



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

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

Påverkan av hyperinsulinemi på kardiovaskulära markörer hos häst

Hanna Edberg

*Uppsala
2016*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2016:20*

Påverkan av hyperinsulinemi på kardiovaskulära markörer hos häst

Effect of hyperinsulinemia on cardiovascular markers in horses

Hanna Edberg

Handledare: *Katarina Nostell, institutionen för kliniska vetenskaper*

Biträdande handledare: *Johan Bröjer, institutionen för kliniska vetenskaper*

Examinator: *Katja Höglund, institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi*

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: *Avancerad nivå, A2E*

Kurskod: EX0736

Utgivningsort: *Uppsala*

Utgivningsår: 2016

Delnummer i serie: *Examensarbete 2016:20*

ISSN: 1652-8697

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

Nyckelord: *insulinresistens, hästar, blodtryck, hjärtfrekvens, hovtemperatur*

Key words: *insulin resistance, horse, blood pressure, heart rate, hoof wall temperature*

Sveriges lantbruksuniversitet

Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Ekvint metabolt syndrom (EMS) hos hästar uppmärksammas allt mer. I EMS ingår insulinresistens som en viktig del av sjukdomen och hästar kan drabbas av fång som följd av sjukdomen. Insulin har förutom metabola effekter även effekter på hjärtkärlsystemet där det är med och reglerar blodtryck, bland annat genom att påverka det perifera kärlmotståndet samt hjärtats kontraktilitet och puls. Hos friska människor ger en insulininfusion ett sänkt medelartärtryck och minskat vaskulärt motstånd. Insulin ger även ett sympatikuspåslag och kan därigenom höja pulsen och aktivera Renin-Angiotensin-Aldosteron-systemet (RAAS). Hos hästar kan en längre tids infusion av insulin ge fång och insulin ger dilatation av hovens kärl. Insulinresistenta människor har ett sämre svar på samma insulinkoncentration och får inte en lika stor blodtryckssänkande och kärldilaterande effekt som friska människor.

Studiens syfte var att se hur hästar med insulinresistens påverkas av en kontinuerlig insulininfusion med avseende på blodtryck, puls och perifer cirkulation. Hypotesen i studien var att insulinresistenta hästar, likt människor, svarar på en insulininfusion med ökad perifer cirkulation och ökad puls samt med ett sänkt blodtryck.

Studien utfördes på 21 stycken patienthästar med diagnostiserad insulinresistens vid ett oralt glukostest i fält. 16 hästar hade haft fång men uppvisade inga symptom på fång vid undersökningstillfället. Hästarna genomgick en euglykemisk hyperinsulinemisk clamp (EHC) med en kontinuerlig insulininfusion (3 mU/kg/min) samtidigt som blodglukosnivån hölls konstant ($5 \text{ mmol/L} \pm 0,2 \text{ mmol/L}$) med en varierande glukosinfusion. Clampen genomfördes under tre timmar. Före och med jämna intervall under insulininfusionen registrerades hovtemperatur, blodtryck och hjärtfrekvens. Blodtryck och hjärtfrekvens registrerades med en ickeinvasiv oscillometrisk teknik och mättes på hästens svans. Resultatet visade att insulininfusionen gav upphov till en signifikant ökad hovtemperatur 15 minuter efter infusionens start och att hovtemperaturen var fortsatt förhöjd i 165 minuter efter infusionens start. Ingen effekt av insulininfusionen på blodtrycket kunde noteras. Hjärtfrekvensen steg signifikant 45 min efter infusionens start och kvarstod signifikant förhöjd till sista mätningen vid 165 min efter start. Insulin- och glukosdata från EHC:n användes för att räkna ut mängden metaboliserat glukos per insulin och tidsenhet (M/I-värde) under *steady state*. Mängden metabolisera glukos (M-värde) var $1,4 \pm 0,44 \text{ mg/kg/min}$. Då hovtemperaturen var konstant innan infusionens start och hästarna stod stilla i sina boxar bedöms temperaturökningen bero på insulininfusionen. Hjärtfrekvensen mättes på ett antal av hästarna dagen innan och var då konstant varför även den ökade hjärtfrekvensen ses som ett resultat av insulininfusionen. Ökningen i hjärtfrekvens kan vara en effekt av den ökade perifera cirkulationen i syfte att upprätthålla blodtrycket. En brist i studien är avsaknad av kontrollgrupp, inga jämförelser har gjorts mot påverkan av insulin hos insulinkänsliga hästar.

En kontinuerlig infusion av insulin gav i denna studie hos insulinresistenta hästar en ökad hovtemperatur, vilket indikerar en ökad perifer cirkulation, och en ökad puls. Ingen förändring i systemiskt blodtryck kunde noteras. Det vore intressant att jämföra resultaten med en population friska hästar.

SUMMARY

Equine metabolic syndrome (EMS) is gaining more and more attention. In EMS the pathogenesis of insulin resistance is an important part. Insulin is a hormone with cardiovascular effects and is involved in adjusting the blood pressure. The effects of insulin on blood pressure works in many ways. In healthy humans insulin reduces the mean arterial pressure by reducing vascular resistance. Insulin also induces sympathetic activation. In horses insulin dilate the hoof vessels in vitro. Insulin-resistant humans have a reduced response to the effects of insulin compared to healthy humans.

The purpose of this study was to measure blood pressure and peripheral vascular circulation in insulin-resistant horses when given a continuous infusion of insulin. The hypothesis was that insulin infusion would induce an increase in heart rate as well as vasodilation, were hoof temperature was used as a marker for vasodilation. The systemic blood pressure was expected to decrease.

21 healthy horses were included in the study. All horses were diagnosed with insulin resistance by an oral glucose test. 16 of the horses had a previous history of laminitis but did not show any signs of acute laminitis on the clinical examination performed before start of the study. A 3-hour euglycaemic hyperinsuliemic clamp (EHC) was performed in all horses where insulin was given intravenously (3 mU/kg/min) with constant blood glucose (5 mmol/L \pm 0,2 mmol/L), maintained by a variable infusion of glucose. Hoof wall temperature was measured every second minute during the EHC. Mean, systolic- and diastolic blood pressure and heart rate were measured before the start of infusion and at 0.45, 1.45 and 2.45 h after the start of infusion, using an indirect high-definition oscillometric monitor (HDO, horse model) applied to the middle of the coccygeal artery. Insulin and glucose data from the EHC were used to calculate the mean rate of glucose disposal per unit of insulin during steady state (M/I ratio). The amount of glucose metabolised (M-value) during the steady state period for the treated horses was 1,4 \pm 0,44 mg/kg/min.

Hoof wall temperature increased significantly after 15 minutes of insulin infusion and stayed increased throughout the infusion. No effect of insulin infusion on blood pressure was observed. The heart rate was significantly increased 45 minutes after the start of the insulin infusion and remained elevated until the last measurement 165 minutes after the start of infusion. The insulin is deemed to be the reason for the increased hoof wall temperature since the temperature was constant before the start of infusion and the horses were standing still in their boxes. The day before the insulin infusion started the heart rate of some of the horses were measured several times and the heart rate did not change, therefore the increased heart rate is expected to be due to the insulin infusion. The increase in heart rate may be a result of the increased peripheral vascular circulation in order to maintain blood pressure.

In conclusion, the results of the present study show that insulin infusion to insulin-resistant horses in this study gave an increased heart rate as well as a increased hoof temperature which is indicating an increased vasodilatation in the hoof. The systemic blood pressure did not change. It would be interesting to compare these results to healthy horses.

INNEHÅLL

Förkortningar	8
INLEDNING.....	9
LITTERATURÖVERSIKT.....	10
Insulinets effekt hos friska individer	10
Effekt av insulininfusion hos friska människor och hästar.....	11
Insulinresistens	12
Insulinresistens och hypertoni hos människa	12
Förändringar i hovtemperatur.....	13
MATERIAL OCH METODER.....	15
Hästar	15
Uppstallning och hantering	15
Eu-glykemisk hyperinsulinemisk clamp, EHC.....	15
Blodtrycksmätning	16
Hovtemperaturmätning	16
Statistisk analys	17
RESULTAT	18
Hjärtfrekvens och blodtryck	18
Hovtemperaturmätning	20
DISKUSSION	21
KONKLUSION	23
REFERENSER.....	24

Förkortningar

ACE	Angiotensinkonverterande enzym
AHR	Alert and hyper responsive
BAR	Bright alert and responsive
BCS	Body condition score
CAR	Calm alert and responsive
CNS	Cresty neck score
DBP	Diastoliskt blodtryck
EHC	Euglycemisk hyperinsulinemisk clamp
EMS	Ekvint metabolt syndrom
G ₁	Glukoskoncentrationen i plasma vid tidsintervallets början
G ₂	Glukoskoncentrationen i plasma vid tidsintervallets slut
GIR	Infusionshastighet av glukos
HF	Hjärtfrekvens
I	Insulinkoncentration i plasma
IL-6	Interleukin 6
LPS	Lipopolysackarider
LSM	Least squares means
M-värde	Mängden metaboliserat glukos
M/I-kvot	Medelglukosförbrukningen per insulinkoncentration i plasma
MAP	Medelartärtryck
NaCl	Natriumklorid
NO	Kväveoxid
PGI ₂	Prostacyklin-2
RAS	Renin-angiotensin system
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-systemet
SBP	Systoliskt blodtryck
SC	Space correction
SD	Standardavvikelse
SE	Standardfel
T	Tidsenhet
TNF	Tumörnekrosfaktor
TNF- α	Tumörnekrosfaktor alfa

INLEDNING

Insulinresistens hos hästar ingår som en del i ekvint metabolt syndrom (EMS), ett syndrom som hos hästar uppmärksammas allt mer. Insulin är ett metabolt hormon men är även ett viktigt hormon för reglering av blodtryck och cirkulation (Muniyappa *et al.*, 2007). Insulin kan fungera både som en vasodilator (kärlvidgande) eller vasokonstriktor (kärlsammandragande) (Polderman *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 1991). I dagsläget vet man väldigt lite om hur insulinresistens påverkar hjärtkärlfunktionen hos hästar.

