



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

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

Effekten av en kontinuerlig glukosinfusion på triglyceridmetabolismen hos hästar med varierande grad av insulinkänslighet

Helena Johansson

*Uppsala
2016*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2016:42*

Effekten av en kontinuerlig glukosinfusion på triglyceridmetabolismen hos hästar med varierande grad av insulinkänslighet

The effect of a continuous glucose infusion on the triglyceride metabolism in horses with various degree of insulin sensitivity

Helena Johansson

Handledare: Johan Bröjer, institutionen för kliniska vetenskaper

Biträdande handledare: Sanna Truelsen Lindåse, institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Pia Haubro Andersen, institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0736

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2016

Delnummer i serie: Examensarbete 2016:42

ISSN: 1652-8697

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

Nyckelord: kontinuerlig glukosinfusion, triglyceridmetabolism, insulinresistens, hyperlipidemi

Key words: continuous glucose infusion, triglyceride metabolism, insulin resistance, hyperlipidaemia

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Kritiskt sjuka hästar som utsätts för kraftig fysiologisk stress kan drabbas av negativ energibalans och störningar i glukos- och fettmetabolismen. Fysiologisk stress aktiverar en neuroendokrin respons för att bevara homeostas. Stresshormoner och inflammatoriska cytokiner stimulerar katabolism för att tillgängliggöra lagrad energi och inducerar insulinresistens hos vävnaden. Hos kritiskt sjuka hästar kan den katabola responsen bli allt för kraftig och orsaka komplikationer. Okontrollerad lipolys, med mobilisering av triglycerider från kroppens energireserver, kan orsaka ansamling av lipider i blodet. Tillstånd med patologiskt förhöjda blodfetter kan leda till förfettning av inre organ och följaktligen en svikande organfunktion. Hästar som drabbats av tillstånd med förhöjda blodfetter kan behandlas med en kontinuerlig intravenös infusion med glukos. Glukosinfusionen syftar till att orsaka hyperglykemi som stimulerar endogen insulinfrisättning, vilket hämmar lipolys och stimulerar upptag av lipider från blodet. Det finns dock ingen konsensus kring hur man optimerar parenteral behandling med en kontinuerlig glukosinfusion hos intensivvårdspatienter med störningar i fettmetabolismen p.g.a. avsaknad av basala kunskaper i hur en sådan behandling påverkar det dynamiska systemet av glukos, insulin och fettsyror hos hästar med varierande grad av insulinresistens.

Studien prövar hypotesen att en kontinuerlig infusion med glukos orsakar hyperglykemi vid en konstant plasmaglukoskoncentration, som stimulerar endogen insulinfrisättning från pankreas hos friska hästar och att sådan induktion av hyperinsulinemi medför ett ökat upptag av glukos och fettsyror från blodet. Studien undersöker vilken grad av hyperglykemi som krävs för att inducera en tillräckligt hög endogen insulinfrisättning för att sänka koncentrationen av triglycerider i blodet.

Metoden som användes för att mäta känsligheten för glukos hos pankreas betaceller var en hyperglykemisk clamp. För att undersöka om graden av hyperglykemi har betydelse för den endogena insulinresponsen och eliminationen av lipider från blodet så användes två olika målkoncentrationer för plasmaglukos vid kontinuerlig glukosinfusion. Infusionshastigheten justerades för att nå antingen en lindrig hyperglykemi eller en kraftig hyperglykemi efter det att den hyperglykemiska clampen avslutats. Försöket pågick i 36 timmar. Blodprover togs för analys av glukos, insulin och triglycerider.

Resultatet av studien visar att en kontinuerlig glukosinfusion vid en konstant hyperglykemisk plasmaglukoskoncentration stimulerar endogen insulinfrisättning och elimination av triglycerider från blodcirkulationen. Triglyceriderna sjönk lika mycket oavsett om en lindrig eller en kraftig hyperglykemi användes för att stimulera endogen insulinfrisättning. En lindrig hyperglykemi genererade ett tillräckligt högt endogent insulinsvar för att reducera koncentrationen av triglycerider hos kliniskt friska hästar med olika grad av insulinkänslighet. En mer insulinresistent häst fick en kraftigare insulin- och triglyceridrespons än en mer insulinkänslig individ vid samma plasmaglukoskoncentration. Det indikerar att en mer insulinresistent häst har svårare att reglera triglyceridkoncentrationen i blodet.

SUMMARY

Critically ill horses subjected to severe physiological stress can suffer from negative energy balance and disturbances in glucose and fat metabolism. Physiological stress activates a neuroendocrine response to maintain homeostasis. Stress hormones and inflammatory cytokines stimulates catabolism to make energy stored in tissues available and also induces insulin resistance in tissues. In critically ill horses, this catabolic response can be exaggerated and cause complications. Uncontrolled lipolysis and mobilization of triglycerides from the body's energy reserves, may cause accumulation of lipids in the blood. Conditions with pathologically elevated lipids in the blood can lead to organ lipidosis and consequently organ failure. Horses with dyslipidaemia can be treated with a continuous intravenous glucose infusion. A glucose infusion intended to cause hyperglycaemia stimulates endogenous insulin secretion, inhibiting lipolysis and stimulates absorption of lipids from the blood. However, there is no consensus on how to optimize parenteral treatment with a continuous glucose infusion in critically ill patients with disorders of fat metabolism due to lack of basic knowledge of how such a treatment will affect the dynamic system of glucose, insulin and fatty acids in horses with varying degrees of insulin resistance.

The study tests the hypothesis that a continuous infusion of glucose causing hyperglycaemia at a constant plasma glucose concentration stimulates endogen insulin secretion from the beta cells of pancreas in healthy horses and that such induction of hyperinsulinemia causes an increased uptake of glucose and triglycerides from the blood. The study examines the degree of hyperglycaemia required to induce a sufficiently high endogenous insulin release to reduce the concentration of triglycerides in the blood.

The method used to measure sensitivity to glucose in the pancreatic beta cells was a hyperglycaemic clamp. To investigate whether the degree of hyperglycaemia is of importance for the endogenous insulin response and elimination of lipids from the blood two different target concentrations of plasma glucose was used for the continuous glucose infusion. The infusion rate was adjusted to achieve either a mild hyperglycaemia or a severe hyperglycaemia following the hyperglycaemic clamp. The test lasted 36 hours. Blood samples were taken for analysis of glucose, insulin and triglycerides.

The results of the study show that continuous glucose infusion at constant hyperglycaemic plasma glucose concentration stimulates endogenous insulin secretion and clearance of triglycerides from the blood circulation. There was an equal reduction in the concentration of triglycerides independent of whether a mild or a severe hyperglycaemia was used to stimulate endogenous insulin release. A mild hyperglycaemia generated a high enough endogenous insulin response to reduce the concentration of triglycerides in clinically healthy horses with various degrees of insulin sensitivity. The response in insulin secretion and triglyceride clearance depended on the degree of insulin sensitivity. A more insulin resistant horse had a higher insulin response and triglyceride response than a more insulin sensitive individual at the same plasma glucose concentration. This indicates that the regulation of triglyceride metabolism in horses will be more difficult to control as the degree of insulin sensitivity declines.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Inledning.....	1
Syfte	1
Frågeställning	1
Litteraturöversikt.....	2
Normal glukos- och fettmetabolism.....	2
Metabola störningar hos kritiskt sjuka hästar.....	4
Insulinresistens	4
Hyperlipemi.....	6
Hyperglykemisk clamp	10
Material och metod.....	11
Hästar	11
Studiedesign	11
Hyperglykemisk clamp	12
Kontinuerlig glukosinfusion.....	12
Biokemiska analyser av plasma och serum.....	13
Statistiska analyser och beräkningar	13
Resultat.....	14
Hyperglykemisk clamp	14
Kontinuerlig glukosinfusion.....	15
Diskussion	19
Hyperglykemisk clamp	19
Hyperbort samband	20
Kontinuerlig glukosinfusion.....	21
Sjukdom, stress och inflammation	23
Konklusion	23
Referenser.....	24

FÖRKORTNINGAR

ANCOVA – analysis of covariance
ANOVA – analysis of variance
AUC – arean under kurvan
bw – kroppsvikt
CI – konfidensintervall
EHC – euglykemisk hyperinsulinemisk clamp
EMS – ekvint metabolt syndrom
GLUT – glukotransportmolekyl
HC – hyperglykemisk clamp
HPA-axeln – hypothalamus-pituitary gland-adrenal gland - axis
HSL – hormonkänsligt lipas
IL – interleukin
LPL – lipoprotein lipas
LPS – lipopolysaccharid
NEFA – nonesterified fatty acids
PPID – pituitary pars intermedia dysfunction
SC – space correction
SD – standard deviation
SIRS – systemic inflammatory response syndrome
S-TG – serumtriglycerider
t – tid
TLR – toll-like receptor
TNF – tumor necrosis factor
VFA – volatile fatty acids
VLDL – very low density lipoprotein

INLEDNING

Syfte

Kritiskt sjuka hästar kan drabbas av störningar i fettmetabolismen, som kan leda till att triglycerider ansamlas i blodet. Det är sedan tidigare känt att behandling med en kontinuerlig glukosinfusion skapar hyperglykemi, vilket stimulerar en endogen insulinfrisättning som sänker koncentrationen av triglycerider i blodet (Dunkel & McKenzie, 2003; Durham, 2006). Till författarens vetskap finns i dagsläget inga vetenskapliga studier publicerade som undersöker vilken grad av hyperglykemi som krävs för att inducera en tillräcklig endogen insulinfrisättning i relation till insulinkänsligheten för att reducera koncentrationen av triglycerider i blodet hos hästar. För att kunna optimera behandling av sjuka individer med störningar i fettmetabolismen är det väsentligt att studera glukos-, insulin- och triglyceriddynamiken hos friska hästar.

Syftet med studien är att undersöka effekten på metabolismen av triglycerider över tid vid behandling med kontinuerlig glukosinfusion vid två olika *steady state* koncentrationer av plasmaglukos (7 respektive 10 mmol/l) hos kliniskt friska hästar med olika grad av insulinkänslighet. I förlängningen kan information från studien användas för att optimera behandlingen av kritiskt sjuka hästar med förändringar i fettmetabolismen.

Frågeställning

Hur påverkas triglyceridmetabolismen hos kliniskt friska hästar med olika grad av insulinresistens av en kontinuerlig glukosinfusion?

LITTERATURÖVERSIKT

Normal glukos- och fettmetabolism

Hästar har under evolutionen utvecklat ett digestionssystem som adapterats för att de ska kunna livnära sig på karga beten med näringsfattigt betesgräs. Deras metabolism är anpassad för ett kontinuerligt intag av energifattig föda bestående av icke- strukturella kolhydrater (monosackarider, disackarider och stärkelse) och strukturella kolhydrater (cellulosa, hemicellulosa och lignin) samt mindre mängder av fetter och proteiner (Frank *et al.*, 2010; McKenzie, 2011). I magsäcken och tunntarmen digererar icke-strukturella kolhydrater, fett och protein, vars produkter sedan kan absorberas i tunntarmen (Geor, 2010). Glukos, som når den systemiska cirkulationen, tas upp av celler och förbrukas antingen direkt eller används för lagring av energi (Frank *et al.*, 2010; Suagee *et al.*, 2010). Glukos är substrat för glykogensyntes och kan lagras i levern eller skelettmuskulaturen som glykogen, alternativt användas för *de novo* syntes av triglycerider i fettvävnaden (Frank *et al.*, 2010; Suagee *et al.*, 2010). Hästens naturliga föda innehåller lite fett, men överskott av glukos kan omvandlas till fett via *de novo* lipogenes. Fett används som energi eller lagras som triglycerider i celler (Frank *et al.*, 2010). Strukturella kolhydrater bryts ned till VFA (volatile fatty acids – acetat, butyrat och propionat) i grovtarmen genom microbiell fermentation. Efter absorption till systemiska blodcirkulationen används propionat för glukoneogenes i levern, medan acetat och butyrat används för syntes av fettsyror för lagring som energireserv i fettvävnaden (McKenzie, 2011).

Glukos är en liten, polär och vattenlöslig monosackarid med mycket stor fysiologisk betydelse. Neuroner har ett nutritionellt behov av en kontinuerlig tillförsel av glukos och i dess frånvaro så dör de. Homeostatisk reglering av glukoskoncentrationen i extracellulär vätska är därför vital och sker med hjälp av endokrina system, som reglerar hormonsekretion och på så sätt näringsämnenas metabola öden (Nussey & Whitehead, 2001).

Glukos, fett och aminosyror som når blodcirkulationen stimulerar pankreas betaceller att frisätta insulin. Insulin är ett hormon, som reglerar fördelningen av energi och kontrollerar metabolismen av energisubstrat. Insulinfrisättning stimuleras dels genom att det finns en ökad mängd energisubstrat tillgänglig i blodet och dels via innervation från parasympatiska nervsystemet (Toribio, 2010). Förhöjd koncentration av glukos i blodet är den viktigaste stimulatoren för sekretion av insulin (Sjaastad *et al.*, 2010). Insulin överför signaler in i celler via stimulering av specifika insulinreceptorer. Insulinreceptorn finns på ytan hos nästan alla celler, men framför allt i insulinkänslig vävnad som lever, skelettmuskulatur och fettvävnad (Kaczmarek *et al.*, 2016). Celler som aktiverats av insulin tar upp glukos från blodet för att få energi (Barton, 2010; McKenzie, 2011). I levern stimulerar insulin syntes av glykogen och fettsyror, medan glykogenolys, glukoneogenes och ketogenes hämmas. Insulin ökar upptaget av glukos och fettsyror i fettvävnaden och minskar lipolysen. Upptaget av glukos och aminosyror ökar i skelettmuskulaturen och på så vis stimuleras syntesen av glykogen och protein av insulin, medan proteolys och frisättning av aminosyror i blodet hämmas (Toribio, 2010). Insulin metaboliseras i lever och njurar och har en halveringstid på 5-8 minuter i blodet (Sjaastad *et al.*, 2010).

