Kein Einfluss von Metformin auf den Glukosestoffwechsel beim equinen metabolischen Syndrom in einer verblindeten Placebo-kontrollierten Feldstudie

Janike Schumacher

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet. beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2018

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2018

© 2018 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany

édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin,
Klinik für Pferde mit Lehrschmiede, Innere Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. Kerstin Fey

Kein Einfluss von Metformin auf den Glukosestoffwechsel beim equinen metabolischen Syndrom in einer verblindeten Placebo-kontrollierten Feldstudie

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Janike Schumacher (geb. Forst)

Tierärztin aus Berlin

Gießen 2017

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan**:** Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter/in:

Prof. Dr. Kerstin Fey

Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger

Tag der Disputation: 18.12.2017

In folgenden Fachvorträgen wurden bereits Teile dieser Arbeit präsentiert:

Schumacher J: Placebo-kontrollierte Studie zum Einfluss von Metformin auf den Glukosestoffwechsel beim equinen metabolischen Syndrom. 25. Jahrestagung der FG Innere Medizin und Klinische Labordiagnostik der DVG; 03.-04. Februar 2017, Göttingen

Forst J, Fedtke A, Failing K, Fey K: No influence of a three-month application of metformin on insulin-resistance of horses and ponies with equine metabolic syndrome. 2nd German Equine Veterinary Association Congress, 28.-29. October 2016, Berlin

Forst J, Fedtke A, Failing K, Fey K: No influence of a three-month application of metformin on insulin-resistance of horses and ponies with equine metabolic syndrome, 2nd European Equine Endocrinology Symposium, 14.-16. May 2014, Windsor/UK

Forst J, Fedtke A, Fey K: Hyperinsulinämie und Insulinresistenz bei adipösen Pferden und Ponys mit Hufrehe. 20. Jahrestagung der FG Innere Medizin und Klinische Labordiagnostik der DVG; 03.-04. Februar 2012, Göttingen

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Janike Schumacher

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AUC	Area under the curve
BCS	Body condition score
CGIT	kombinierter Glukose-Insulin-Test
CLEIA	Chemilumineszenz Enzym Immunoassay
CLIA	Chemilumineszenz Immunoassay
CN	Cresty neck
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid (Ethylendiamintetraessigsäure)
EHCT	Euglykämischer hyperinsulinämischer Clamp Test
EMS	Equines metabolisches Syndrom
FSIGT	Frequently sampled intravenous glucose tolerance test
Hkt	Hämatokrit
IR	insulinresistent
IS	insulinsensitiv
KGW	Körpergewicht
Li-Hep.	Lithium-Heparin
MAX	Maximum
MIN	Minimum
min	Minute
mRNA	Messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
n	Anzahl
OGT	oraler Glukosetoleranztest
OST	Oral sugar test
PLT	Platelet count (Thrombozytenzahl)
PPID	Pituitary pars intermedia dysfunction
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen in der Minute)
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
Tab.	Tabelle
WBC	White blood cell count (Leukozytenzahl)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis I

Inhaltsverzeichnis II – V

1 EINLEITUNG ..... - 1 -

2 LITERATURÜBERSICHT ..... - 2 -

2.1 DAS EQUINE METABOLISCHE SYNDROM ..... - 2 -

2.1.1 Adipositas - Obesitas ..... - 3 -

2.1.2 Insulinresistenz/ Hyperinsulinämie ..... - 5 -

2.1.3 Hufrehe ..... - 7 -

2.1.4 Labordiagnostische Tests ..... - 9 -

2.1.4.1 Plasmainsulinkonzentration ..... - 9 -

2.1.4.2 Glukosetoleranztest (oral/i.v.) ..... - 11 -

2.1.4.3 Oral sugar test ..... - 13 -

2.1.4.4 Insulintoleranztest ..... - 14 -

2.1.4.5 Kombinierter Glukose-Insulin-Test ..... - 15 -

2.1.4.6 Glukose Clamp-Techniken ..... - 16 -

2.1.4.7 Testverfahren zur EMS-Diagnostik im Vergleich ..... - 17 -

2.2 THERAPIEANSÄTZE BEI EMS ..... - 20 -

2.2.1 Diätetik und Bewegungsmanagement ..... - 20 -

2.2.2 Medikamente/Antidiabetika ..... - 22 -

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN ..... - 26 -

3.1 MATERIAL UND METHODEN ..... - 26 -

3.1.1 Patienten ..... - 26 -

3.1.1.1 Rekrutierung ..... - 26 -

3.1.1.2 Voruntersuchung ..... - 26 -

3.1.1.3 Beurteilung des Ernährungszustandes ..... - 27 -

3.1.1.3.1 Body condition score ..... - 27 -
3.1.1.3.2 Schätzung des Körpergewichts ..... - 27 -
3.1.1.4 Blutuntersuchungen ..... - 29 -
3.1.1.5 Folgeuntersuchung ..... - 30 -
3.1.1.6 Kombinierter Glukose-Insulin-Test ..... - 30 -
3.1.2 Metformin-Studie ..... - 32 -
3.1.2.1 Einschlusskriterien ..... - 32 -
3.1.2.2 Ablauf ..... - 32 -
3.1.2.3 Verblindung ..... - 33 -
3.1.3 Statistische Auswertung ..... - 34 -
3.2 ERGEBNISSE ..... - 36 -
3.2.1 Ergebnisse der Voruntersuchung ..... - 36 -
3.2.1.1 Nüchtern-Insulinwerte ..... - 36 -
3.2.1.2 Hämatologie ..... - 38 -
3.2.1.3 Klinisch chemische Blutparameter ..... - 39 -
3.2.1.4 Cortisol und ACTH ..... - 41 -
3.2.1.5 Auswertung des ersten CGITs ..... - 41 -
3.2.2 Ergebnisse rekrutierter Patienten ..... - 43 -
3.2.2.1 Initial eingeschlossene Patienten und Studienabbrecher ..... - 43 -
3.2.2.2 Patienten mit vollständiger Studienteilnahme ..... - 44 -
3.2.3 Ergebnisse des ersten CGITs ..... - 45 -
3.2.3.1 Flächen unter dem Glukoseverlauf ..... - 45 -
3.2.3.2 Dauer bis zum Erreichen des Basalglukosewertes ..... - 50 -
3.2.3.3 Insulinkonzentration während des ersten CGITs ..... - 50 -
3.2.4 Ergebnisse der Cross-over Studie ..... - 52 -
3.2.4.1 Kombinierte Glukose-Insulin-Tests ..... - 52 -

