

En ny experimentell djurmodell för att studera ämnesomsättningsrubbnings hos häst

Slutrapport

Mål med studien

Huvudsyftet med denna studie var att genom en standardiserad försöksmodell simulera de tidiga metabola förändringar man ser hos hästar med endotoxinemi, fång och ekvint metabolt syndrom för att på så sätt kunna studera mekanismerna bakom perifer insulinresistens och rubbningar i fettmetabolismen på häst. Att få denna information är ett nödvändigt första steg i att kunna utveckla framgångsrika behandlingsstrategier för ett sjukdomsproblem som i dagsläget oftast inte svarar på olika terapeutiska åtgärder eller förändringar i foderstaten.

På humansidan är det väl beskrivet att intensivvårdspatienter utvecklar en övergående typ 2 diabetes, så kallad stressdiabetes (Wolfe et al. 1987, Wolfe and Martini, 2000, Lazzeri et al. 2009). Dessa patienter får höga blodsockervärden (blodglukos) till följd av en nedsatt känslighet för insulin i kombination med en ökad produktion av glukos i levern. Det som stimulerar leverns glukosproduktion är bland annat förhöjda nivåer av cirkulerande cytokiner, tillväxthormoner (GH), glukagon och kortisol (Lang et al. 1992, Khani and Tayek 2001). De höga blodsockervärdena man ser hos intensivvårdspatienter har visat sig vara kopplade till ökad dödlighet (van den Berghe et al. 2001, Corstjens et al. 2006). Man har också visat att det finns en koppling mellan höga glukosnivåer i blodet och uppkomsten av postoperativa infektioner hos traumapatienter (Yendarmuri et al. 2003). Intensivvårdspatienter har också förhöjda nivåer av blodfetter (triglycerider) och låga nivåer av de olika fettfraktionerna; det goda HDL-kolesterolet (high-density lipid) och det dåliga LDL-kolesterolet (low-density lipid) (Wendel et al 2007). Hos hästar med kolik har man visat förhöjda koncentrationer av blod- och vävnadsglukos samt plasmaglycerol (Hollis et al. 2007, Edner et al. 2007, 2009)

Följande frågeställningar skulle besvaras:

- Hur ser det hormonella svaret ut avseende insulin, kortisol och tillväxthormon i det tidiga skedet i utvecklandet av diabetes typ 2-liknande tillstånd hos häst?
- Vilken betydelse har fettvävshormonerna leptin och adiponectin för rubbningar i fett och kolhydratmetabolismen i det tidiga skedet i utvecklandet av diabetes typ 2-liknande tillstånd hos häst?
- Får hästen liknande förändringar i triglycerider, HDL, samt LDL och kolesterol som de som ses hos människa vid diabetes typ 2-liknande tillstånd hos häst?
- Sker det lokala metabola förändringar i muskeln (laktat, pyruvat, glycerol) i det tidiga skedet i utvecklandet av diabetes typ 2- liknande tillstånd hos häst?
- Finns det ett samband mellan endotoxinkoncentrationerna i blod och graden av hormonella och metabola förändringar?

Försöksprotokoll

Hästar

10 varmlodiga travare som ägdes av institutionen för kliniska vetenskaper, SLU, och som inte uppvisade kliniska symptom på sjukdom användes i studien.

Försöksdesign

Prospektiv, experimentell studie. Etiskt tillstånd finns för projektet.

Metoder

Försöksutförande

Dagen före infusionen lades en mikrodialyskateter i gluteusmuskulaturen för inställande av steady-state. Vid dagen för infusionen lades venkatetrar i höger respektive vänster halsven för kontinuerlig infusion av endotoxiner respektive blodprovdragning. Hästen fick sedan vila i boxen i ca 30 minuter efter instrumentering, därefter togs alla 0-prover (blodprover, mikrodialys, fysiologiska parametrar). Därefter gavs en kontinuerlig infusion av endotoxin (E.coli 055:B55) i en dos av 84 ng/kg/timme (total dos 500ng/kg kroppsvikt utspätt i 1000 ml koksalt) under 6 timmar med hjälp av en infusionspump.