Glukos tas upp av celler via specifika glukotransportmolekyler (GLUT) i cellmembranet. Det finns olika typer av GLUT-molekyler. I dagsläget finns 14 kända isoformer av GLUT, varav vissa är vävnadsspecifika. GLUT-1 är icke-insulinberoende och styr det basala upptaget av glukos i celler (de Laat *et al.*, 2015) och GLUT-4 är insulinberoende (Duehlmeier *et al.*, 2010). GLUT-4 förvaras i cytoplasman och translokeras vid signalering från insulin till cellmembranet, där den är aktiv för transport av glukos in i cellen (Sjaastad *et al.*, 2010). Skelettmuskulaturen står för runt 80 % av det insulinstimulerade glukosupptaget hos friska

hästar (Kaczmarek *et al.*, 2016; Waller *et al.*, 2012). Vid euglykemi går den stora majoriteten av det icke-insulinberoende glukosupptaget till annan vävnad än skelettmuskulatur, men vid hyperglykemi går runt hälften av det icke-insulinberoende glukosupptaget till skelettmuskulaturen (Baron *et al.*, 1988).

Fettsyror absorberas från tarmen och transporteras i kylomikroner via lymfatiska systemet till systemiska blodcirkulationen. Kylomikroner och fettsyror som frisätts i blodet från fettvävnaden tas upp av levern. Där används fettsyror antingen direkt för produktion av energi genom betaoxidation, eller så förestas de till triglycerider. Triglycerider packas tillsammans med protein, kolhydrater och kolesterol i very low density lipoproteins (VLDL). VLDL transporterar sedan triglycerider i blodet till andra vävnader, där de kan lagras eller direkt användas som energisubstrat. I fettvävnadens kapillärendotel finns enzymet lipoprotein lipas (LPL), som spjälkar lipoproteinernas triglycerider så att fett kan tas upp från blodet och lagras in i fettvävnadens adipocyter. Insulin aktiverar LPL och stimulerar på så sätt upptag av lipider från blodet (Barton, 2010; Sjaastad *et al.*, 2010). Insulin hämmar också lipolys och reducerar fettvävnadens frisättning av fria fettsyror (Breidenbach *et al.*, 1999; Coppack *et al.*, 1994).

Den energi som lagras in i kroppens energireserver kan vid behov göras tillgänglig genom aktivering av katabola mekanismer. I samband med ökad energiförbrukning eller minskat intag av energisubstrat så aktiveras neuroendokrina system för att bevara energihomeostas och normoglykemi. HPA-axeln (*hypothalamus- pituitary gland- adrenal gland- axis*) reglerar vätske- och elektrolytbalans, immunförsvar och energimetabolism för att bevara homeostas (Torbio, 2010). Som svar på fysiologisk stress aktiveras HPA-axeln, vilket resulterar i en frisättning av glukokortikoider och katekolaminer, som stimulerar mobilisering av lagrad energi (Hurcombe, 2011). Glukokortikoider, katekolaminer, glukagon, tillväxthormon och tyroideahormon är hormoner som är betydelsefulla för reglering av blodglukoskoncentrationen och anses ha en anti-insulin effekt, som leder till mobilisering av energireserver och resulterar i en ökad glukoneogenes, glykogenolys och lipolys (Buren *et al.*, 2002; McKenzie, 2011; Torbio, 2010). Sekretionen av både insulin och glukagon potentieras av gastrointestinala hormoner, inkretiner, som frisätts som respons på oralt intagna näringsämnen (Nussey & Whitehead, 2001).

Eftersom hästar har VFA som främsta dietära energikälla och inte glukos, så är levern viktig för glukoneogenes (Suagee *et al.*, 2010). Om glukoskoncentrationen i blodet sjunker så aktiveras sympatiska nervsystemet (Sjaastad *et al.*, 2010). Sympatiska nervsystemet hämmar insulinsekretion och stimulerar frisättning av hormonet glukagon från endokrina pankreas (Torbio, 2010). Glukagon stimulerar glykogenolys och glukoneogenes i levern så att glukos kan frisättas i blodet (Barton, 2010; Sjaastad *et al.*, 2010).

Glukokortikoider sänker det insulinstimulerade upptaget av glukos hos fettvävnad och skelettmuskulatur. Kortisol hämmar effekten av insulin på glukosupptag och lipogenes. Effekten av kortisol blir att användningen av glukos sjunker och blodglukoskoncentrationen stiger. Vid stress ökar kortisol mobiliseringen av fettsyror och aminosyror genom lipolys respektive proteolys för att göra dem tillgängliga. Kortisolet stimulerar ökad glukoneogenes genom ökad mobilisering av aminosyror från extrahepatisk vävnad (Nussey & Whitehead, 2001; Torbio, 2010).

Glukagon, glukokortikoider och katekolaminer aktiverar enzymet hormonkänsligt lipas (HSL) i fettvävnad och stimulerar på så sätt lipolys. HSL är det hastighetsbestämmande enzymet, som katalyserar nedbrytningen av triglycerider i fettvävnaden (Barton, 2010; Sjaastad *et al.*, 2010). Aktivt HSL spjälkar triglycerider till glycerol och fria fettsyror, som frisätts i blodet och kan

användas för glukoneogenes respektive betaoxidation. Fria fettsyror kan antingen tas upp och oxideras av perifer vävnad eller tas upp av levern där de omvandlas till ketonkroppar eller triglycerider. Större delen av de fria fettsyrorerna tas upp av levern, även om flera typer av vävnader är kapabla att använda dem. I levern förestras de fria fettsyrorerna till triglycerider, som packas i VLDL för att åter transporteras via blodet till perifer vävnad (Barton, 2010; McKenzie, 2011; Watson & Love, 1994). När det metabola svaret har tillgodosett det ökade behovet av energisubstrat så avtar frisättningen av fria fettsyror från fettvävnaden genom att aktiviteten hos HSL hämmas av insulin (Barton, 2010; Hughes *et al.*, 2004; Sjaastad *et al.*, 2010).

Endokrina pankreas innerveras av både sympatiska och parasympatiska nervsystemet. Sympatiska nerver stimulerar insulinfrisättning via β -adrenerga receptorer och hämmar sekretion via α -adrenerga receptorer. Parasympatiska vagala nerver stimulerar både insulin- och glukagonfrisättning (Nussey & Whitehead, 2001). Adipocyter uttrycker β_2 -adrenerga receptorer (Carrington *et al.*, 2003). Sympatiska nervsystemets katekolaminer (adrenalin och noradrenalin) stimulerar aktivering av lipolys hos adipocyter (Breidenbach *et al.*, 1999; Carrington *et al.*, 2003; Coppack *et al.*, 1994).

Om det uppstår ett ökat behov av glukos eller intaget minskar så kan glykogenförråden förbrukas och lipidoxidation för glukoneogenes i levern blir den viktigaste källan till energi (Barton, 2010). Smärta, sjukdom, vävnadsskada, kirurgi eller endotoxemi utsätter kroppen för fysiologisk stress, som förstärker den katabola responsen vid negativ energibalans (McKenzie, 2011). Förhöjda koncentrationer av glukokortikoider och katekolaminer ses vid fysiologisk stress (Ayala *et al.*, 2012). Mobiliseringen av triglycerider från kroppens energireserver för lipidoxidation, som sker då energihomeostasen inte kan upprätthållas, är en normal respons men den kan under vissa förhållanden bli överdriven och orsaka komplikationer. Kraftig fysiologisk stress hos kritiskt sjuka hästar kan utlösa en okontrollerad lipolys, som leder till tillstånd med patologiskt förhöjda blodfetter och förfettning av inre organ (Barton, 2010).

Metabola störningar hos kritiskt sjuka hästar

Insulinresistens

Inflammation kan orsaka förändrad insulinkänslighet hos vävnaden (Tanti & Jager, 2009; Vick *et al.*, 2008; Wooldridge, 2015). Ökad produktion av inflammatoriska cytokiner och hormoner hämmar insulinreglerad cellsignalering och inducerar insulinresistens (Tadros & Frank, 2012).

Definition

Insulinresistens definieras som en nedsatt respons på insulin hos insulinkänslig vävnad. Insulinresistens orsakas av en defekt insulinsignalering, vilket leder till frisättning av allt högre insulinkoncentrationer för att ett tillräckligt stort antal insulinreceptorer ska aktiveras för att utlösa en biologisk effekt av insulin (Toribio, 2010).

Insulinresistens karakteriseras av en onormal glykemisk och insulinemisk respons på glukos, som tillförs intravenöst eller peroralt (Frank *et al.*, 2010). Hyperinsulinemi och insulinresistens associeras med normoglykemi vid kompenserad insulinresistens och hyperglykemi vid dekomparerad insulinresistens (Toribio, 2010). Hyperinsulinemi kan bero på ökad sekretion av insulin från pankreas eller sänkt *clearance* av insulin från blodet (Frank & Tadros, 2014).

Normoglykemi kan definieras som en blodglukoskoncentration på 60 - 90 mg/dl (vilket motsvarar 3,3 - 5,0 mmol/l) (Kaczmarek *et al.*, 2016). Referensintervallet för normoglykemi

hos häst vid Universitetsdjursjukhuset, Sveriges lantbruksuniversitet är 3,5 - 6,1 mmol/l (Hillström *et al.*, 2013).

Etiologi

En föreslagen patofysiologisk mekanism bakom insulinresistens är att sänkt insulinkänslighet grundar sig i en inflammatorisk process, men ursprunget till denna kan vara av olika etiologi och av akut eller kronisk karaktär. Insulinresistens har identifierats som en riskfaktor för flera sjukdomar hos hästar (Treiber *et al.*, 2005). Insulinresistens har rapporterats hos hästar med ekvint metabolt syndrom (EMS), *pituitary pars intermedia dysfunction* (PPID), fetma, diabetes mellitus, fång, endotoxemi, granulocytstämning och *osteochondritis dissecans* (Toribio, 2010). Kompensatorisk hyperinsulinemi vid tillstånd med nedsatt insulinkänslighet kan bevara glukoshomeostasen, men det är en riskfaktor för utveckling av metabola störningar (Treiber *et al.*, 2005). Fetma, inaktivitet och en diet med högt innehåll av stärkelse kan medföra störningar i glukos- och fettmetabolismen orsakat av en låggradig kronisk inflammation i fettvävnaden (Kaczmarek *et al.*, 2016; Treiber *et al.*, 2006). Nedsatt insulinkänslighet orsakas också av akuta sjukdomstillstånd med systemisk inflammation, som vid endotoxemi (Toth *et al.*, 2008).

Patofysiologi

En nedsatt insulinkänslighet i vävnaden kan bero på förändringar i själva insulinreceptorn, via nedsatt tyrosinkinasetivitet, alternativt påverkas transduktionen av insulinets intracellulära signalvägar genom förändringar i fosforyleringssteg av intracellulära kinaser. Detta interfererar med den avsedda metabola och vasoregulatoriska responsen på insulin (Frank *et al.*, 2010; Tanti & Jager, 2009).

Systemisk inflammation i samband med sjukdom utlöser en stressrespons, som syftar till att bevara homeostasen. Den fysiologiska stress som orsakas av smärta, proinflammatoriska cytokiner (IL-1, IL-6 och TNF- α) och endotoxiner aktiverar HPA-axeln, vilket resulterar i frisättning av glukokortikoider och katekolaminer (Hurcombe, 2011). Glukokortikoider och katekolaminer stimulerar mekanismer med katabol effekt för att mobilisera lagrad energi och orsakar nedsatt känslighet för insulin (Toribio, 2010). Insulinresistenta hästar uttrycker en mindre mängd aktiva GLUT-4 i cellmembranet i skelettmuskulatur och fettvävnad (Waller *et al.*, 2011a; Waller *et al.*, 2011b). Det insulinstimulerade upptaget av glukos hos skelettmuskulatur och fettvävnad reduceras och koncentrationen av glukos och insulin stiger i blodet (Toribio, 2010).

Endotoxemi orsakar nedsatt insulinkänslighet hos häst (Toth *et al.*, 2008). Endotoxemi definieras som förekomst av endotoxiner i blodet, men termen används också för att beskriva den okontrollerade systemiska inflammatoriska responsen som kan uppstå som en komplikation vid flera septiska och aseptiska tillstånd och som kan leda till multipel organsvikt och septisk chock. Endotoxin är en lipopolysackarid (LPS) som utgör en strukturell cellväggskomponent hos gramnegativa bakterier. Lipopolysackarider som frigörs från gramnegativa bakterier och som korsar membranbarriärer och når ut i vävnaden eller systemiska cirkulationen orsakar en inflammatorisk respons genom aktivering av immunförsvarets celler och stimulering av ökat uttryck av inflammatoriska mediatorer (Sanchez, 2010). Immunförsvarets *toll-like receptors* (TLR) känner igen patogener som LPS och initierar produktion av proinflammatoriska cytokiner som IL-1, IL-6 och TNF- α (Lunn & Horohov, 2010). Septisk chock är förenat med hög mortalitet och kräver snabb och intensiv vård.

Det finns en koppling mellan sepsis och insulinresistens (Wooldridge, 2015). Exponering av LPS hos friska hästar har använts som metod i kliniska försök för att studera sambandet mellan inflammation och insulinresistens (Toth *et al.*, 2010). Efter en intravenös infusion av LPS

uppvisar hästar ett ökat uttryck av de proinflammatoriska cytokinerna IL-1, IL-6 och TNF- α samt kliniska symptom på systemisk inflammation med nedsatt allmäntillstånd, ökad rektaltemperatur, inappetens, lindrig takykardi och takypné samt lindriga koliksymptom och mjuk träck (Han *et al.*, 2011; Tadros & Frank, 2012; Vick *et al.*, 2008).

I en studie av Vick *et al.* (2008), där man avsåg att studera insulinresistens, administrerades LPS genom intravenös infusion för att inducera ett inflammatoriskt tillstånd hos hästarna. Vid undersökning av insulinkänslighet sågs initialt en ökad insulinkänslighet som progredierade mot en nedsatt insulinkänslighet hos hästarna (Vick *et al.*, 2008). I en annan studie exponerades hästar med sedan tidigare konstaterat varierande grad av insulinresistens för endotoxiner. Studien påvisade ett ökat uttryck av TLR-4 och TNF- α i skelettmuskulatur och i visceral fettvävnad hos insulinresistenta hästar jämfört med insulinkänsliga hästar (Waller *et al.*, 2012). TLR-4 aktiveras av LPS och initierar en intracellulär reaktionskaskad som aktiverar transkriptionsfaktorer (NF- κ B), vilket bl.a. leder till produktion av inflammatoriska cytokiner (Moore & Vandenplas, 2014). Ökat uttryck av proinflammatoriska cytokiner (TNF- α) ger ett förändrat uttryck av gener i skelettmuskulatur och i visceral fettvävnad, som leder till förändringar i glukoshomeostas och insulinkänslighet samt reducerad aktivitet hos GLUT-4. Resultaten i studien antyder att aktivering av TLR-4 nedreglerar insulinsignalering och orsakar perifer insulinresistens. TNF- α undertrycker gener som styr upptag och lagring av glukos och fettsyror, vilket kan tyda på att inflammation kan leda till störningar i glukos- och fettmetabolismen (Waller *et al.*, 2012).