3.2.4.2 Glukose AUCs bei den drei CGITs ..... - 54 -
3.2.4.3 Individuelle Glukoseverläufe bei den drei CGITs ..... - 55 -
3.2.4.4 Dauer bis zum Erreichen des Basalglukosewertes ..... - 61 -
3.2.4.5 Insulinkonzentrationen während der CGITs ..... - 63 -
3.2.4.6 Cortisolwerte während der CGITs ..... - 67 -
3.2.4.7 ACTH-Werte während der CGITs ..... - 67 -
3.2.5 Individuelle Besonderheiten ..... - 68 -
4 DISKUSSION ..... - 71 -
4.1 DISKUSSION VON MATERIAL UND METHODEN ..... - 71 -
4.1.1 Diskussion der Auswahl der Studienteilnehmer ..... - 71 -
4.1.2 Diskussion des Studienablaufes ..... - 73 -
4.1.3 Diskussion der durchgeführten Untersuchungen ..... - 76 -
4.1.3.1 Diskussion des CGITs ..... - 76 -
4.1.3.2 Diskussion der Auswertung des CGITs ..... - 78 -
4.1.4 Diskussion der Wahl von Macrogol als Placebo ..... - 78 -
4.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE ..... - 80 -
4.2.1 Diskussion der Ergebnisse der Voruntersuchung ..... - 80 -
4.2.2 Diskussion der Ergebnisse der CGITs ..... - 81 -
4.2.3 Diskussion der vergleichenden Betrachtung nach Metformin- und nach Placebogabe ..... - 83 -
6 ZUSAMMENFASSUNG ..... - 88 -
7 SUMMARY ..... - 89 -
8 LITERATUR ..... - 90 -
9 ANHANG ..... - 103 -
9.1 TABELLENVERZEICHNIS ..... - 103 -
9.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS ..... - 103 -

1 EINLEITUNG

Die Bedeutung der Pferde und Ponys hat sich im Laufe der Jahrhunderte deutlich gewandelt. Ehemals wichtig in der Kavallerie und zur Bewältigung der täglichen Arbeit sind sie im heutigen Zeitalter meist Freizeitbegleiter und werden nur selten körperlich wirklich beansprucht. Das Missverhältnis zwischen zu wenig Bewegung und zu hoher Energiezufuhr führt nicht nur bei Menschen, Hunden und Katzen (*German* 2006) zur Entstehung von Übergewicht, sondern auch bei unseren Equiden (*Owers* und *Chubbock* 2013).

Das schon seit dem Anfang des 19. Jahrhunderts bekannte humane metabolische Syndrom wird häufig als Wohlstandskrankheit angesehen und hat in dem erstmals 2002 beschriebenen, equinen metabolischen Syndrom (EMS) einen namentlichen Partner in der Pferdemedizin bekommen (*Johnson* 2002). Das humane metabolische Syndrom wird durch eine Reihe von Faktoren charakterisiert, welche gemeinsam das Risiko für die Entstehung der koronaren Herzkrankheit, von Herzinfarkten, Schlaganfällen und Stoffwechselstörungen wie Typ 2 Diabetes mellitus deutlich erhöhen. Im Gegensatz dazu stellt die bei Pferden und Ponys mit dem EMS auftretende Hufrehe das bedeutsamste gesundheitliche Problem dar. Neben einer Optimierung des Haltungsmanagements der Tiere wurde bereits in wenigen Studien die Wirkung einiger Pharmaka untersucht. Das Antidiabetikum Metformin wird seit vielen Jahren erfolgreich bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 in der Humanmedizin eingesetzt. Studien zu Metformin bei gesunden Pferden (*Rendle* et al. 2013) beziehungsweise nach relativ kurzem Einsatz bei EMS Patienten (*Vick* 2006, *Tinworth* et al. 2012) ergaben widersprüchliche Ergebnisse. Gleichwohl wird die Substanz zumindest als unterstützende Maßnahme im angloamerikanischen Bereich empfohlen (*Frank* et al. 2010, *Frank* und *Tadros* 2014, *Morgan* et al. 2015).

Ziel der eigenen randomisierten, doppelt verblindeten Cross-over Studie war es, die Auswirkungen einer dreimonatigen Gabe von Metformin auf den Insulin- und Glukosestoffwechsel bei an EMS erkrankten Pferden und Ponys im Feld zu untersuchen.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 DAS EQUINE METABOLISCHE SYNDROM

Erstmals fiel der Begriff des equinen metabolischen Syndroms (EMS) im Jahre 2002, als Johnson den Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Adipositas, Insulinresistenz und Hufrehe beschrieb (*Johnson* 2002). Acht Jahre später formulierte ein Expertenkomitee ein „Consensus Statement“ um diesen Begriff genauer zu definieren (*Frank* et al. 2010). Das gemeinsame Auftreten von Adipositas beziehungsweise Obesitas, Insulinresistenz/Hyperinsulinämie und Hufrehe (bzw. nur der Prädisposition dafür) wird seitdem unter dem Begriff des EMS zusammengefasst. Zusätzlich können die betroffenen Tiere Probleme wie Hypertriglyzeridämie, Dyslipidämie, Hyperleptinämie, gesteigerte Entzündungsmarker, Hypertension und einen gestörten Reproduktionszyklus aufweisen (*Gentry* und *Thompson* 2004, *Frank* et al. 2006, *Treiber* et al. 2006a, *Vick* 2006, *Carter* et al. 2009a). Betroffen sind tendenziell eher Equiden unter 15 beziehungsweise 18 Jahren (*Johnson* 2002, *Frank* et al. 2010). Als prädisponiert gelten zahlreiche Ponyrassen wie Welsh-, Dartmoor- und Shetlandponys, Norweger, aber auch Morgan Horses, Paso Finos, Araber, Saddlebreds, Quarter Horses und Tenessee Walking Horses (*Johnson* 2002, *Frank* 2011). Treiber et al. konnten bei einer Untersuchung an insgesamt 160 Welsh- und Dartmoorponys auch eine genetische Komponente für die Entwicklung eines metabolischen Syndroms nachweisen (*Treiber* et al. 2006a). In einer weiteren Studie wurden deutliche Rasseunterschiede zwischen Ponys, Andalusiern und Trabern in Bezug auf den Insulin- und Glukosestoffwechsel aufgezeigt (*Bamford* et al. 2014)

Namentlich wurde das equine metabolische Syndrom angelehnt an das humane metabolische Syndrom, welches eine Zusammenfassung von Risikofaktoren für die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen wie Arteriosklerose, Herzinfarkt und Schlaganfall sowie der Stoffwechselerkrankung Diabetes mellitus Typ 2 darstellt.

Der klinisch und tierschutzmäßig wichtigste Aspekt bei EMS Patienten besteht in der Entwicklung von Hufreheschüben (*Frank* 2011). Pferde zeigen nur sehr selten eine Erschöpfung des Pankreas mit einem damit einhergehenden

Diabetes mellitus Typ 2, sondern meist eine sogenannte kompensierte Insulinresistenz mit Hyperinsulinämie (*Durham* et al. 2009, *Johnson* et al. 2012). Die drei Hauptkomponenten des equinen metabolischen Syndroms und ihre Pathogenese stehen in engen Wechselbeziehungen zueinander und werden im Folgenden eingehender erläutert.

2.1.1 Adipositas - Obesitas

Generalisierte Obesitas oder „Adipositas“, bedeutet per Definition „krankhaftes Übergewicht, das zu gesundheitlichen Beeinträchtigungen führt“ (*Dornblüth* und *Pschyrembel* 2004). Dieses Problem, welches bei Menschen (*Völzke* et al. 2015) sowie Hunden und Katzen (*German* 2006) gleichermaßen bekannt ist, macht auch vor dem „Haustier“ Pferd nicht halt.