Metabolt syndrom hos människa innefattar en rad olika symptom, bland annat insulinresistens, hyperinsulinemi, övervikt, dyslipidemi och hypertoni (Eckel *et al.*, 2005; Miranda *et al.*, 2005). Exakt hur sambandet mellan insulinresistens och hypertoni ser ut vet man inte i dagsläget. I studier där man gett insulin i blodet till friska och insulinresistenta människor har man sett att bägge dessa grupper får en sänkning i blodtrycket vilket sannolikt är kopplat till insulinets vasodilaterande effekter (Anderson *et al.*, 1991). I flera av dessa studier har man använt sig av en euglykemisk hyperinsulinemisk clamp (EHC), en metod att kvantifiera insulinkänslighet där man slår ut kroppens egen insulinproduktion genom att ge insulin samtidigt som man håller blodglukosnivån konstant genom att tillföra glukos. Om det krävs mycket glukos för att hålla blodglukosnivån konstant så har individen en god insulinkänslighet medan det hos insulinresistenta individer går åt en mindre mängd glukos. EHC används idag för att kvantifiera insulinresistens hos häst men vi vet inte om blodtrycket påverkas på samma sätt som hos människa när man tillför insulin. Vi vet inte heller hur det påverkar den perifera vasodilatationen.

Studiens syfte är att se hur hästar med insulinresistens påverkas av en kontinuerlig insulininfusion med avseende på blodtryck, puls och perifer cirkulation. Hypotesen i studien är att insulinresistenta hästar, likt människor, svarar på en insulininfusion med ökad perifer cirkulation och ökad puls samt med ett sänkt blodtryck.

Detta examensarbete inleds med en litteraturstudie som syftar till att ge en övergripande inblick i hur insulin påverkar kärlsystemet med utgångspunkt ur ett humant perspektiv. När presenterad fakta gäller studier på hästar eller andra djurslag kommer detta anges.

LITTERATURÖVERSIKT

Insulin verkar som ett metabolt hormon och utsöndras efter en måltid när glukosnivån i blodet stiger. Det verkar för att bygga upp kroppen genom att stimulera till metabolism av proteiner, fetter och kolhydrater. Insulin har till exempel den viktiga funktionen att öka upptaget av glukos i cellerna och stimulerar levern att syntetisera glykogen och minska återbildningen av glukos. På det sättet hjälper det till att hålla blodsockernivån konstant (Sjaastad *et al.*, 2010). Förutom dess effekter som ett metabolt hormon har insulin visats ha flera andra funktioner. Bland annat är insulin med och reglerar blodtrycket genom att påverka resistensen i det perifera kärlsystemet (Muniyappa *et al.*, 2007).

Insulinets effekt hos friska individer

Insulin ökar glukosupptaget, hjärtminutvolymen och blodgenomströmningen i skelettmuskulatur hos friska människor (Baron & Brechtel, 1993; Baron *et al.*, 1993). Hjärtminutvolymen har visats öka genom att insulin både kan öka slagvolymen och pulsen (Baron *et al.*, 1993). Hjärtfrekvensen stiger genom att insulin ger ett sympatikuspåslag (Siani *et al.*, 1990; Rowe *et al.*, 1981).

Insulin påverkar njuren till att resorbera bland annat natrium och kalium (Stenvinkel *et al.*, 1992; Friedberg *et al.*, 1991; Defronzo *et al.*, 1975). Natrium resorberas genom att framförallt aldosteron men även insulin aktiverar natrium-kaliumpumpen (Ewart & Klip, 1995). Friedberg *et al.* (1991) menar att resorptionen av kalium kan vara en effekt av den hypokalemi som uppstår i blodet vid aktivering av natrium-kaliumpumpen. Vid en längre tids infusion av insulin har Stenvinkel *et al.* (1992) visat att resorptionstakten av jonerna avtar. Trots resorptionen av natrium och kalium som sker i njuren är plasmakoncentrationen av natrium konstant medan koncentrationen av kalium sjunker (Friedberg *et al.*, 1991; Defronzo *et al.*, 1975). Den ökande mängden natrium ger en ökad plasmavolym och ett ökat blodtryck (Muniyappa *et al.*, 2007).

Renin-Angiotensin-Aldosteron-systemet (RAAS) aktiveras normalt vid lågt blodtryck genom ökat sympatikuspåslag, sänkt natriumkoncentration i blodet eller genom att de juxtaglomerulära cellerna i njuren känner av en blodtrycksänkning i arteriolerna. Renin, från de juxtaglomerulära cellerna, startar kaskaden genom att katalysera omvandlingen av angiotensinogen till angiotensin I. Därefter omvandlas angiotensin I till angiotensin II av det angiotensinkonverterande enzymet (ACE) i framförallt lungans endotel. Angiotensin II verkar till att höja blodtrycket genom att bland annat få artärerna att dra ihop sig och öka insöndringen av antidiuretiskt hormon och aldosteron. Aldosteron bidrar i sin tur, som det sista steget i RAAS, till att höja blodtrycket genom att öka sparandet av natrium i njuren (Sjaastad *et al.*, 2010). Förutom att påverka njuren till att spara natrium påverkar insulin RAAS, dels genom att bidra till en ökad effekt av renin och ökad insöndring av angiotensin II och dels genom att ge ett sympatikuspåslag vilket ökar effekten av RAAS (Haenni *et al.*, 2001; Rooney *et al.*, 1991; Trovati *et al.*, 1989; se Perlstein *et al.*, 2007 s. 944; Grassi *et al.*, 1995).

Insulin reglerar det vaskulära motståndet genom att balansera mellan vasodilatation och vasokonstriktion. Insulin verkar vasodilaterande genom att stimulera produktionen av kväveoxid (NO) och prostacyclin (PGI₂) i endotelcellerna (Mollace *et al.*, 2005; Sobrevia *et*

al., 1996; Zeng & Quon, 1996). En mindre produktion av NO har även visats ske i den glatta muskulaturen runt kärlet (Muniyappa *et al.*, 2007). NO gör att den glatta muskulaturen runt kärlet slappnar av och ökar därigenom blodgenomströmningen i vävnaden (Muniyappa *et al.*, 2007; Ignarro *et al.*, 1981). Insulin har visats motverka detta genom att även stimulera till produktion av endothelin-1, vilket ger vasokonstriktion. Även detta hormon har visats utsöndras av endotelcellerna och de glatta muskelcellerna kring kärlet (Levin, 1995). NO tillsammans med prostacyclin motverkar vasokonstriktionen och produktionen av endothelin-1 (Mollace *et al.*, 2005; Levin, 1995). Nettoeffekten vid insulininfusion hos friska människor blir ett sänkt vasculärt motstånd och ökad kapillär blodgenomströmning i skelettmuskulatur (Eggleston *et al.*, 2007; Utriainen *et al.*, 1995; Baron & Brechtel, 1993).

Effekt av insulininfusion hos friska människor och hästar

Det finns studier som visat att en insulininfusion ger ett sänkt medelartärtryck (MAP) (Baron & Brechtel, 1993; Baron *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1991). Dessutom har blodgenomströmningen visats öka i skelettmuskulatur genom ett minskat vasculärt motstånd och blodgenomströmningen är tillsammans med sänkningen i MAP och den ökade hjärtminutvolymen beroende av insulinkoncentrationen i blodet. En högre koncentration av insulin har visats ge en större effekt hos friska människor (Baron & Brechtel, 1993). Effekten av insulin på det vasculära motståndet har hos människa visats börja efter 20 minuters infusion och blodgenomströmningen i skelettmuskulaturen nådde sitt maximum efter ca 100 minuter (Eggleston *et al.*, 2007). Insulin har även visats kunna öka kärldilatationen i de större venerna hos vissa personer (Anderson *et al.*, 1991).

Det finns dock studier som inte visar på en sänkning av MAP och ökad perfusion. Skillnader i form av hur vältränade testpersonerna är, muskelsammansättningen, hur väl blodförsörjda musklerna är samt en individuell endotelfunktion påverkar insulinets effekt (Utriainen *et al.*, 1996; Utriainen *et al.*, 1995). Det tillsammans med hur länge försöken pågår kan vara orsaken till skillnader av insulinets effekt i olika studier enligt Clark *et al.* (2003). En högre koncentration av insulin i blodet hos testpersonerna och längre tid har visats ge en större effekt på MAP och blodperfusionen enligt författarna. En nyare studie har visat att en förhöjd nivå av insulin i blodet, så kallad hyperinsulinemi, gav en högre puls och ett högre systoliskt och diastoliskt blodtryck (Sucharita *et al.*, 2011).

I en studie av Anderson *et al.* (1991) har man visat att en insulininfusion gav förhöjda nivåer av noradrenalin och den sympatiska nervaktiviteteten i skelettmuskulaturen steg. Detta skedde vid låga och höga fysiologiska koncentrationer av insulin. Sympatikuspåslaget skulle även kunna vara ett svar på det minskade vasculära motståndet så att normal blodcirkulation upprätthålls, istället för att vara en direkt effekt av insulin (Baron & Brechtel, 1993).