Hyperlipemi

Negativ energibalans och fysiologisk stress i samband med sjukdom, smärta, vävnadsskada eller kirurgiska ingrepp och inappetens utlöser en neuroendokrin respons, som resulterar i en förstärkt mobilisering av lagrad energi för att kunna tillgodogöra kroppens energibehov och bevara normoglykemi. Glukokortikoider och katekolaminer stimulerar katabola processer, hämmar insulinsekretion och effekten av insulin hos vävnaden. Kritiskt sjuka hästar som belastas av kraftig fysiologisk stress kan utveckla störningar i fettmetabolismen med en okontrollerad lipolys och förhöjda koncentrationer av lipider i blodet samt insulinresistens som ytterligare förvärrar tillståndet (Barton, 2010).

Definition

Hos friska hästar är serumkoncentrationen av triglycerider vanligen < 1 mmol/l (Hughes *et al.*, 2004). Tillstånd med ökade koncentrationer av triglycerider, kolesterol och fria fettsyror i blodet delas in efter karaktär. Hyperlipidemi beskriver tillstånd där koncentrationen triglycerider i serum är 100 - 500 mg/dl, (vilket motsvarar 1,13 - 5,65 mmol/l). Hypertriglyceridemi innebär att serumtriglycerider är högre än normalt (>100 mg/dl, motsvarande > 1,13 mmol/l), men hästen är utan tecken på klinisk sjukdom. Vid hyperlipemi är serumtriglycerider > 500 mg/dl (motsvarande > 5,65 mmol/l), hästen har kliniska symptom på sjukdom, synlig förfettnings av levern och andra organ förekommer samt serum har ökad turbiditet eftersom fetthinnehållet är så högt. Hyperlipemi drabbar vanligen ponnyraser, miniatyrhästar och åsnor. Kraftig hypertriglyceridemi drabbar större hästraser och definieras som serumtriglycerider > 500 mg/dl (motsvarande > 5,65 mmol/l), men synlig förändring av serum eller förfettnings av inre organ förekommer inte (McKenzie, 2011).

Etiologi

Ökad koncentration av lipider i blodet är en fysiologisk respons på hypofagi och ökad fysiologisk ansträngning vid träning men som korrigeras när hästen ätit och fysisk ansträngning upphört (Hughes *et al.*, 2004). Predisponerande faktorer för patologiska tillstånd med förhöjda

lipidkoncentrationer är inappetens och primär sjukdom, som orsakar fysiologisk stress, negativ energibalans och *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) (Dunkel & McKenzie, 2003). Hyperlipemi drabbar vanligen överviktiga ponnyer, som utsatts för någon form av stress i form av t.ex. sjukdom, transport eller förändringar i skötselrutiner där ökade krav ställs på metabolismen. Ston som är dräktiga i sista trimestern eller lakterande ston är särskilt utsatta (Watson & Love, 1994). Utveckling av kraftig hypertriglyceridemi sker vanligen som sekundär komplikation till en primär sjukdom som orsakar inappetens och minskat foderintag hos kritiskt sjuka hästar med tecken på SIRS (Dunkel & McKenzie, 2003). Sjukdomar hos vuxna hästar som associeras med SIRS är främst de som drabbar gastrointestinalkanalen, som enterit, colit och strangulerande obstruktioner, samt metrit, peritonit och pleuropneumoni (MacLeay, 2010; Moore and Vandenplas, 2014).

Friska hästar som hålls på svält får signifikant förhöjda koncentrationer av lipider i blodet. Främst är det fria fettsyror (NEFA – *nonesterified fatty acids*) som mobiliseras från fettvävnaden. Frisättningen av VLDL från levern varierar hos olika individer och kan indikera en predisponering för utveckling av störningar i fettmetabolismen (Frank *et al.*, 2002).

Kliniska symptom

Kliniska symptom är ospecifika och beror på den primära sjukdomen. Hyperlipemi ger kliniska symptom på nedsatt allmäntillstånd, inappetens, kolik, feber, muskelsvaghet, diarré, ataxi, ödem och ikterus (Barton, 2010). Utveckling av symptom på hyperlipemi är resultatet av en sviktande funktion hos lever och njurar, orsakat av fettinfiltration i dessa organ (Watson & Love, 1994). Primär sjukdom med endotoxinemi och SIRS ger generellt kliniska symptom på nedsatt allmäntillstånd, inappetens, koliksymptom, hypertermi eller hypotermi, takykardi och takypné (Han *et al.*, 2011; Moore & Vandenplas, 2014; Tadros & Frank, 2012; Vick *et al.*, 2008). Utveckling av kraftig hypertriglyceridemi försämrar allmäntillstånd och aptit ytterligare (Dunkel & McKenzie, 2003).

Diagnostik

Diagnos ställs genom undersökning av lipidkoncentration med biokemisk analys av serum. Kliniska symptom och hematologiska förändringar är ospecifika och beror på underliggande primär sjukdom (McKenzie, 2011). Hematologisk undersökning visar ofta hemokoncentration och stressleukogram (Hughes *et al.*, 2004). Biokemiska analyser kan utföras för utvärdera patientens metabola status. Metabolisk acidosis, förhöjda lever- och njurvärden (γ -glutamyltransferas, alkaliskt fosfat, laktat dehydrogenas och sorbitol dehydrogenas, förhöjd bilirubin, urea och kreatinin) är vanliga fynd (Watson & Love, 1994).

Patofysiologi

Kraftig fysiologisk stress hos kritiskt sjuka hästar ger frisättning av glukokortikoider och katekolaminer som aktiverar HSL och därmed inducerar lipolys i fettvävnaden. Insulinkänsligheten i vävnaden reduceras av glukokortikoider och katekolaminer samtidigt som inflammatoriska tillstånd med endotoxinemi inducerar insulinresistens (Toth *et al.*, 2008). Fettsyror mobiliseras från fettvävnaden för att tillgängliggöra lagrad energi (Barton, 2010). Lipolysen orsakar en frisättning av fria fettsyror som överskrider leverns förmåga till ketogenes och oxidering av fettsyror, vilket gör att de istället förestas till triglycerider. Triglyceriderna frisätts i blodet förpackade i VLDL och följaktligen stiger koncentrationen av triglycerider i blodet (Watson & Love, 1994). Den ökade tillförseln av lipider till levern bidrar till ökad sekretion av VLDL, en okontrollerad glykogenolys och glukoneogenes med ökad frisättning av glukos i blodet och minskad nedbrytning av insulin i levern (Kaczmarek *et al.*, 2016).

Vid hyperlipemi sker en överproduktion av VLDL, så att mer VLDL frisätts från levern än vad som tas upp av fettvävnaden. LPL är det hastighetsbestämmande enzymet för upptag av VLDL från blodet till fettvävnaden (Barton, 2010). Enzymen LPL och hepatiskt lipas har signifikant ökad aktivitet i samband med hyperlipemi, vilket tyder på att det är överproduktionen av VLDL som orsakar hypertriglyceridemi, inte försämrat bortskaffande från blodet (Watson *et al.*, 1992).

Ett katabolt tillstånd i kombination med nedsatt känslighet för insulin främjar lipolys (Durham & Thiemann, 2015). Ansamling av fetter i levern orsakar förändring i insulinsignaleringen, med ökad insulinresistens och produktion av proinflammatoriska cytokiner (Kaczmarek *et al.*, 2016). Insulinresistens underlättar VLDL-syntes och sekretion till plasma. Denna process stimuleras ytterligare av TNF- α , som är en viktig faktor för reglering av lipidhomeostasen (Chen *et al.*, 2009). De ökade nivåerna av cytokiner, TNF och interleukiner (IL-1, IL-6), som associeras med SIRS kan bidra till utvecklingen av kraftig hypertriglyceridemi (Dunkel & McKenzie, 2003).

Om mobiliseringen av fettsyror från fettvävnaden och syntesen av triglycerider överstiger lipoxidation och sekretion av VLDL, så sker en förfettnings av levern genom att fett infiltrerar levervävnaden och stör leverns funktion, vilket leder till svikt (Barton, 2010). Skelettmuskulatur och pankreas försöker att använda fett genom att öka sin betaoxidation, men fett kan ansamlas även i dessa vävnader och orsaka förändringar i normal cellfunktion, inkluderat insulinsignalering (Frank *et al.*, 2010).

Patologi

Vid obduktion ses förfettnings av inre organ och vävnader. Värst drabbade är lever och njurar, vilka antar en blek, svullen och skör textur. I fall med kraftig fettinfiltration kan levern rupturera och orsaka intraabdominella blödningar. Förfettnings kan även ses i skelettmuskulatur, binjurebark och hjärtmuskel. Pankreatit, glomerulit, lungödem, fokala blödningar, infarkter, venösa tromber och hyalin degeneration har rapporterats hos hästar med hyperlipemi. Histopatologisk undersökning bekräftar förekomst av fettinfiltration i inre organ och vävnader (Watson & Love, 1994).

Prognos

Förhöjda triglycerider i blodet är av klinisk relevans, ty det visar på att hästen är i ett katabolt stadium som kan fortskrida till förfettnings av lever, njurar och andra organ, vilket med tiden leder till organsvikt (Dunkel & McKenzie, 2003). Hyperlipemi är förenat med relativt hög mortalitet, trots att tillståndet är reversibelt (Durham & Thiemann, 2015). Triglyceridkoncentrationen är inte avgörande för överlevnad, så prognosen beror inte på graden av hypertriglyceridemi (Kneeland *et al.*, 2013; Waitt & Cebra, 2009). Mortaliteten för hyperlipemi är 57-85 % (Watson & Love, 1994).

Behandling

Behandling av tillstånd med förhöjda blodfetter består dels av behandling av det underliggande primära tillståndet som skapat en negativ energibalans och dels av korrigerings av den negativa energibalansen (McKenzie, 2011). Hästar med förhöjda blodfetter har ofta en nedsatt aptit som gör att det frivilliga foderintaget är otillräckligt för att täcka energibehovet. Enteral näringstillförsel kan också vara olämplig i vissa fall där gastrointestinala lidanden är en del av den primära sjukdomsbilden (Watson & Love, 1994). Hästar som inte vill eller bör äta kan behandlas med intravenös näringslösning (Durham & Thiemann, 2015). Behandling med en kontinuerlig glukosinfusion, som orsakar hyperglykemi stimulerar endogen insulinfrisättning

(de Laat *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2011). Behandlingen syftar inte till att täcka hästens energibehov utan avser att genom tillförsel av glukos till systemet orsaka hyperglykemi och på så sätt stimulera pankreas betaceller att frisätta insulin (McKenzie, 2011). Insulinkoncentrationen, som stiger i blodet vid infusion med glukos, kan stimulera anabola processer i skelettmuskulatur och fettvävnad i form av minskad frisättning av lipider från fettvävnaden och ökat upptag av triglycerider och glukos i vävnaden (Durham *et al.*, 2004). Hyperglykemi och hyperinsulinemi stimulerar lipogenes och förestring av fettsyror (Kaczmarek *et al.*, 2016) varvid koncentrationen av fria fettsyror och triglycerider i blodet reduceras (Suagee *et al.*, 2011).

Behandling av kritiskt sjuka hästar med kraftig hypertriglyceridemi med en parenteral näringstillförsel med 50 % glukoslösning via intravenös infusion, som gjordes i en studie av Dunkel och McKenzie (2003), resulterade i att serumtriglycerider normaliserades. Hästarnas allmäntillstånd och aptit förbättrades i takt med att triglyceriderna återgick till normala värden (Dunkel & McKenzie, 2003). I en annan studie kunde man också visa att koncentrationen av triglycerider reducerades genom parenteral behandling med glukosinfusion hos ponnyer och åsna med hyperlipemi (Durham, 2006). Behandling med glukosinfusion bör fortgå till triglyceriderna åter är normala (Dunkel & McKenzie, 2003).

En studie av Han *et al.* (2011) syftade till att undersöka effekten av en kontinuerlig infusion av glukos eller kontinuerlig infusion av både glukos och insulin på glukos- och insulinkoncentrationerna i blodet hos friska hästar och hästar som exponerats för endotoxiner. Vid infusion med glukos till friska hästar gav 30 kcal/kg/d (motsvarande 6,13 mg/kg/min) snabbt en hyperglykemi med blodglukos >10mmol/l. Samtidig infusion med insulin 0,07 U/kg/h förhindrade hyperglykemi. Insulinkoncentrationen i blodet steg signifikant hos både friska hästar och hästar som exponerats för endotoxin vid infusion med enbart glukos och vid infusion med både glukos och insulin. Insulinkoncentrationen var dock signifikant lägre hos de hästar som enbart behandlades med glukosinfusion (Han *et al.*, 2011).

Vissa hästar kan utveckla kraftig hyperglykemi (>10mmol/l) vid behandling med glukoslösning. Infusionshastigheten kan då behöva sänkas eller så bör man lägga till behandling med exogent insulin (Dunkel & McKenzie, 2003). Överdoserings av glukos kan orsaka diures, dehydrering, elektrolytrubbningar och förvärra den metabola acidosen (Watson & Love, 1994). Hyperglykemi kan innebära en risk för glukotoxicitet. Hyperglykemi kan via olika mekanismer bidra till ökad produktion av reaktiva fria syreradikaler. Oxidativ stress kan skada alla delar av cellen såsom proteiner, membranlipider och nukleinsyror (Araki & Nishikawa, 2010). Eftersom hästar med hyperlipidemi sannolikt också är insulinresistenta så kan enbart infusion med glukos resultera i hyperglykemi. Insulinbehandling kan då vara nödvändig för att komma över den perifera insulinresistensen och stimulera glukosupptag i insulinkänslig vävnad samt återställa normal aktivitet hos HSL (McKenzie, 2011).