Recht aktuelle Untersuchungen in Schottland, England und Dänemark haben gezeigt, das 20 bis 45% der untersuchten Pferde als übergewichtig einzustufen waren (*Wyse* et al. 2008, *Stephenson* et al. 2011, *Giles* et al. 2014, *Jensen* et al. 2015). Auffällig ist hierbei die Tendenz von Besitzern, ihren Tieren einen niedrigeren Body condition score (BCS) zuzuordnen, als dies unabhängige Untersucher tun würden. In einer Studie an 300 erwachsenen Pferden in Virginia-Maryland/ USA wurden sogar 51% der untersuchten Pferde als übergewichtig oder fettleibig eingestuft (*Thatcher* et al. 2012). Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die Prävalenz von Übergewicht oder Fettleibigkeit während der Weidesaison in den Sommermonaten deutlich höher ist als in den Wintermonaten (*Giles* et al. 2014). Weitere Autoren betonen, dass Fettleibigkeit bei Pferden als ernstzunehmendes Problem immer häufiger zu beobachten ist (*Owers* und *Chubbock* 2013) und auch als solches erkannt wird (*Frank* 2011). Dabei wird eine generalisierte Adipositas meist mithilfe eines mehrstufigen Body condition score semiquantitativ erfasst (*Henneke* et al. 1983, *Carter* et al. 2009a, *Frank* 2011). Ein ausgeprägtes Fettdepot im Bereich des Mähnenkamms ist typisch für eine regionale Adipositas bei Pferden und Ponys und wird als "cresty neck" (CN) bezeichnet (*Frank* 2011). Hierfür haben Carter und Kollegen eigens ein Punktesystem, den „cresty neck score“ (CNS) entwickelt, der eine objektivere Beurteilung dieser Körperregion erlaubt. Die Autoren konnten einen

Zusammenhang zwischen dem CNS und erhöhten Insulin- und Triglyceridwerten nachweisen (*Carter* et al. 2009a). Dabei gilt ein CNS von ≥ 3 (von 5) als üblich für EMS Patienten (*Frank* et al. 2010). Weitere typische Lokalisationen für Fettdepots bei einer regionalen Adipositas von Pferden mit dem equinen metabolischen Syndrom sind der Schweifansatz, die Region hinter der Schulter und die Euter- beziehungsweise Präputialregion (*Frank* et al. 2010, *Johnson* et al. 2010, *Frank* 2011).

Ebenso wie bei anderen Spezies wird auch beim Pferd die dauerhafte, über dem Bedarf liegende Zufuhr an Nährstoffen in Kombination mit einem Mangel an Bewegung für die Entstehung der Fettleibigkeit verantwortlich gemacht (*Buff* et al. 2006, *Radin* et al. 2009, *Frank* et al. 2010).

Fettgewebe ist nicht nur ein Energiespeicher, es ist vielmehr als aktives endokrines Organ anzusehen (*Radin* et al. 2009). Wenn Fettgewebe an Masse zunimmt und Adipozyten ihre maximale Speicherkapazität erreichen, hat das eine Dysregulation der Adipokinfreisetzung zur Folge, die insbesondere pro-inflammatorische Zytokine ansteigen lässt (*Kashyap* und *DeFronzo* 2007, *Radin* et al. 2009). Bei Menschen und Ratten wird dem viszeralen Fettgewebe im Hinblick auf die Pathogenese von mit Übergewicht assoziierten Erkrankungen die bedeutendste Rolle, insbesondere hinsichtlich Entzündungsreaktionen, zugeordnet (*Lefebvre* et al. 1998, *O'Rourke* et al. 2009). Beim Pferd hingegen scheint im Hinblick auf eine erhöhte Entzündungsbereitschaft nicht das viszerale Fettgewebe, sondern das Fettgewebe im Bereich des Nackens eine besondere Rolle zu spielen. An dieser Lokalisation lassen sich signifikant höhere Konzentrationen an mRNA für Interleukin 1 und 6 nachweisen als in anderen Fettgeweben (*Burns* et al. 2010). Mehrere Studien belegen, dass auch beim Pferd Fettleibigkeit mit einer Erhöhung von Entzündungsmediatoren und einer Verringerung der Insulinsensitivität einhergeht (*Vick* et al. 2007, *Carter* et al. 2009a, *Suagee* et al. 2013). So konnten *Vick* et al. (2007) in einer Untersuchung an 60 Stuten signifikante Korrelationen zwischen einem erhöhten BCS und dem Körperfettanteil ($r = 0,90$) sowie Korrelationen dieser beiden Aspekte mit einer verringerten Insulinsensitivität ($r = -0,57$ und $r = -0,64$) sowie der gesteigerten Konzentration von Entzündungsmediatoren wie dem Interleukin 1 ($r = 0,40$ bzw.

0,42) feststellen. Auch in einer weiteren Untersuchung wird die Korrelation zwischen der Konzentration von Serum Amyloid A (SAA) und dem BCS ($r = 0,27$; $p = 0,007$) bzw. Insulin ($r = 0,37$; $p < 0,001$) hervorgehoben (*Suagee* et al. 2013). Dies wird durch die Studie von *Carter* et al. (2009a) unterstützt, bei der übergewichtige oder fettleibige Ponys signifikant häufiger eine Hyperinsulinämie von ≥ 30 mU/l aufwiesen als Normalgewichtige. Der geringgradige Entzündungsstatus, der durch vermehrtes Fettgewebe und erhöhte freie Fettsäuren hervorgerufen wird, spielt eine Schlüsselrolle bei der Entstehung einer Insulinresistenz, da erhöhte Zytokinlevel die Insulinsignalwege in peripheren Geweben hemmen (*Kashyap* und *DeFronzo* 2007).

2.1.2 Insulinresistenz/ Hyperinsulinämie

Der Begriff der Insulinresistenz beschreibt eine zu geringe Reaktion von insulinsensitiven Geweben, wie zum Beispiel Muskelzellen, Fett- und Lebergewebe, auf das Hormon (*Kahn* 1978, *Frank* und *Tadros* 2014). Dies wird unter anderem mit einer Dysfunktion von Glukosetransporter Typ 4 (GLUT-4) in Skelettmuskelzellen und Fettgewebe erklärt (*Waller* et al. 2011). GLUT-4 ist ein Membrantransportprotein, welches in Vesikeln verschiedener Zellen bei Säugetieren vorliegt, insulinabhängig in die Zellmembran integriert wird und dort für die Glukoseaufnahme in die Zelle sorgt. Die Folgen der Insulinresistenz sind eine beeinträchtigte Glukoseaufnahme ins Gewebe, eine gesteigerte Glukosesynthese in der Leber und eine gesteigerte Lipolyse, welche wiederum einen Anstieg der zirkulierenden freien Fettsäuren zur Folge hat (*Frank* und *Tadros* 2014). Beim Pferd ist eine Insulinresistenz im Regelfall mit einer Hyperinsulinämie und Euglykämie assoziiert (*Frank* 2009). Ob nun die Hyperinsulinämie die Folge oder die Ursache der Insulinresistenz darstellt ist fraglich (*Frank* und *Tadros* 2014), da auch eine chronische Hyperinsulinämie in einer Herabregulierung der Insulinrezeptoraktivität und der nachfolgenden Prozesse resultiert (*Shanik* et al. 2008). Die vermehrte Sekretion von Insulin aufgrund einer schlechteren Insulinsensitivität des Gewebes wird auch beim Pferd als kompensierte Insulinresistenz bezeichnet (*Treiber* et al. 2005, *Durham* et al. 2009, *Johnson* et al. 2012). Eine zusätzliche Ursache für die regelmäßig

bei EMS Patienten zu beobachtende postprandiale Hyperinsulinämie könnte eine erhöhte Stimulation der ß-Zellen des Pankreas durch Inkretine darstellen. Inkretinhormone wie das glucagon-like peptide 1 (GLP-1) und glucose dependent insulinotropic polypeptide (GIP) werden nach der Aufnahme von Zuckern, Fett und Aminosäuren aus Dünndarmzellen freigesetzt. Sie regen die Insulinsekretion an und verlangsamen die Magenentleerung (*Frank* und *Tadros* 2014). Die Ergebnisse der zu diesem Thema beim Pferd existierenden Studien zeigen zwar einen Zusammenhang zwischen dem aGLP-1 und Insulin bei EMS Patienten (*Chameroy* et al. 2016, *de Laat* et al. 2016b), konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zu gesunden Tieren nachweisen (*Chameroy* et al. 2016).

