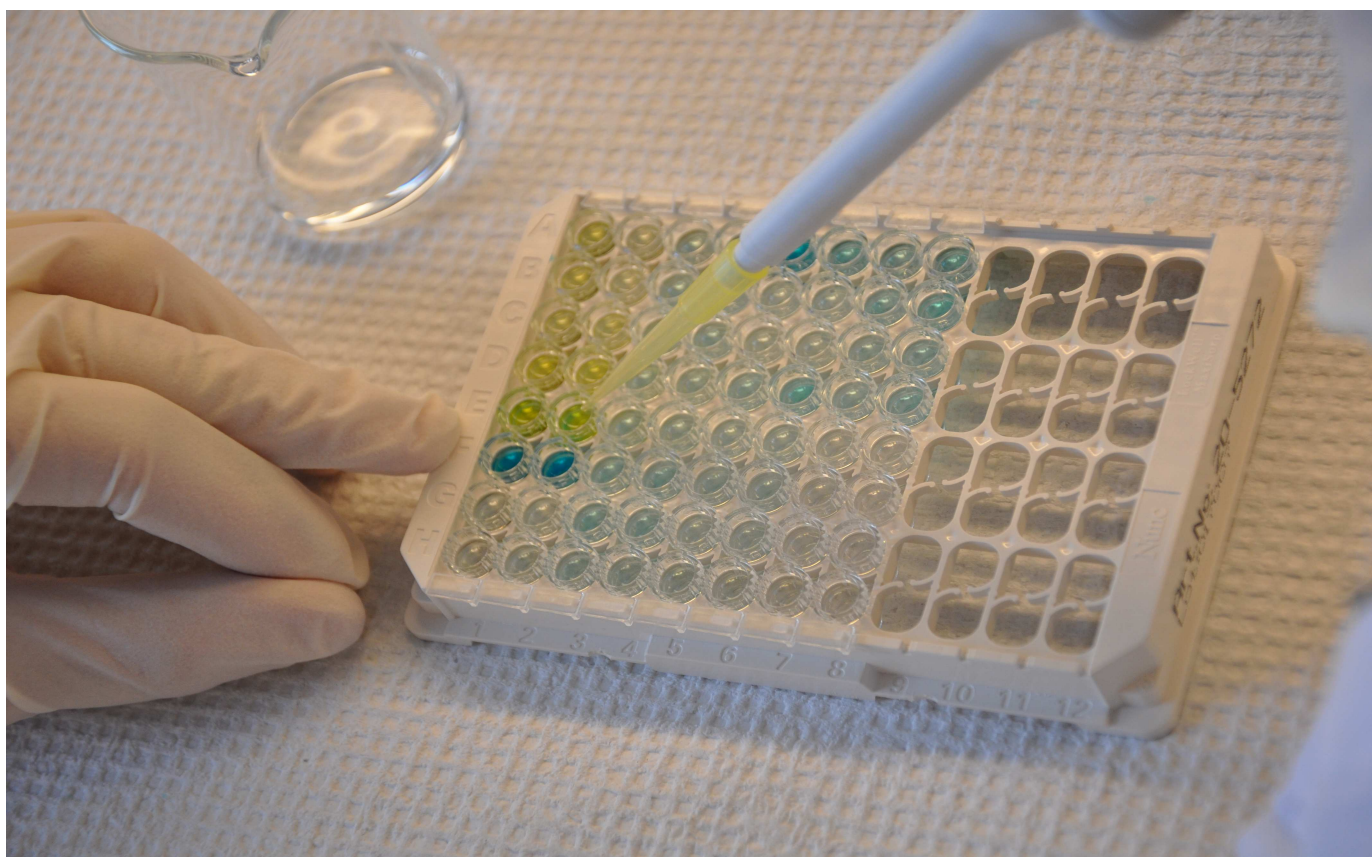


# Diagnostik af Equin Metabolisk Syndrom

Betydning af partiel versus komplet faste ved udtagelse af enkeltblodprøver samt insulinanalyse ved brug af ELISA og RIA.



**3. Fagdyrlægeopgave**

**Lisbeth Boel Brandborg**

**St. Merløse Dyreklinik, Februar 2010.**

## Summary:

Equine Metabolic Syndrome (EMS) was described in 2002. It is a metabolic disease in horses characterized by adiposity, decreased insulin sensitivity resulting in hyperinsulinemia. Patients suffering from EMS are at increased risk of developing laminitis, which has enforced focus on describing the pathogenesis and consequences of the disease. The disease is diagnosed on clinical signs and elevated serum insulin- glucose and triglyceride values. Whether the IV glucose and insulin absorption test is necessary for a correct diagnosis is still an open question. The purpose of this study was to evaluate levels of serum triglyceride, glucose and insulin on obese horses in risk of having EMS, and impact of complete versus partial fasting on serum these blood value levels was evaluated. This study contained 40 horses with the clinical picture of EMS, 20 that had been completely fasted 10 hours before sampling and 20 that had 2 kg of hay available. The insulin levels were analyzed using a RIA DSL 1200. The insulin and glucose values varied significantly with complete versus partial fasting. Serum insulin levels were analyzed using a Wilcoxon 2-sample test with a p-value of 0,04 and serum glucose levels were analyzed using a t-test with a p value of 0,045. This shows the importance of a standardized procedure when screening for EMS in order to make a correct interpretation of the lab results. The serum insulin levels were also measured using an equine insulin ELISA kit (mercodia) former validated for the use on equine serum. 20 normal horses were examined using the ELISA and their values were all under the cut-off for hyperinsulinemia. 17 cases were evaluated using both tests, and 2 had to be excluded due to errors in the reading of the result in the ELISA. The coefficient of correlation between the tests was 89.

## Resumé:

Equin Metabolisk Syndrom (EMS) blev defineret i 2002 og er en stofskiftelidelse hos hest karakteriseret ved fedme og nedsat insulinfølsomhed med hyperinsulinæmi til følge. Patienter med EMS er i forøget risiko for at udvikle forfængenhed, hvilket har bragt stor fokus på denne lidelses patogenese og konsekvenser. Lidelsen diagnosticeres i praksis ofte på baggrund af det kliniske billede, samt forøgede serum insulin- glukose og triglycerid niveauer. Om IV glukose og insulin absorptionstest er nødvendig for en endelig diagnose står stadig til diskussion. Formålet med dette studie er at måle serum insulin, glukose og triglycerid hos obese heste, der er i risiko for at have EMS. Disse parametre måles hos komplet versus partielt fastede dyr for at teste betydningen af faste for niveauet af disse parametre på enkeltblodprøver. Dette studie indeholdt 40 heste med det kliniske billede på EMS: 20 heste blev komplet fastet 10 timer inden blodprøvetagning og 20 fik adgang til 2 kg hør 10 timer inden blodprøvetagning. Insulinniveauerne blev målt ved hjælp af RIA DSL 1200. Insulin- og glukoseniveauerne var signifikant forskellige ved de 2 tests. Ved en Wilcoxon two-sample test fandtes der en signifikant forskel mellem insulinniveauer ( $p=0,04$ ), samt ved en t-test en signifikant forskel mellem glukoseniveauer ( $p=0,045$ ). En ensretning af proceduren ved udtagelse af prøver er derfor essentiel for en korrekt

tolkning af resultaterne. Serum insulinniveauerne blev endvidere målt ved brug af et Equine Insulin ELISA (Mercodia) tidligere valideret til hest. 20 Normale heste lå alle indenfor normalniveauet. 17 komplet fastede heste blev evalueret ved begge tests, hvor 2 blev ekskluderet pga. for store afvigelser i aflæsningen af ELISA-kittet. Korrelationskoefficienten mellem de 2 tests kunne beregnes til 89.