I en retrospektiv fallserie undersöktes den kliniska responsen på exogent insulin vid behandling av hästar med hyperlipemi och hypertriglyceridemi. Olika doseringsregim hade använts i de olika fallen. Insulin hade administrerats som subkutana injektioner en gång per dygn alternativt som intravenös bolus så ofta som varje timme, men vanligen var sjätte timme. Insulinbehandling hade kombinerats med en kontinuerlig glukosinfusion. Behandling med exogent insulin tycktes kunna hjälpa till med bortskaffandet av lipider från blodcirkulationen. Artikelförfattarna menar dock att det är möjligt att liknande resultat hade erhållits med endast glukosinfusion som stimulerat endogen insulinfrisättning (Waite & Cebra, 2009).

Till författarens vetskap finns i dagsläget ingen koncensus kring hur man optimerar parenteral behandling hos intensivvårdspatienter med störningar i fettmetabolismen. Det saknas elementära kunskaper i vad en kontinuerlig glukosinfusion har för effekter på det dynamiska systemet av glukos, insulin och triglycerider över tid hos hästar med varierande grad av insulinresistens. Vid tillstånd med förhöjda lipidkoncentrationer i blodet och insulinresistens råder en relativ hypoinsulinemi, vilken bör korrigeras för att bryta den katabola processen vid negativ energibalans och kraftig fysiologisk stress. Tillförsel av glukos till systemet stimulerar endogen insulinsekretion men det är inte känt vilken grad av hyperinsulinemi som krävs relativt graden av insulinresistens för att stimulera anabola mekanismer. Genom exogen administration av insulin kan man nå högre insulinkoncentrationer, förutsatt att man samtidigt tillför glukos till systemet, eftersom risken för hypoglykemi annars är överhängande. Exogen insulinadministration med kompensatorisk glukosinfusion är ett dyrare alternativ och kräver mer noggrann övervakning av patienten. Enbart en kontinuerlig glukosinfusion är ett billigare, säkrare och enklare alternativ (McKenzie, 2011).

Hyperglykemisk clamp

En hyperglykemisk clamp är en teknik som kan användas för att studera patogenesen vid metabola sjukdomstillstånd med störningar i glukosmetabolismen hos häst och ponny, exempelvis vid hyperlipidemi och hyperadrenocorticism (Rijnen & van der Kolk, 2003). Tekniken kan användas för att mäta hur känsliga pankreas betaceller är för glukos (betacellsresponsen) men också användas för att kvantifiera patientens insulinkänslighet. Metoden syftar till att genom exogen tillförsel av glukos i blodet öka plasmakoncentrationen till en konstant hyperglykemisk nivå under en tidsperiod på ungefär två timmar. Den infusionshastighet som behövs för att upprätthålla den hyperglykemiska blodglukoskoncentrationen konstant kan användas som index för att bestämma glukosmetabolismen (DeFronzo *et al.*, 1979).

Den mängd glukos som metaboliseras under *steady state* motsvarar den mängd glukos som tillförs systemet via glukosinfusion, förutsatt att den basala endogena glukosproduktionen i levern fullständigt hämmas av hyperinsulinemin och hyperglykemin. Genom matematiska beräkningar kan man kvantifiera mängden metaboliserad glukos, vilket uttrycks som M-värdet (DeFronzo *et al.*, 1979). M-värdet kan användas för beräkning av en kvot, en M/I- kvot, som beskriver mängden glukos som metaboliseras per insulinenhet i plasma. M/I- kvoten kan användas som index för vävnadens insulinkänslighet (DeFronzo *et al.*, 1979; Rijnen & van der Kolk, 2003). Plasmakoncentrationen av insulin under *steady state* ger ett mått på betacellernas respons på glukos (Rijnen & van der Kolk, 2003).

Metodiken vid en hyperglykemisk clamp baseras på att infusionshastigheten justeras enligt principen för *negative feedback* för att nå *steady state* vid en konstant hyperglykemisk blodglukoskoncentration. Stiger blodglukoskoncentrationen så tillförs mer glukos till systemet än vad som metaboliseras och infusionshastigheten bör följaktligen sänkas. Om glukoskoncentrationen istället sjunker är upptaget och förbrukningen av glukos i vävnaden större än den mängd glukos som tillfördes systemet och en ökad infusionshastighet krävs för att åter fylla ut distributionsvolymen för glukos. Den sanna mängden glukos som metaboliseras per tidsenhet kan sedan approximeras baserat på infusionshastigheten, med hänsyn taget till avvikelsen från den förutbestämda målkoncentrationen för blodglukos, vid vilken man strävar efter att nå *steady state* (DeFronzo *et al.*, 1979). En del glukos förloras i urinen vid hyperglykemi, vilket man också måste korrigera för. Glukoskoncentrationen i urinen mäts därför efter hyperglykemiska clampens två timmar är slut (DeFronzo *et al.*, 1979; Rijnen & van der Kolk, 2003).

I en studie som avsåg att ta fram referensvärden för häst var M-värdet $0,011 \pm 0,0045$ mmol/kg/min ($p < 0,05$) och M/I- kvoten $0,017 \pm 0,016$ (mmol/kg/min)/(pmol/L) ($p < 0,05$) (Rijnen & van der Kolk, 2003). Resultaten från en annan studie visade på ett högre M-värde hos friska hästar ($0,039 \pm 0,0012$ mmol/kg/min) än vad som tidigare rapporterats, vilket indikerar att dessa hästar hade en högre glukosmetabolism och känslighet för insulin (de Laat *et al.*, 2012). I den senare studien var dock blodglukoskoncentrationen högre vid den hyperglykemiska clampens *steady state* jämfört med den tidigare studien ($12,5 \pm 1,1$ mmol/l jämfört med $11,2 \pm 0,41$ mmol/l). Artikelförfattarna menar att det högre M-värdet i den senare studien troligen kan förklaras av att de använt en högre infusionshastighet för glukosen. M/I- kvoten i den senare studien var $0,014 \pm 0,002$, vilket är jämförbart med resultatet i den första studien (de Laat *et al.*, 2012).

MATERIAL OCH METOD

Hästar

Studien omfattade sex varmbloodhästar som ägs av institutionen för Kliniska vetenskaper, Sveriges Lantbruksuniversitet. Alla hästarna som inkluderades i studien var ston. Åldern på hästarna var mellan 8 - 23 år (medelålder $15 \pm 5,1$). Kroppsvikten varierade mellan 461,0 kg till 619,5 kg, (medelvikt $535,7$ kg $\pm 59,2$). Hästarna bedömdes vara kliniskt friska vid försökstillfället och utan kliniska tecken på metabol sjukdom. Ingen av hästarna var i träning. Hästarna hade varierande grad av insulinkänslighet, vilket var känt sedan tidigare eftersom hästarna har ingått i tidigare studier av insulinresistens.

Studiedesign

Studien utfördes som en prospektiv studie med experimentella kliniska försök i en cross over design. Studien omfattar behandling med en kontinuerlig glukosinfusion (500 mg/ml) under 34 timmar vid två skilda tillfällen med en veckas mellanrum per häst. Målet med glukosinfusionen var att skapa en *steady state* vid två olika blodglukoskoncentrationer: 7 mmol/l och 10 mmol/l. Varje 34 timmars kontinuerlig glukosinfusion föregicks av en hyperglykemisk clamp under 2 timmar för mätning av hästarnas insulinkänslighet och pankreas betacellsfunktion. Den första timmen under den 34 timmars kontinuerliga glukosinfusionen användes för att ställa in hästens blodglukoskoncentration till den förutbestämda nivån, 7 eller 10 mmol/l. Vilken häst som tilldelades den lägre eller den högre målkoncentrationen blodglukos vid det första undersökningstillfället avgjordes slumpmässigt. Vid det andra försökstillfället undersöktes respektive häst med den kvarvarande målkoncentrationen blodglukos.

Under försöket vistades hästarna i individuella boxar, med fri tillgång till vatten och sin vanliga dyngsgiva av hö uppdelat i mindre portioner för att få ett kontinuerligt intag av grovfoder över dygnet. Hästarna fick tillgång till grovfodret efter att försöket pågått i tre timmar. Efter försökets 36 timmar trappades infusionshastigheten successivt ned tills det att hästen nådde en fysiologisk blodglukoskoncentration. Under tiden mellan försökstillfällena vistades hästarna utomhus i hage tillsammans med resten av flocken under dagtid och uppstallade i box under nattetid.

Studien godkändes i etisk prövning av Uppsala djurförsöksetiska nämnd (diarienummer: C30/15).

Hyperglykemisk clamp

Den hyperglykemiska clampen utfördes enligt den metod som beskrivits av Defronzo *et al.* (1979) för att kvantifiera hästarnas insulinkänslighet och mäta β -cellsresponsen.

Dagen före försöket försågs hästarna med en venkateter (Intranule, 2,0 x 105 mm, Vygon, Ecouen, Frankrike) i vardera jugularvenen. Huden i området för jugularvenen preparerades genom lokalbedövning (EMLA, AstraZeneca, Södertälje, Sweden) och steriltvätt på båda sidor av halsen innan kanylerna lades och suturerades fast i huden. Förlängningsslangar (Discofix B, 250 mm, Braun Medical AG, Schweiz) och spiralaggregat (Baxter flo-guard, filter 15 μ m, Baxter Healthcare SA, Zürich, Switzerland) fästes till den ena venkatetern för administration av glukos (Glucose 500 mg/ml, Fresenius Kabi AB, Uppsala, Sverige). Den andra venkatetern försågs med en förlängningsslang för blodprovstagning.

Hästarna fastades ca 8 timmar innan den hyperglykemiska clampen inleddes. Hästarna vägdes på morgonen före start för att få aktuell vikt och kunna beräkna korrekt infusionshastighet. Blodprover för analys av glukos, insulin och triglycerider togs vid -10 min och -1 min före försökets start. Vid start gavs hästarna en intravenös bolus av glukos (dos 100 mg/kg glukos, 500 mg/ml) under 1 min för att nå hyperglykemi (cirka 10 mmol/l). Därefter hölls blodglukoskoncentrationen på 10 mmol/l genom kontinuerlig tillförsel av glukos i varierande hastighet med hjälp av en volymetrisk infusionspump (Colleague, Volumetric infusion pump, Baxter Healthcare SA, Zurich, Switzerland) under den hyperglykemiska clampens två timmar. För att säkerställa att den hyperglykemiska blodglukosnivån upprätthölls togs blodprover var femte minut via venkatetern för direkt analys av blodglukoskoncentrationen med en glukometer (AccuCheck Aviva, Roche Diagnostics Scandinavia AB, Bromma, Sverige). Infusionshastigheten för glukos justerades om blodglukoskoncentrationen devierade mer än 0,2 mmol/l från den förutbestämde målkoncentrationen i blodet (10mmol/l). Den hyperglykemiska clampen pågick i två timmar. Den första timmen användes som inställningsfas för att nå en konstant hyperglykemisk nivå med blodglukoskoncentration på 10 mmol/l. Under andra timmen eftersträvades att bevara *steady state*. Blodprover för senare analys av plasmaglukos och plasmainsulin aspirerades via venkatetern avsedd för blodprovstagning var tionde respektive var tjugonde minut. Urinprov togs sterilt genom urinkateter i urinblåsan två timmar efter den hyperglykemiska clampens start för mätning av urinens volym och glukoskoncentration.

Kontinuerlig glukosinfusion

Behandling med en kontinuerlig glukosinfusion under 34 timmar följde direkt efter den hyperglykemiska clampen. Den första timmen av den kontinuerliga glukosinfusionens 34 timmar användes för att nå en konstant hyperglykemisk nivå med *steady state* vid den förutbestämde blodglukoskoncentrationen, 7 eller 10 mmol/l. Under efterföljande 33 timmar bevarades *steady state* vid den förutbestämde blodglukoskoncentrationen genom att glukos tillfördes systemet med varierande hastighet via intravenös infusion med volymetrisk infusionspump (Colleague, Volumetric infusion pump, Baxter Healthcare SA, Zurich, Switzerland), vilken justerades om blodglukoskoncentrationen devierade mer än 0,2 mmol/l från den avsedda målkoncentrationen (7 eller 10 mmol/l). Blodglukoskoncentrationen analyserades direkt med hjälp av glukometer (AccuCheck Aviva, Roche Diagnostics Scandinavia AB, Bromma, Sverige) en gång i halvtimmen under 34 timmar för att säkerställa att den avsedda blodglukoskoncentrationen upprätthölls. Blodprover för senare analys av plasmaglukos aspirerades en gång i timmen från venkatetern avsedd för blodprovstagning under behandlingsperiodens 34 timmar. Blodprover för analys av insulin och triglycerider togs före

och omedelbart efter den hyperglykemiska clampen samt vid 12, 24 och 36 timmar under försöksperioden.

Biokemiska analyser av plasma och serum

Blodprover för laboratorieanalyser aspirerades via en venkateter och överfördes till sterila blodprovsrör med tillsats av antikoagulantia (EDTA och litium-heparin) samt till serumrör. Blodprovsrören centrifugerades i 10 minuter vid 2700 x g och plasma respektive serum avskildes och förvarades i eppendorfrör i -80 °C fram tills det att de biokemiska laboratorieanalyserna utfördes. Proverna analyserades med avseende på plasmakoncentration av glukos och insulin samt serumkoncentration av triglycerider. Plasmaglukos analyserades med en membranbunden enzym-elektrodmotodik (YSI 2300 STAT Plustm analyzer, YSI Inc, Yellow Springs, Ohio). För analys av plasmainsulin användes en ELISA (Mercoia Equine Insulin ELISA, Mercoia AB, Uppsala, Sweden). Serumtriglycerider analyserades med enzymatisk kolorimetrisk metodik (Clinical Chemistry Architect c4000, Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA).

Statistiska analyser och beräkningar

För att bestämma insulinkänsligheten beräknades metaboliserad glukos (M-värde) och metaboliserad glukos per insulinenhet (M/I- kvot). M-värde och M/I- kvot beräknades under hyperglykemiska *clampens steady state*, mellan 80 - 120 min, för varje häst och försökstillfälle enligt den metod som beskrivits av Defronzo *et al.* (1979).

