxysteroid hydrogenas (11 β -HSD). Det verkar även som att nettobalansen av dessa gynnar en förlängd vävnadsaktivitet av dexametason och triamcinolone-acetonid. Överuttryck av 11 β -HSD-1 i fettväv verkar spela en viktig etiologisk roll i metaboliskt syndrom, insulinresistens och hyperglykemi (Cornelisse & Robinson 2013). Preliminära data säger att vävnadsspecifik variation i 11 β -hydroxysteroid dehydrogenas aktivitet sker i nackens fettvävnad hos hästar med EMS som drabbats av akut fång (McFarlane 2011). Förändringar av 11 β -HSD aktivitet i hud/hudapendix kan eventuellt spela en roll vid utvecklandet av fång. Kortisol-regenererande aktivitet hos 11 β -HSD-1 är ökad i lamellagret hos fånghästar (Johnson *et al.* 2004).

Kunskapen om sambandet mellan kortisonbehandling och fångutveckling är knapp och man bör iaktta försiktighet vid kortisonbehandling av överviktiga och/eller insulinresistenta hästar. Fall där kortisonbehandling kopplats till fånganfall omfattar ofta lite äldre hästar med mer generella problem som recurrent airway obstruction (RAO) och som dessutom kan ha haft PPID eller EMS (Cornelisse & Robinson 2013). Tillförsel av kortison påverkar som nämnts glukosomsättningen hos häst. Efter en dos av dexametason ses efter 2 timmar och därefter under ytterligare något dygn en måttlig insulinresistens men efter 72 timmar ses en mer normal insulinkänslighet (Haffner *et al.* 2009). Dexametasonbehandling under 21-dagar ger en signifikant insulinresistens vid behandlingens slut (Tiley *et al.* 2007). Ökade kortisolnivåer ökar också de kärlsammandragande effekterna av katekolaminer via kärlets α -adrenoreceptorer. Intravenös giva av dexametason i 6 dagar potentierte den vasokonstriktiva effekten av fenylefrin and endothelin-1 (ET-1) på kutana kärl i hästben (Keen *et al.* 2013). Insulinresistens kan minska endotelcellers produktion av vasodilatatorn kväveoxid (NO), vilket teoretiskt skulle kunna leda till minskat blodflöde genom hoven (Cornelisse & Robinson, 2013) och därmed förändrad glukostillgång för lamellagrets epidermala basalceller.

Glukokortikoider och fetma

Hos människa stimulerar glukokortikoider stimulerar differentieringen av preadiopocyter till företrädesvis intraabdominala adiopocyter. Intraabdominala adiopocyter producerar hormoner såsom resistin och leptin snabbare än subkutana adiopocyter, vilket bidrar till insulinresistens. Dessutom anses 11 β -hydroxysteroid dehydrogenas typ 1 (11 β HSD1) i intraabdominala adiopocyter öka den vävnadsspecifika kortisol koncentrationen signifikant mer än i adiopocyter på andra ställen (Johnson *et al.*, 2004). Ökad frisättning av fria fettsyror från intraabdominalt fett bidrar också till utvecklingen av insulinresistens (Johnson *et al.* 2002).

Gaffelbandsdegeneration

Degenerativa förändringar i gaffelbanden är vanliga hos hästar med PPID (Hofberger *et al.*, 2015) och kan resultera i björnfot, extension av kotled, (Halper *et al.*, 2006) och kan förknippas med långvarig exponering för intermittent höga kortisolnivåer även om kortisolhalterna inte är konstant förhöjda hos hästar med PPID (Tadros & Frank, 2013). Hos hästar med PPID sågs minskade longitudinella arrangemang av kollagenfibrer i SLs tillsammans med inslag av brosk, extracellulär matrix och blödningar samt betydande proteoglykanansamlingar mellan SL fibrerna. Förändringarna, försämrade arrangemang av kollagenfibrer, blödningar och broskinslag, liknar de som ses vid degenerative suspensory ligament desmitis (DSLSD) som beskrivits i flera raser och hos människor med hälseneruptur och Cushings sjukdom där kortikosteroid behandling anses vara en riskfaktor på grund av en minskning i draghållfasthet (Halper *et al.* 2006).