## Introduktion:

Termen Equin Metabolisk Syndrom (EMS) blev brugt første gang i 2002, hvor den blev knyttet til en stofskiftelidelse hos hest bestående af fedme og insulinresistens med forøget risiko for forfangenhed til følge (1). Grundlaget for den viden man i dag har inden for veterinær medicin er i store træk hentet i humanmedicinen, hvor der i 1988 blev beskrevet metabolisk syndrom med insulinresistens, hypertension og forøget risiko for hjertekarsygdomme – et syndrom, der hos mennesker ofte er et forstadium til diabetes mellitus type II. Lidelsen er indenfor veterinær medicin endvidere beskrevet under termer som "Perifer cushing syndrom", "Insulin resistens syndrom", "Equin Syndrom X", "Omental Cushing Syndrom" eller "pre-laminitis Metabolisk Syndrom, PLMS" (2,3). I den voksende mængde litteratur på området er termen Equin Metabolisk syndrom i dag den mest anvendte.

Insulinresistens er defineret som en reduktion i insulins evne til at stimulere insulinfølsomme væv med hyperinsulinæmi til følge (1). Mekanismer for den nedsatte insulinfølsomhed kan være som følger: Reduktion i antallet af insulinreceptorer, defekte insulinreceptorer, forandring i insulins affinitet for receptoren eller defekt intracellulær signalering. I humanmedicinen er der beskrevet en defekt i den insulinafhængige glukose transporter GLUT 4, en teori der måske også kan appliceres på heste (4). Som følge heraf kræves der en højere serum insulinkoncentration for at opnå biologisk effekt på de perifere væv. I denne tilstand, hvor kroppen stadig er i stand til at kompensere for den nedsatte insulinfølsomhed, vil der derfor ofte ses hyperinsulinæmi og normoglycæmi. (1). Hos mennesker kan en længerevarende overproduktion af insulin resultere i "betacelleudmattelse" med ophør af produktion af insulin med udvikling af diabetes mellitus type II. Der er her tale om en ukompenseret insulinresistens med hypoinsulinæmi og hyperglycæi til følge. Der er i dag kun publiceret få studie af diabetes mellitus hos hest (5, 6). I det seneste studie konkluderes det, at denne diagnose er langt mere hyppig end først antaget, hvorfor der højst sandsynligt vil blive bragt mere fokus på denne lidelse i fremtiden (7).

Den kliniske præsentation af heste med EMS indeholder en eller flere af følgende komponenter:

**Obesitet**, der kan være både generel eller regional, er en helt central problemstilling. Fedtceller fungerer ikke blot som lager, men har vist sig at være aktive celler, der udskiller en lang række inflammationsmediatorer med stor betydning for stofskiftet, bla. fx TNF alfa, IL1 og 6, Leptin, adiponectin, resitin samt cortisol (8). Med udgangspunkt i den humane forskning er sammenhængen mellem fedme, insulinresistens udskillelsen af inflammationsmediatorer hos hest

også belyst. Der er således fundet sammenhæng mellem insulinfølsomhed og huldscore hos hest i flere studier (3,9,10,11). Af de undersøgte inflammationsmediatorer kunne der findes sammenhæng mellem Il-1 og insulinsensitivitet hos hest, samt en sammenhæng mellem TNFalfa protein hos hopper over 20 år (10). Endvidere er der fundet sammenhæng mellem leptinkoncentration og fedme (9,12), samt leptinkoncentration, fedme, nedsat insulin følsomhed og forøget risiko for laminitis (13). Nye studier har endvidere set sammenhæng mellem niveauet af TNF alfa og tidligere episoder af forfangenhed – en sammenhæng, der af forfatteren også knyttes sammen med insulinresistens (14). Cortisol udskilles fra omentale fedtceller og hæmmer insulin (15). Heste med EMS alene har dog ikke forhøjet cortisolniveau, og test for cushing er hos heste, der alene lider af EMS, negativ (1). Derfor er betegnelsen "Perifer Cushings syndrom" egentlig ikke retvisende. Det kan dog ikke udelukkes, at heste der lider af EMS på et tidspunkt i livet udvikler cushing, eller at heste med cushing udvikler EMS som følge af cortisol's indvirken på insulin (15).

I klinikken anvendes ofte en subjektiv vurdering af patientens huld ud fra en skala fra 1-9 (16), hvor disse patienter ofte ligger i niveauet 7-9 (9). Endvidere er der også udviklet morfometriske målinger til såvel generel som regional fedme, hvor der knyttes faste værdier til de enkelte trin på ovennævnte huldskala. Som eksempel kan det nævnes, at en hest der har gjord:stangmålsratio på  $>1.26 \pm 0.01$  ligger på trin 7 og derover (11). Udvikling af fedme og insulinresistens kan være såvel genetisk (9,17) som miljøbetinget, da insulinresistens godt kan udvikles hos ikke genetisk disponerede dyr ved overfodring med foder rig på kulhydrat gennem længere tid (3).

**Laminitis** uden foregående episoder af kulhydrat overload, kolik eller endometritis er endvidere et symptom der ofte følger den overvægtige hest med hyperinsulinæmi (18,3,19,20,21,22). I praksis har man fundet en sammenhæng mellem forfangenhed og insulinniveauer i plasma på  $>70 \mu\text{U}/\text{ML}$ . (22), og i eksperimentelt studiedesign har man fundet direkte sammenhæng mellem stærkt forhøjede insulinniveauer ( $1036 \pm 55 \mu\text{U}/\text{mL}$ ) og udvikling af forfangenhed (18). En forståelse af sammenhængen mellem hyperinsulinæmi og forfangenhed er blevet belyst i flere studier. Først teorien om, at separation ved basalmembranen så som følge af cellernes manglende kapacitet for glykoseoptag (23). Denne teori blev dog efterfølgende tilbagevist, da man fandt, at cellerne i lamellerne er uafhængige af insulin for glykoseoptag, da den insulinafhængige type 1 glykose co-transporter (GLUT1) dominerer i disse væv (24). Ved humane pendant til EMS er hypertension som følge af endothelial dysfunktion en velbeskrevet problemstilling. Ved studier på hest er der også fundet hypertension, hvorfor endothelial dysfunktion også kan være et element af EMS (19). Humane studier har vist, at insulin stimulerer såvel vasodilatoriske som vasokonstriktive ruter, og denne viden er også overført på hestemodeller (25,26): Nitrogen Oxid (NO) og Endothelin-1 (ET-1) er vigtige endothel-derivede vasoregulatoriske substanser. Ved insulinresistens ses en nedsat NO produktion, hvilket medfører vasokonstriktion. Endvidere er der ved kulhydratoverload hos hest set en forøget endothelial produktion af ET-1, der har en vasokonstriktiv effekt. Dette kan også bidrage yderligere til vasokonstriktion hos heste, der som følge af insulinresistens allerede