Metaboliserad glukos (M-värdet) beräknas enligt ekvationen:

$$M = INF - UC - SC$$

Där M är metaboliserad glukos, INF är infusionshastigheten för glukos, UC är förlust av glukos i urinen och SC är korrigerig för att glukoskoncentrationen fluktuerar över tid i blodet i förhållande till målkoncentrationen på 10 mmol/l. Om blodglukoskoncentrationen ökar under ett givet tidsavsnitt har all glukos som tillförts via infusionen under denna tid inte metaboliserats utan överskottet av infunderad glukos har fördelats i den extracellulära volymen. Har glukoskoncentrationen i blodet istället sjunkit har metabolismen av glukos varit större än den tillförda infusionen av glukos. Eftersom viss fluktuation i glukoskoncentrationen förekommer under *steady state* så approximeras den faktiska mängden glukos som metaboliserats utifrån den mängd som translokeras från eller till den extracellulära vätskan genom *space correction* (SC) (Defronzo *et al.*, 1979).

$$SC = \frac{(G_2 - G_1) \times (0,19 \times bw)}{t \times bw} = \frac{(G_2 - G_1) \times 0,19}{t}$$

SC beskriver förändringen i tillförsel eller bortskaffande av glukos från distributionsvolymen över tid. Distributionsvolymen (V_d i liter) för glukos motsvarar 19 % av kroppsvikten och beräknas genom att kroppsvikten (bw i kg) multipliceras med en faktor 0,19.

$$V_d = 0,19 \times bw$$

SC beräknades genom att differensen mellan glukoskoncentrationen i slutet av en tidsperiod (G_2) och glukoskoncentrationen början av en tidsperiod (G_1) för en definierad tidsperiod (t) under *steady state* multipliceras med en den andel av kroppsvikten som glukos fördelar sig i under samma tidsperiod.

Medelkoncentrationen av plasmainsulin under *steady state* är ett mått på betacellernas respons på glukos. Betacellsresponsen kalkylerades genom att beräkna medelvärdet av plasmainsulinkoncentrationen vid 80 min, 100 min och 120 min under den hyperglykemiska clampen.

Kvoten mellan metaboliserad glukos (M; $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) och plasmainsulinkoncentrationen (I; ng/l) ger en M/I- kvot som beskriver mängden metaboliserad glukos per insulinenhet (Defronzo et al., 1979; Rijnen and van der Kolk, 2003).

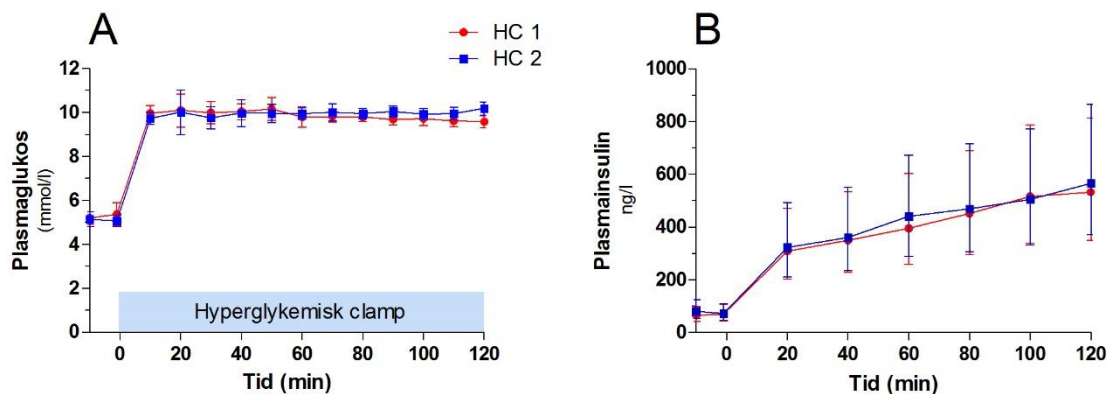
För statistisk undersökning av mätdata användes ett statistikprogram (JMP® Pro 11.0.0, SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA). Arean under kurvan (AUC) för koncentrationerna av plasmainsulin och plasmatriglycerider över tid kalkylerades med hjälp av trapetzoidmetoden. Som statistisk metod för hypotesprövning användes en parat t-test eller en 2-vägs variansanalys för upprepade mätningar (ANOVA) samt en efterföljande Tukey-test. I de fall då residualerna inte var normalfördelade logtransformerades data innan statistisk analys. Logtransformerade data redovisas sedan som geometriskt medelvärde \pm 95 % konfidensintervall (CI). Övriga data redovisas som medelvärde \pm standardavvikelse (SD). Linjär och icke linjär regressionsanalys utfördes för att studera korrelationen mellan parametrar. I de fall då linjär regression utfördes undersöktes om de två regressionslinjerna för data från kontinuerlig glukosinfusion under 34 timmar vid plasmakoncentrationerna 7 eller 10 mmol/l hade samma lutning. Nollhypotesen om samma lutning och intercept av regressionslinjerna testades genom analys av kovarians (ANCOVA) mellan dessa två stokastiska variabler, med tillägg för en interaktionsterm. $P < 0,05$ användes som gränsvärde för att bestämma statistisk signifikans.

RESULTAT

Samtliga hästar som deltog i studien tolererade försöket väl.

Hyperglykemisk clamp

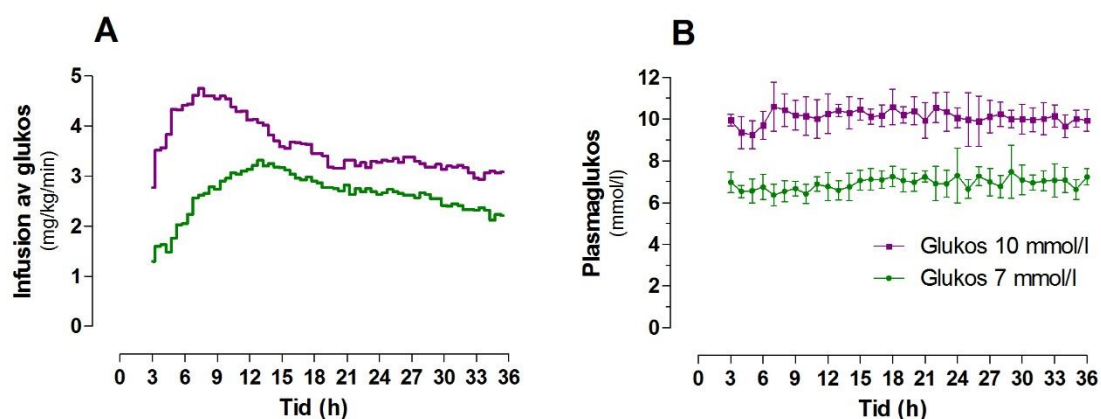
Hästarnas insulinkänslighet kvantifierades med hjälp av den hyperglykemiska clampen. Resultaten av de enskilda parametrarna från de båda hyperglykemiska clamparna sammanfördes och redovisades som ett genomsnittligt värde för varje häst. Den metaboliserade mängden glukos uttryckt som M-värdet varierade mellan 1,5 – 2,9 $\text{mg}/\text{kg}/\text{min}$ med medelvärdet $1,9 \pm 0,5$ $\text{mg}/\text{kg}/\text{min}$. Metaboliserad glukos per insulinenhet, M/I-kvot, varierade mellan 1,5 – 8,2 ($[\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}]/[\text{ng}/\text{l}]$) med medelvärde $4,2 \pm 2,1$ ($[\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}]/[\text{ng}/\text{l}]$). Spridningen i M-värde och M/I-kvot visar att hästarna i studien hade varierande grad av insulinkänslighet. Hästarnas betacellsrespons varierade mellan 340 – 1000 ng/l (534 ± 216 ng/l).



Figur 1. Graf 1A visar medelkoncentrationerna \pm SD för plasmaglukos (mmol/l) över tid (min) för den hyperglykemiska clampen. Figur 1B visar geometriska medelvärden \pm CI för plasmainsulin (ng/l) över tid (min) för den hyperglykemiska clampen. Röda cirklar anger första tillfället (HC1) som den hyperglykemiska clampen utfördes och blå fyrkanter anger det andra tillfället (HC2).

I figur 1A visas medelkoncentrationerna för plasmaglukos över tid hos hästarna vid den första och den andra hyperglykemiska clampen. Det fanns ingen skillnad i plasmaglukoskoncentration mellan försökstillfällena ($P = 0,39$). I figur 1B visas geometriska medelvärden för plasmainsulinkoncentrationerna över tid vid den första och den andra hyperglykemiska clampen. Det fanns ingen skillnad i koncentrationen av plasmainsulin mellan försökstillfällena ($P = 0,13$). Initialt skedde en kraftigare ökning av plasmainsulinkoncentrationen, men ökningen nådde en plattå effekt och under den tid som betecknas som *steady state* (60 – 120 min) så fanns inga skillnader i plasmainsulinkoncentrationerna över tid ($P = 0,78 - 1,0$).

Kontinuerlig glukosinfusion

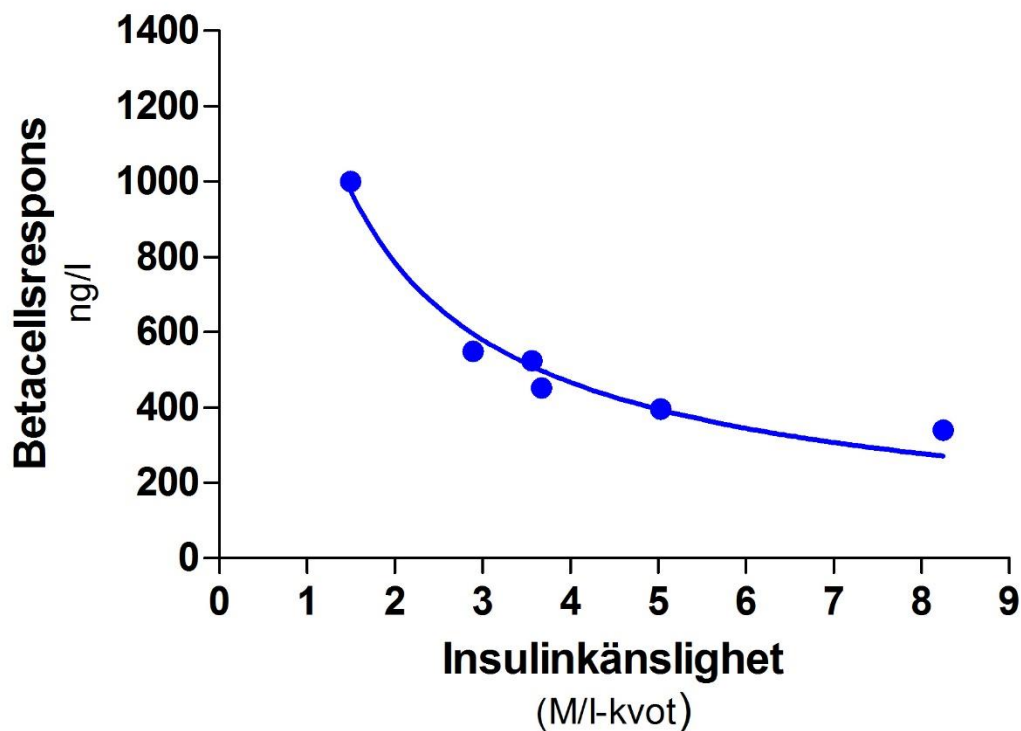


Figur 2. Graf A och B visar medelinfusionshastigheterna för glukos (mg/kg/min) respektive medelplasmakoncentration (\pm SD) av glukos (mmol/l) över tid (h) vid två olika målkoncentrationer för blodglukos. Gröna cirklar eller enbart gröna linjer visar data för kontinuerlig glukosinfusion vid 7 mmol/l plasmaglukoskoncentration och lila fyrkanter eller enbart lila linjer visar data för kontinuerlig glukosinfusion vid 10 mmol/l plasmaglukoskoncentration.

I figur 2A presenteras medelinfusionshastigheten av glukos över tid vid de två olika målkoncentrationerna för plasmaglukos vid den kontinuerliga glukosinfusionen. En signifikant

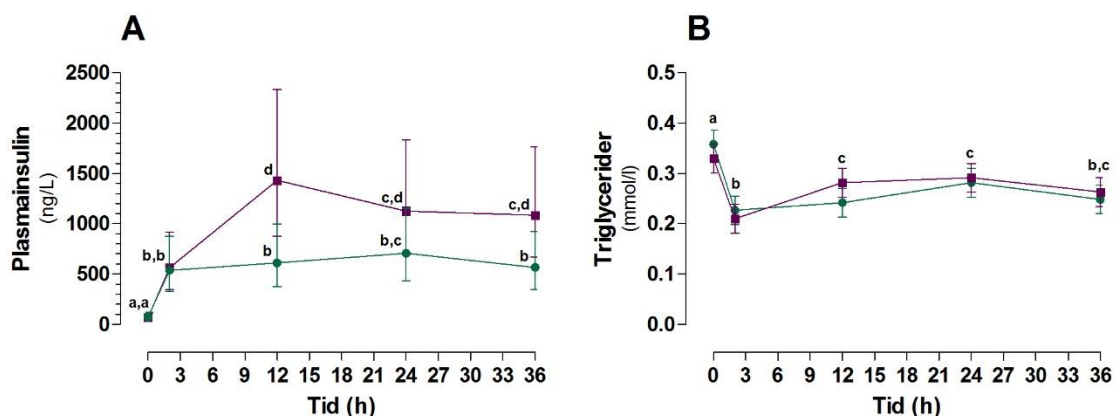
skillnad förelåg mellan glukosinfusionshastigheterna för att skapa en stabil plasmaglukoskoncentration på 7 respektive 10 mmol/l ($P < 0,001$). Infusionshastigheten av glukos ändrade sig över tid ($P < 0,001$). Det fanns en interaktion mellan de olika plasmaglukoskoncentrationerna (7 och 10 mmol/l) och tiden ($P < 0,001$), eftersom infusionshastigheten förändrades över tid på olika sätt mellan de olika målkoncentrationerna. Generellt sett så krävdes det vid båda målkoncentrationerna initialt en ökad infusionshastighet för att bevara målkoncentrationen av plasmaglukos. Den ökade infusionshastigheten nådde en topp vid ca 6 - 9 timmar för målkoncentrationen 10 mmol/l och vid 12 - 15 timmar för 7 mmol/l. Infusionshastigheten avtog sedan och nådde en *steady state* mellan 15-36 timmar för 10 mmol/l och 18-36 timmar för 7 mmol/l.