Provtagning

Blodprover för analys av hormoner metabola parametrar samt syra-bas balans togs. För att kunna kontrollera att endotoxininfusionen gav upphov till ett inflammatoriskt svar analyserades den vita blod bilden. För att få normalvärden togs blodprover kl 08, 11, 14, 17 samt kl 20 dagen före infusionen. Vid dagen för infusionen togs blodprover omedelbart före infusionen start, varje timme under infusionen och upp till 6 timmar efter infusionens slut. Därefter togs blodprover varannan timme i ytterligare 6 timmar. Under de resterande 60 timmarna togs blodprover var tredje timme. Totalt togs 40 blodprover/häst.

Mikrodialys för analys av glukos, glycerol, lakat, urea och pyruvat samlades kontinuerligt under 60 minuter från en dialyskateter placerad i hästens gluteusmuskulatur (bakdelsmuskulatur). Prover samlades i samma intervall som blodproven. Totalt togs 26 mikrodialysprover/häst.

Övervakning

Fysiologiska parametrar (ex. allmäntillstånd, temperatur, hjärtfrekvens, andningsfrekvens, slemhinnor, auskultation av hjärta, lungor och buklyd samt notering av träck konsistens och urinavgång mm.) Fysiologiska parametrar kontrollerades var 30 min under infusionen av endotoxin och var 30 min under de första 4 timmarna efter infusionens slut. Därefter kontrollerades status varje 3 timma under det första dygnet efter infusionens slut och 2 gånger/dygn de resterande 2 dagarna. EKG för trådlös registrering av hjärtfrekvens och rytm applicerades med hjälp av klisterelektroder på hästens bröstorg och mage. EKG och blodtryck registrerades kontinuerligt under infusionens samt 3 timmar efter infusionens slut.

Uteblivna analyser

Då adiponektinanalysen försvunnit från marknaden när det var dags att analysera våra prover kunde denna analys ej utföras. Vad gäller glukagonanalyserna hade kostnaden för denna ökat markant varför denna analys fick utgå då den inte rymdes inom budgeten för detta projekt.

Resultat

Samtliga hästar uppvisade lindriga och övergående symptom på endotoxemi i form av nedsatt AT, feber, förhöjd andnings- och hjärtfrekvens samt nedsatt tarmmotorik. Kroppstemperaturen ökade under infusionen och nådde en maxtemperatur på 40.5 ± 0.4 °C efter 6 timmars infusion. Medelkroppstemperaturen minskade sedan långsamt men var fortfarande signifikant högre jämfört med basalvärdena under de första 24 h efter infusionens slut. De kliniska tecknen på endotoxemi hade försvunnit hos alla hästar 72 timmar efter infusionens slut.

Syra-bas, Hematologi samt PG

Ingen av hästarna fick någon påtaglig påverkan på syra-bas balansen. Infusionen av endotoxin orsakade en kraftig leukopeni och neutropeni (ca 2 h infusion) och som kvarstod under hela infusionsperioden för att sedan gradvis övergå i en leukocytos. Denna leukocytos kvarstod 72 timmar efter infusionens slut. Prostaglandinfrisättningen visade i likhet med andra studier en bifasisk kurva med en initial stegring under den första timmen av infusionen för att sedan plana ut och därefter åter stiga efter ca 2 h infusion.

Glukos samt insulin

Hästarna utvecklade en kraftig men snabbt övergående hyperglykemi och hyperinsulinemi under endotoxininfusionen. Ytterligare en insulinstegring skedde vid 16 till 24 timmar efter endotoxininfusionens start, men denna stegring var mindre uttalad. Glukoskoncentrationen var stabil under hela perioden efter endotoxininfusionens slut.

Hästarnas insulinkänslighet utvärderades genom kalkylering av RISQI (reciprocal of the square root of insulin) (Treiber et al. 2005). Efter endotoxininfusionens slut utvecklade hästarna en insulinresistens som sedan kvarstod under 30 timmar.