har et kompromitteret kredsløb i hoven. De strukturmæssige forandringer i hoven ved laminitis induceret ved kraftigt forhøjede insulinniveauer adskiller sig fra de forandringer der ses ved kulhydrat overload (27,28). I ovennævnte forsøg fandtes der ikke en separation ved basalmembranen, men i stedet en fortykket lamelær basalmembran med elongerede lameller til følge. Dette kan medføre at hovbenet trækkes nedad i hovkapslen og forårsager smerte ved tryk på sålen, uden at der er tale om en egentlig separation. Denne tilstand kan derfor vise sig at være reversibel hvis insulinniveauet igen bringes til normalen (27). Dette understøttes af et studie udført i praksis, hvor der efter vægtreduktion sås reduktion i såvel basal seruminsulin samt laminitis gradueret på en Obel skala (22).

Det kliniske billede understøttes af følgende laboratoriefund:

**Forhøjet serum insulin, glukose og triglycerid** på enkeltblodprøver af den fastede hest i praksis er de mest anvendte værktøjer til at understøtte klinikerens mistanke om EMS. Insulin måles i dag ved brug af Radio Immuno Assay (RIA) kits til måling af humant insulin. I Danmark sendes de fleste prøver til VetMedLab, IDEXX, i Tyskland, hvor man anvender DSL-1600 RIA, der tidligere er valideret til hest (29). IDEXX angiver normalværdien for Insulin i intervallet 4,2 – 26 µU/ml. Endvidere har Mercodia markedsført et ELISA, der er udviklet til at måle hesteinsulin. Dette er blevet valideret til brug i raske heste (30). Mercodia Equin insulin ELISA er en antistof ELISA, baseret på en sandwich teknik, hvor 2 monoclonale antistoffer er rettet med forskellige sites på insulinmolekylet. Hesteinsulin afviger med 7 aminosyrer fra human insulin, og hvis det er den del af peptidet, der bindes til antistofferne i ELISA-brønden, vil der som konsekvens heraf bindes mere eller mindre insulin. Mercodia angiver normalværdier for insulin hos hest til 40-120 ng/L (0,96-17,57 uU/ml) før fodring og 120-290 ng/L (17,57-42 uU/ml) umiddelbart efter fodring. En ELISA der måler equin insulin kunne være nyttig, da den potentielt er mere specifik, og umiddelbart også billigere.

Serum Glukoseværdier ligger ofte i den høje ende af – eller lige over normalintervallet for glukose, der af IDEXX angives til at ligge på 93 mg/dl. Det er angivet i litteraturen, at EMS patienter har blodglukose niveau op til 140 mg/dl (31), hvorimod andre angiver en værdi på 120 som værende grænsen mellem kompenseret og ukompenseret insulinresistens (32).

Serum Triglycerid er ofte også let forhøjet hos EMS patienten. Et studie angiver et gennemsnit på 34,6 mg/dl hos EMS heste, sammenlignet med normalgruppen med et gennemsnit på 18,9. (9). Andre forfattere angiver et niveau på >57 mg/dl for at være diagnostisk for EMS (17).

Det anbefales at enkeltblodprøver udføres på delvist eller komplet fastet hest. Der har været sat spørgsmålstegn ved, om komplet faste medfører stress, hvilket kan give falsk forhøjede insulinmålinger (4).



Som beskrevet ovenfor arbejdes der med at beskrive fedme og hyperinsulinæmis sammenhæng med en række inflammationsmediatorer, og det er muligt at disse vil indgå som parametre i en blodanalyse af EMS i fremtiden.

For en endeligt at kunne diagnosticere insulinresistens kan kroppens biologiske respons på eksogent tilført insulin og glukose måles. Dette kan gøres ved en kombineret glukose-insulintest (CGIT-test) hvorved man måler kroppens fysiologiske respons på en IV bolus af glukose og insulin, og en sådan test er også beskrevet til hest (32). CGIT testen er netop igen blevet evalueret og modificeret (34). Heste der er insulinresistente, vil have glukose over grundniveau i mere end 35 minutter og vil have seruminsulin der ligger højere end 100  $\mu\text{U/ml}$  45 min efter injektion af en bolus af glukose og insulin. I humanmedicinen ved man, at faste insulin og glukose korrelerer så godt til denne test, at disse parametre i sammenhold med det kliniske billede anvendes til at diagnosticere insulinresistens (35). Det er også fremført at EMS kan diagnosticeres på baggrund af disse parametre alene, hvorfor en absorptionstest kun er nødvendig i grænsetilfælde (21).

**Arteriel hypertension** er et vigtigt komponent af MS hos mennesker og denne faktors betydning har også været undersøgt hos hest. I et studie af insulinresistens og hypertension hos en gruppe ponyer fandtes der et højere gennemsnit i blodtryk hos ponyer i risiko for laminitis sammenlignet med ponyer i kontrolgruppen (19). I et nyere studie fandtes der dog ingen sammenhæng mellem arterielt blodtryk og muligheden for at forudsige udvikling af laminitis hos ponyer (13).

Formålet med det udførte studie er følgende:

1: Undersøgelse af niveauer for serum insulin, triglycerid og glukose på enkeltblodprøver hos obese heste under mistanke for at have EMS. Endvidere undersøges betydningen af komplet versus partiel faste for de nævnte blodværdier. Dette gøres ved at måle de nævnte værdier på heste der har været komplet fastet i 12 timer inden blodprøvetagning (gruppe 1, prøve nr. 21-40) sammenlignet med heste der har fået tilbudt halm og 2 kg. Hø over de sidste 10 timer inden blodprøven tages (gruppe 2, prøve nr. 41-60). Endvidere laves der korrelation på blodværdier, alder, race samt tidligere episoder af forfangenhed.

2: Sammenligning af Mercodia Equine Elisa kit til måling af equin insulin med RIA DSL 1600, der som nævnt tidligere begge er valideret til hest. Sammenligningen blev lavet ved at lave equin insulin ELISA målinger på 37 heste, dels 20 raske (gruppe 3, prøve nr. 1-20) og dels 17 heste under mistanke for at have EMS (gruppe 1, prøve nr. 21-37). Der køres dobbeltmålinger på samtlige heste i ELISA kittet. De 17 heste i gruppe 1 analyseres som tidligere nævnt også i RIA DSL-1600. De 20 raske heste blev benyttet for at opnå fortrolighed med anvendelsen mercodias ELISA.