Auch eine verminderte Elimination von Insulin durch die Leber kann zu einer Hyperinsulinämie beitragen, da im Normalfall ein Großteil des von den ß-Zellen des Pankreas sezernierten Insulins aus dem Pfortaderkreislauf herausgefiltert wird, bevor es das periphere Zirkulationssystem erreicht. Mithilfe der Messung des bei der Synthese von Insulin anfallenden C-Peptids konnte nachgewiesen werden, dass bei insulinresistenten Pferden ein niedrigeres C-Peptid zu Insulin Verhältnis als bei gesunden Tieren besteht (*Tóth* et al. 2010). Das connecting peptide (C-Peptid) verbindet die A- und B- Ketten des Proinsulins. Es wird bei der Umwandlung von Proinsulin zu Insulin abgespalten und zusammen mit diesem aus den ß-Zellen des Pankreas ausgeschüttet. Da das C-Peptid in den gleichen Mengen wie Insulin freigesetzt, aber nicht über die Leber ausgeschieden wird und eine längere Halbwertszeit hat, wird bei physiologischem Insulinstoffwechsel erwartet, dass höhere C-Peptid als Insulinkonzentrationen im Blut vorliegen. In der Studie von Toth et al. (2010) lag die Insulinkonzentration bei gesunden Pferden um 75% niedriger als die Konzentration des C-Peptids. Da aber die Insulinkonzentration bei den EMS Patienten sogar um 5% höher lag als die Konzentration des C-Peptids folgern die Autoren, dass die Hyperinsulinämie bei diesen Tieren aufgrund einer Kombination aus einer gesteigerten Insulinsekretion und einer reduzierten Insulinelimination der Leber zustande kommt. Weiterhin „...deuten die Ergebnisse dieser Untersuchung daraufhin, dass die hepatische Insulinausscheidung als Folge einer erhöhten Blutglukosekonzentration abnimmt“ (*Tóth* et al. 2010, Übersetzung der Autorin).

Die Folgen der Insulinresistenz und der Hyperinsulinämie bestehen in zahlreichen veränderten Stoffwechselvorgängen, einem gestörten Reproduktionszyklus, einer erhöhten Anfälligkeit für Hufreheschübe bei Weideponys oder im schlimmsten Fall der Hufreheerkrankung selber. Dies wurde eindrücklich durch die Studien in der Arbeitsgruppe um Pollitt untermauert, bei denen Insulininfusionen über 2-3 Tage zur Hufrehe bei allen Probanden führte (*Asplin* et al. 2007, *de Laat* et al. 2010). Aber auch eine „moderate" Hyperinsulinämie mit Werten um 200 µU/ml durch die alleinige Infusion jener Glukosemenge, die in den Versuchen mit Insulininfusion notwendig war, um den euglykämischen Zustand beizubehalten, führte zu histologischen Veränderungen der Huflamellen wie im ersten Hufrehe-Stadium (*de Laat* et al. 2012).

2.1.3 Hufrehe

Der dritte für die betroffenen Tiere und ihre Besitzer meist bedeutsamste Aspekt des equinen metabolischen Syndroms ist die Entstehung einer Hufrehe. Die Pododermatitis aseptica diffusa ist äußerst schmerzhaft und stellt die ernsthafteste Erkrankung des Pferdehufes dar (*Pollitt* 2004). Dieser Autor definiert die Hufrehe als eine Ablösung der lamellären Verbindung zwischen der distalen Phalanx und der inneren Hufwand. Im Lehrbuch „Der Huf" (Hrsg. Litzke) wird die Erkrankung als eine „diffuse Entzündung der Huflederhaut, die mit einer Schädigung des Hufbeinträgers einhergeht und im Extremfall zum völligen Funktionsverlust des Hufbeinträgers und zum Ausschuhen" führt (Kap. 10.6.6 Hufrehe; *Litzke* 2012) beschrieben. Dabei ist bekannt, dass es bereits im symptomlosen Initialstadium zu irreversiblen Gewebsschäden am Hufbeinträger kommt (*Budras* 2005). Das bereits genannte Entstehungs- bzw. Initialstadium ist das erste Stadium der Hufrehe. Das zweite Stadium besteht aus der akuten Phase, welche mit dem typischen Hufreheschmerz einhergeht und bis zur Verlagerung des Hufbeins in der Hufkapsel andauern kann. Das dritte, chronische Stadium wird durch ebendiese Positionsveränderung, also eine Absenkung und/oder Rotation des Hufbeins in der Hufkapsel, gekennzeichnet (*Pollitt* 2004, *Budras* 2006). Außer bei der einseitigen Belastungshufrehe, welche beispielsweise durch das Schonen der kontralateralen Gliedmaße bei extrem

schmerzhaften Prozessen wie Frakturen entsteht, sind meist beide Vorderhufe oder sogar alle vier Hufe von einer Hufrehe betroffen. Die auslösenden Faktoren sind vielfältig und reichen von schwerwiegenden systemischen Erkrankungen, die den Verdauungs-, Respirations- oder Genitaltrakt betreffen können, über mechanische Überlastung bis hin zu endokrinologischen Ursachen (*Pollitt* 2004, *Geor* und *Frank* 2009). Die endokrin verursachte Hufrehe stellt einen großen Anteil an der Gesamtzahl der Hufreheerkrankungen (*Geor* und *Frank* 2009, *McGowan* 2010). Dieser betrug bei einer Untersuchung in Finnland sogar 89 Prozent (32 von 36 Tiere), von denen zwei Drittel mit einer basalen Hyperinsulinämie (ohne Hirsutismus) auffielen (*Karikoski* et al. 2011). Ähnlich vielfältig wie die auslösenden Faktoren der Hufrehe sind die Pathomechanismen dieser Erkrankung. Grundlegend sind zwei Hypothesen zu nennen. Zum einen besteht die Vasokonstriktionstheorie, welche eine Ischämie und Nekrose des Hufbeinträgers durch bislang nicht eindeutig bestimmte „gefäßaktive Mediatoren“ erklärt. Zum anderen wird die Matrix-Metalloproteinasentheorie vertreten, bei der die übermäßige Aktivierung dieser Enzyme zu einer Separation der dermoepidermalen Verbindung führt (*Kyaw-Tanner* und *Pollitt* 2004). Es wird jedoch betont, dass „der gleichzeitige Ablauf mehrerer Kaskaden unter gegenseitiger Beeinflussung wie Gefäßveränderungen, Enzymaktivitäten und metabolisch-hormonellen Einflüssen bedeutsam ist“ (*Budras* 2005). Im Bezug auf den Pathomechanismus der Hufrehe bei EMS wurde zeitweise angenommen (*Budras* 2006), dass ein Glukosemangel im Huf durch eine reduzierte Insulinsensitivität ursächlich ist. Dies wurde u.a. durch Asplin et al. (2011) widerlegt. Diese Autoren stellten fest, dass Huflamellen auf ein GLUT-1 vermitteltes Glukose-Transport-System angewiesen sind und die Glukoseaufnahme im Huf nicht durch Insulin verändert oder beeinflusst wird (*Asplin* et al. 2011). Als gesichert gilt gleichwohl, dass Insulin eine wichtige Rolle bei der Entstehung der endokrin bedingten Hufrehe spielt. So konnte in zwei Studien an zuvor gesunden Ponys bzw. Trabrennpferden durch eine dauerhafte, iatrogen hervorgerufene Hyperinsulinämie über 48 bis 72 Stunden bei allen Tieren eine Hufrehe ausgelöst werden (*Asplin* et al. 2007, *de Laat* et al. 2010). Des weiteren korreliert die Höhe des basalen Plasmainsulins mit der