En längre tids infusion av höga doser insulin kan hos hästar inducera fång (de Laat *et al.*, 2010; Asplin *et al.*, 2007). Det finns indikationer på att infusionen inte har någon påverkan på hjärtfrekvensen medan hovtemperaturen stiger under infusionen innan fånganfallet bryter ut (Asplin *et al.*, 2007). En stigande hovtemperatur har visats indikera att perfusionen i hoven ökar (Hood *et al.*, 2001). Även hyperglykemi med fysiologisk hyperinsulinemi under 48 h har visats ge laminära förändringar i hoven (de Laat *et al.*, 2012a). Insulin har in vitro visats få hovens kärl att dilatera (Venugopal *et al.*, 2014). Berhane *et al.* (2006) har visat att

dilatationen påverkas av NO men även andra ämnen från endotelet är involverade i regleringen av käriltonus. Till exempel har endothelin-1 visats vara en viktig vasokonstriktor även i hovens kärl (Berhane *et al.*, 2006). Men några förändrade nivåer av endothelin-1 och NO i blod från jugularvenen, har inte visats vid insulininfusion (Urschel *et al.*, 2014). Hos hästar som har en akut hyperinsulinemi har man sett ökade nivåer av proinflammatoriska cytokiner, tumörnekrosfaktor (TNF) och interleukin-6 (IL-6) i blodet (Suagee *et al.*, 2011).

Insulinresistens

Insulinresistens innebär ett nedsatt svar på insulinkoncentrationen i blodet (Shanik *et al.*, 2008; Sesti, 2006). Reaven (1995) menar att det är en individuell skillnad på hur väl kroppen tar hand om glukos. Vissa personer är av naturen mer insulinresistenta och möter den sämre upptagningsförmågan av glukos genom att öka insöndringen av insulin, vilket leder till förhöjda insulinkoncentrationer i blodet, så kallad hyperinsulinemi. Cirka 75 % av glukosen metaboliseras i skelettmuskulaturen. En felaktig hantering av glukos kan bidra till utveckling av insulinresistens (Sesti, 2006; Kraus, 1999). Shanik *et al.* (2008) menar att hyperinsulinemi i sig kan leda till att insulinresistens utvecklas.

Insulinresistens hos människa är vanligare hos överviktiga personer men förekommer även hos normalviktiga personer. Fortsätter insulinnivån att ligga högt i blodet kan diabetes mellitus typ 2 utvecklas (Reaven, 2005). Diabetes mellitus typ 2 är definierat som förhöjda blodglukosnivåer vid fasta eller efter glukosbelastning. Ofta är diabetes mellitus typ 2 förknippat med insulinresistens i kombination med en nedsatt produktion av insulin från betacellerna. Det ger förhöjda blodglukosnivåer som anses förvärra sjukdomen (Berne & Fritz, 2014).

Insulinresistens och hypertoni hos människa

Det är vanligt att personer med insulinresistens har hypertoni (Reaven, 2005, Landsberg *et al.*, 2013). Orsaken till varför insulinresistenta personer får hypertoni är i dagsläget inte helt klarlagt och olika mekanismer har diskuterats. Ett ökat sympatikuspåslag, aktivering av RAAS, och endotelcellsdisfunktion har presenterats som möjliga orsaker till förhöjt blodtryck (Landsberg *et al.*, 2013).

Övervikt bidrar till ökad aktivitet av RAAS (Ahmed *et al.*, 2005; Engeli *et al.*, 2005) samt har visat ge ett ökat sympatikuspåslag (Grassi *et al.*, 1995) och då även insulin har visat ge ett sympatikuspåslag (Anderson *et al.*, 1991) bidrar detta till ytterligare aktivering av RAAS. En studie har även visat att RAAS reglering av aldosteron hos överviktiga och insulinresistenta personer inte alltid fungerar normalt. (Bomback & Klemmer, 2009). Ytterligare en bidragande orsak till att insulinresistenta får högt blodtryck kan vara att insulin hos överviktiga och insulinresistenta personer påverkar njuren till en ökad resorption av natrium (Kuroda *et al.*, 1999; Rocchini *et al.*, 1989).

Överviktiga och insulinresistenta människor drabbas ofta av endotelldysfunktion, det vill säga kärlen har en försämrad förmåga att dilatera, vilket leder till minskad genomblödning i skelettmuskulatur (Reaven, 2005; Steinberg *et al.*, 1996; Baron *et al.*, 1993). Detta skulle kunna vara en bidragande orsak till hypertoni (Baron *et al.*, 1993). Orsaken till den minskade vasodilatationen är i dagsläget inte helt fastställd. En del av förklaringen kan vara de förhöjda

halterna av fria fettsyror i blodet som har visats finnas hos överviktiga personer (Groop *et al.*, 1992). Fria fettsyror har visats bidra till ett högre systoliskt blodtryck och högre MAP (Steinberg *et al.*, 1997). Vid kortvarigt höga halter av fria fettsyror har de dessutom visats minska genomblödningen i skelettmuskulatur (Steinberg *et al.*, 2000). Genom att påverka frisättningen av NO från endotelet, har fria fettsyror visats ge en minskad vasodilatation hos insulinkänsliga personer (Tripathy *et al.*, 2003). Samtidigt har både överviktiga och normalviktiga insulinresistenta personer visats ha högre plasmakoncentrationer av endothelin-1 (Caballero, 2003) och en nedsatt funktion av den NO-beroende vasodilatationen (Kim *et al.*, 2006; Panza *et al.*, 1993) vilket också kan förklara en del av den minskade vasodilatationen hos insulinresistenta personer. Även tumörnekrosfaktor alfa (TNF- α) skulle kunna vara en bidragande orsak till onormal kärlfunktion då den har visats vara högre hos personer med regional bukfetma än hos normalviktiga personer (Winkler *et al.*, 1999) och TNF- α bidrar till ökad produktion av endothelin-1 (Kahaleh & Fan, 1997; Hu *et al.*, 1993: se Winkler *et al.*, 1999 s. 208).

Personer med insulinresistens kan behöva upp till tre gånger så höga koncentrationer av insulin i blodet för att få samma ökade blodflöde i skelettmuskulatur som insulinkänsliga (Laakso *et al.*, 1990). Studier där man gett insulinresistenta personer insulininfusion samtidigt som man höll deras blodglukosnivå konstant såg man ingen signifikant sänkning av MAP, det vaskulära motståndet eller någon ändring på hjärtminutvolymen. Inte heller någon ökad mängd noradrenalin har uppmätts (Swan *et al.*, 1997; Baron & Brechtel, 1993). I motsats till de studierna har en nyare studie visat att insulin sänker medelblodtrycket hos personer med högt blodtryck (Heise *et al.*, 1998). Sänkningen skedde hos både insulinkänsliga och insulinresistenta personer men sänkningen var lägre hos de insulinresistenta (Heise *et al.*, 1998). En möjlig förklaring till att resultaten varierar mellan studier kan vara relaterat till att man använt sig av olika doser av insulin. I en studie där man gett olika insulindoser till samma insulinkänsliga hästar såg man att graden av insulinresistens varierade beroende på vilken dos som gavs (Urschel *et al.*, 2014). För att kunna jämföra studier bör de vara gjorda med samma insulindos enligt författarna.

I en studie på hästar som tidigare haft fång såg man att blodtrycket steg under våren i samband med att de blev mer insulinresistenta (Bailey *et al.*, 2008). Blodtryckstegringen kan eventuellt bidra till att insulinresistenta hästar är mer predisponerade för att få fång än insulinkänsliga hästar menar författarna. In vitro har insulin visats dilatera kärlen i hovarna, men kärl som gjorts insulinresistenta dilaterar mindre än normala kärl (Venugopal *et al.*, 2014). I samma riktning pekar resultaten i studier av Gauff *et al.* (2013) och Venugopal *et al.* (2011) som visat att insulin in vitro leder till vasokonstriktion i insulinresistenta kärl i hoven, och ett ökat uttryck av endothelin-1 (Gauff *et al.*, 2013).

Förändringar i hovtemperatur

Förändringar i hovens blodkärl har visats ge en förändring av hovtemperaturen (Menzies-Gow *et al.*, 2005). Hovtemperaturen visades kunna öka genom ökat blodflöde eller ökad diameter av artärerna i samband med endotoxemi efter bukkirurgi (Menzies-Gow *et al.*, 2005). Hovtemperaturen har även visats bero delvis på omgivande temperatur och därför kan det vara svårt att jämföra studier som gjorts i olika omgivningstemperaturer (Hood *et al.*, 2001). Endotoxemi och intag av svart valnöt ökar temperaturen och blodflödet i hoven

(Menzies-Gow *et al.*, 2005; Peroni *et al.*, 2005) medan aminer i blodet, för att simulera överätning av kolhydrater, har visats sänka temperaturen och blodflödet i hoven. Sänkningen skedde utan påverkan på den systemiska cirkulationen (Bailey *et al.*, 2004). Hovtemperaturen har även visats sjunka vid intag av en kolhydratrikdiet i syfte att framkalla fång, men temperaturen återgick till det normala innan hästen utvecklade klinisk fång (Hood *et al.*, 2001).

MATERIAL OCH METODER

Hästar

Studien är godkänd av Uppsala djurförsöksetiska nämnd, Sverige. Hästarna i studien var 21 st patienthästar med tydlig insulinresistens. Inklusionskriterierna var att hästarna hade ett insulinsvar på >1500 ng/L (friska hästar har <400 ng/L, gråzon mellan 400-700 ng/L) vid det orala glukostoleranstest som utförts i fält, hade normala nivåer av ACTH för säsongen (november-juli <7 pmol/L, augusti-oktober <11 pmol/L) samt inga tecken på smärta eller fång.