Behandling

Det finns bara en typ av läkemedel som är registrerat i Sverige för att behandla PPID och det är typ 2 dopaminreceptoragonisten Prascend (Pergolid) som nedreglerar POMC peptidproduktionen. Dosen varierar från 0,5 till 2,0 mg/dag. En initial dos på 0,001 mg/kg/d (0,5 mg/d för en 500-kg häst) rekommenderas. Behandlingssvaret bör utvärderas med hjälp av ny endokrin test inom 4 till 8 veckor. Om ingen förbättring observeras, kan dosen ökas med 0,25 mg/d var 3:e till 4:e dag tills de diagnostiska testresultaten återgår till det normala. När en effektiv dos är etablerad, så får hästen stå på den för livet. Då en klinisk förbättring ofta kan ses mycket snabbare än en normalisering av blodglukosnivåer och insulinkänslighet kan det vara klokt att följa upp även en stabil häst med endokrina tester 1 – 2 gånger per år (Schott, 2002). Klinisk förbättring, såsom pälsfällning, brukar noteras inom 2 – 3 månader. Pergolid ersätter underskottet av dopamin i pars intermedia, men binder inte till typ 1 dopamin receptorer som finns i det vaskulära epitelet. Följaktligen kan pergolid användas till PPID hästar med fång (McCue, 2002).

Behandling med pergolid leder alltså till förbättring av både kliniska tecken och biokemiska abnormiteter förknippade med sjukdomen (McFarlane 2007; 2011). Hos äldre hästar med obehandlad PPID leder tänders överörlighet till en risk för parodontit varför tandvården är viktig. Likaså är god hovvård, behandling av eventuellt fånganfall, sekundära infektioner inklusive parasitism, klippning och kost viktigt. Hos hästar med insulinresistens ska lättlösliga kolhydrater undvikas, men

insulinresistenta hästar med PPID har ofta även muskelförlust som komplicerar deras näringsbehov (McFarlane 2011).

DISKUSSION

PPID anses vara en spontan dopaminerg neurodegenerativ sjukdom som har vissa patologiska likheter med Parkinsons sjukdom. Det finns fördelar med en hästmodell i avseende att studera neurodegenerativ sjukdom hos människa: Den höga förekomsten av PPID i hästpopulationen, likheten i dopaminerg neurodegeneration mellan Parkinsons sjukdom och PPID. Lättheten att identifiera drabbade hästar, tillgången på avelsinformation och stamtavlor för genetisk analys. Tillgången till många sjuka djur och äldre, friska kontrollhästar, viljan av ägarna att registrera sina djur i studier. Även tillgången till *in vivo* och post-mortem prov gör hästen lämplig som modelldjur. Hästens myckna vistelse i utemiljö och den åtföljande exponeringen för miljöföroreningar samt dess intag av både grund- och ytvatten bidrar också därtill. Så, med hästen som modelldjur har man teoretiskt en bra möjlighet att utvärdera miljöns inverkan på neurodegenerativa sjukdomar (McFarlane, 2007).

Många anser att PPID har en väldigt hög prevalens i hästpopulationen, hur hög är dock svårt att avgöra i dagsläget (McFarlane 2011). De diagnostiska metoderna är inte felfria och hästar riskerar att diagnosticeras falskt positiva under hösten, vilket kan bidra till de höga prevalenssiffrorna som ses i vissa fall (McGowan, 2005; McFarlane 2011). Att 30 % av alla hästar över 15 år (McFarlane 2011) ska lida av PPID anser Wattle vara en för hög siffra baserat på klinisk erfarenhet av svenska hästar. I Queensland, Australien, är motsvarande siffra 21 % (McGowan *et al.* 2013). De diagnostiska metoderna bör vidareutvecklas för en säkrare diagnosticering. Det finns de som hoppas på att operation av hypofysen ska bli ett framtida alternativ, då detta i teorin helt skulle kunna bota drabbade hästar. Kirurgi kommer med största sannolikhet inte bli ett alternativ i Skandinaviska länder då ett sådant ingrepp skulle bli både ekonomiskt och medicinskt samt därigenom etiskt svårt att försvara (enligt handledaren).