Triglycerider, lipoproteiner, fria fettsyror

Endotoxininfusionen gav markanta förhöjningar i nivån av triglycerider i blodet. Alla lipoproteinfraktioner (VLDL, LDL, HDL) steg men ökningen var störst i VLDL fraktionen. Triglyceridförändringarna inträffade sent i förloppet (48-72 h efter infusionens slut). Inga förändringar sågs i kolesterolfraktionen av lipoproteiner. De fria fettsyrorna steg 12-24 efter infusionens slut och föregick därmed ökningen i triglycerider.

Kortisol samt GH

Samtliga hästar fick ett ökat kortisolpåslag samt en kraftig sänkning av koncentrationen tillväxthormon i slutet av endotoxininfusionen. Kortisolkoncentrationen nådde sin peak vid tidpunkten för endotoxininfusionens slut. Kortisolvärdet började sedan sjunka långsamt för att normaliseras ca 30 timmar efter infusionens slut. Tillväxthormonkoncentrationerna (GH) sjönk markant i slutet av infusionsperioden och låg kvar lågt (ca 50 % reducerat) 72h timmar efter infusionens slut.

Mikrodialys

Mikrodialysdata visade att laktat samt pyruvat steg dramatiskt i muskeln under infusionen och att dessa värden låg kvar högt även 1,5 dygn efter infusionens slut. Detta tyder på en accelererad glykolys som överstiger citronsyracykelns kapacitet. Glukoskoncentrationerna uppvisade stora fluktuationer under infusionen samt de närmaste timmarna efter infusionens slut. Även glycerol uppvisade stora individuella variationer under infusionen.

Konklusion

- *Hur ser det hormonella svaret ut avseende insulin, kortisol och tillväxthormon i det tidiga skedet i utvecklandet av diabetes typ 2-liknande tillstånd hos häst?*

Trots de kliniska symptomen på endotoxinemi, ökat inflammations- och kortisolpåslag samt insulinresistens så uppvisade hästarna normala glukoskoncentrationer. Vuxna hästar får sällan förhöjda glukoskoncentrationer trots att de är uttalat insulinresistenta till skillnad från människor som vid insulinresistens ofta blir hyperglykemiska. En förklaring till denna skillnad

mellan arterna skulle kunna vara det faktum att koncentrationen GH verkar sjunka hos häst i samband med tidig endotoxemi. GH: s stimulerande effekt på leverns glukosproduktion minskar därmed vilket kan vara en faktor som gör att blodglukoset inte stiger lika mycket som hos människa där man ser kraftigt stegrade nivåer av GH i samband med endotoxemi.

- *Vilken betydelse har fettvävshormonerna leptin och adiponectin för rubbningar i fett och kolhydratmetabolismen i det tidiga skedet i utvecklandet av diabetes typ 2-liknande tillstånd hos häst?*

Leptinkoncentrationerna påverkades ej av endotoxininfusionen. Konklusionen blir därför att fettvävshormonet leptin inte har någon betydelse för den tidiga fasen av utvecklandet av stressdiabetes hos häst.

Då adiponektinanalysen utgått på marknaden kunde denna analys inte utföras.

- *Får hästen liknande förändringar i triglycerider, HDL, samt LDL och kolesterol som de som ses hos människa vid diabetes typ 2-liknande tillstånd hos häst?*

På människa har man visat att intensivvårdspatienter har förhöjda nivåer av blodfetter (triglycerider) och låga nivåer av de olika fettfraktionerna; det goda HDL-kolesterolet (high-density lipid) och det dåliga LDL-kolesterolet (low-density lipid) (Wendel et al 2007). Resultaten visar att hästar framförallt får en stegring av triglycerider och att ökningen var störst i VLDL fraktionen. Dessa förändringar påminner om de man ser hos hästar med hyperlipemi. Det är första gången detta rapporterats hos häst. Några förändringar motsvarande de man ser hos människa i kolesterolfraktionen gick ej att se. Resultaten från denna studie bekräftade pilotstudiens resultat att hästar uppvisar mycket senare förändringar i fettmetabolismen jämfört med andra djurslag. Sammantaget tyder detta på att den mekanism som reglerar fettmetabolismen är annorlunda på häst jämfört med människa.