Wahrscheinlichkeit der Entstehung einer Hufrehe bei auf der Weide gehaltenen Ponys (*Carter* et al. 2009c) und deren Schweregrad (*Walsh* et al. 2009). Bemerkenswert erscheint, dass sich die Histopathologie bei der durch Insulin ausgelösten Hufrehe zumindest im Detail von denen anderer Ätiologien unterscheidet. So fehlt bei insulinbedingter Rehe die umfassende Auflösung der Basalmembran (*Asplin* et al. 2010). Der enge Zusammenhang zwischen dem Hormon Insulin und der Hufrehe macht deutlich, dass die Therapie von Insulinresistenz und Hyperinsulinämie bei EMS-Patienten als besonders wichtig im Hinblick auf die Verbesserung der Hufreheproblematik bei diesen Tieren anzusehen ist (*Nourian* et al. 2009).

2.1.4 Labordiagnostische Tests

Neben der Anamnese, der ausführlichen klinischen Untersuchung, der Beurteilung des Ernährungszustandes und gegebenenfalls radiologischen Untersuchungen zur Hufrehediagnostik sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Diagnose des EMS stellen zu können (*Frank* et al. 2010). Da nicht alle adipösen Pferde und Ponys ein Stoffwechselproblem in Form einer Hyperinsulinämie oder Insulinresistenz aufweisen, sollte dieser Aspekt nachgewiesen werden. Die heutigen labordiagnostischen Möglichkeiten sind vielfältig und reichen von der einmaligen Messung von Blutparametern bis hin zu mehr oder weniger aufwändigen dynamischen Tests. EMS Patienten zeigen zumeist eine Normoglykämie, was durch die kompensatorisch erhöhte Insulinausschüttung erklärt wird (*Frank* et al. 2010). Daher hat sich die beim Menschen übliche, regelmäßige Bestimmung der Blutglukose bei Equiden als nicht zielführend herausgestellt. Bei den dynamischen Testverfahren ist noch ungeklärt, welches das geeignetste Verfahren zur Diagnose einer Insulindysregulation ist (*Smith* et al. 2016). Nachfolgend werden die einzelnen Testverfahren erläutert und in Kapitel 2.1.4.7 vergleichend betrachtet.

2.1.4.1 Plasmainsulinkonzentration

Die Messung der basalen Insulinkonzentration im Plasma ist die einfachste Methode, um einen Hinweis auf ein Problem im Bereich der Insulinsensitivität zu bekommen (*Treiber* et al. 2005, *Frank* et al. 2006). Die Probenentnahme sollte

am nüchternen Tier erfolgen (*Frank* et al. 2010, *Frank* 2011), um einen Einfluss des Futters zu vermeiden. Dabei wird empfohlen, den Tieren ab 22 Uhr nur noch eine Scheibe Heu zu füttern und das Blut am darauffolgenden Morgen vor der Fütterung zu entnehmen (*Frank* 2009, 2011). Die Proben sollten gekühlt an ein Referenzlabor versendet werden (*Frank* 2011). Die Messung der Insulinkonzentration erfolgte früher meist mittels Radioimmunoassay (RIA). Speziell der aktuell vom Hersteller nicht mehr angebotene Siemens Coat-A-Count RIA wurde als empfehlenswert angesehen (*Tinworth* et al. 2011). Die Referenzbereiche, beziehungsweise cut-off Werte als Grenze zur Hyperinsulinämie wurden im „consensus paper“ mit 20 µU/ml für den Radioimmunoassay angegeben (*Frank* et al. 2010). Zugleich gilt ein hoher Wert von >100 µU/ml als guter Indikator für eine Insulinresistenz (*Frank* 2011). Die 2016 veröffentlichten Referenzbereiche für einen Chemilumineszenz Immunoassay (CLIA), welche mit dem IMMULITE 2000® gemessen wurden entstanden aus einer Untersuchung von 130 erwachsenen Ponys. Es wurde ein Referenzbereich von 2,0 – 21,2 mU/l erstellt und eine gute Durchführbarkeit des Verfahrens ohne signifikanten Verlust der Insulinaktivität bei Lagerung über drei Tage festgestellt (*Köller* et al. 2016). Zu berücksichtigen ist weiter der ebenfalls 2016 veröffentlichte Vergleich von drei Methoden zur Bestimmung von equinem Insulin. Dieser zeigt, dass der enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), RIA und CLIA signifikant unterschiedliche Ergebnisse bei Messung der gleichen Proben aufweisen. Der CLIA bietet dabei den weitesten analytischen Bereich im Vergleich mit den beiden anderen Methoden, kommt aber bei Insulingehalten von unter 100 µU/ml zu deutlich niedrigeren Ergebnissen als der ELISA und der RIA. Ein Vergleich von Studien, bei denen unterschiedliche Methoden zur Insulinbestimmung eingesetzt wurden, ist also schwer möglich. Auch Referenzbereiche oder cut-off Werte sollten nach Meinung der Autoren methodenspezifisch betrachtet werden (*Warnken* et al. 2016).

Obwohl die erhöhte basale Insulinkonzentration eine reproduzierbare, hohe diagnostische Genauigkeit besitzt (*Carter* et al. 2009c), gibt es Hinweise darauf, dass die Sensitivität des Parameters nur gering ausfällt (*Dunbar* et al. 2016). So wird die Insulinkonzentration so durch die Fütterung beeinflusst, dass sie auch

nach Nüchternstellung in Abhängigkeit von der Futterzusammensetzung stark schwanken kann (*McIntosh* et al. 2007, *Dugdale* et al. 2010, *Jansson* et al. 2016). Frank et al. (2006) stellten in ihrer Untersuchung an sieben übergewichtigen, insulinresistenten und fünf normalgewichtigen Pferden ohne Insulinresistenz fest, dass ein Pferd aus der ersten Gruppe mit einem Nüchtern-Insulinwert von 17 µU/ml im gleichen Bereich wie die Pferde der zweiten Gruppe lag, obwohl es insulinresistent war. Dies verdeutlicht die Wichtigkeit von dynamischen Tests, wenn eine Insulinresistenz vermutet wird (*Frank* et al. 2006, *Frank* und *Tadros* 2014). Ebenso wie bei einer mild ausgeprägten Insulinresistenz ist bei Tieren mit einer akuten Hufrehe oder bei Pferden mit einer Pankreasinsuffizienz als Folge der anhaltenden Insulinresistenz die Bestimmung der basalen Plasmainsulinkonzentration nicht ausreichend (*Frank* 2009).