Det övergripande patologimönstret som kan ses utöver hypofysförändringar tros orsakas av inflammation och oxidativ stress, trots att man varken lyckats påvisa systemisk oxidativ stress hos hästar med PPID (Glover *et al.* 2009) eller ökad sådan hos äldre hästar. De höga plasmakoncentrationerna av antiinflammatoriska hormoner hos hästar med PPID indikerar att dessa förändringar är associerade med utvecklingen av PPID snarare än att vara ett resultat av sjukdomen (Glover *et al.*, 2009). Att symptompektrat är så brett tyder också på en spridd sjukdomspåverkan och utvecklingen av patologiska förändringar i multipla vävnader bör utredas närmare.

Två tredjedelar av alla hästar som drabbas av fång är ston (enligt svenska försäkringsbolags ersättningsstatistik), vilket skapar tankar kring huruvida samma könsfördelning kan råda hos hästar med PPID. Det finns dock inga större studier som bekräftar en könspredisponering och i nuläget anser man att varken köns- eller raspredisponering råder (McCue 2002; Schott 2002). Fång ses relativt ofta tillsammans med PPID. Om fång är en följd av PPID eller om sjukdomen av annan orsak lättare drabbar hästar med PPID är inte klarlagt. Hästar med PPID och/ eller equint metabolt syndrom (EMS) har ökad risk för förhöjda koncentrationer av endogent kortisol och insulinresistens, vilka är kända faktorer vid fång (Cornelisse & Robinson 2013). Då hästar med PPID och EMS ofta är överviktiga så skulle man även kunna tänka sig att den ökade risken kan bero på att deras bärande vävnader är dålig form till följd av inaktivitet. I teorin skulle fysisk aktivering av PPID hästar således minska fångrisken genom både metabola och belastningsmässiga förbättringar i de vävnader som hör till rörelseapparaten.

I frågan om exogent tillfört kortison kan påverka fångpatogenesisen finns inga klara samband redovisade och slutsatsen blir att man bör tillämpa försiktighet vid kortisonbehandling av överviktiga och/eller insulinresistenta hästar (Cornelisse & Robinson 2013).