## Materialer og metode:

**Gruppe 1:** Der udtages blod fra 20 heste, der er under mistanke for at have hyperinsulinæmi. Patienterne i denne gruppe udvælges ud fra en huldvurdering på 7 eller derover, trods restriktiv fodring. En del af hestene har tidligere været forfangne, men er ikke akut forfangne på prøvetagningstidspunktet. Alle racer og aldersgrupper er inddraget, dog er heste over 15 år testet negativ for Cushings ved en dexamethason suppressions test. Hestene i denne gruppe har kun adgang til vand, og fastes komplet i 10 timer inden blodprøvetagning. Blodprøverne udtages alle om morgenen mellem 8-9. De opsamles i serumglas ved brug af vacutainer. Prøverne holdes på frost indtil centrifugering i 5 min ved 13000 rpm. Der går max 30 minutter fra prøven er udtaget til den er centrifugeret og lagt i fryseren (-18 grader C). Den nedfryses i min. 24 timer inden den sendes i frostcontainer til Idexx Vet Med Lab i Tyskland. Her analyseres prøven for insulin (RIA DSL 1200, human Insulin), triglycerid (GPO-PAP, Roche/Hitachi) samt glukose (Hexokinasemetoden, Roche/Hitachi). Endvidere sendes prøverne også til Departement of Veterinary Disease Biology på Københavns Universitet, hvor prøven analyseres for equint insulin ved brug af "Mercodia Equine Insulin ELISA".

**Gruppe 2:** Der udtages blod fra 20 heste, der er under mistanke for at have hyperinsulinæmi. Patienterne i denne gruppe er udvalgt ud fra samme kriterier som i gruppe 1. Hestene fratages kraftfoder og græs de sidste 10 timer inden blodprøvetagning, men har haft adgang til vand og begrænsede mængder halm/hø. Der gives 2 kg hø som sidste måltid 10 timer inden blodprøven tages. Blodprøverne udtages alle om morgenen mellem 8-9. De opsamles i serumglas ved brug af vacutainer. Prøverne holdes på frost indtil centrifugering i 5 min ved 13000 rpm. Der går max 30 minutter fra prøven er udtaget til den er centrifugeret og lagt i fryseren (-18 grader C). Den nedfryses i min. 24 timer inden den sendes i frostcontainer til Idexx Vet Med Lab i Tyskland. Her analyseres prøven for insulin (RIA DLS 1200 human Insulin), triglycerid (GPO-PAP, Roche/Hitachi) samt glukose (Hexokinasemetoden, Roche/Hitachi) .

**Gruppe 3:** Denne gruppe er inddraget for at opnå fortrolighed ved anvendelse af ELISA kittet. Der udtages blod fra 20 heste, der ikke er under mistanke for at have hyperinsulinæmi. Blodprøver er udtaget i forbindelse med rutinemæssig sundhedskontrol. Heste og ponyer i denne kategori er i racemæssig, aldersmæssig og managementmæssig overensstemmelse med heste i gruppe 1 og 2, dog uden at være overvægtige eller have tidligere episoder af forfangenhed. Denne gruppe repræsenterer individer i deres normale miljø, hvor der er adgang til begrænsede mængder stråfoder (2 kg) de sidste 10 timer inden blodprøven tages. Blodprøverne udtages alle om morgenen mellem 8-9. De opsamles i serumglas ved brug af vacutainer. Prøverne holdes på frost indtil centrifugering i 5 min ved 13000 rpm. Der går max 30 minutter fra prøven er udtaget til den er centrifugeret og lagt i fryseren (-18 grader C). Den nedfryses i min. 24 timer inden den sendes i frostcontainer til Departement of Veterinary Disease Biology på Københavns Universitet, hvor prøven analyseres for equint insulin ved brug af "Mercodia Equine Insulin ELISA".

Undersøgelse af fastes betydning for serum triglycerid, glukose og insulin foretages ved dels en t-test samt en Wilcoxon two-sample test. Alle analyser foretages i SAS. Insulinundersøgelsen i ELISA mod RIA foretages på baggrund af linær regression med udregning af en korrelationskoefficient. Analysen foretages i SAS. Omregninger mellem enhederne, der dels er i  $\mu\text{U/ml}$  (RIA) og  $\text{ng/L}$  (ELISA) er som følger:  $10 \text{ ng/L} = 1,72 \text{ pmol/L}$ .  $1 \mu\text{U/ml} = 7.175 \text{ pmol/L}$ .

## Resultater:

Resultaterne fremgår af tabel 1,2 og 3.

Tabel 1: Gruppe 1. Heste under mistanke for EMS. Komplet faste.

Case no	Race	Alder	Huld (1-9)	Tidl. Forfangen?	Humant insulin $\mu\text{g/ml}$	Heste-insulin $\text{ng/L}$	Triglycerid, $\text{mg/dl}$	Glukose, $\text{mg/dl}$
21	fjordhest	8	8	j	31,2	750	52,5	97,3
22	varmblod	10	7	j	19,8	70	8,75	84,69
23	sportspony	7	7	n	9,1	<10	43,75	97,3
24	fjordhest	6	7	j	42,4	170	96,25	91,9
25	ponylanding	8	8	j	25,3	50	35	93,7
26	pinto	9	7	n	27,5	50	26,3	93
27	dartmoor	11	7	n	11,9	<10	26,25	88,3
28	haflinger	8	7	j	17	<10	17,5	86
29	tinker	9	8	n	27,1	540	17,5	86
30	fjordhest	14	8	j	24,1	190	35	90
31	fjordhest	12	7	j	330	2345	87,5	106,3
32	ponylanding	7	8	n	74,1	750	26,25	104,51
33	?	19	8	n	36,8	115	26,25	102,71
34	araber	5	8	?	22,6	80	43,75	93,7
35	araber	10	8	?	63,7	660	43,75	100,91
36	haflinger	11	8	n	8,5	<10	52,5	86,5
37	Islænder		8	j	52,3	680	17,5	96,5
38	ponylanding	8	8	j	97,5		35	104
39	Islænder	7	7	j	10,8		87,5	79,28
40	?	21	8	j	30,5		26,25	102,71

Tabel 2: Gruppe 2. Heste under mistanke for EMS. Delvis faste.

Case no	Race	Alder	Huld (1-9)	Tidl. Forfangen?	Humant insulin $\mu\text{g/ml}$	Heste-insulin $\text{ng/L}$	Triglycerid, $\text{mg/dl}$	Glukose, $\text{mg/dl}$
41	fjordhest	5	8	j	56,7		43,75	100
42	haflinger	12	8	j	8,6		52,5	97,3
43	ponybl.	14	7	j	79,4		52,5	113,52
44	varmblod	6	7	j	57,3		35	100,91
45	ponybl.	8	8	j	186,1		52,5	142,35
46	Islænder	11	8	j	34,9			
47	Islænder	14	8	j	84,9		61,25	
48	Islænder	14	8	j	31,4		32	
49	varmblod	9	7	j	38,4		52,5	81,1
50	?	17	9	j	125,8		43,15	
51	islænder	15	8	j	245,8			
52	varmblod	9	7	n	24,4		35	97,3
53	frieser	7	7	n	21,2			
54	islænder	11	7	j	94			
55	ponybl.	20	?	j	57,4			
56	islænder	11	7	j	58,5			
57	shetlænder	7	7	n	14,4		26,2	162,18
58	fjordhest	8	8	j	50,1		52,5	111,72
59	welsh	14	7	j	41,8		70	99
60	welsh	14	7	j	158,2		35	108



Tabel 3: Gruppe 3. Normale heste.