Figur 2B visar att det fanns en skillnad i plasmaglukos mellan den kontinuerliga glukosinfusionen vid 7 mmol/l blodglukoskoncentration jämfört med 10 mmol/l ($P < 0,001$). Det förekom ingen skillnad ($P = 0,27$) i plasmaglukos över tid inom de båda kontinuerliga glukosinfusionerna (7 eller 10 mmol/l).



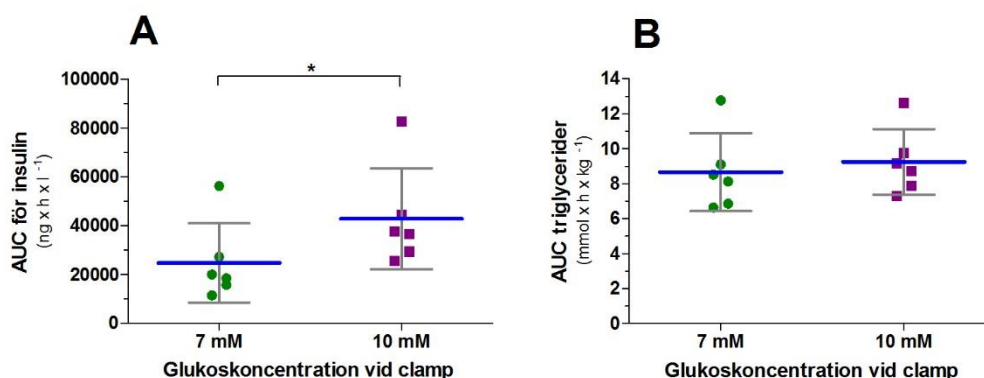
Figur 3. *Hyperbolt samband mellan hästarnas betacellsrespons (ng/l) och deras insulinkänslighet (M/I-kvot; [$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$]/[ng/l]).*

Relationen mellan insulinkänsligheten (M/I-kvot; [$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$]/[ng/l]) och betacellsresponsen (ng/l) visas i figur 3. Sambandet var hyperbolt, d.v.s. det kunde beskrivas enligt modellen: $\log(\text{betacellsrespons}) = \text{konstant} + \text{faktor} \cdot \log(\text{M/I-kvoten})$ ($r^2 = 0,96$).



Figur 4. Graf A och B visar geometriska medelvärden \pm (CI) av plasmainsulin (ng/l) respektive medelvärden \pm (SD) av serumtriglycerider (mmol/l) över tid (h) för kontinuerlig glukosinfusion med två olika målkoncentrationer för plasmaglukos. Gröna cirklar visar data för kontinuerlig glukosinfusion vid 7 mmol/l plasmaglukoskoncentration och lila fyrkanter visar data för kontinuerlig glukosinfusion vid 10 mmol/l plasmaglukoskoncentration. I graf A visar olika bokstäver signifikanta ($P < 0,05$) skillnader mellan glukosinfusion 7 och 10 mmol/l samt i tidpunkterna. För graf B visar olika bokstäver att det föreligger skillnad i tid ($P < 0,05$).

Resultaten för undersökning av plasmainsulin och serumtriglycerider från 0 – 36 timmar vid kontinuerlig glukosinfusion med en konstant plasmaglukoskoncentration vid två olika målkoncentrationer (7 och 10 mmol/l) redovisas i figur 4A respektive 4B. Det förelåg en effekt av tid ($P < 0,001$) och en effekt av plasmaglukoskoncentration (7 eller 10 mmol/l) ($P < 0,01$) samt en interaktion mellan plasmaglukoskoncentration och tid ($P = 0,0013$). För serumtriglyceriderna fanns en effekt av tid ($P < 0,001$) men ingen effekt av den kontinuerliga glukosinfusionens målkoncentration för olika plasmaglukoskoncentrationer ($P = 0,66$) eller effekt av interaktion mellan tid och vid olika plasmaglukoskoncentrationer ($P = 0,19$).

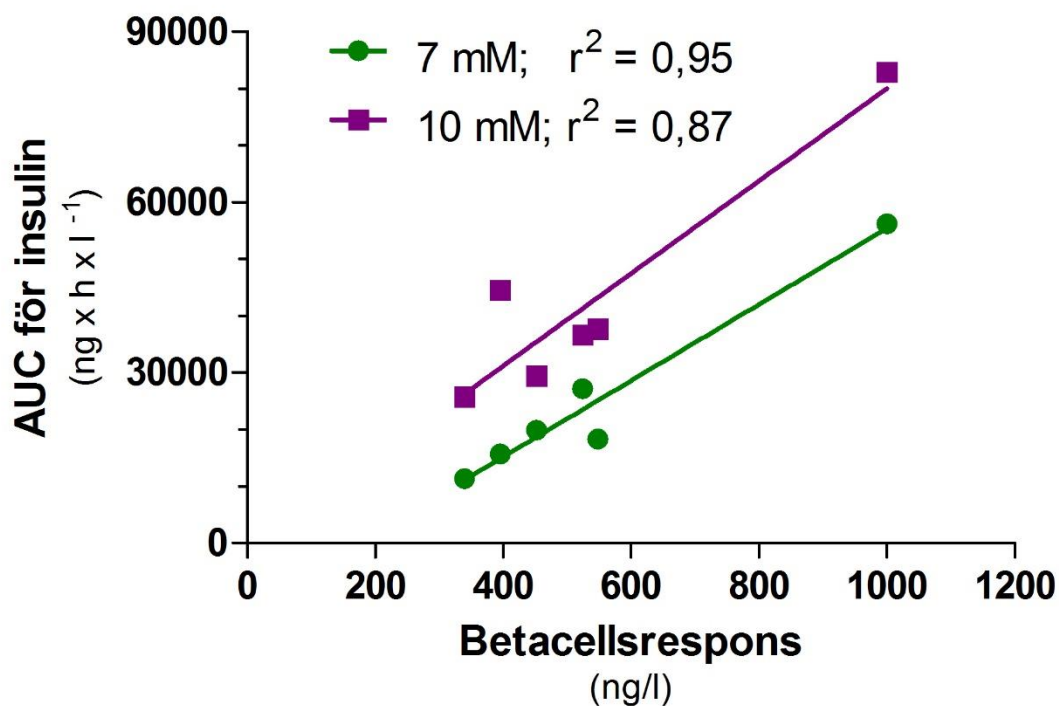


Figur 5. Figuren 5A visar arean under kurvan (AUC) för plasmainsulin mellan 2-36 timmar. 5B visar arean under kurvan (AUC) för triglycerider mellan 2-36 timmar. De individuella hästarna är utmärkta med gröna cirklar för kontinuerlig glukosinfusion vid 7 mmol/l plasmaglukoskoncentration och lila fyrkanter vid 10 mmol/l. Den blå linjen representerar medelvärdet och den grå linjen visar SD.

Arean under kurvan (AUC) för plasmainsulinkoncentrationen under tidsperioden 2-36 timmar för kontinuerlig glukosinfusion med konstant plasmaglukoskoncentration vid 7 mmol/l och 10 mmol/l redovisas i figur 5A. AUC för plasmainsulin är ett mått på insulinresponsen och motsvarar den totala mängd insulin som funnits i den systemiska cirkulationen från timme 2 till 36. En signifikant skillnad i insulinresponsen uttryckt som AUC för plasmainsulin förelåg

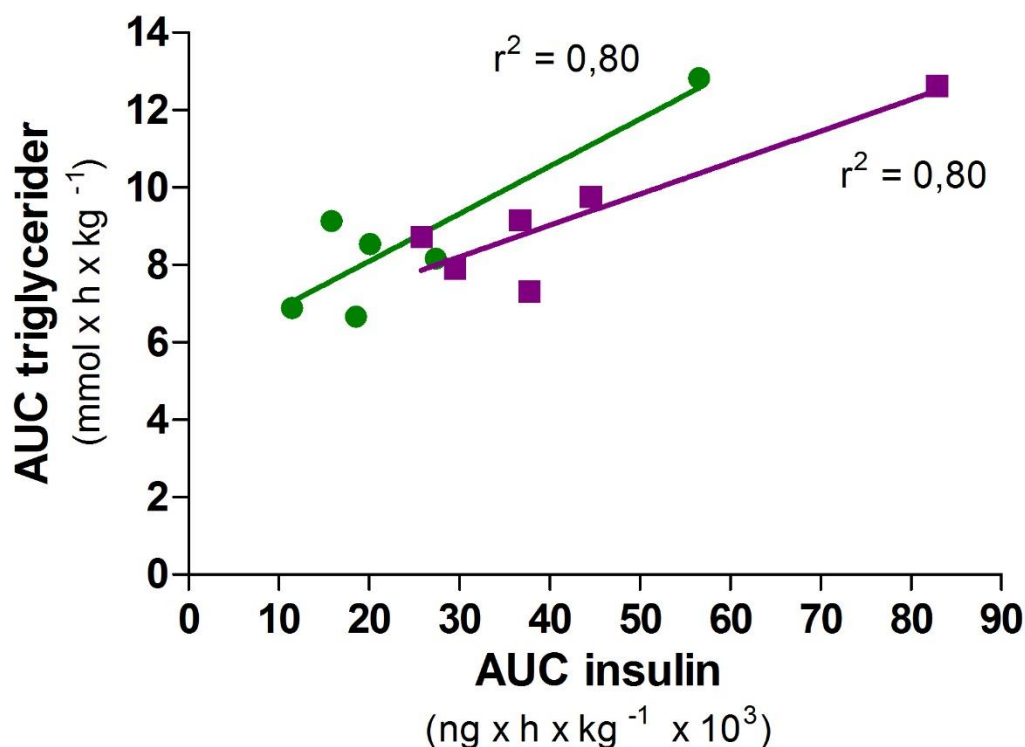
mellan en kontinuerlig glukosinfusion med konstant plasmaglukoskoncentration vid 7 mmol/l jämfört med 10 mmol/l ($P = 0,003$).

Triglyceridresponsen uttryckt som AUC för serumtriglyceriderkoncentrationen under tidsperioden 2 – 36 timmar för kontinuerlig glukosinfusion med konstant koncentration plasmaglukos vid 7 mmol/l och 10 mmol/l redovisas i figur 5B. Det fanns ingen signifikant skillnad i triglyceridresponsen mellan de två målkoncentrationerna för plasmaglukos (7 och 10 mmol/l) ($P = 0,16$). Den kraftigare endogena insulinfrisättningen som erhöles med kontinuerlig glukosinfusion vid 10 mmol/l har således inte sänkt triglyceridkoncentrationen mer än med en konstant plasmaglukoskoncentration vid 7 mmol/l.



Figur 6. Insulinresponsen uttryckt som AUC för tiden 2-36 timmar vid kontinuerlig glukosinfusion med konstant plasmaglukoskoncentration vid 7 respektive 10 mmol/l relaterat till hästarnas betacellsrespons. De individuella hästarna är utmärkta med gröna cirklar för kontinuerlig glukosinfusion vid konstant plasmaglukoskoncentration vid 7 mmol/l och lila fyrkanter vid 10 mmol/l.

Det fanns linjära samband mellan betacellsresponsen och insulinresponsen uttryckt som AUC från de två kontinuerliga glukosinfusionerna under tidsperioden 2-36 timmar, vid plasmaglukoskoncentrationerna 7 och 10 mmol/l ($r^2 = 0,95$ respektive $r^2 = 0,87$) (figur 6). De två linjära regressionslinjerna var parallella med varandra (nollhypotesen om samma lutning kunde inte förkastas, $P = 0,43$). Den endogena insulinresponsen under 34 timmar under en kontinuerlig glukosinfusion vid en konstant plasmaglukoskoncentration vid 7 och 10 mmol/l är alltså starkt relaterad till betacellsresponsen vid den hyperglykemiska clampen.



Figur 7. Grafen visar triglyceridresponsen uttryckt som AUC för serumtriglyceridkoncentrationen över tiden 2 – 36 timmar ($\text{mmol} \times \text{h} \times \text{kg}^{-1}$) i relation till insulinresponsen uttryckt som AUC för plasmainsulin ($\text{ng} \times \text{h} \times \text{kg}^{-1} \times 10^3$) över samma tidsperiod. De individuella hästarna är utmärkta med gröna cirklar för kontinuerlig glukosinfusion vid konstant plasmaglukoskoncentration vid plasmaglukos 7 mmol/l och lila fyrkanter vid plasmaglukoskoncentration 10 mmol/l.

Triglyceridresponsen (AUC för serumtriglyceridkoncentrationen över tid) i relation till insulinresponsen (AUC för plasmainsulin över tid) visas i figur 7. Triglyceridresponsen, uttryckt som AUC för serumtriglyceridkoncentrationen motsvarar den totala mängden triglycerider i blodet under den kontinuerliga glukosinfusionen (2-36 timmar). Triglyceridresponsen ökar proportionerligt med en ökad insulinrespons vid kontinuerlig glukosinfusion vid plasmaglukoskoncentrationerna 7 och 10 mmol/l ($r^2 = 0,80$ respektive $r^2 = 0,80$). De två linjära regressionslinjerna var parallella med varandra (nollhypotesen om samma lutning kunde inte förkastas, $P = 0,18$).

DISKUSSION

Hyperglykemisk clamp

Skillnaden i M-värde och M/I-kvot hos hästarna tyder på en spridning i materialet med avseende på insulinkänslighet. Alltså fanns det en varierande grad av insulinkänslighet hos hästarna som ingick i studien.

Det finns flera olika metoder för att mäta insulinkänslighet hos hästar. I studien användes en hyperglykemisk clamp (HC). En euglykemisk hyperinsulinemisk clamp (EHC) anses vara *the gold standard* för kvantifiering av vävnadens känslighet för insulin (Firshman & Valberg, 2007). Principen för en EHC är att den infusionshastighet för glukos som krävs för att bevara euglykemi är ekvivalent med den mängd glukos som tas upp av vävnaden vid kontinuerlig

infusion av exogent insulin i en standardiserad mängd per tidsenhet. Fördelen med en EHC är att all exogent insulin som administreras är biologiskt aktivt, medan en liten andel av det endogena insulinet som frisätts vid en HC utsöndras som proinsulin, vilket är biologiskt mindre potent än insulin. Vid en HC är utsöndringen av insulin relaterad till patientens betacellsrespons och varierar därför mellan individer medan mängden tillförd exogent insulin vid EHC är lika mellan testade individer. En EHC är därför en säkrare metod som ger ett mer tillförlitligt mått på insulinkänslighet (Rijnen & van der Kolk, 2003). En fördel med HC är att den kan kvantifiera betacellsresponsen till skillnad mot EHC, som inte kan utvärdera betacellernas funktion.