Enligt karenslistan under svensk travsport respektive svenska ridsportförbunden så får hästar under pågående behandling med Prascend inte delta i tävlingssammanhang. Då alternativa behandlingsmetoder med godkända preparat saknas så kan detta utgöra ett problem och då framförallt inom ridsporten eftersom det där inte finns någon övre åldersgräns för deltagande i tävlingssammanhang.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Aleman, M., Watson, J. L., Williams, D. C., LeCouteur, R. A., Nieto, J. E. & Shelton, G. D. (2006). Myopathy in horses with pituitary pars intermedia dysfunction (Cushing's disease). *Neuromuscular Disorders* [online], 16(11), pp 737–744. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960896606004640>. [Accessed 2015-03-17].
- Borer-Weir, K. E., Menzies-Gow, N. J., Bailey, S. R., Harris, P. A. & Elliott, J. (2013). Seasonal and annual influence on insulin and cortisol results from overnight dexamethasone suppression tests in normal ponies and ponies predisposed to laminitis. *Equine Veterinary Journal* [online], 45(6), pp 688–693. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/evj.12053/abstract>. [Accessed 2015-03-17].
- Catherine M. McGowan (2005). Diagnosis and treatment of equine Cushing's syndrome. *The veterinarian*.
- Cornelisse, C. J. & Robinson, N. E. (2013). Glucocorticoid therapy and the risk of equine laminitis. *Equine Veterinary Education* [online], 25(1), pp 39–46. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2042-3292.2011.00320.x/abstract>. [Accessed 2015-03-17].
- Frank, N., Andrews, F. M., Sommardahl, C. S., Eiler, H., Rohrbach, B. W. & Donnell, R. L. (2006). Evaluation of the Combined Dexamethasone Suppression/Thyrotropin-Releasing Hormone Stimulation Test for Detection of Pars Intermedia Pituitary Adenomas in Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* [online], 20(4), pp 987–993. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2006.tb01816.x/abstract>. [Accessed 2015-03-23].
- French, K., Pollitt, C. C. & Pass, M. A. (2000). Pharmacokinetics and metabolic effects of triamcinolone acetonide and their possible relationships to glucocorticoid-induced laminitis in horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* [online], 23(5), pp 287–292. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2885.2000.00288.x/abstract>. [Accessed 2015-03-17].
- Glover, C. M., Miller, L. M., Dybdal, N. O., Lopez, A., Duckett, W. M. & McFarlane, D. (2009). Extrapituitary and Pituitary Pathological Findings in Horses with Pituitary Pars Intermedia Dysfunction: A Retrospective Study. *Journal of Equine Veterinary Science* [online], 29(3), pp 146–153. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080609000173>. [Accessed 2015-03-17].
- Haffner, J. C., Eiler, H., Hoffman, R. M., Fecteau, K. A. & Oliver, J. W. (2009). Effect of a single dose of dexamethasone on glucose homeostasis in healthy horses by using the combined intravenous glucose and insulin test. *Journal of animal science* [online]. Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301581591>. [Accessed 2015-03-17].
- Halper, J., Kim, B., Khan, A., Yoon, J. H. & Mueller, P. E. (2006). Degenerative suspensory ligament desmitis as a systemic disorder characterized by proteoglycan accumulation. *BMC Veterinary Research* [online], 2(1), p 12. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/2/12/abstract>. [Accessed 2015-03-25].
- Hofberger, S., Gauff, F. & Licka, T. Suspensory ligament degeneration associated with pituitary pars intermedia dysfunction in horses. *The Veterinary Journal* [online]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023315000040>. [Accessed 2015-03-17].