Case no	Race	Alder	Huld (1-9)	Tidl. Forfangen?	Humant insulin µg/ml	Heste-insulin ng/L	Triglycerid, mg/dl	Glukose, mg/dl
1	varmblod	7	5	n		<10		
2	Ponyblanding	6	6	n		<10		
3	sportspony	7	5	n		<10		
4	fjordhest	5	6	n		<10		
5	varmblod	8	5	n		<10		
6	sportspony	9	5	n		<10		
7	islænder	9	6	n		<10		
8	haflinger	9	6	n		30		
9	varmblod	14	4	n		30		
10	haflinger	7	5	n		<10		
11	Shetlænder	5	5	n		<10		
12	Paint	6	6	n		<10		
13	Paint	8	6	n		<10		
14	islænder	7	5	n		<10		
15	islænder	12	5	n		<10		
16	islænder	10	6	n		15		
17	fjordhest	5	6	n		105		
18	welsh	6	6	n		150		
19	dartmoor	6	6	n		0		
20	frieser	7	7	n		<10		

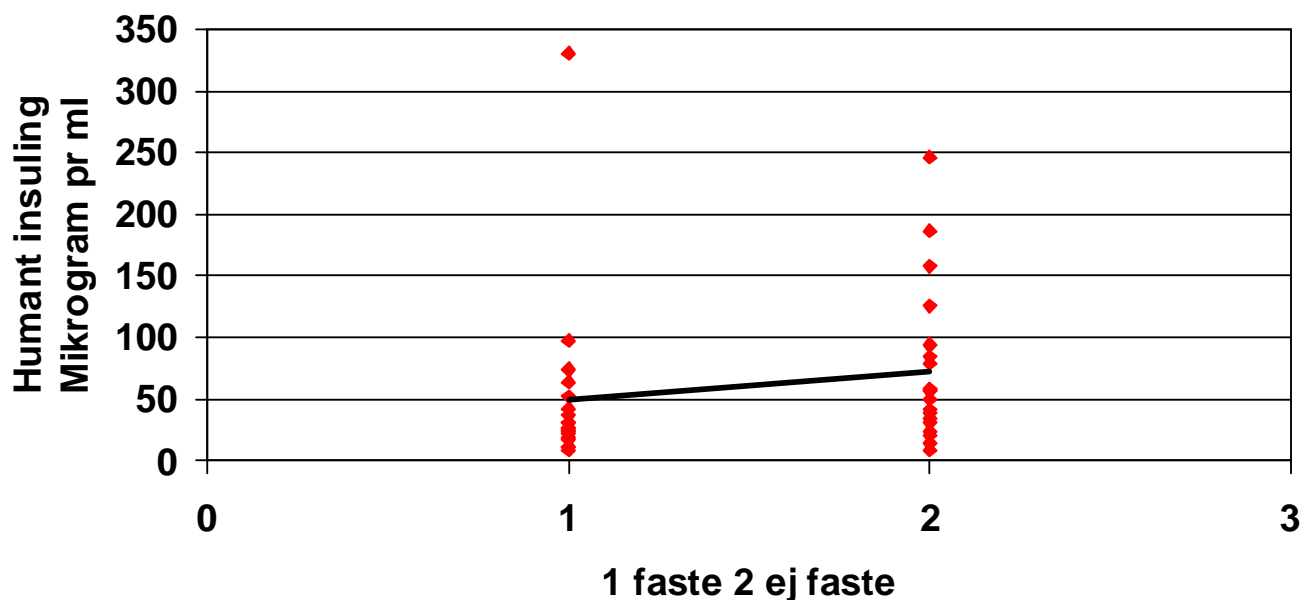
29 ud af 40 heste under mistanke for EMS på de kliniske symptomer har forhøjede insulinniveauer efter 10 timers komplet eller partiel faste.

Fastes betydning for triglycerid niveau er analyseret i en t-test med triglycerid som afhængig variabel og faste som forklarende variabel. Gennemsnittet for fastede er 40,2 mg/dl og for ikke fastede 46,0 mg/dl. Der er ingen signifikant forskel på de 2 grupper ( $p=0,19$ ).

Fastes betydning for glukoseniveau er ligeledes analyseret i en t-test med glukose som afhængig variabel og faste som forklarende variabel. Gennemsnit blandt fastede er 94 mg/dl og blandt ikke fastede 110 mg/dl. Denne forskel er signifikant ( $p=0,045$ ).

Fastes betydning for insulinniveau er afbilledet i figur 1:

## Sammenhæng mellem faste og humant insulin



Som det kan ses af figuren, er der én måling, der skiller sig klart ud i den ikke fastede gruppe, case nummer 31 med en insulinværdi på 330  $\mu\text{U/ml}$ . Data er ikke normalfordelte. Inddrages alle resultater i en t-test er gennemsnittet blandt de fastede 50,2 og blandt de ikke fastede 73,5, men der er ikke signifikant forskel mellem de 2 grupper. Et alternativ til t-testen, der egentlig kun kan anvendes på data, der er normalfordelte, er en non-parametrisk test. Wilcoxon two-sample test og Kruskal Wallis test er begge mere valide til ikke-normalfordelte data, og begge har en p-værdi på 0,04, hvilket er signifikant.

Sammenhæng mellem alder og triglycerid, glukose og insulin er hver især analyseret i en linær regressionsmodel med alder som forklarende variabel. Der er ingen signifikant sammenhæng i nogen af grupperne.

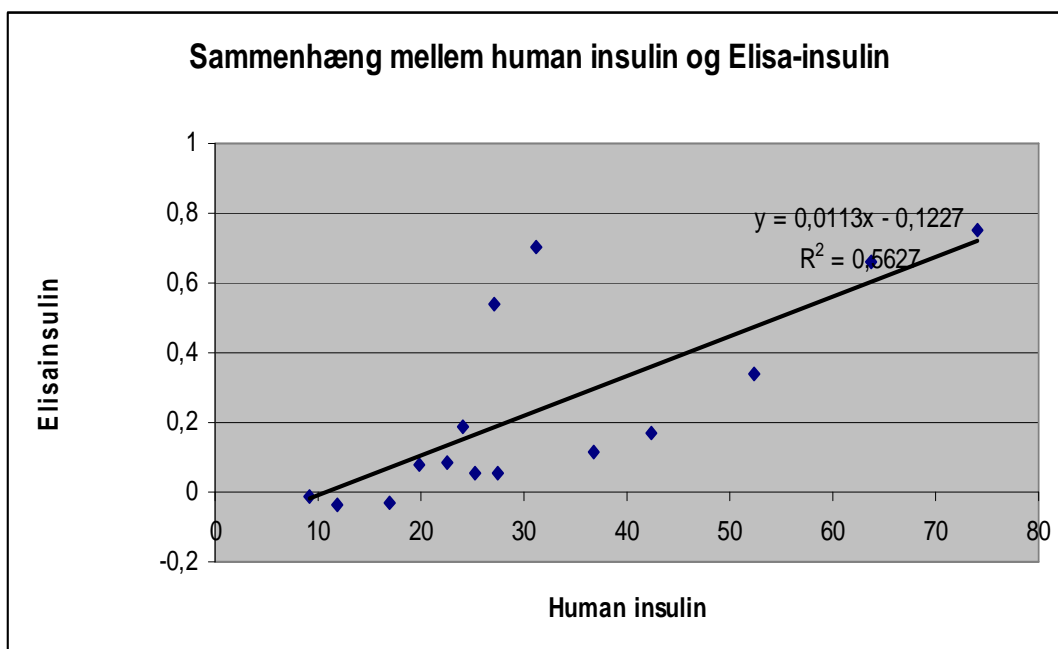
Sammenhæng mellem insulinniveau og tidligere episoder af forfængenhed er analyseret med en t-test. Insulinniveauet er signifikant højere hos heste, der tidligere har været forfængne (74,7  $\mu\text{U/ml}$ ) sammenlignet med heste, der ikke tidligere har været forfængne (27,4  $\mu\text{U/ml}$ ).  $P=0,004$ .