- *Sker det lokala metabola förändringar i muskeln (laktat, pyruvat, glycerol) i det tidiga skedet i utvecklandet av diabetes typ 2- liknande tillstånd hos häst?*

Mikrodialysdata visar att endotoxininfusionen inducerar en kraftigt accelererad glykolys och att denna kvarstår en längre tid även efter det att infusionen avslutats. Den bakomliggande orsaken till detta går bara att spekulera i men kan tänkas bero på en kombination av ett ökat påslag av stresshormon (katekolaminier och kortisol) och en perifer insulinresistens.

- *Finns det ett samband mellan endotoxinkoncentrationerna i blod och graden av hormonella och metabola förändringar?*

Endotoxiner kunde endast detekteras i plasma vid enstaka tillfällen på enstaka hästar vilket sannolikt reflekterar det faktum att levern hinner med att metabolisera endotoxinet i den takt som krävs för att några förhöjda nivåer inte ska uppträda i blod. Det gick därför inte att korrelera endotoxinkoncentrationerna till de metabola eller hormonella förändringarna.

Resultatförmedlingsplan

ACVIM årliga konferens 2013

Bröjer J, Edner A, Nostell K, Carbohydrate and fat metabolism in Equine Endotoxemia.

Nostell K, Edner A, Bröjer J, Cardiovascular response in Equine Endotoxemia

Föredrag och föreläsningar

Delar av dessa data har presenterats för Svenska Islandshästföreningens företagarseminarium i Uppsala 29-30 okt, 2011.

Veterinärmötet 2012

De nya rönen angående metabolismen hos hästar med endotoxinemi kommer delvis att presenteras för allmänpraktiserande veterinärer i samband med veterinärmötet HT 2012 under rubriken kolik.

I manuskript

Bröjer J, Edner A, Nostell K, Carbohydrate and fat metabolism in Equine Endotoxemia.

Nostell K, Edner A, Bröjer J, Cardiovascular response in Equine Endotoxemia

Edner A, Bröjer J, Nostell K, Muscle metabolic changes during experimental endotoxemia in horses, analysed by microdialysis techniques.

Detta är de studier som är under bearbetning men vi räknar med att det kommer komma fler publikationer inom ramen för detta projekt.

Referenser

Agwunobi , A., reid, C., Maycock, P., Little, R., Carlsson, G. Insulin resistance and substrate utilization in human endotoxemia. J. Clin. Endocrinol. 85 (10): 3770-78

Corstjens AM, van der Horst IC, Zijlstra JG et al. (2006) Hyperglycemia in critically ill patients: markers or mediator of mortality? Crit. Care 10, 216.

Hollis AR, Boston RC and Corley KT (2007) Blood glucose in horses with acute abdominal disease. J. Vet. Intern. Med. 21, 1099-1103.

Edner A, Nyman G, and Essén-Gustavsson B (2007) Metabolism before, during and after anaesthesia in colic and healthy horses. Acta Veterinaria Scandinavica 49. Open access journal.

Edner A, Essén-Gustavsson B and Nyman G (2009) Metabolism during anaesthesia and recovery in colic and healthy horses: a microdialysis study. Acta Veterinaria Scandinavica 51. Open access

journal.

Khani S. and Tayek JA (2001) Cortisol increases gluconeogenesis in humans: its role in the metabolic syndrome. *Clin. Sci. (Lond)*. 101, 739-747.

Lang CH, Dobrescu C, Bagby GJ (1992) Tumour necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output. *Endocrinology*. 130, 43-52.

Lazzeri C, Tarquini R and Glunza, F (2009) Glucose dysmetabolism and prognosis in critical illness. *Intern. Emerg. Med.* 4, 147-156.