Uppstallning och hantering

Försöket utfördes vid Universitetsdjursjukhuset (UDS), Uppsala. Hästarna inkom två dagar innan den euglykemiska hyperinsulinemiska clampen (EHC) skulle genomföras för att aklimatisera sig till den nya miljön och minska risken för ett stresspåslag som kunde påverka resultaten. Stallet var en enskild avdelning med plats för fem hästar. Onödigt spring i stallet undveks för att minska stressen för hästarna. Vid försöken var det två till tre hästar i stallet samtidigt. Inga nya hästar flyttades in i stallet efter att patienthästarna flyttats in. Hästarna stod i box med papper som underlag. De hade med sig eget foder och fortsatte på sin tidigare foderstat. Hästarna motionerades i skritt för hand tre till fyra gånger per dag. Tolv timmar innan försöket sattes hästarna på svält med fri tillgång till vatten. En permanentkanyl lades aseptiskt i en av halsvenerna (*Vena jugularis*) vid ankomsten till UDS och en permanentkanyl anlades aseptiskt i den andra halsvenen dagen innan EHC:n. På alla hästarna lades permanentkanylen efter minst 30 min med lokalbedövande kräm¹ över området innehållande lidokain 25 mg/g och prilokain 15 mg/g. Permanentkanylerna spolades med natriumklorid. Innan hemgång graderades hästarna enligt *Body Condition Score* (BCS), skala 1-9, där 1 är extremt avmagrad och 9 är extremt fet samt enligt *Cresty Neck Score* (CNS), skala 0-5, där 0 är inget fett på nackligamenten och 5 är så mycket fett på nackligamentet att mankammen faller åt sidan (Carter *et al.*, 2009; Henneke *et al.*, 1983).

Vid dagen för EHC:n förbereddes hästarna genom att förlängningar sattes på permanentkanylerna, en hovtemperatursensor placerades på hästens hovvägg med tejp och kuffen till blodtrycksmätaren sattes runt svansroten. En muskelbiopsi togs från gluteusmuskulaturen på vänster sida (*Musculus gluteus medius*). Innan muskelbiopsin togs hade hästen stått med lokalbedövande kräm¹ på huden i 30 min innehållande lidokain 25 mg/g och prilokain 15 mg/g. Lokalbedövning² innehållande mepivakain 20 mg/ml injicerades även under huden. Därefter fick hästen vila i 30 minuter innan insulininfusionen påbörjades. Resultatet av muskelbiopsierna redovisas inte i detta examensarbete.

¹Emla, Astra Zeneca, Södertälje, Sverige

²Carbocain, Astra Zeneca, Södertälje, Sverige

Eu-glykemisk hyperinsulinemisk clamp, EHC

EHC anses vara *gold standard* för mätning av insulinresistens. En kontinuerlig infusion av insulin³ 3 mU/kg/min gavs intravenöst samtidigt som en varierande glukosinfusion⁴ gavs för

att hålla konstant blodsocker, sk euglykemi (5 mmol/L \pm 0,2 mmol/L). Insulinet var utspätt till 500 ml med steril koksalt (0,9 % NaCl) och med 5 ml av hästens eget blod. Blodprov togs var femte minut från den permanentkanyl som inte användes för insulin- och glukosinfusion. Efter provtagning flushades permanentkanylen med steril koksaltlösning. Glukosnivån analyserades med två stycken handhållna blodsockermätare⁵. Blodsockermätarnas medelvärde användes som resultat. Om blodsockernivån skilde med mer än 0,3 enheter mellan blodsockermätarna⁵ analyserades provet ytterligare en gång. Glukosinfusionen justerades om blodsockernivån avvek >0,2 mmol/l från euglykemi. Insulininfusionen skedde under 3 h. Under hela infusionstiden stod hästen uppbunden i sin box.

Blodtrycksmätning

Blodtrycksmätningen utfördes med The Memo Diagnostic High Definition Oscillometry Monitor⁶, (hästmodell 1.35.00, S+B medVET GmbH, Babenhausen, Tyskland). Den mäter med en ickeinvasiv oscillometrisk teknik, har en automatiskt uppblåsbar kuff och är utprovad för häst (Tuensmeyer *et al.*, 2015; Soder *et al.*, 2012). Apparaten noterades vid varje mätning hjärtfrekvens (HF), medelartärtryck (MAP), systoliskt (SBP) och diastoliskt blodtryck (DBP). Kuffen (8 cm bred) satt runt svansroten och dess position och hur hårt den satt runt svansroten noterades och kontrollerades inför varje mätningstillfälle. Mätningen utfördes före EHC:n, 45 min, 1 h 45 min samt 2 h och 45 min efter starten av infusionen. Vid varje mätningstillfälle upprepades mätningarna sex gånger. Innan mätningarna noterades utfördes mätningen några gånger så att hästen skulle vänja sig. Hästens stressnivå bedömdes subjektivt vid varje mätning. Tre nivåer användes, *calm alert and responsive* (CAR), *bright alert and responsive* (BAR) samt *alert and hyper responsive* (AHR).

Hovtemperaturmätning

Mätningen av hovtemperatur används som ett mått på förändring av den perifera cirkulationen. Hovtemperaturen mättes med en sensor⁷ kopplad till en datauppsamlare⁸ (mätosäkerhet \pm 0,35°C) och mätvärdena fördes senare över till ett datorprogram⁹. . Temperaturen registrerades på hästens ena framhov genom att en temperatursensor tejpades fast direkt nedanför kronranden. Sensorerna sattes på ca 50 minuter innan infusionens start för att tillåta hovtemperaturen att stabilisera sig efter omgivningstemperaturen. Värdet registrerades varannan minut genom försöket. Samtidigt registrerades omgivningstemperaturen⁸ i hästens box. Utrustningen har tidigare använts för mätning av hovtemperatur på häst (de Laat *et al.*, 2010, de Laat *et al.*, 2012b)

³Humulin regular, Eli Lilly Sweden AB, Solna, Sverige

⁴Glucose, Fresenius kab AB, Uppsala, Sverige

⁵Accu-chek aviva, Roche Diagnostics Scandinavia AB, Bromma, Sverige

⁶MD, S + B medVetGmbH, Babenhausen, Tyskland

⁷PB-5003, Intab, Stenkullen, Sverige

⁸Tinytag, Intab, Stenkullen, Sverige

⁹Easyview, Intab, Stenkullen, Sverige

Statistisk analys

De statistiska analyserna genomfördes med ett kommersiellt statistikprogram¹⁰. Medelvärden±standardavvikelse (SD) räknades ut för SBP, MAP, DBP och HF. Om det första värdet var högre än det efterföljande, med avseende på SBP, togs den mätningen bort. Mätningen togs även bort om den skilde >20 %, med avseende på SBP, från medeltrycket enligt riktlinjer för hund och katt (Brown *et al.*, 2007). Rent avvikande orimliga värden togs också bort. Ett medelvärde±SD räknades ut på övriga värden individuellt för varje häst och tidpunkt. Mixed model med upprepad mätning och Tukey-Kramer som post-hoc test användes för att jämföra medelvärdena vid de olika tidpunkterna med tidpunkt och stressnivå som kovariat och individ som en varierande effekt. Resultaten för analyserna av mixed model anges som *least square means* (LSM)±standardfel (SE). En stegvis multivariatanalys utfördes för att utvärdera vad som kunde förklara hjärtfrekvensen. Från början togs kovariaten tid, BCS, CNS, ålder, M/I-kvot, vikt, ras, kön, SBP, MAP, DBP, HF, insulinkoncentration samt om de haft fång eller inte fång med som fast kovariat. Individ sattes som varierande kovariat. De variabler med högst p-värde togs bort stegvis tills alla kvarvarande hade $p < 0,05$. Inga interaktioner analyserades i modellen. R^2 anger hur mycket de kvarvarande kovariaten förklarar av modellen. Högsta nivå för signifikans sattes till $p = 0,05$.

Hovtemperaturen vid varje kvart analyserades med mixed model för upprepade mätningar, med rumstemperaturen och tid som ett fast kovariat, häst som varierande kovariat och tid som faktor för upprepad mätning. Tukey-Kramer användes som post-hoc test. Rumstemperaturen vid varje kvart analyserades med mixed model för upprepade mätningar, med tid som ett fast kovariat, häst som varierande kovariat och tid som faktor för upprepad mätning. Tukey-Kramer användes som post-hoc test. En stegvis multivariatanalys utfördes också för att utvärdera vad som kunde förklara hovtemperaturen. Resultaten för analyserna av mixed model anges som LSM±SE. Från början togs kovariaten tid, BCS, CNS, ålder, M/I-kvot, vikt, ras, kön, SBP, MAP, DBP, HF, insulinkoncentration samt om de haft fång eller inte fång med som fast kovariat. Individ sattes som varierande kovariat. De variabler med högst p-värde togs bort stegvis tills alla kvarvarande hade $p < 0,05$. Inga interaktioner analyserades i modellen. R^2 anger hur mycket de kvarvarande kovariaten förklarar av modellen. Högsta nivå för signifikans sattes till $p = 0,05$.