Sammenhæng mellem triglycerider og tidligere forfængenhed samt glukose og tidligere forfængenhed er analyseret med en t-test. Der kunne findes sammenhæng mellem triglycerid og tidligere episoder af forfængenhed, både ved et signifikant gennemsnit i de 2 grupper (tidligere

forfangne 47mg/dl og ikke-forfangne 31,1 mg/dl)  $p=0,01$  og ved signifikant større spredning hos heste der tidligere har været forfangne ( $p=0,04$ ). Der kunne ikke findes signifikant sammenhæng mellem glukose og tidligere forfangenhed ( $p=0,75$ ).

Insulinværdierne i RIA viste en korrelation mellem race og insulinniveauer, således ligger koldblodshestenes gennemsnit ( $72,41\mu\text{U/ml}$ ) signifikant højere end varmbloodsgennemsnit ( $30,52$ ) med en  $p$ -værdi på  $0,01$ . En lignende tendens kan ses ved at inddеле grupperne i hest versus pony.

Sammenligning af Insulinniveauer ved Mercodia equin Elisa mod RIA DSL 1600: Alle heste i gruppe 3, der er normale, ligger i niveauet for normale heste (under  $290\text{ ng/l}$ ). Mange af resultaterne i både gruppe 1 og 3 ligger meget lavt i equin insulin ved denne test, men som et eksempel på hvordan dobbeltbestemmelse laves, er de alligevel præsenteret i fig. 2. Der er som nævnt under metode kørt dobbeltbestemmelse på alle prøver i ELISA kittet. Resultaterne af korrelationen mellem RIA og ELISA er udregnet ved lineær regression og er grafisk afbilledet på fig. 2.



Figur 2: Elisa Insulinmåling (equint insulin) og RIA insulinmåling (human insulin).

Ved en udregning af en korrelationskoefficient hvor alle prøver inddrages er koefficienten 0,56. Der er 2 af prøverne i gruppe 1, hvor der er så markant forskel mellem dobbeltbestemmelserne i ELISA kittet, at prøverne må anses for invalide (Patient no. 21 og 29). Udelades de 2 prøver bliver korrelationskoefficienten 0,89, hvilket må siges at være acceptabelt. Det skal dog understreges, at de præsenterede data er behæftet med så stor usikkerhed, at de kun bør betragtes som vejledende.

## Diskussion:

Kun 29 ud af 40 heste med kliniske symptomer på EMS har forhøjede insulinniveauer. Det understreger vigtigheden af, at diagnosen ikke stilles på den kliniske undersøgelse og ejeroplysninger alene. Hvis der endvidere udføres en stimulationstest er det muligt at flere af de mistænkte patienter vil få stillet en korrekt diagnose.

Komplet faste frem for delvis faste har en signifikant betydning for niveauet af glukose ved screening for EMS i praksis. I gruppen med komplet fastede heste er blodglukoseniveauet gennemsnitligt lavere end i den delvis fastede gruppe. Denne parameter kan være af betydning, hvis man med enkeltblodprøver skal kunne give et bud på om der er tale om kompenseret eller ukompenseret insulinresistens – tilstande der dog bør undersøges nærmere ved brug af en stimulationstest (6). Som nævnt i afsnittet om blodværdier har der dog i litteraturen været givet flere bud på forventelige øvre grænser for kompenserede blodglukoseniveauer -100-140 mg/dl (31,32). Dette studie understreger vigtigheden af en ensartet procedure ved udtagelsen af enkeltblodprøver, og er hesten komplet fastet bør den øvre grænse ligge lavere end hvis hesten ikke er fastet komplet. Tidligere forfangenhed versus ikke tidligere forfangenhed har ingen betydning for blodglukoseniveauet.

Der er ingen signifikant forskel på triglycerid niveauet efter 12 timers faste, hvilket stemmer fint overens med tidligere studier på raske heste (36). Der skal tilsyneladende længerevarende faste til at påvirke triglycerid niveauet hos hyperinsulinæmiske heste, som det er tilfældet hos raske heste (36). Der er dog et andet fund, der er lidt interessant – der findes signifikant højere triglycerid niveauer hos heste der tidligere har været forfangne frem for heste der ikke har været forfangne. Der har ikke tidligere været analyseret på nogen sammenhæng mellem serum triglycerid og forfangenhed. Årsagen til denne sammenhæng i dette studie kan være, at heste der allerede har været forfangne er længere fremme i sygdomsprocessen med større kredsløbspåvirkning og højere serum triglycerid til følge.

Insulinniveauet i blodet afviger også signifikant i de 2 grupper. I den komplet fastede gruppe ses dog en case, der afviger betydeligt fra de øvrige ved en meget høj insulinværdi (330  $\mu$ U/ml). Resultatet er sandsynligvis validt, da begge tests måler en høj værdi på denne patient. Der er tale om en hest på 12 år, der tidligere har været forfangen. Undertegnede har tidligere stødt på lignende resultater hos andre patienter, men her har der endvidere været diagnosticeret cushing. Selvom der er tale om en patient i 12 års alderen kunne det være interessant at udføre en dexametason-supprettionstest på denne patient. Er denne positiv bør patienten ekskluderes. Ekskluderes denne patient vil spredningen være signifikant mindre hos heste der er komplet fastet, hvorfor denne fremgangsmåde bør anses som den mest sikre ved diagnosticering af hyperinsulinæmi hos heste. Flere forfattere har sat spørgsmålstegn ved, om komplet faste i 12 timer vil medføre stress med forhøjede cortisolniveau og derved kunstigt forhøjede

insulinniveauer til følge. Dette kan afkræftes i dette studie, da insulinniveauet er lavere hos de komplet fastede heste end de delvist fastede. Heste, der tidligere har været forfangne har et markant højere insulinniveau end heste der ikke tidligere har været forfangne. Dette kan sandsynligvis forklares som for triglycerid: Disse heste kan være længere fremme i sygdomsforløbet med højere insulinniveauer til følge.

Der kunne ikke findes nogen sammenhæng mellem alder og insulin, triglycerid og glukose. Da langt de fleste heste i dette studie er under 15 er det nok et forventeligt resultat. Det kunne i den sammenhæng være interessant at lave et studie af insulinniveau i blodet hos ældre dyr.