Treiber, K., Kronfeld, D., Hess, T., Boston, R., Harris, P. Use of proxies and reference quintiles obtained from minimal model analysis for determination of insulin sensitivity and pancreatic beta-cell responsiveness in horses. 2005, 66 (12): 2114-21.

Van der Berghe G, Wouters P, Weekers F et al. (2001) Intensive insulin therapy in critically ill patients. *N. Engl. J. Med.* 345, 1359-1367.

Wallace AM, McMahon AD, Packard CJ et al. (2001) Plasma leptin and the risk of cardiovascular disease in the west of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS). *Circulation*. 104, 3052-3056.

Wendel M, Rüdiger P and Heller AR (2007) Lipoproteins in inflammation and sepsis. II. Clinical aspects. *Int. Care Med.* 33, 25-35.

Wolfe RR, Herdon DN, Jahoor F (1987) Effect of severe burn injury on substrate cycling by glucose and fatty acids. *N. Eng. J. Med.* 317, 403-408.

Wolfe RR and Martini WZ. (2000) Changes in intermediary metabolism in severe surgical illness. *World J. Surg.* 24, 639-674.

Yendarmuri S, Fulda GJ and Tinkoff GH (2003) Admission hyperglycemia as a prognostic indicator in trauma. *J. Trauma* 55, 33-38.

Populärvetenskaplig sammanfattning

Huvudsyftet med denna studie var att genom en standardiserad försöksmodell efterlikna de tidiga ämnesomsättningsrubbningsrubbningar man ser hos hästar med endotoxinemi, fång och ekvint metabolt syndrom för att på så sätt kunna studera mekanismerna bakom perifer insulinresistens och rubbningar i fettomsättningen på häst. Att få denna information är ett nödvändigt första steg i att kunna utveckla framgångsrika behandlingsmetoder för ett sjukdomsproblem som i dagsläget oftast inte svarar på olika behandlingsåtgärder eller förändringar i foderstaten.

På människa är det väl beskrivet att intensivvårdspatienter utvecklar en övergående typ 2 diabetes, så kallad stressdiabetes. Dessa patienter får höga blodsockervärden (blodglukos) till följd av en nedsatt känslighet för insulin i kombination med en ökad produktion av glukos i levern. Den ökade produktionen av glukos i levern är delvis orsakad av att man får ett ökat påslag av tillväxthormon. Resultaten från denna studie visade att hästar inte får något ökat påslag av tillväxthormon vid endotoxinemi, utan istället uppvisar kraftiga sänkningar av tillväxthormon i blodet. Detta skulle kunna förklara varför hästar, till skillnad från människor, sällan får höga blodglukosvärden i blodet trots att de är mycket sjuka.

Studien visade också att hästar med endotoxinemi har en avvikande fettomsättning jämfört med människa. På människa har man visat att intensivvårdspatienter har förhöjda nivåer av blodfetter och låga nivåer av de olika fettfraktionerna; det goda HDL-kolesterolet (high-density lipid) och det dåliga LDL-kolesterolet (low-density lipid). Resultaten från denna studie visar att hästar framförallt får en kraftig stegring av blodfetterna men att kolesterolet inte påverkas i nämnvärd utsträckning. Dessa förändringar påminner om de man ser hos hästar med hyperlipemi. Det är första gången detta rapporterats hos häst. Förändringarna i fettmetabolismen uppstod också sent i förloppet jämfört med andra djurslag. Sammantaget tyder detta på att den mekanism som reglerar fettmetabolismen är annorlunda på häst jämfört med människa.

Sammanfattningsvis skiljer sig hästen från människan i både fettmetabolism och det hormonella svaret vid endotoxinemi eller sk. stressdiabetes. Då mycket av de behandlingsmetoder man har idag baseras på resultat från människostudier kommer dessa resultat ha stor betydelse när man utformar behandlings- och utfodringsstrategier för sjuka hästar i framtiden. Förhoppningsvis kan detta på sikt leda till minskad djurlidande och förkortade vårdtider för våra sjuka hästar.