När M/I- kvot används som mått för vävnadens insulinkänslighet under den hyperglykemiska clampen så antar man att hyperglykemin i sig inte ökar glukosupptaget. I den mån det sker så kommer det insulinstimulerade glukosupptaget att överskattas. Modellen förutsätter också att hyperglykemin fullständigt hämmar leverns basala produktion av glukos. Om så inte är fallet så kommer M-värdet att underskatta den totala mängden metaboliserad glukos. Under clampen varierar insulinnivåerna och den matematiska korrigeringen för detta förutsätter ett linjärt förhållande mellan M och I. Användning av en hyperglykemisk clamp för att mäta insulinkänslighet förutsätter också att sjukdomstillståndet inte påverkar det icke-insulinberoende glukosupptaget (DeFronzo *et al.*, 1979).

Tidigare studier på häst har gjorts där man undersökt glukosupptaget vid hyperinsulinemi. I en studie var nivån av GLUT-1 i skelettmuskulaturen förhöjd efter 6 timmars hyperinsulinemi, vilket kan indikera ett ökat icke insulinberoende upptag av glukos från blodet (Suagee *et al.*, 2011). I en annan studie hade dock nivåerna av GLUT-1 i skelettmuskulaturen istället nedreglerats efter 48 timmars hyperinsulinemi, vilket skulle kunna vara ett försök att skydda cellerna från glukotoxicitet i samband med förlängd hyperinsulinemi (de Laat *et al.*, 2015).

Vid en hyperglykemisk clamp stiger förmodligen det icke insulinberoende glukosupptaget via GLUT-1 genom att koncentrationsgradienten mellan plasma och intracellulär koncentration i den icke insulinberoende vävnaden ökar. Det är inte känt hur stor andel av glukosen som tas upp via GLUT-1 vid olika grad av hyperglykemi hos hästar. Eftersom en liten del av den glukos som infunderas vid en hyperglykemisk clamp tas upp via ett ökat icke insulinberoende upptag i vävnaden blir M-värdet något missvisande. Den problematiken är mindre vid kvantifiering av insulinkänsligheten med en EHC då clamp vid euglykemi tillämpas. Även vid en EHC sker ett passivt upptag av glukos av den icke insulinberoende vävnaden, men i lägre grad jämfört med HC.

Hyperbolt samband

Resultaten från studien tyder på att betacellsresponsen är exponentiellt avtagande i förhållande till insulinkänsligheten. Hög insulinkänslighet gav en låg betacellsrespons och låg insulinkänslighet gav en hög betacellsrespons. En sådan relation mellan betacellsresponsen och insulinkänsligheten innebär att hos individer som initialt är känsliga för insulin ger små förändringar i insulinkänsligheten endast små förändringar i betacellsresponsen, medan hos initialt insulinresistenta individer ger små förändringar i insulinkänsligheten kraftiga förändringar i betacellsresponsen. Ökande insulinresistens medför större förändringar i den mängd insulin som frisätts eftersom en ökad koncentration av plasmainsulin krävs för att kompensera för insulinresistensen (kompenserad insulinresistens). Förhållandet mellan insulinkänslighet och betacellsresponsen kan beskrivas som ett hyperbolt samband.

Ett hyperbolt samband mellan insulinsekretion och insulinkänslighet har tidigare beskrivits hos människa. En högre grad av insulinresistens associeras med kraftigare insulinsekretion vid en standardiserad glukosgiva peroralt eller intravenöst och högre insulinkänslighet med lägre

insulinsekretion vid samma glukosgiva hos människa. Eftersom förhållandet är hyperbolt så kommer små förändringar i insulinkänslighet medföra kraftiga förändringar i insulinsekretion när insulinkänsligheten är låg. När insulinkänsligheten är hög så ger istället kraftiga förändringar i insulinkänsligheten endast relativt lindrig höjning av insulinsekretionen (Kahn *et al.*, 1993).

För att bevara normoglykemi måste betacellerna kompensera för perifer insulinresistens med en tillräcklig höjning i insulinsekretion. Kapaciteten hos betacellerna att utsöndra adekvat mängd insulin sjunker när glukosintoleransen förvärras (Malin *et al.*, 2014) och patienten utvecklar så småningom typ 2 diabetes. Det hyperbola förhållandet mellan insulinkänslighet och betacellsresponsen antyder starkt att regleringen av plasmainsulinkoncentrationen och insulinkänsligheten hos vävnaden sker genom ett *negativt feedback*-system (Kahn *et al.*, 1993).

Resultaten från den aktuella studien stödjer teorin om ett hyperbolt samband mellan insulinkänslighet och betacellsrespons föreligger även hos häst. När insulinkänsligheten minskar så sker en kraftigare ökning av betacellsresponsen, så att allt mer insulin frisätts som kompensation för en ökande insulinresistens (kompenserad insulinresistens).

Det hyperbola sambandet mellan insulinkänslighet och betacellsrespons tyder på att hästens förmåga att reglera sin metabolism och bevara normoglykemi vid förändringar i insulinresistensen, som sker t.ex. vid inflammation, stress eller sjukdom, avgörs av dess initiala glukostolerans. En initialt insulinkänslig häst torde kunna få en relativt kraftigt nedsatt insulinkänslighet utan att det relativt sett krävs en särskilt stor kompensatorisk ökning av betacellsresponsen. En individ med låg insulinkänslighet, som utsätts för fysiologisk stress som ytterligare förvärrar insulinresistensen kommer förmodligen att kräva en kraftig ökning av sin betacellsrespons för att upprätthålla metabol homeostas.

Utveckling av tillstånd med störningar i fettmetabolismen som resulterar i förhöjda blodfetter är vanligt förekommande hos ponny (Hughes *et al.*, 2004). Ponnyraser och ferala raser som evolutionärt har anpassats för att leva i miljöer där det finns ont om näringsrik föda anses vara naturligt mer insulinresistenta än hästar (Frank *et al.*, 2010). Detta kan vara ett uttryck för hur det hyperbola sambandet mellan insulinkänsligheten och betacellsresponsen påverkar förmågan att kontrollera fettmetabolismen hos hästar med varierande grad av insulinkänslighet.

Kontinuerlig glukosinfusion

Studien visar att hos kliniskt friska hästar orsakar hyperglykemi en endogen insulinfrisättning, som har triglyceridsänkande effekt. En kontinuerlig glukosinfusion vid en konstant hyperglykemisk plasmaglukoskoncentration, som stimulerar endogen insulinfrisättning medförde dock en lika stor sänkning i koncentrationen triglycerider oberoende av graden av hyperglykemi, trots att plasmainsulinkoncentrationen var signifikant högre vid en högre plasmaglukoskoncentration jämfört med en lägre. Om detta gäller även för kritiskt sjuka hästar under en intensivvårdssituation går det inte att dra några slutsatser kring utifrån den här studien.

Kontinuerlig glukosinfusion vid den kraftigare hyperglykemiska nivån (10 mmol/l) hade en kortare inställelsetid för att nå *steady state* jämför med den lindrigare hyperglykemin (7mmol/l). Skillnaden beror sannolikt på att båda perioderna föregicks av en HC vid 10 mmol/l, varvid den övergick i en kontinuerlig glukosinfusion med bibehållen glukosnivå i det ena fallet (10 mmol/l) och med en sänkt glukosnivå (7 mmol/l) i det andra fallet. Resultaten tyder på en relativt lång adaptationsperiod för att systemet ska balanseras för de nya förutsättningarna och nå *steady state*.

För att skapa en stabil plasmaglukoskoncentration vid en förutbestämd konstant hyperglykemisk nivå krävdes en högre glukosinfusionshastighet vid en högre målkoncentration för plasmaglukos jämfört med en lägre plasmaglukoskoncentration. Glukosinfusionshastigheten förändrades på olika sätt över tid vid olika målkoncentrationer för plasmaglukos. Det varierande behovet av glukostillförsel till systemet för att behålla en konstant plasmaglukoskoncentration skulle kunna förklaras av någon typ av diurnal variation som framträder tydligare vid en högre plasmaglukoskoncentration. Studien har inte närmare undersökt denna variation.

En kontinuerlig glukosinfusion med en konstant plasmaglukoskoncentration vid 10 mmol/l stimulerade en endogen insulinrespons som gav en signifikant högre plasmainsulinkoncentration jämfört med vid 7 mmol/l plasmaglukos. Insulinresponsen (uttryckt som AUC för plasmainsulinkoncentrationen, alltså den totala mängden insulin som fanns i blodet under 2-36 timmar) under den kontinuerliga glukosinfusionen var högre vid en högre (10 mmol/l) konstant plasmaglukoskoncentration jämfört med en lägre (7mmol/l). Insulinresponsen ökade i princip proportionerligt i förhållande till en ökad plasmaglukoskoncentration, vid samma betacellsrespons. Det hyperbola sambandet mellan betacellsresponsen och insulinkänsligheten innebär att den endogena insulinresponsen är helt relaterad till betacellsresponsen och därmed även till insulinkänsligheten. Betacellsresponsen under den hyperglykemiska clampen var starkt relaterad till insulinresponsen under den kontinuerliga glukosinfusionen där blodglukoskoncentrationen hölls på en konstant hyperglykemisk nivå. En kraftigare endogen insulinrespons vid samma konstanta hyperglykemiska plasmaglukoskoncentration tyder följaktligen på att hästen är mer insulinresistent.

Ingen skillnad i koncentration av serumtriglycerider fanns mellan kontinuerlig glukosinfusion vid de olika målkoncentrationerna för plasmaglukos vid de tidpunkter då blodprover för analys av serumtriglycerider togs. Initialt sågs en snabb sänkning av triglyceridkoncentrationen, men efter försökets första 2 timmar steg dessa återigen långsamt under försökets resterande timmar 34 timmar. Dock kvarstår triglyceridkoncentrationen lägre än ursprungsnivån under hela den kontinuerliga glukosinfusionen. Det fanns ingen skillnad i triglyceridresponsen (uttryckt som AUC för serumtriglyceridkoncentrationen under 2- 36 timmar) vid kontinuerlig glukosinfusion vid konstant plasmaglukoskoncentration på olika hyperglykemisk nivå (7 jämfört med 10 mmol/l). Triglyceridresponsen ökade proportionerligt med en ökad insulinrespons vid kontinuerlig glukosinfusion vid plasmaglukoskoncentrationerna 7 och 10 mmol/l. En mer insulinresistent häst fick en kraftigare endogen insulinrespons vid en plasmaglukoskoncentration jämfört med en mer insulinkänslig häst vid samma plasmaglukoskoncentration. Reducerad insulinkänslighet ger följaktligen högre triglyceridrespons. En hög triglyceridrespons innebär bortskaffande av en mindre mängd triglycerider från blodet. Den triglyceridsänkande effekten av behandling med kontinuerlig glukosinfusion vid en konstant plasmaglukoskoncentration var lika stor oberoende av plasmaglukoskoncentrationen vid samma grad av insulinkänslighet. En mer insulinresistent häst har förmodligen svårare att reglera sin fettmetabolism än en mindre insulinresistent individ.

Det fanns ingen skillnad i triglyceridkoncentrationen mellan hästarna vid försökets start och alla hästarna utgick från normala triglyceridkoncentrationer. En av hästarna hade en avvikande insulin- och triglyceridrespons vid kontinuerliga glukosinfusionen jämfört med övriga hästar. Eftersom studien är designad som en *cross over* och samma häst fick likartade avvikande resultat vid repetitiv undersökning är det sannolikt ingen slump, utan ett tillförlitligt resultat som visar på variation i studiepopulationen.

Sjukdom, stress och inflammation

Resultaten från studien tyder på att en lindrig hyperglykemi (7 mmol/l) ger en tillräckligt hög endogen insulinrespons för att reducera triglyceridkoncentrationen i blodet hos kliniskt friska hästar. En kraftig hyperglykemi (10 mmol/l) gav en högre endogen insulinsekretion, men denna hade inte någon ökad triglyceridsänkande effekt. Resultaten talar för att behandling med en kontinuerlig glukosinfusion, som ger en lindrig hyperglykemi har lika god effekt som en kraftig hyperglykemi, om avsikten är att reducera koncentrationen av triglycerider i blodet.

Basal kännedom om hur en frisk häst reagerar på behandlingen är en grundläggande förutsättning för att kunna dra slutsatser om hur behandlingen påverkar en sjuk individ. I den aktuella studien var hästarna kliniskt friska. Deras varierande grad av insulinkänslighet kan illustrera det som sker vid utveckling av insulinresistens, men det går utifrån studien inte att dra några slutsatser kring hur ämnesomsättningen påverkas av en kontinuerlig glukosinfusion hos kritiskt sjuka hästar i en intensivvårdssituation. Stresshormoner och inflammatoriska cytokiner ändrar förutsättningarna i det dynamiska systemet hos sjuka hästar jämfört med hos kliniskt friska individer. I studien av Vick *et al* (2008), som undersökte insulinkänsligheten vid inflammatoriska tillstånd, konstaterades att inflammation påverkar insulinkänsligheten hos vävnaden. En ökad insulinkänslighet konstaterades 6 timmar efter administration av LPS, som kan vara resultatet av ett cytokinstimulerat icke-insulinmedierat glukosupptag. Studien påvisade sedan en reducerad insulinkänslighet vid 24 h efter endotoxinexponering. Det ökade bortskaffandet av glukos från blodet initialt kan vara en del av den tidiga immunresponsen (Vick *et al.*, 2008).

Det finns mycket få publicerade vetenskapliga studier som undersökt effekten av behandling med en kontinuerlig intravenös glukosinfusion vid tillstånd med förhöjda blodfetter hos kritiskt sjuka hästar. I framtiden krävs studier på kritiskt sjuka hästar för att kunna belägga att dessa patienter kan behandlas lika effektivt med en kontinuerlig glukosinfusion som skapar en hyperglykemi kring 7 mmol/l jämfört med den mer vanliga behandlingsstrategin, som eftersträvar en hyperglykemi kring 10 mmol/l. Fördelen med att eftersträva en lägre glukoskoncentration vid behandling med en kontinuerlig glukosinfusion är dels att det praktiskt sett är lättare att styra glukoskoncentrationen i blodet och dels att kostnaden blir lägre eftersom en mindre mängd glukos åtgår. En lägre konstant hyperglykemisk nivå minskar risken för biverkningar av hyperglykemin, som glukotoxicitet, glukosuri och diures.