För att mäta individernas insulinkänslighet användes M/I-kvoten. Det är mängden metaboliserat glukos (M) per insulinkoncentration i plasma (I). M/I-kvoten räknas fram under EHC:n. Efter 120 minuter som är en inställningsperiod för att uppnå en stabil blodglukosnivå, sker beräkningarna de sista 60 minuterna, under sk *steady state*, i EHC:n. M-värdet är ett medelvärde av sex M-värden som beräknas per 10 minutersperiod. Mängden metaboliserat glukos (M) är infusionshastigheten av glukos (GIR) minus *space correction* (SC). SC är en korrigering för det glukos som tillförs eller försvinner från den extracellulära volymen på annat sätt än genom glukosmetabolismen. SC beräknas genom formeln:

$SC = (G_2 - G_1) \times 0,19/T$, där G_1 = glukoskoncentrationen i plasma vid tidsintervallets början, G_2 = glukoskoncentrationen i plasma vid tidsintervallets slut, T = tidsintervallet (10 min)

En M/I-kvot beräknas för varje 20 minutersintervall med insulinkoncentrationen i plasma för samma intervall. M/I-kvoten är sedan medelvärdet av de tre M/I-kvoterna under *steady state*.

Gränsvärde för att räknas som insulinresistent var ett M-värde <2 mg/kg/min, 2-4 mg/kg/min räknas som intermediärt insulinkänslig och >4 mg/kg/min räknas som insulinkänslig (Nostell, pers. medd., 2015)

¹⁰JMP Pro 12.0.1, SAS Institute Inc, Cary, NC

RESULTAT

Följande raser var representerade bland hästarna; islandshäst (10 st), halvblod (2 st), norsk fjordhäst (2 st), minishetlandspionny (2 st), korsningsponny (1 st), korsningshäst (1 st), welsh cob (1 st), highlandponny (1 st) och svensk ridponny (1 st). Fem av hästarna var valacker och 16 var ston. Hästarnas medelålder var 14±5 år (5-22 år). Body Condition Score (BCS) var 6,9±1,1 (5,5-9) och Cresty Neck Score (CNS) 3,7±0,6 (2,5-5). Medelvikten±SD var 405±123 kg (124-608 kg). Ingen av hästarna hade tecken på fång vid undersökningen inför EHC men 16 individer hade haft fång tidigare. Den genomsnittliga mängden metaboliserat glukos per insulinenhet (M/I-kvoten) hos hästarna var 1,9±1,1 (0,64-5,7) [mg/kg/min x 10³]/[mU/L]. M-värdet var 1,4±0,44 (0,78-2,7) mg/kg/min.

Hjärtfrekvens och blodtryck

Hos två av hästarna kunde mätningen av blodtryck och hjärtfrekvens ej utföras då hästarna blev alltför stressade. Vid mätningen hos en av hästarna gick mätinstrumentet sönder och mätningen ströks. Majoriteten av hästarna upplevdes som lugna, de flesta av dem som var stressade i början lugnade ner sig under EHC:n (tabell 1).

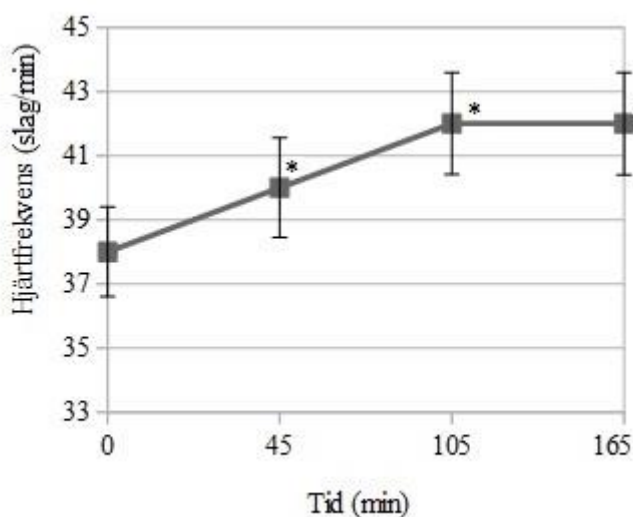
Tabell 1. Stressnivå i samband med blodtrycksmätningarna: före insulininfusionen samt vid 45, 105 respektive 165 min efter insulininfusionens start, i samband med blodtrycksmätning. CAR=calm alert and responsive, BAR= bright alert and responsive, AHR=alert and hyper responsive, N=18

Stressnivå	Tidpunkt (min)			
	0	45	105	165
CAR	9	16	17	17
BAR	9	2	1	1
AHR	0	0	0	0

Medelhjärtfrekvensen var 38±1 slag/min innan insulininfusionen och steg under insulininfusionen. Medelhjärtfrekvensen var signifikant skild från initialmätningen efter 45 minuter och under resten av EHC (p<0,0001, figur 1). Minishetlandspionnyen hade signifikant högre medelhjärtfrekvens under hela mätningen än övriga raser (p<0,0001, tabell 3). Det systoliska blodtrycket (SBP), DBP och MAP var 114±4 mmHG, 67±3 mmHG respektive 86±3 mmHG innan insulininfusionen, någon signifikant förändring i dessa parametrar sågs inte under insulininfusionen (tabell 2).

Tabell 2. Systoliskt- (SBP), diastoliskt- (DBP) och medelartärblodtryck (MAP) före insulininfusionen samt vid 45, 105 respektive 165 min efter insulininfusionens start, N=18

Mätparameter		Tidpunkt (min)				p-värde
		0	45	105	165	
SBP	LSM	114	113	110	113	p<0,64
	SE	4	4	5	5	
MAP	LSM	86	87	86	85	p<0,87
	SE	3	4	4	4	
DBP	LSM	67	70	69	68	p<0,57
	SE	3	3	4	4	



Figur 1. Hjärtfrekvens (LSM±SE) före och under tre timmars EHC, *signifikant skild från initialvärdet, p<0,0001. N=18.

Tabell 3. Medelvärdet för hjärtfrekvens (slag/min) ±SE *signifikant skild från övriga raser p<0,0001

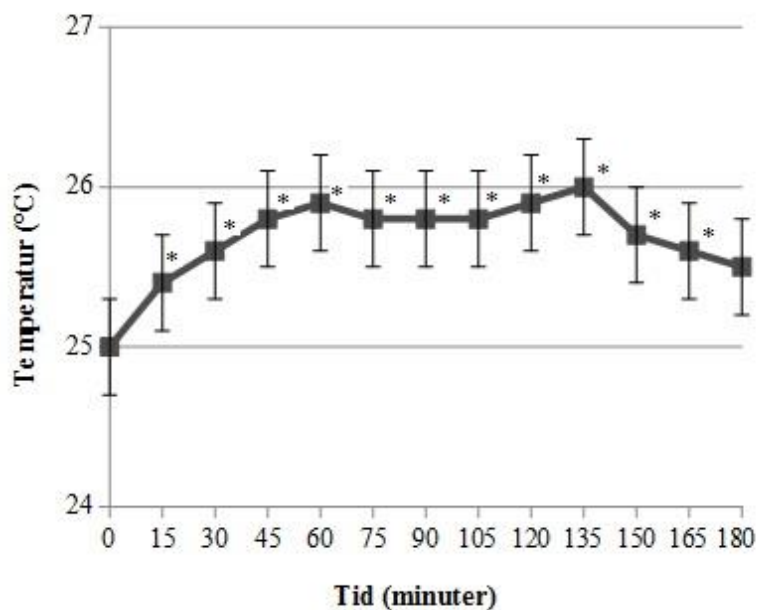
Ras	N	Hjärtfrekvens (slag/min)	
		LSM	SE
Halvblodshäst	1	35	2
Islandshäst	10	37	1
Welsh cob	1	35	2
Svensk ridponny	1	33	2
Norsk fjordhäst	2	39	2
Minishetlandspanny	1	52*	2
Highlandponny	1	36	2
Korsningsponny	1	32	2

Av de 14 kovariat som var med från början var tre signifikanta i multivariatanalysen för att förklara hjärtfrekvensen. Analysen visade att ålder ($p < 0,04$), stressnivå ($p < 0,04$) och insulinkoncentrationen i blodet ($p < 0,0001$) under EHC var signifikant bidragande till hjärtfrekvensen. R^2 för den slutliga modellen var 0,90. Residualerna var normalfördelade. Ökande ålder bidrog till sänkt hjärtfrekvens medan ökande stressnivå och insulinkoncentration i blodet bidrog till en högre hjärtfrekvens.

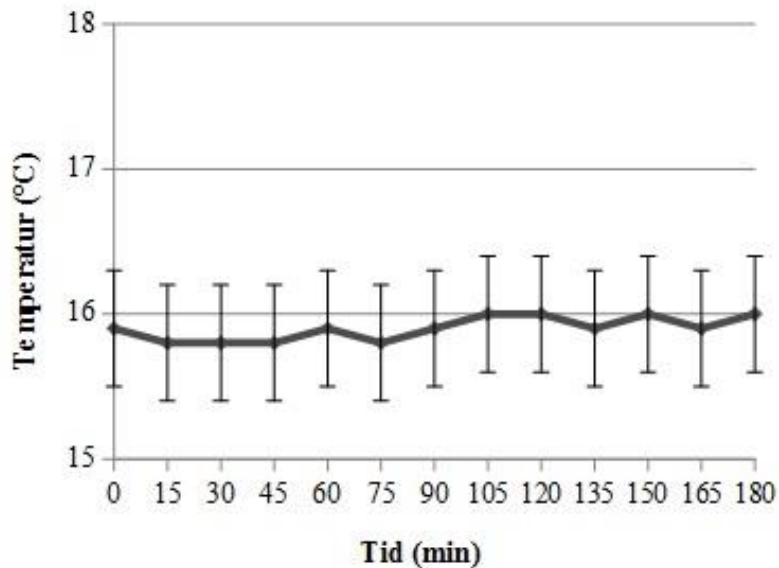
Hovtemperaturmätning

Hos två av hästarna kunde inte hovtemperaturen registreras på grund av fel på mätinstrumentet och hos en häst utfördes inte mätningen på grund av stor risk att hästen skulle skada utrustningen. Mätningarna togs bort för en av hästarna pga att drag i stallet gett helt felaktiga värden.