- Johnson, P. J., Messer, N. T., Slight, S. H., Wiedmeyer, C., Buff, P. & Ganjam, V. K. (2004). Endocrinopathic laminitis in the horse. *Clinical Techniques in Equine Practice* [online], 3(1), pp 45–56. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534751604000307>. [Accessed 2015-03-17].
- Johnson, P. J., Slight, S. H., Ganjam, V. K. & Kreeger, J. M. (2002). Glucocorticoids and laminitis in the horse. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* [online], 18(2), pp 219–236. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749073902000159>. [Accessed 2015-03-17].
- Keen, J. A., McGorum, B. C., Hillier, C. & Nally, J. E. (2013). Short-term incubation of equine laminar veins with cortisol and insulin alters contractility in vitro: possible implications for the pathogenesis of equine laminitis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* [online], 36(4), pp 382–388. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2885.2012.01429.x/abstract>. [Accessed 2015-03-17].
- Logan, A. & Weatherhead, B. (1980). Photoperiodic Dependence of Seasonal Changes in Pituitary Content of Melanocyte-Stimulating Hormone. *Neuroendocrinology* [online], 30(5), pp 309–312. Available from: <http://www.karger.com/doi/10.1159/000123019>. [Accessed 2015-04-08].
- McCue, P. M. (2002). Equine Cushing's disease. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* [online], 18(3), pp 533–543. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S074907390200038X>. [Accessed 2015-03-17].
- McFarlane, D. (2007). Advantages and limitations of the equine disease, pituitary pars intermedia dysfunction as a model of spontaneous dopaminergic neurodegenerative disease. *Ageing Research Reviews* [online], 6(1), pp 54–63. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568163707000037>. [Accessed 2015-03-17].
- McFarlane, D. (2011). Equine Pituitary Pars Intermedia Dysfunction. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* [online], 27(1), pp 93–113. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749073910001185>. [Accessed 2015-03-17].
- Mc, G. & J, B. (1986). Equine intravenous glucose tolerance test: glucose and insulin responses of healthy horses fed grain or hay and of horses with pituitary adenoma. *American journal of veterinary research* [online], 47(3), pp 570–572. Available from: <http://europepmc.org/abstract/med/3516026>. [Accessed 2015-03-19].
- McGOWAN, C. M. & Neiger, R. (2003). Efficacy of trilostane for the treatment of equine Cushing's syndrome. *Equine Veterinary Journal* [online], 35(4), pp 414–418. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2746/042516403776014271/abstract>. [Accessed 2015-03-23].
- Millington, W. R., Dybdal, N. O., Dawson, R., Manzini, C. & Mueller, G. P. (1988). Equine Cushing's Disease: Differential Regulation of β -Endorphin Processing in Tumors of the Intermediate Pituitary. *Endocrinology* [online], 123(3), pp 1598–1604. Available from: <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/endo-123-3-1598>. [Accessed 2015-03-22].
- No, D., Km, H., Je, M., Dh, G., Pc, K. & Gh, S. (1994). Diagnostic testing for pituitary pars intermedia dysfunction in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association* [online], 204(4), pp 627–632. Available from: <http://europepmc.org/abstract/med/8163420>. [Accessed 2015-04-08].
- Rendle, D. i., Duz, M., Beech, J., Parkin, T. & Durham, A. e. (2015). Investigation of Single and Paired Measurements of Adrenocorticotrophic Hormone for the Diagnosis of Pituitary Pars Intermedia Dysfunction in Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* [online], 29(1), pp 355–361. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jvim.12489/abstract>. [Accessed 2015-03-17].
- Riga, D., Riga, S., Halalau, F. & Schneider, F. (2006). Brain Lipopigment Accumulation in Normal and Pathological Aging. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online], 1067(1), pp 158–163. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1196/annals.1354.019/abstract>. [Accessed 2015-03-23].

- Saiardi, A. & Borrelli, E. (1998). Absence of Dopaminergic Control on Melanotrophs Leads to Cushing's-Like Syndrome in Mice. *Molecular Endocrinology* [online], 12(8), pp 1133–1139. Available from: <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/mend.12.8.0144>. [Accessed 2015-03-23].
- Schott II, H. C. (2002). Pituitary pars intermedia dysfunction: equine Cushing's disease. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* [online], 18(2), pp 237–270. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749073902000184>. [Accessed 2015-03-17].
- Sjaastad Ö. V., Hove K. & Sand O. 2003. The endocrine system, In *Physiology of domestic animals*. pp. 229, 247. Scandinavian veterinary press, Oslo.
- Tadros, E. M. & Frank, N. (2013). Endocrine disorders and laminitis. *Equine Veterinary Education* [online], 25(3), pp 152–162. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2042-3292.2011.00327.x/abstract>. [Accessed 2015-03-25].
- Tiley, H. A., Geor, R. J. & McCutcheon, L. J. (2007). Effects of dexamethasone on glucose dynamics and insulin sensitivity in healthy horses. *American Journal of Veterinary Research* [online], 68(7), pp 753–759. Available from: <http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/ajvr.68.7.753>. [Accessed 2015-03-17].
- Wattle, O. & Pollitt, C. C. (2004). Lamellar metabolism. *Clinical Techniques in Equine Practice* [online], 3(1), pp 22–33. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534751604000289>. [Accessed 2015-03-17].
- Wilson, M. G., Nicholson, W. E., Holscher, M. A., Sherrell, B. J., Mount, C. D. & Orth, D. N. (1982). Proopiomelanocortin Peptides in Normal Pituitary, Pituitary Tumor, and Plasma of Normal and Cushing's Horses. *Endocrinology* [online], 110(3), pp 941–954. Available from: <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/endo-110-3-941>. [Accessed 2015-03-23].