Forskellen på insulinniveauet racer imellem kan fortolkes på 2 måder: Enten ligger insulinniveauet "naturligt" forskelligt mellem koldblod og varmblod, eller også er de forskelligt disponeret for udvikling af insulinresistens. Litteraturen beskriver, at visse racer er genetisk disponerede for at udvikle insulinresistens (9,17). Om det ene eller andet er tilfældet i dette studie, kan dog ikke afgøres på baggrund af faste-insulinniveauet alene. Det kunne være ønskeligt at drage en konklusion på baggrund af en stimulationstest.

Sammenligning af insulin i ELISA kittet med RIA DLS 1200 er behæftet med flere problemer ved aflæsningen af resultaterne i ELISAén. Dels er der målt optisk densitet i 0-calibratoren, hvilket jo i sig selv vidner om afvigelser ved aflæsning af selv de kendte værdier i kittet. Dette er også årsag til de minusværdier der ses i resultatskemaet, da visse af prøverne repræsenterer en lavere optisk densitet en 0-calibratoren. Endvidere er der de tidligere nævnte problemer med store afvigelser mellem de 2 parrede prøver på samme patient i ELISA kittet - prøver der burde køres om, hvis testresultatet skal være validt. Endvidere påvirker aflæsningen på 330 uU/ml hældningen af kurven meget kraftigt, hvorfor det anbefales at ekskludere denne, da denne måling giver uforholdsmæssig stor påvirkning af kurvens hældning. Korrelationskoefficienten, der efter eksklusion af 3 resultater ender på 0,89, er lavere end den tidligere præsenterede validering af kittet, der dog også er fortaget mod en anden RIA (Cout-A-Count) (30). I den tidligere validering er der kun anvendt raske individer, og det kunne være ønskeligt at have en validering der indeholdt værdier i det forhøjede spektrum også. Det opfanger tilsyneladende høje værdier, da der er overensstemmelse mellem de 2 kits ved den ekstremt høje aflæsning af case no. 31. Som antaget i metode-afsnittet kunne man potentielt have fundet en gennemgående forskel i de 2 kits, der teoretisk kunne forklares ved en mindre forskel i aminosyresekvensen mellem humant og hesteinsulin. Denne forskel kan ikke sandsynliggøres med disse data. Det kunne derfor være ønskeligt at opnå større erfaring i brug af kittet ved at gentage et lignende antal cases for at lave en ny sammenligning, forhåbentlig med udgangspunkt i en mere valid standardkurve. Som tidligere nævnt bør de ovenfor præsenterede data kun betragtes som vejledende.

## Konklusion:

Patienter under mistanke for EMS har i dette studie insulinniveauer fra 8,6 til 330  $\mu\text{U/ml}$ , og kun 29 ud af de 40 under mistanke har niveauer over normalen. Diagnosen kan derfor ikke stilles på kliniske symptomer alene, men bør altid som minimum understøttes af insulinmåling. Heste, der har hyperinsulinæmi, har triglycerid niveauer fra 17,5-96,25 mg/dl og glukoseniveauer fra 81-142 mg/dl. Komplet faste i 10 timer bevirkede en gennemsnitlig lavere blod-glukose og insulinværdi med mindre spredning, men havde ingen effekt på triglycerid niveauet.

Ved screening for EMS i praksis har det derfor betydning for testresultatet om hesten er komplet eller delvist fastet. Anbefalingen er en komplet faste med adgang til vand 10 timer inden blodprøvetagning.

**I fremtiden** kunne det være ønskeligt at lave et studie af faste-insulin korreleret til en intravenøs glukose og insulin absorptionstest på et større antal cases, for endelig at få bekræftet om fasteinsulin kan stå alene ved diagnostik af EMS i praksis. Dette bør gøres både ved brug af Equin-insulin ELISA samt human-insulin RIA. Equin insulin ELISA bør ikke stå alene her, da der ved stimulationstesten injiceres humant insulin. Denne baggrundsviden vil være vigtig i bestræbelserne på at finde et nemt og økonomisk overskueligt værktøj til diagnostik af EMS i praksis.

Decideret validering af ELISA kittet bør baseres på yderligere undersøgelser af Mercodias ELISA-kit. Dette bør gøres før det kan anbefales til brug i praksis. Det kan dog vise sig at blive et nemt og billigt alternativ RIA-kittet.

## Taksigelser:

Jeg vil gerne sige tak til følgende, der har været en rigtig stor hjælp i forbindelse med udarbejdelsen af denne hovedopgave:

Dorte Xenia Gram, Dyrlæge PhD, Lektor Afd. For farmakologi og toksikologi, KU Life for opsætning af Mercodia Insulin Elisa. Også en stor tak for konstruktiv kritik og kommentarer på den skriftlige fremstilling af projektet.

IDEXX VetMedLab for økonomisk støtte til aflæsning af human insulin, glukose og triglycerid.

Jan Dahl for stor hjælp med det statistiske analysearbejde.

Dyrlæge Ginnie Holmes Hørning fra Næstvedegnens Dyrlæger, Nanna Luthersson fra Hestedoktoren, Charlotte Jespersen fra Højelse Hesteklinik, Anne Mette Lindberg fra Kolding Dyrehospital og Dorte Madsen fra Snertinge Dyrehospital for hjælp med indsamling af patientmateriale.



## Litteratur:

- 1: Johnson, P. J: "The equine metabolic syndrome Peripheral Cushing's syndrome." *The veterinary clinics, Equine practice* 18, ss. 271-293, 2002.
- 2: Kronfeld, D.S: "Equine syndrome X, the metabolic disease, and equine grain-associated disorders: Nomenclature and Dietetics." *Equine Nutrition*, vol. 23, no. 12, ss. 567-569, 2003.
- 3: Trieber, K. H, Kronfeld, D. S, Hess, T. M, Byrd, B.M, Splan, R. K, Staniar, W.B: "Evaluation of genetic and metabolic predispositions and nutritional risk factors for pasture associated laminitis in ponies." *JAVMA*, vol 228, no. 10, ss. 1538-1545, 2006.
- 4: Frank N: "Equine Metabolic Syndrome." *Journal of Equine Veterinary Science*. Vol 29, no. 5, ss. 259-267, 2009.
- 5: Johnson, P. J, Scotty, N. C, Wiedmayer, C, Messer N. T, Kreeger J. D: Diabetes Mellitus in a domesticated Spanish mustang." *JAVMA*, vol 226, no. 4, ss. 584-588, 2005.
- 6: Durham, A.E, Hughes, K. J, Cottle. H. J, Rendle D. I and Boston R. C: "Type 2 diabetes mellitus with pancreatic dysfunction in 3 horses confirmed with minimal model analysis." *Equine Veterinary Journal*, 41, 9, ss. 924-929, 2009.
- 7: Menzies-Gow, N: "Diabetes in the horse: A condition of increasing clinical awareness for differential diagnosis and interpretation of tests." *Equine Veterinary Journal*, 41, 9 ss. 841-843, 2009.
- 8: Radin, M. J, Sharkey L. C og Holycross, B. J: "Adipokines: A review of biological and analytical principles and an update in dogs, cats and horses." *Veterinary Clinical Pathology*, 38/2 ss. 136-156, 2009.
- 9: Frank, N, Elliot, S. B, Brandt, L. E, Keisler, D.H: "Physical characteristics, blood hormone concentration, and plasma lipid concentration in obese horses with insulin resistance." *JAVMA*, vol 228, no. 9, ss. 1383-1389, 2006.
- 10: Vick, M. M, Adams A. A, Murphy B. A, Sessions, D. R, Horohov D. W, Cook R. F, Shelton, B. J, Fitzgerald B. P: "Relationships among inflammatory cytokines, obesity and insulin sensitivity in the horse." *Juorn. Anim. Sci*, 85, ss. 144-1155, 2007.
- 11: Carter, R, Geor, R. J, Burton Stanair, W, B, Cubitt, T.A, Harris, P. A: "Apparent adiposity assessed by standardized scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies". *Equine Veterinary Journal*, 179, ss. 204-210, 2009.
- 12: Gentry, L. R, Thompson Jr. G. T, Gentry Jr, G. T, Davis, K. A, Rodke R.A, Cartmill J. A: "The relationship between bodycondition, leptin, and reproductive and hormonal characteristics of mares during the seasonal anovulatory period." *J. Animal Sci*, 80, 2695-2703, 2002.