Hovtemperaturen ökade signifikant från initialvärdet före insulininfusionen 15 minuter in i EHC och var fortsatt förhöjd till 165 minuter in i EHC:n ($p < 0,0001$), (figur 2). Rumstemperaturen förändrades inte under försöket, (figur 3).



Figur 2. Hovtemperatur ($LSM \pm SE$) före och under tre timmars EHC, *signifikant skild från initialvärdet, $p < 0,0001$, $N = 17$.



Figur 3. Rumstemperatur (LSM±SE) före och under tre timmars EHC, $p < 0,5$.

Av de 14 kovariaten som ingick i multivariatanalysen för att förklara hovtemperaturen var fyra signifikanta. Multivariatanalysen visade att BCS ($p=0,0009$), vikt ($p=0,0002$), ras ($p=0,0017$) samt insulinkoncentrationen i blodet ($p < 0,0001$) under EHC var signifikant bidragande till hovtemperaturen. Raserna halvblodshäst ($p=0,0002$), islandshäst ($p=0,0006$), norsk fjordhäst ($p=0,0083$) och minishetlandspöny ($p=0,0006$) påverkade hovtemperaturen men inte korsningshäst ($p < 0,21$), R^2 för den slutliga modellen var 0,88. Residualerna var normalfördelade. Högre BCS, insulinkoncentration samt raserna halvblodshäst och norsk fjordhäst bidrog till en ökad hovtemperatur medan högre vikt samt raserna minishetlandspöny och islandshäst bidrog till en sänkt hovtemperatur.

DISKUSSION

Denna studie visar att insulinresistenta hästar som utsätts för en insulininfusion visar tecken på en ökad vasodilatation i form av ökad hovtemperatur. Detta stämmer överens med vad man funnit hos insulinresistenta och friska människor samt in vitro på friska hästar (Venugopal *et al.*, 2014; Baron & Brechtel, 1993; Laakso *et al.*, 1990). En tidigare studie in vivo på friska hästar har också visat att hovtemperaturen stiger vid insulininfusion (Asplin *et al.*, 2007).

Andra tänkbara orsaker till ökad hovtemperatur än insulin är t ex ökad rörelse eller varmare omgivningstemperatur men det bedöms som osannolikt då hästen stod uppbunden i sin box under insulininfusionen och omgivningstemperaturen förändrades inte under tiden. Omgivningstemperaturen togs dessutom med som variabel i de statistiska analyserna för hovtemperaturen.

På människa har man sett en vasodilaterande effekt av insulin efter 20 minuters infusion och den största vasodilaterande effekten efter 100 minuters insulininfusion (Eggleston *et al.*, 2007), det stämmer ganska väl överens med våra resultat där hovtemperaturen steg vid 15 minuter och låg som högst efter 135 minuter. På människa har en insulininfusion gett en ökad perifer cirkulation under 240 minuter (Laakso *et al.*, 1990). Så var inte fallet i vår studie, istället sjönk hovtemperaturen på slutet. En möjliga orsak till det kan vara fysiologiska

skillnader på insulinsvaret hos människa och häst, hos häst minskar kanske den kärldilaterande effekten med tiden. Att en sänkt omgivningstemperatur skulle gett hovtemperatursänkningen bedöms som mindre trolig då rumstemperaturen steg något, ej signifikant, på slutet. Skillnader i blodets insulinkoncentration och infusionshastighet av insulinet mellan nämnda studier och vår studie kan vara andra orsaker till de olika resultaten, då detta tidigare har visats ha effekt på graden av insulinresistens och därmed kan påverka studiens resultat (Urschel *et al.*, 2014). Laakso *et al.* (1990) visade även att insulinresistenta individer behövde högre insulinkoncentration i blodet för att uppnå samma effekt på den perifera cirkulationen, parallellt till det kan inte dras i vår studie eftersom vi enbart hade insulinresistenta hästar. In vitro har insulin visats ha vasodilaterande effekt på insulinkänsliga hästars kärl i hovarna (Wooldridge *et al.*, 2014). En studie in vivo på insulinkänsliga hästar skulle kunna visa eventuella skillnader eller likheter med resultaten i vår studie.

Resultatet av multivariatanalysen på hovtemperaturen ska tolkas med försiktighet eftersom alla kovariaten som är signifikanta är beroende av varandra. Rasskillnaden skulle lika väl kunna bero på viktskillnad, och vikt och BCS samt ras och BCS hänger ihop. Det försvåras ytterligare av att vikten och vissa raser bidrog till sänkt hovtemperatur medan BCS och några andra raser bidrog till ökad hovtemperatur. Dessutom är antalet raser och antalet individer av varje ras lågt. Därför är det svårt att dra några slutsatser om hur dessa egentligen påverkar hovtemperaturen och vilken som är viktigast. Det kan innebära att det enbart är BCS och insulinkoncentrationen i blodet som har betydelse för hovtemperaturförändringen. Att insulinkoncentrationen bidrog till ökad hovtemperatur styrker att förändringen i hovtemperatur är relaterad till insulinkänsligheten. En studie med fler individer krävs för att säkert dra dessa slutsatser.

Tidigare studier på människa (Baron & Brechtel, 1993; Baron *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1991) har visat på sänkt blodtryck i samband med ökad perifer vasodilatation vid insulingiva, något som inte har visats i denna studie. Det kan förklaras av att pulsen steg hos hästarna vilket ökar hjärtminutvolymen och gör att tillräcklig cirkulation upprätthålls utan att blodtrycket stiger. Det är i likhet med tidigare studie på människa där hjärtfrekvensen steg vid insulininfusion (Sucharita *et al.*, 2011). Hjärtfrekvensökningen kan också förklaras med att insulin ger ett sympatikuspåslag med ökad mängd adrenalin (Anderson *et al.*, 1991) men det kan ej styrkas i denna studie då adrenalin inte analyserades. Stress skulle kunna vara en orsak till förhöjd hjärtfrekvens då även stress leder till ett sympatikuspåslag, men det bedöms som mindre troligt då hästarnas stressnivå bedömdes vid blodtrycks- och hjärtfrekvensmätning och de visade en sjunkande stressnivå. Ökningen av hjärtfrekvensen uppmättes vid första mätningen som skedde efter 45 min (figur 3), en tidigare studie på hund har visat effekt efter 10 minuter (Liang *et al.*, 1982) och på människa efter 6-15 minuter (Giugliano *et al.*, 1997; Mogensen *et al.*, 1980). En studie visade ingen förändring av hjärtfrekvensen, där var dock insulinkoncentrationen lägre än i vår studie och den var utförd på friska människor (Airaksinen *et al.*, 1985). För att säkerställa när förändringen i hjärtfrekvens kommer på bör mätning av hjärtfrekvens ske med ett tätare intervall.

Multivariatanalysen av hjärtfrekvensen visade att insulinkoncentrationen i blodet bidrog till ökad hjärtfrekvens och det stärker sambandet att det är insulinets effekt som ger en ökad hjärtfrekvens.

Att minishetlandponnyn hade högre hjärtfrekvens i studien än övriga raser bör tolkas med försiktighet då det endast är värdet från en häst, det skulle kunna ligga högre av slumpen. Även de andra hästraserna har väldigt få individer. Det är dock en intressant iakttagelse och fler studier på hur hjärtfrekvensen varierar hos olika raser och storlekar på hästar vore önskvärt.

En begränsning med denna studie är frånvaron av kontrollgrupp men hovtemperaturen kontrollerades under en period innan försöket och var då konstant och blodtrycket kontrollerades för några hästar dagen innan EHC och de värdena skiljer sig inte från de på morgonen innan starten av EHC.

Resultaten i vår studie kan vara en länk i förklaringen till varför insulinresistens leder till fång då ökat blodflöde i hoven kan förekomma vid akut fång (Wongaumnuaykul *et al.*, 2006; Trout *et al.*, 1990).

Sammanfattningsvis kan studiens hypoteser att insulininfusion leder till ökad perifer cirkulation och ökad hjärtfrekvens hos insulinresistenta hästar bekräftas. Hypotesen avseende ett sänkt blodtryck kunde inte bekräftas då ingen förändring noterades.

KONKLUSION

En kontinuerlig infusion av insulin gav i denna studie hos insulinresistenta hästar en ökad hovtemperatur, vilket indikerar en ökad perifer cirkulation, och en ökad puls. Ingen förändring i systemiskt blodtryck kunde noteras. En studie med ett större antal individer behövs för att säkert visa på vilket sätt vikt, ras, BCS och insulinkoncentrationen i blodet är bidragande till förändringen i hovtemperatur.