Um den Zusammenhang von Plasmainsulinkonzentration und Blutglukose in einem Wert darstellen zu können, werden sogenannte Proxies berechnet. Proxies sind Insulinsensitivitätsindices, welche in der Humanmedizin häufig verwendet werden. Die zwei laut Literatur in Kombination beim Pferd zu empfehlenden Proxies sind der reciprocal of the square root of insulin = der Kehrwert/Reziprokwert der Quadratwurzel von Insulin (RISQI) und die modified insulin to glucose ratio = das modifizierte Insulin zu Glukose Verhältnis (MIRG) (*Treiber* et al. 2005). „Der RISQI repräsentiert den Grad der Insulinsensitivität (eine niedrige Zahl weist auf eine Insulinresistenz hin) und der MIRG repräsentiert die Fähigkeit des Pankreas Insulin freizusetzen. Pferde mit einer kompensierten IR haben höhere MIRG Werte“ (*Frank* 2011, Übersetzung der Autorin). Die Nutzung von Proxies ist für Populationsstudien, für das Screening und Langzeitmonitoring von klinischen Fällen laut dieser Arbeitsgruppe sinnvoll (*Treiber* et al. 2005, *Treiber* et al. 2006b). Ebenso wie die Parameter, aus denen sie berechnet werden, besitzen Proxies zwar eine hohe Spezifität, aber eine nur geringe Sensitivität (*Treiber* et al. 2005).

2.1.4.2 Glukosetoleranztest (oral/i.v.)

Der Glukosetoleranztest kann oral oder auch intravenös durchgeführt werden.

Beim oralen Glukosetoleranztest (OGT) wird 1 g Dextrose (= Glukose) pro kg Körpergewicht (KGW) mit Wasser vermengt und den nüchternen Tieren mit 0,5 kg einer Spreu-basierten Futterration gefüttert (*Roberts* und *Hill* 1973, *Jeffcott* et al. 1986, *Frank* und *Geor* 2014). Nach ein bis zwei Stunden wird im Blut ein Glukosepeak erreicht, welcher jedoch von der Magenentleerung und unter anderem von der sonst üblichen Futterration sowie der Jahreszeit beeinflusst wird *(Borer et al. 2012).* Die Messung der Insulinkonzentration nach zwei Stunden scheint der beste Weg zu sein, um Tiere mit einer Insulinresistenz zu identifizieren. Ein Wert von ≥ 87 µU/ml nach 120 Minuten gilt als zu hohe Insulinantwort (*Borer* et al. 2012, *Frank* und *Geor* 2014). In einer Studie von *de Laat* und *Sillence* (2017) wurde die Reproduzierbarkeit des OGT an 8 gesunden Ponys untersucht. Dabei wurde, um die Akzeptanz zu verbessern, auf Grundlage einer Pilotstudie eine Dosierung von 0,75 g D-Glukose/kg KGW genutzt. Es konnten zwar keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Insulinergebnisse zwischen dreimalig wiederholten OGTs festgestellt werden, aber die Höhe der Insulinantwort fiel je nach Ponytyp sehr unterschiedlich aus und die Glukosewerte waren weniger reproduzierbar. Im Gegensatz zu dem intravenösen Glukosetoleranztest ist der OGT zudem von Faktoren wie der Fressgeschwindigkeit, der Magenentleerung und der intestinalen Absorption abhängig (*Kronfeld* et al. 2005, *de Laat* und *Sillence* 2017).

Auch vor dem intravenösen Glukosetoleranztest wird eine Fastenzeit von 10 bis 12 Stunden vor Testbeginn empfohlen. Nach dem Legen eines Venenverweilkatheters werden 0,5 g Dextrose/kg KGW üblicherweise als 50% Lösung injiziert. Die Blutproben werden vor und 15, 30, 45 und 60 Minuten nach der Zuckerinjektion entnommen (*Schuver* et al. 2014). Bei gesunden Tieren werden die Ausgangsblutwerte innerhalb einer Stunde wieder erreicht (*Garcia* und *Beech* 1986).

Eine Abwandlung des intravenösen Glukosetoleranztests stellt der als Goldstandard geltende „frequently sampled intravenous glucose tolerance test“ (FSIGT) dar, welcher ebenso wie der „euglykämische, hyperinsulinämische Clamp Test“ (EHCT) quantitative Aussagen zur Insulinsensitivität ermöglicht. Der EHCT wird nachfolgend in Kapitel 2.1.4.6 ausführlicher erläutert. Der FSIGT

wurde erstmals von Hoffman et al. 2003 in der Pferdemedizin angewendet und wird als weniger komplex und aufwändig als der EHCT beschrieben (*Hoffman* et al. 2003). Beim FSIGT werden nach der Entnahme der Blutproben zur basalen Insulin- und Glukosebestimmung 0,3 g Glukose/kg KGW und nach 20 Minuten 30 µU Insulin/kg KGW intravenös verabreicht. Über einen Zeitraum von 180 Minuten werden 30 weitere Blutproben, teilweise im Minutenabstand, entnommen. Aus den Glukose- und Insulinwerten wird mithilfe des für diesen Zweck in der Humanmedizin entwickelten MinMod Millenium Computerprogramms, basierend auf dem ursprünglich von Bergman et al. 1979 entwickelten Modell, folgende Werte berechnet: Die Glukoseeffektivität (Sg), die Insulinsensitivität, die akute Insulinantwort auf Glukose (AIRg) und der Dispositionsindex (DI) (*Hoffman* et al. 2003). 2009 wurde in einer Untersuchung an sechs erwachsenen Stuten belegt, dass eine Dextrosedosis von 0,1 g/kg KGW ebenso adäquate Ergebnisse liefert, aber die Glukoseausscheidung über den Urin reduziert wird. Daher wird die niedrigere Dosis als empfehlenswert angesehen (*Tóth* et al. 2009b).