KONKLUSION

Resultaten från studien tyder på att en lindrig hyperglykemi med plasmaglukos på 7 mmol/l gav en tillräckligt hög endogen insulinfrisättning för att sänka koncentrationen av triglycerider i serum hos kliniskt friska hästar. Det var ingen statistiskt signifikant skillnad i serumtriglyceridkoncentrationen vid en konstant plasmaglukoskoncentration av 7 mmol/l jämfört med 10 mmol/l. Resultatet tyder på att en lindrig hyperglykemi (7 mmol/l) ger en tillräckligt hög endogen insulinrespons för att reducera triglyceridkoncentrationen i blodet hos friska hästar. En kraftig hyperglykemi (10 mmol/l) gav en högre endogen insulinsekretion, men denna hade inte någon ökad triglyceridsänkande effekt. Resultaten talar för att behandling med en kontinuerlig glukosinfusion, som ger en lindrig hyperglykemi har lika god effekt som en kraftig hyperglykemi, om avsikten är att reducera koncentrationen av triglycerider i blodet.

REFERENSER

- Araki, E., and T. Nishikawa, 2010, Oxidative stress: A cause and therapeutic target of diabetic complications: *Journal of Diabetes Investigation*, v. 1, p. 90-96.
- Ayala, I., N. F. Martos, G. Silvan, C. Gutierrez-Panizo, J. G. Clavel, and J. Carlos Illera, 2012, Cortisol, adrenocorticotrophic hormone, serotonin, adrenaline and noradrenaline serum concentrations in relation to disease and stress in the horse: *Research in Veterinary Science*, v. 93, p. 103-107.
- Baron, A. D., G. Brechtel, P. Wallace, and S. V. Edelman, 1988, Rates and tissue sites of non-insulin-mediated and insulin-mediated glucose-uptake in humans: *American Journal of Physiology*, v. 255, p. E769-E774.
- Barton, M. H., Disorders of the Liver, I *Equine internal medicine*, 2010, 3 ed, red. Reed, S. M., Bayly, W. M., Sellon, D. C., s. 939-975, Saunders Elsevier
- Breidenbach, A., H. Fuhrmann, E. Deegen, A. Lindholm, and H. P. Sallmann, 1999, Studies on equine lipid metabolism 2. Lipolytic activities of plasma and tissue lipases in large horses and ponies: *Journal of Veterinary Medicine Series a-Physiology Pathology Clinical Medicine*, v. 46, p. 39-48.
- Buren, J., H. X. Liu, J. Jensen, and J. W. Eriksson, 2002, Dexamethasone impairs insulin signalling and glucose transport by depletion of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B in primary cultured rat adipocytes: *European Journal of Endocrinology*, v. 146, p. 419-429.
- Carrington, E. F., M. Desautels, and J. M. Naylor, 2003, beta-adrenergic stimulated lipolysis in pony adipocytes is exclusively via a beta 2-subtype and is not affected by lactation: *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*, v. 136, p. 311-320.
- Chen, X. P., K. L. Xun, L. D. Chen, and Y. T. Wang, 2009, TNF-alpha, a potent lipid metabolism regulator: *Cell Biochemistry and Function*, v. 27, p. 407-416.
- Coppack, S. W., M. D. Jensen, and J. M. Miles, 1994, In-vivo regulation of lipolysis in humans: *Journal of Lipid Research*, v. 35, p. 177-193.
- de Laat, M. A., C. K. Clement, M. N. Sillence, C. M. McGowan, C. C. Pollitt, and V. A. Lacombe, 2015, The impact of prolonged hyperinsulinaemia on glucose transport in equine skeletal muscle and digital lamellae: *Equine Veterinary Journal*, v. 47, p. 494-501.
- de Laat, M. A., M. N. Sillence, C. M. McGowan, and C. C. Pollitt, 2012, Continuous intravenous infusion of glucose induces endogenous hyperinsulinaemia and lamellar histopathology in Standardbred horses: *Veterinary Journal*, v. 191, p. 317-322.
- Defronzo, R. A., J. D. Tobin, and R. Andres, 1979, Glucose clamp technique - method for quantifying insulin secretion and insulin resistance: *American Journal of Physiology*, v. 237, p. E214-E223.
- Duehlmeier, R., A. Hacker, A. Widdel-Bigdely, W. von Engelhardt, and H.-P. Sallmann, 2010, Insulin stimulates GLUT4 translocation in the semitendinosus muscle of Shetland ponies: *Veterinary Journal*, v. 184, p. 176-181.
- Dunkel, B., and H. C. McKenzie, 2003, Severe hypertriglyceridaemia in clinically ill horses: diagnosis, treatment and outcome: *Equine Veterinary Journal*, v. 35, p. 590-595.
- Durham, A. E., 2006, Clinical application of parenteral nutrition in the treatment of five ponies and one donkey with hyperlipaemia: *Veterinary Record*, v. 158, p. 159-164.
- Durham, A. E., T. J. Phillips, J. P. Walmsley, and J. R. Newton, 2004, Nutritional and clinicopathological effects of post operative parenteral nutrition following small intestinal resection and anastomosis in the mature horse: *Equine Veterinary Journal*, v. 36, p. 390-396.
- Durham, A. E., and A. K. Thiemann, 2015, Nutritional management of hyperlipaemia: *Equine Veterinary Education*, v. 27, p. 482-488.

- Firshman, A. M., and S. J. Valberg, 2007, Factors affecting clinical assessment of insulin sensitivity in horses: *Equine Veterinary Journal*, v. 39, p. 567-575.
- Frank, N., R. J. Geor, S. R. Bailey, A. E. Durham, and P. J. Johnson, 2010, Equine Metabolic Syndrome: *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 24, p. 467-475.
- Frank, N., J. E. Sojka, and M. A. Latour, 2002, Effect of withholding feed on concentration and composition of plasma very low density lipoprotein and serum nonesterified fatty acids in horses: *American Journal of Veterinary Research*, v. 63, p. 1018-1021.
- Frank, N., and E. M. Tadros, 2014, Insulin dysregulation: *Equine Veterinary Journal*, v. 46, p. 103-112.
- Geor, R. J., Aspects of clinical nutrition, I *Equine internal medicine*, 2010, 3 ed, red. Reed, S. M., Bayly, W. M., Sellon, D. C., s. 205-232, Saunders Elsevier
- Han, J. H., H. C. McKenzie, L. J. McCutcheon, and R. J. Geor, 2011, Glucose and insulin dynamics associated with continuous rate infusion of dextrose solution or dextrose solution and insulin in healthy and endotoxin-exposed horses: *American Journal of Veterinary Research*, v. 72, p. 522-529.
- Hillström, A., Jones, B., Ström Holst, B., Strage, E., Tvedten, H., Lilliehöök, I., Falkenö, U., *Kompendium i klinisk kemi*, 2013, Institutionen för kliniska vetenskaper, Sveriges lantbruksuniversitet
- Hughes, K. J., D. R. Hodgson, and A. J. Dart, 2004, Equine hyperlipaemia: A review: *Australian Veterinary Journal*, v. 82, p. 136-142.
- Hurcombe, S. D. A., 2011, Hypothalamic-Pituitary Gland Axis Function and Dysfunction in Horses: *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice*, v. 27, p. 1-+.
- Kaczmarek, K., B. Janicki, and M. Glowska, 2016, Insulin resistance in the horse: a review: *Journal of Applied Animal Research*, v. 44, p. 424-430.
- Kahn, S. E., R. L. Prigeon, D. K. McCulloch, E. J. Boyko, R. N. Bergman, M. W. Schwartz, J. L. Neifing, W. K. Ward, J. C. Beard, J. P. Palmer, and D. Porte, 1993, Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human-subjects - evidence for a hyperbolic function: *Diabetes*, v. 42, p. 1663-1672.
- Kneeland, M. R., H. Aceto, and R. D. Nolen-Walston, 2013, Retrospective analysis of clinical features and prognostic indicators in hypertriglyceridemic adult equids (1997-2011): *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 27, p. 650-651.
- Lunn, P., Horohov, P., The equine immune system, I *Equine internal medicine*, 2010, 3 ed, red. Reed, S. M., Bayly, W. M., Sellon, D. C., s. 2-56, Saunders Elsevier
- Malin, S. K., S. R. Kashyap, J. Hammel, Y. Miyazaki, R. A. DeFronzo, and J. P. Kirwan, 2014, Adjusting Glucose-Stimulated Insulin Secretion for Adipose Insulin Resistance: An Index of beta-Cell Function in Obese Adults: *Diabetes Care*, v. 37, p. 2940-2946.
- MacLeay, J. M., Disorders of the musculoskeletal system, I *Equine internal medicine*, 2010, 3 ed, red. Reed, S. M., Bayly, W. M., Sellon, D. C., s. 488-544, Saunders Elsevier
- McKenzie, H. C., 2011, Equine Hyperlipidemias: *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice*, v. 27, p. 59-+.
- Moore, J. N., and M. L. Vandenplas, 2014, Is it the Systemic Inflammatory Response Syndrome or Endotoxemia in Horses with Colic?: *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice*, v. 30, p. 337-+.
- Nussey, S., Whitehead, S., *Endocrinology: an integrated approach*. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford.
- Rijnen, K., and J. H. van der Kolk, 2003, Determination of reference range values indicative of glucose metabolism and insulin resistance by use of glucose clamp techniques in horses and ponies: *American Journal of Veterinary Research*, v. 64, p. 1260-1264.
- Sanchez, C. L., Disorders of the gastrointestinal system, I *Equine internal medicine*, 2010, 3 ed, red. Reed, S. M., Bayly, W. M., Sellon, D. C., s. 777-938, Saunders Elsevier

- Sjaastad, O. V., O. Sand, and K. Hove, 2010, Physiology of domestic animals: Physiology of domestic animals, p. 804 pp.-804 pp.
- Suagee, J. K., B. A. Corl, M. V. Crisman, J. G. Wearn, L. J. McCutcheon, and R. J. Geor, 2010, De novo fatty acid synthesis and NADPH generation in equine adipose and liver tissue: Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, v. 155, p. 322-326.
- Suagee, J. K., B. A. Corl, M. W. Hulver, L. J. McCutcheon, and R. J. Geor, 2011, Effects of hyperinsulinemia on glucose and lipid transporter expression in insulin-sensitive horses: Domestic Animal Endocrinology, v. 40, p. 173-181.
- Tadros, E. M., and N. Frank, 2012, Effects of continuous or intermittent lipopolysaccharide administration for 48 hours on the systemic inflammatory response in horses: American Journal of Veterinary Research, v. 73, p. 1394-1402.
- Tanti, J.-F., and J. Jager, 2009, Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation: Current Opinion in Pharmacology, v. 9, p. 753-762.
- Toribio, R. E., Disorders of the endocrine system, I *Equine internal medicine*, 2010, 3 ed, red. Reed, S. M., Bayly, W. M., Sellon, D. C., s. 1248-1310, Saunders Elsevier
- Toth, F., N. Frank, S. B. Elliott, R. J. Geor, and R. C. Boston, 2008, Effects of an intravenous endotoxin challenge on glucose and insulin dynamics in horses: American Journal of Veterinary Research, v. 69, p. 82-88.
- Toth, F., N. Frank, R. J. Geor, and R. C. Boston, 2010, Effects of pretreatment with dexamethasone or levothyroxine sodium on endotoxin-induced alterations in glucose and insulin dynamics in horses: American Journal of Veterinary Research, v. 71, p. 60-68.
- Treiber, K. H., R. C. Boston, D. S. Kronfeld, W. B. Staniar, and P. A. Harris, 2005, Insulin resistance and compensation in Thoroughbred weanlings adapted to high-glycemic meals: Journal of Animal Science, v. 83, p. 2357-2364.
- Treiber, K. H., D. S. Kronfeld, T. M. Hess, B. M. Byrd, R. K. Splan, and W. B. Staniar, 2006, Evaluation of genetic and metabolic predispositions and nutritional risk factors for pasture-associated laminitis in ponies: Javma-Journal of the American Veterinary Medical Association, v. 228, p. 1538-1545.
- Vick, M. M., B. A. Murphy, D. R. Sessions, S. E. Reedy, E. L. Kennedy, D. W. Horohov, R. F. Cook, and B. R. Fitzgerald, 2008, Effects of systemic inflammation on insulin sensitivity in horses and inflammatory cytokine expression in adipose tissue: American Journal of Veterinary Research, v. 69, p. 130-139.
- Waite, L. H., and C. K. Cebra, 2009, Characterization of hypertriglyceridemia and response to treatment with insulin in horses, ponies, and donkeys: 44 cases (1995-2005): Javma-Journal of the American Veterinary Medical Association, v. 234, p. 915-919.
- Waller, A. P., T. A. Burns, M. C. Mudge, J. K. Belknap, and V. A. Lacombe, 2011a, Insulin Resistance Selectively Alters Cell-Surface Glucose Transporters but not their Total Protein Expression in Equine Skeletal Muscle: Journal of Veterinary Internal Medicine, v. 25, p. 315-321.
- Waller, A. P., L. Huettner, K. Kohler, and V. A. Lacombe, 2012, Novel link between inflammation and impaired glucose transport during equine insulin resistance: Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 149, p. 208-215.
- Waller, A. P., K. Kohler, T. A. Burns, M. C. Mudge, J. K. Belknap, and V. A. Lacombe, 2011b, Naturally occurring compensated insulin resistance selectively alters glucose transporters in visceral and subcutaneous adipose tissues without change in AS160 activation: Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease, v. 1812, p. 1098-1103.

- Watson, T. D. G., L. Burns, S. Love, C. J. Packard, and J. Shepherd, 1992, Plasma-lipids, lipoproteins and postheparin lipases in ponies with hyperlipemia: *Equine Veterinary Journal*, v. 24, p. 341-346.
- Watson, T. D. G., and S. Love, 1994, Equine hyperlipidemia: Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian, v. 16, p. 89-98.
- Wooldridge, A. A., 2015, Are insulin resistance and sepsis related?: *Equine Veterinary Education*, v. 27, p. 57-58.