REFERENSER

- Ahmed, S.B., Fisher, N.D.L., Stevanovic, R. & Hollenberg, N.K. (2005). Body mass index and angiotensin-dependent control of the renal circulation in healthy humans. *Hypertension*, 46(6):1316-1320.
- Airaksinen, J., Lahtela, J.T., Ikaheimo, M.J., Sotaniemi, E.A. & Takkunen, J.T. (1985). Intravenous insulin has no effect on myocardial-contraction or heart-rate in healthy-subjects. *Diabetologia*, 28(9):649-652.
- Anderson, E.A., Hoffman, R.P., Balon, T.W., Sinkey, C.A. & Mark, A.L. (1991). Hyperinsulinemia produces both sympathetic neural activation and vasodilatation in normal humans. *Journal of Clinical Investigation*, 87(6):2246-2252.
- Asplin, K.E., Sillence, M.N., Pollitt, C.C. & McGowan, C.M. (2007). Induction of laminitis by prolonged hyperinsulinaemia in clinically normal ponies. *Veterinary Journal*, 174(3):530-535.
- Bailey, S.R., Habershon-Butcher, J.L., Ransom, K.J., Elliott, J. & Menzies-Gow, N.J. (2008). Hypertension and insulin resistance in a mixed-breed population of ponies predisposed to laminitis. *American Journal of Veterinary Research*, 69(1):122-129.
- Bailey, S.R., Menzies-Gow, N.J., Marr, C.M. & Elliott, J. (2004). The effects of vasoactive amines found in the equine hindgut on digital blood flow in the normal horse. *Equine Veterinary Journal*, 36(3):267-272.
- Baron, A.D. & Brechtel, G. (1993). Insulin differentially regulates systemic and skeletal-muscle vascular-resistance. *American Journal of Physiology*, 265(1):E61-E67.
- Baron, A.D., Brechtelhook, G., Johnson, A. & Hardin, D. (1993). Skeletal-muscle blood-flow – a possible link between insulin resistance and blood-pressure. *Hypertension*, 21(2):129-135.
- Berhane, Y., Elliott, J. & Bailey, S.R. (2006). Assessment of endothelium-dependent vasodilation in equine digital resistance vessels. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 29(5):387-395.
- Berne, C., Fritz, T. (2014) Diabetes mellitus I: Ramström, H. (red), *Läkemedelsboken*. Uppsala: Läkemedelsverket, 587-613. Tillgänglig: http://www.lakemedelsboken.se/pdf/filer/k1_end_diabetmellitus_2013fm10.pdf [2015-12-30]
- Bomback, A.S. & Klemmer, P.J. (2009). Interaction of Aldosterone and Extracellular Volume in the Pathogenesis of Obesity-Associated Kidney Disease: A Narrative Review. *American Journal of Nephrology*, 30(2):140-146.
- Brown, S., Atkins, C., Bagley, R., Carr, A., Cowgill, L., Davidson, M., Egner, B., Elliott, J., Henik, R., Labato, M., Littman, M., Polzin, D., Ross, L., Snyder, P. & Stepien, R. (2007). Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(3):542-558.
- Caballero, A.E. (2003). Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: A road to diabetes and heart disease. *Obesity Research*, 11(11):1278-1289.
- Carter, R.A., Geor, R.J., Staniar, W.B., Cubitt, T.A. & Harris, P.A. (2009). Apparent adiposity assessed by standardised scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies. *Veterinary Journal*, 179(2):204-210.

- Clark, M.G., Wallis, M.G., Barrett, E.J., Vincent, M.A., Richards, S.M., Clerk, L.H. & Rattigan, S. (2003). Blood flow and muscle metabolism: a focus on insulin action. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 284(2):E241-E258.
- de Laat, M.A., McGowan, C.M., Sillence, M.N. & Pollitt, C.C. (2010). Equine laminitis: Induced by 48 h hyperinsulinaemia in Standardbred horses. *Equine Veterinary Journal*, 42(2):129-135.
- de Laat, M.A., Sillence, M.N., McGowan, C.M. & Pollitt, C.C. (2012a). Continuous intravenous infusion of glucose induces endogenous hyperinsulinaemia and lamellar histopathology in Standardbred horses. *Veterinary Journal*, 191(3), ss. 317-322.
- de Laat, M.A., Pollitt, C.C., Walsh, D.M., McGowan, C.M. & Sillence, M.N. (2012b). Persistent digital hyperthermia over a 48 h period does not induce laminitis in horses. *Veterinary Journal*, 192(3):435-440.
- Defronzo, R.A., Cooke, C.R., Andres, R., Faloona, G.R. & Davis, P.J. (1975). Effect of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium, and phosphate in man. *Journal of Clinical Investigation*, 55(4):845-855.
- Eckel, R.H., Grundy, S.M. & Zimmet, P.Z. (2005). The metabolic syndrome. *Lancet*, 365(9468):1415-1428.
- Eggleston, E.M., Jahn, L.A. & Barrett, E.J. (2007). Hyperinsulinemia rapidly increases human muscle microvascular perfusion but fails to increase muscle insulin clearance - Evidence that a saturable process mediates muscle insulin uptake. *Diabetes*, 56(12):2958-2963.
- Engeli, S., Bohnke, J., Gorzelniak, K., Janke, J., Schling, P., Bader, M., Luft, F.C. & Sharma, A.M. (2005). Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Hypertension*, 45(3):356-362.
- Ewart, H.S. & Klip, A. (1995). Hormonal-regulation of the Na⁺-K⁺-ATPas – mechanism underlying rapid and sustained changes in pumpactivity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 269(2):C295-C311.
- Friedberg, C.E., Vanburen, M., Bijlsma, J.A. & Koomans, H.A. (1991). Insulin increases sodium-reabsorption in diluting segment in humans – evidence for indirekt mediation through hypokalemia. *Kidney International*, 40(2):251-256.
- Gauff, F., Patan-Zugaj, B. & Licka, T.F. (2013). Hyperinsulinaemia increases vascular resistance and endothelin-1 expression in the equine digit. *Equine Veterinary Journal*, 45(5):613-618.
- Giugliano, D., Marfella, R., Verrazzo, G., Acampora, R., Coppola, L., Cozzolino, D. & Donofrio, F. (1997). The vascular effects of L-arginine in humans - The role of endogenous insulin. *Journal of Clinical Investigation*, 99(3):433-438.
- Grassi, G., Seravalle, G., Cattaneo, B.M., Bolla, G.B., Lanfranchi, A., Colombo, M., Giannattasio, C., Brunani, A., Cavagnini, F. & Mancina, G. (1995). Sympathetic activation in obese normotensive subjects. *Hypertension*, 25(4):560-563.
- Groop, L.C., Bonadonna, R.C., Simonson, D.C., Petrides, A.S., Shank, M. & Defronzo, R.A. (1992). Effect of insulin on oxidative and nonoxidative pathways of free fatty-acid metabolism in human obesity. *American Journal of Physiology*, 263(1):E79-E84.
- Haenni, A., Reneland, R., Lind, L. & Lithell, H. (2001). Serum aldosterone changes during hyperinsulinemia are correlated to body mass index and insulin sensitivity in patients with essential hypertension. *Journal of Hypertension*, 19(1):107-112.
- Heise, T., Magnusson, K., Heinemann, L. & Sawicki, P.T. (1998). Insulin resistance and the effect of insulin on blood pressure in essential hypertension. *Hypertension*, 32(2):243-248.

- Henneke, D.R., Potter, G.D., Kreider, J.L. & Yeates, B.F. (1983). Relationship between condition score, physical measurements and body-fat percentage in mares. *Equine Veterinary Journal*, 15(4):371-372.
- Hood, D.M., Wagner, I.P. & Brumbaugh, G.W. (2001). Evaluation of hoof wall surface temperature as an index of digital vascular perfusion during the prodromal and acute phases of carbohydrate-induced laminitis in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 62(7):1167-1172.
- Hu, R.M., Levin, E.R., Pedram, A. & Frank, H.J.L. (1993). Insulin stimulates production and secretion of endothelin from bovine endothelial-cells. *Diabetes*, 42(2):351-358.
- Ignarro, L.J., Lippton, H., Edwards, J.C., Baricos, W.H., Hyman, A.L., Kadowitz, P.J. & Gruetter, C.A. (1981). Mechanism of vascular smooth-muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric-oxid – evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 218(3):739-749.
- Kahaleh, M.B. & Fan, P.S. (1997). Effect of cytokines on the production of endothelin by endothelial cells. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 15(2):163-167.
- Kim, J.A., Montagnani, M., Koh, K.K. & Quon, M.J. (2006). Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction - Molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation*, 113(15):1888-1904.
- Kraus, W. (1999). Insulin resistance syndrome and cardiovascular disease: Genetics and connections to skeletal muscle function. *American Heart Journal*, 138(5):S413-S416.
- Kuroda, S., Uzu, T., Fujii, T., Nishimura, M., Nakamura, S., Inenaga, T. & Kimura, G. (1999). Role of insulin resistance in the genesis of sodium sensitivity in essential hypertension. *Journal of Human Hypertension*, 13(4):257-262.
- Laakso, M., Edelman, S.V., Brechtel, G. & Baron, A.D. (1990). Decreased effect of insulin to stimulate skeletal-muscle blood-flow in obese man – a novel mechanism for insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 85(6):1844-1852.
- Landsberg, L., Aronne, L.J., Beilin, L.J., Burke, V., Igel, L.I., Lloyd-Jones, D. & Sowers, J. (2013). Obesity-Related Hypertension: Pathogenesis, Cardiovascular Risk, and Treatment A Position Paper of The Obesity Society and the American Society of Hypertension. *Journal of Clinical Hypertension*, 15(1):14-33.
- Levin, E.R. (1995). Mechanisms of disease – endothelins. *New England Journal of Medicine*, 333(6):356-363.
- Liang, C.S., Doherty, J.U., Faillace, R., Maekawa, K., Arnold, S., Gavras, H. & Hood, W.B. (1982). Insulin infusion in conscious dogs – effects on systemic and coronary hemodynamics, regional blood flows, and plasma-catecholamines. *Journal of Clinical Investigation*, 69(6):1321-1336.
- Menzies-Gow, N.J., Bailey, S.R., Stevens, K., Katz, L., Elliott, J. & Marr, C.M. (2005). Digital blood flow and plasma endothelin concentration in clinically endotoxemic horses. *American Journal of Veterinary Research*, 66(4):630-636.
- Miranda, P.J., DeFronzo, R.A., Califf, R.M. & Guyton, J.R. (2005). Metabolic syndrome: Definition, pathophysiology, and mechanisms. *American Heart Journal*, 149(1):33-45.
- Mogensen, C.E., Christensen, N.J. & Gundersen, H.J.G. (1980). The acute effect of insulin on heart-rate, blood-pressure, plasma noradrenaline and urinary albumin excretion – the role of changes in blood-glucose. *Diabetologia*, 18(6):453-457.