2.1.4.3 Oral sugar test

Als eine Abwandlung des oralen Glukosetoleranztests ist der in den USA beliebte oral sugar test (OST) zu nennen. Den nüchternen Tieren wird hierbei 0,15 ml/kg KGW Maissirup oral mittels Maulspritze verabreicht. Blutproben werden vor sowie 30, 60, 90 und 120 Minuten nach der Verabreichung des Sirups entnommen und die Glukose- und Insulinwerte gemessen (*Schuver* et al. 2014). Dabei gelten Tiere, bei denen die Insulinwerte nach 60 und 90 Minuten über 60 µU/ml liegen als insulinresistent (*Frank* 2011). Ob ein Futterentzug für den Testablauf notwendig ist, wird derzeit noch kontrovers diskutiert. In einer Untersuchung von *Bertin* et al. (2016) wurde kein, in der Studie von *Knowles* et al. (2016) hingegen ein signifikanter Einfluss eines Futterentzuges auf die Testergebnisse festgestellt. Die Haltungsform (Weidehaltung vs. Stall) hatte in einer weiteren Untersuchung keinen Einfluss auf die Glukose- und Insulinantwort beim OST. Bei Weidetieren war in dieser Untersuchung ein geringer, aber signifikanter ($p = 0,02$) Einfluss der Jahreszeit auf die Ergebnisse mit höheren

Glukosewerten im September im Vergleich zum Sommer festzustellen (*Banse* und *McFarlane* 2014).

Da insbesondere die Ergebnisse der Insulinbestimmung des OST gut mit denen des intravenösen Glukosetoleranztests korrelieren (AUC Insulin: $r = 0,90$, $p < 0,001$; AUC Glukose: $r = 0,58$, $p = 0,012$) und er einfach und mit geringem Zeitaufwand in der Praxis durchzuführen ist, wird er als geeigneter Feldtest angesehen (*Schuver* et al. 2014). Allerdings wird die genaue Zusammensetzung des kommerziell vertriebenen Glukosesirups (Karo® light corn syrup, ACH Food Companies Inc, Cordova, Tennessee, USA) in den USA vom Hersteller nicht bekannt gegeben, so dass unklar bleibt, mit Hilfe welcher Kohlenhydrate die Insulinresistenz ermittelt wird (*Lindase* et al. 2016a). In einer skandinavischen Untersuchung wurde der OST unter Verwendung eines dort verfügbaren Glukosesirups (Dan Sukker Glykossirap, Nordic Sugar A/S, Copenhagen, Dänemark) mit bekannter Zusammensetzung in einer Dosierung von 0,2 ml/kg KGW (entspricht 216 mg/kg Zucker) durchgeführt und erscheint den Autoren als praktikabel und nützlich (*Lindase* et al. 2016a).

2.1.4.4 Insulintoleranztest

Der Insulintoleranztest (ITT) wird ebenfalls zur indirekten Messung der Insulinsensitivität des Gewebes verwendet. Bei diesem Test werden 0,02 bis 0,125 IU/kg KGW Insulin intravenös als Bolus verabreicht. Blutproben zur Glukosemessung werden vor sowie 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 und 180 Minuten nach der Injektion entnommen (*Caltabilota* et al. 2010). Zur Vereinfachung des Ablaufes wurde der Test auf lediglich zwei Blutproben (vor und 30 Minuten nach 0,1 IU Insulin/kg KGW i.v.) verkürzt. Dieses Vorgehen wird „2-step insulin response test“ genannt (*Bertin* und *Sojka-Kritchevsky* 2013). Es zeigte sich, dass insulinsensitive Tiere 30 Minuten nach der Injektion nur noch 50% ihrer Ausgangsblutglukosekonzentration aufwiesen. Der 2-step Test benötigt somit nur zwei statt 10 Blutproben. Zudem ist der Probenahmezeitraum und somit der Zeitaufwand für den Tierarzt auf 30 min verkürzt. Dies lässt den 2-step Insulintoleranztest als nützlich für die Praxis erscheinen. Um eine Hypoglykämie zu vermeiden, werden nach der zweiten Probenentnahme 150

mg/kg KGW einer 50% Dextroselösung injiziert (*Bertin* und *Sojka-Kritchevsky* 2013, *Frank* und *Tadros* 2014).

2.1.4.5 Kombinierter Glukose-Insulin-Test

Der kombinierte Glukose-Insulin-Test (CGIT) wurde aus dem intravenösen Glukosetoleranztest und dem Insulintoleranztest von Eiler et al. 2005 evaluiert. Ziel war es, einen einfach zu interpretierenden, praxistauglichen und wenig kostenintensiven Test zu entwickeln, der zuverlässig Probleme im Glukosestoffwechsel detektiert (*Eiler* et al. 2005). Der CGIT wird ebenfalls an nüchternen Pferden durchgeführt. Mittels eines Venenverweilkatheters werden 150 mg Glukose/kg KGW und sofort anschließend 0,1 IU/kg KGW Insulin intravenös als Bolus verabreicht. Die Blutglukose wird über einen Zeitraum von zwei Stunden bestimmt (Messzeitpunkte: 0, 1, 5, 15, 25, 35, 45, 60, 75, 90, 106 und 120 Minuten), wobei im ursprünglichen Testprotokoll zusätzliche Probenentnahmen nach 135 und 150 Minuten erfolgten. In der Regel wird dafür ein mobiles Glukosemessgerät (Glukometer) genutzt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen besteht in einer Glukosekurve über die Zeit, welche zunächst Werte im hyperglykämischen Bereich aufzeigt. Je nach Regulationsfähigkeit des Probanden sinken diese dann unterschiedlich schnell wieder in den normo- oder bei Gesunden sogar in den hypoglykämischen Bereich. Die Insulinsensitivität wird als normal angesehen, wenn der basale Glukosewert innerhalb von 45 Minuten wieder erreicht wird. Ein verspätetes Wiedererreichen der basalen Glukosekonzentration wird einer Insulinresistenz zugeschrieben (*Eiler* et al. 2005, *Frank* und *Tadros* 2014). Um das Testergebnis zu verifizieren ist es üblich geworden, zusätzlich den Insulinspiegel nach 45 Minuten zu messen. Dieser Wert wird hauptsächlich durch die Insulinfreisetzung und die Insulinausscheidungsrate des Pankreas beeinflusst (*Frank* und *Tadros* 2014). Wenn der Insulinspiegel zu diesem Zeitpunkt >100 µU/ml beträgt, gilt eine Insulinresistenz als gegeben (*Frank* et al. 2010). Da es im Testverlauf zu einer Hypoglykämie kommen kann, sollten stets aufgezogene Spritzen mit Glukoselösung bereitliegen und bei Bedarf intravenös verabreicht werden. Der kombinierte Glukose-Insulin-Test zeigt eine geringe Reproduzierbarkeit im

Hinblick auf die Glukosekurve, aber eine hohe Reproduzierbarkeit der Insulinwerte (*Brojer* et al. 2013). Die Jahreszeit scheint, zumindest bei gesunden erwachsenen Pferden, keinen klinisch relevanten Einfluss auf die Ergebnisse des CGITs zu haben (*Funk* et al. 2012).

2.1.4.6 Glukose Clamp-Techniken

„Glukose-Clamp-Techniken sind eine gute Methode, um den Glukosestoffwechsel bei Pferden und Ponys zu untersuchen“ (*Rijnen* und *van der Kolk* 2003, Übersetzung der Autorin). Grundsätzlich wird zwischen hyperglykämischer und euglykämisch hyperinsulinämischer Clamp-Technik unterschieden. Während die hyperglykämische Technik die Betazellsensitivität für Glukose quantifiziert, bestimmt die euglykämisch hyperinsulinämische Clamp-Technik die Insulinsensitivität (IS) des Organismus (*DeFronzo* et al. 1979). Das Prinzip der beiden Techniken wurde ursprünglich von dieser Arbeitsgruppe für die Humanmedizin entwickelt und wird nachfolgend erläutert.