- 13: Carter R. A, Treiber K. H, Geor R. J, Douglass, L and Harris P. A: "Prediction of incipient pasture-associated laminitis from hyperinsulinaemia, hyperleptemia and generalized and localized obesity in a cohort of ponies." *Equine Veterinary Journal*, 41, 2, ss. 171-178, 2009.
- 14: Trieber, K, Carter, R, Gay, L, Williams, C og Geor, R: "Inflammatory and redox status of ponies with a history of pasture associated laminitis." *Vet. Immunol. Immunopathol.* 129, 216-220, 2009.
- 15: Johnson P.J, Messer, N. T, Wiedmeyer, C, Buff, P, Ganjam, V.K: Endocrinopatic laminitis in the horse." *Clinical Techniques in equine practice*, ss. 45-56, 2004.
- 16: Henneke, D. R, Potter, G. D, Kreider, J. L, Teates, B. F: "Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares." *Equine Veterinary Journal*, 15, 4, 371-372, 1983.
- 17: Divers, T. J: "Endocrine testing in Horses: Metabolic Syndrome and Cushing's Disease." *Journ. of Equine Veterinary Science*, vol. 28, no. 5, ss. 315-316, 2008.
- 18: Asplin, K. E, Sillence M. N, Politt, C. C, McGowan C. M: "Induction of laminitis by prolonged hyperinsulinaemia in clinically normal ponies." *The veterinary Journal*, 174, ss. 530-535, 2007.
- 19: Bailey, A, Habersohn-Butcher, J. L, Ramson, K.J, Elliott, J, Menzies-Gow, N.J: "Hypertension and insulin resistance in a mixed breed population of ponies predisposed to laminitis." *American Journal of Vet Res*, Vol. 69, no. 1, ss. 122-129, 2008.
- 20: Kronfeld, D.S, Trieber, K. H, Hess, T. M, Byrd, B.M, Splan, R. K, Staniar, W.B, White, N.W: "Metabolic Syndrome in healthy ponies facilitates nutritional countermeasures against pasture laminitis." *Journal of nutrition*, 136, 7, ss. 2090S-2093S, 2006.
- 21: Frank, N: "Endocrinopatic laminitis, Obesity-associated laminitis and pasture-associated laminitis." *Proceedings of the 54<sup>th</sup> annual convention AAEP*, ss. 341-346, 2008.
- 22: Walsh, D. M, McGrowan, C. M, McGrowan, T, Lamb, S. V, Schanbacher B. J, Place, N. J: "Correlation of Plasma Insulin Concentration with Laminitis Score in a Field Study of Equine Cushings Disease and Equine Metabolic Syndrome." *Journal of Equine Veterinary Science*, 29, 2, ss. 87-94, 2009.
- 23: Pass, M. A, Pollitt, S, Pollitt, C. C: "Decreased glucose metabolism causes separation of hoof lamellae in vitro: A trigger for laminitis? *Equine vet journal*, 26, ss. 133-138, 1998.
- 24: Asplin, K. E, McGrowan C. M, Pollitt C. C, Curlewis, J, Sillence M. N: "Role of insulin in glyucose uptake in the equine hoof." *Journ. Vet. Internal Med*, 21, 668, 2007
- 25: Eades S. C et al " Serial alterations in digital haemodynamics and endothelin1-immunoreactivity, platelet neutrophil aggregation and concentrations of nitiic oxide, insulin and glucose in blood obtained from horses following carbohydrate overload." *Am. Journ of Vet res*, 68; ss. 87-94, 2007.
- 26: Geor, R, Frank N: "Metabolic Syndrome – From Human organ disease to laminar failure in equids." *Veterinary Immunology and immunopathology*, 129, ss.151-154, 2009.

- 27: Nourian, A.R, Asplin K. E, McGrowan, C.M, Sillence M. N og Pollit, C.C: "Equine Laminitis: Ultrastructural lesions detected in ponies following hyperinsulinaemia." Equine Veterinary Journal, 41, 7, ss. 671-677, 2009.
- 28: Nourian, A.R, Baldwin G.I, Van Eps, A.W, og Politt, C. C: "Equine Laminitis: Ultrastructural lesions detected 24-30 hours after induction with oligofructose." Equine Veterinary Journal, 39, 4, ss. 360-64, 2007.
- 29: Reimers, T. J, Cowan, R. G, MaCann, J. P og Ross, M. W: "Validation of a rapid solid-phase radioimmunoassay for canine, bovine and equine insulin." American Journal of Veterinary research, vol 43, no. 7, ss. 1274-1278, 1982.
- 30: Öberg, J, Lillehök, I, Wattle, O, Karlsson Å, Bröjer J: "Validation of a species specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for measurement of serum insulin in horses." ACVIM poster, Montreal, CA.
- 31: 4: Johnson, P. J, Messer, N. T, Ganjam, V. K: "Cushing's syndrome, insulin resistance and endocrinopathic laminitis." Equine Vet Journal, 36, 3, ss. 194-198, 2004.
- 32: Frank, N, Geor, R.J, Adair, S: "Guide to Insulin Resistance and Laminitis for the Equine Practitioner. "VetAMix" Loyd Inc. 2008.
- 33: Eiler, H, Frank, N, Andrews, F. M, Oliver, J. W, Fecteau, K. A: "Physiologic assessment of blood glucose and insulin testing in horses." American Journal of Veterinary Research, 66, 9, ss. 1598-1604, 2005.
- 34: Toth, F, Frank, N, Elliot S.B, Perdue, K, Geor, R. J og Boston, R. C: "Optimisation of the frequently sampled intravenous glucose tolerance test to reduce urinary glucose spilling in horses." Equine veterinary journal , 41, 9 ss. 844-851, 2009.
- 35: WHO consultation: "Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications." 1999.
- 36: Frank N, Sojka, J. E, Latour, M. A: "Effect of withholding feed on concentration and composition of plasma very low density lipoprotein and serum nonesterified fatty acids in horses. AJVR, Vol 63, no 7, ss. 1018-1021, 2002