- Mollace, V., Muscoli, C., Masini, E., Cuzzocrea, S. & Salvemini, D. (2005). Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacological Reviews*, 57(2):217-252.
- Muniyappa, R., Montagnani, M., Koh, K.K. & Quon, M.J. (2007). Cardiovascular actions of insulin. *Endocrine Reviews*, 28(5):463-491.
- Panza, J.A., Casino, P.R., Kilcoyne, C.M. & Quyyumi, A.A. (1993). Role of endothelium-derived nitric-oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential-hypertension. *Circulation*, 87(5):1468-1474.
- Perlstein, T.S., Gerhard-Herman, M., Hollenberg, N.K., Williams, G.H. & Thomas, A. (2007). Insulin induces renal vasodilation, increases plasma renin activity, and sensitizes the renal vasculature to angiotensin receptor blockade in healthy subjects. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(3):944-951.
- Peroni, J.F., Harrison, W.E., Moore, J.N., Graves, J.E., Lewis, S.J., Krunkosky, T.M. & Robertson, T.P. (2005). Black walnut extract-induced laminitis in horses is associated with heterogeneous dysfunction of the laminar microvasculature. *Equine Veterinary Journal*, 37(6):546-551.
- Polderman, K.H., Stehouwer, C.D.A., vanKamp, G.J. & Gooren, L.J.G. (1996). Effects of insulin infusion on endothelium-derived vasoactive substances. *Diabetologia*, 39(11):1284-1292.
- Reaven, G.M. (1995). Pathophysiology of insulin-resistance in human-disease. *Physiological Reviews*, 75(3):473-486.
- Reaven, G.M. (2005). The insulin resistance syndrome: Definition and dietary approaches to treatment. I: *Annual Review of Nutrition*, 25:391-406.
- Rocchini, A.P., Katch, V., Kveselis, D., Moorehead, C., Martin, M., Lampman, R. & Gregory, M. (1989). Insulin and renal sodium retention in obese adolescents. *Hypertension*, 14(4):367-374.
- Rooney, D.P., Edgar, J.D.M., Sheridan, B., Atkinson, A.B. & Bell, P.M. (1991). The effect of low-dose insulin infusions on the renin-angiotensin and sympathetic nervous systems in normal man. *European Journal of Clinical Investigation*, 21(4):430-435.
- Rowe, J.W., Young, J.B., Minaker, K.L., Stevens, A.L., Pallotta, J. & Landsberg, L. (1981). Effect of insulin and glucose infusions on sympathetic nervous-system activity in normal man. *Diabetes*, 30(3):219-225.
- Sesti, G. (2006). Pathophysiology of insulin resistance. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 20(4):665-679.
- Shanik, M.H., Xu, Y., Skrha, J., Dankner, R., Zick, Y. & Roth, J. (2008). Insulin Resistance and Hyperinsulinemia Is hyperinsulinemia the cart or the horse? *Diabetes Care*, 31:S262-S268.
- Siani, A., Strazzullo, P., Giorgione, N., Deleo, A. & Mancini, M. (1990). Insulin-induced increase in heart-rate and its prevention by propranolol. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 38(4):393-395.
- Sjaastad OV, Sand O & Hove K. (2010). *Physiology of Domestic Animals*. 2nd edition. Oslo: Scandinavian Veterinary Press.
- Sobrevia, L., Nadal, A., Yudilevich, D.L. & Mann, G.E. (1996). Activation of L-arginine transport (system y(+)) and nitric oxide synthase by elevated glucose and insulin in human endothelial cells. *Journal of Physiology-London*, 490(3):775-781.

- Soder, J., Brojer, J.T. & Nostell, K.E.A. (2012). Interday variation and effect of transportation on indirect blood pressure measurements, plasma endothelin-1 and serum cortisol in Standardbred and Icelandic horses. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54.
- Steinberg, H.O., Bayazeed, B., Hook, G., Johnson, A., Cronin, J. & Baron, A.D. (1997). Endothelial dysfunction is associated with cholesterol levels in the high normal range in humans. *Circulation*, 96(10):3287-3293.
- Steinberg, H.O., Chaker, H., Leaming, R., Johnson, A., Brechtel, G. & Baron, A.D. (1996). Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction - Implications for the syndrome of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 97(11):2601-2610.
- Steinberg, H.O., Paradisi, G., Hook, G., Crowder, K., Cronin, J. & Baron, A.D. (2000). Free fatty acid elevation impairs insulin-mediated vasodilation and nitric oxide production. *Diabetes*, 49(7):1231-1238.
- Stenvinkel, P., Bolinder, J. & Alvestrand, A. (1992). Effects of insulin on renal hemodynamics and the proximal and distal tubular sodium handling in healthy-subjects. *Diabetologia*, 35(11):1042-1048.
- Suagee, J.K., Corl, B.A., Crisman, M.V., Hulver, M.W., McCutcheon, L.J. & Geor, R.J. (2011). Effects of acute hyperinsulinemia on inflammatory proteins in horses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 142(3-4):141-146.
- Sucharita, S., Tinku, T., Raj, T., Kurpad, A.V. & Vaz, M. (2011). Cardiovascular autonomic responses to hyperinsulinemia in young adult males of normal and low body mass index. *Autonomic Neuroscience-Basic & Clinical*, 161(1-2):121-125.
- Swan, J.W., Anker, S.D., Walton, C., Godsland, I.F., Clark, A.L., Leyva, F., Stevenson, J.C. & Coats, A.J.S. (1997). Insulin resistance in chronic heart failure: Relation to severity and etiology of heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 30(2):527-532.
- Tripathy, D., Mohanty, P., Dhindsa, S., Syed, T., Ghanim, H., Aljada, A. & Dandona, P. (2003). Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes*, 52(12):2882-2887.
- Trout, D.R., Hornof, W.J., Linford, R.L. & O'Brien, T.R. (1990). Scintigraphic evaluation of digital circulation during the development and acute phases of equine laminitis. *Equine Veterinary Journal*, 22(6):416-421.
- Trovati, M., Massucco, P., Anfossi, G., Cavalot, F., Mularoni, E., Mattiello, L., Rocca, G. & Emanuelli, G. (1989). Insulin influences the renin-angiotensin-aldosterone system in humans. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 38(6):501-503.
- Tuensmeyer, J., Hopster, K., Feige, K. & Kaestner, S.B.R. (2015). Agreement of high definition oscillometry with direct arterial blood pressure measurement at different blood pressure ranges in horses under general anaesthesia. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 42(3):286-291.
- Urschel, K.L., Escobar, J., McCutcheon, L.J. & Geor, R.J. (2014). Effects of the rate of insulin infusion during isoglycemic, hyperinsulinemic clamp procedures on measures of insulin action in healthy, mature thoroughbred mares. *Domestic Animal Endocrinology*, 47:83-91.
- Utriainen, T., Holmang, A., Bjorntorp, P., Makimattila, S., Sovijarvi, A., Lindholm, H. & Yki-Jarvinen, H. (1996). Physical fitness, muscle morphology, and insulin-stimulated limb blood flow in normal subjects. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 270(5):E905-E911.

- Utriainen, T., Malmstrom, R., Makimattila, S. & Ykjarvinen, H. (1995). Methodological aspects, dose-response characteristics and causes of interindividual variation in insulin stimulation of limb blood-flow in normal subjects. *Diabetologia*, 38(5):555-564.
- Venugopal, C., Holmes, E., Beadle, R., Kearney, M. & Eades, S. (2014). Comparison of Insulin-Induced Digital Vessel Ring Responses of Laminitic and Clinically Healthy Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(8):998-1002.
- Venugopal, C.S., Eades, S., Holmes, E.P. & Beadle, R.E. (2011). Insulin resistance in equine digital vessel rings: An in vitro model to study vascular dysfunction in equine laminitis. *Equine Veterinary Journal*, 43(6):744-749.
- Winkler, G., Lakatos, P., Salamon, F., Nagy, Z., Speer, G., Kovacs, M., Harnos, G., Dworak, O. & Cseh, K. (1999). Elevated serum TNF-alpha level as a link between endothelial dysfunction and insulin resistance in normotensive obese patients. *Diabetic Medicine*, 16(3):207-211.
- Wongaumnaykul, S., Siedler, C., Schobesberger, H. & Stanek, C. (2006). Doppler sonographic evaluation of the digital blood flow in horses with laminitis or septic pododermatitis. *Pferdeheilkunde*, 22(4):472-473.
- Wooldridge, A.A., Waguespack, R.W., Schwartz, D.D., Venugopal, C.S., Eades, S.C. & Beadle, R.E. (2014). Vasorelaxation responses to insulin in laminar vessel rings from healthy, lean horses. *Veterinary Journal*, 202(1):83-88.
- Zeng, G.Y. & Quon, M.J. (1996). Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin - Direct measurement in vascular endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, 98(4):894-898.