Bei der hyperglykämischen Clamp-Technik wird die Konzentration der Glukose im Plasma mithilfe einer zweiphasigen Glukoseinfusion auf ein fixes hyperglykämisches Plateau gebracht und dort über einen Zeitraum von zwei Stunden gehalten. In der ersten Phase der Infusion wird eine solche Menge an Glukose infundiert, dass die gewünschte Hyperglykämie erreicht wird. In der zweiten Phase, der Erhaltungsphase, wird die Infusionsrate alle fünf Minuten angepasst, um das hyperglykämische Plateau zu erhalten. Die Messung der Plasmainsulinkonzentration erfolgt in den ersten zehn Minuten in zwei Minuten Intervallen und danach alle zehn Minuten. Zum einen stellt die zur Aufrechterhaltung der Hyperglykämie notwendige Glukoseinfusionsrate ein Maß für die Insulinsensitivität des Organismus dar, zum anderen ist die Insulinantwort auf die fixierte Hyperglykämie ein gutes Maß für die Betazellantwort auf Glukose (*DeFronzo* et al. 1979).

Das Prinzip der euglykämischen hyperinsulinämischen Clamp-Technik (EHCT) besteht darin, die Plasmainsulinkonzentration in einen hyperinsulinämischen Bereich zu steigern und sie auf diesem Plateau für 120 Minuten zu halten. Um eine Hypoglykämie zu verhindern, wird parallel eine Glukoseinfusion verabreicht.

Dieses Vorgehen basiert auf der Gabe eines Insulin-Bolus mit anschließender fixer Infusionsrate für Insulin, welche durch vorherige Studien festgelegt wurde. Zeitgleich wird die Glukoseinfusionsrate angepasst, um die Glukosekonzentration im euglykämischen Bereich zu halten. Die Glukosemenge, die hierfür notwendig ist, stellt ein Maß für die Insulinsensitivität dar, da die Infusionsrate der Glukose die Glukoseaufnahme in die Körperzellen durch Insulin widerspiegelt. Der EHCT verspricht dabei eine verlässlichere Messung der Insulinsensitivität als die hyperglykämische Clamp-Technik, da die gesamte Menge des verabreichten Insulins biologisch aktiv ist. Hingegen besteht ein Teil des beim hyperglykämischen Clamp sezernierten, körpereigenen Insulins aus Proinsulin, welches weniger potent als Insulin ist.

Beide Glukose-Clamp-Techniken besitzen beim Menschen eine gute Reproduzierbarkeit (*DeFronzo* et al. 1979). Der EHCT zeigte auch beim Pferd eine gute Reproduzierbarkeit und geringe Variabilität mit einem Variationskoeffizienten der Insulinsensitivität von 14,1 ± 5,7% (*Pratt* et al. 2005). Der EHCT wird in der Pferdemedizin als gute Methode zur Untersuchung des Glukosestoffwechsels und der Insulinsensitivität betrachtet (*Rijnen* und *van der Kolk* 2003). Der Nachteil der Glukose Clamp-Techniken liegt im hohen Zeitaufwand und den hohen Kosten, was sie unattraktiv für die klinische Praxis macht (*Brojer* et al. 2013).

2.1.4.7 Testverfahren zur EMS-Diagnostik im Vergleich

Der EHCT und der FSIGT gelten in der Pferdemedizin als am besten etablierte Methoden zur Untersuchung der Insulinsensitivität. Nachfolgend werden die bislang existierenden vergleichenden Untersuchungen zu diesen und den weiteren dynamischen Testverfahren erläutert. Es ist noch immer unklar, welches Verfahren das beste Verhältnis von Aufwand zu Nutzen darstellt und am besten geeignet ist, um die Insulinsensitivität in der Praxis zu beurteilen (*Smith* et al. 2016). Die Wahl des Testverfahrens ist daher meist von den Umständen der Untersuchung abhängig.

Bei einem Vergleich von EHCT und FSIGT durch *Pratt* et al. (2005) wurden sechs gesunde Stuten über einen Zeitraum von vier Wochen jeweils zweimal beiden

Tests unterzogen. Zwischen den Untersuchungen lagen mindestens fünf Tage. Dabei zeigte der FSIGT eine geringere Reproduzierbarkeit und höhere Variabilität als der EHCT. Der Variationskoeffizient der Insulinsensitivität für den FSIGT lag bei 23,7 ± 11,2% und für den EHCT bei 14,1 ± 5,7%. Der Korrelationskoeffizient betrug für den FSIGT 0,33 und für den EHCT 0,74. Daher ist der EHCT unter den verwendeten Untersuchungsbedingungen für die Beurteilung der Insulinsensitivität bei wiederholten Untersuchungen zu Managementänderungen oder dem Krankheitsverlauf besser geeignet als der FSIGT.

Die oralen dynamischen Testverfahren wurden vergleichend vor allem von *Banse* und *McFarlane* (2014), *Dunbar* et al. (2016) und *Smith* et al. (2016) untersucht. *Smith* et al. (2016) verglichen den OGT mit dem OST. In einer randomisierten Studie mit cross-over Design wurden dafür acht Ponys und fünf Pferde wiederholt untersucht. Hierbei klassifizierte der OGT mehr Tiere als insulinresistent (IR) (sieben von acht Ponys) als der OST (fünf der acht Ponys). Bei beiden Untersuchungen wurden die gleichen fünf Tiere als IR klassifiziert. Bei einem Vergleich des OST mit dem EHCT und einem Dexamethason-Hemmtest wurden acht gesunde, insulinsensitive Pferde über einen Zeitraum von vier Wochen mit den unterschiedlichen Testverfahren untersucht. Hierbei gab es keine Korrelation der Ergebnisse (*Banse* und *McFarlane* 2014). Die Autoren geben als mögliche Ursache für dieses Ergebnis zum einen die einheitliche Population aus gesunden Tieren an. Zum anderen halten sie es für möglich, dass der intravenöse Glukosetoleranztest besser mit dem OST korreliert, da beide Tests sowohl die Pankreasantwort als auch die Insulinsensitivität wiederspiegeln, wohingegen mittels EHCT nur die Gewebsinsulinsensitivität beurteilt wird. Insgesamt halten sie weitere Untersuchungen für notwendig, um den Nutzen des OST beurteilen zu können.

Dunbar et al. (2016) verglichen in einer prospektiven, randomisierten Studie an 12 klinisch gesunden Pferden die basale Insulinkonzentration, den OST, den CGIT und den FSIGT miteinander. Dabei wurden die Testverfahren in randomisierter Reihenfolge, mit einem Abstand von 8-12 Tagen bei jedem der Tiere durchgeführt. Der als Goldstandard gewertete FSIGT klassifizierte dabei

sieben Pferde als IR und fünf als insulinsensitiv (IS). Die basale Insulinkonzentration und der OST hingegen stuften alle Tiere als IS ein. Die Autoren schlussfolgern daher, dass der OST keinen größeren diagnostischen Nutzen habe als die einmalige Messung des basalen Insulins. Der CGIT zeigte hingegen eine hohe Sensitivität von 85,7%, aber nur eine geringe Spezifität von 40%, wenn die Dauer der positiven Glukosekurve betrachtet wurde. Eine gemeinsame Berücksichtigung der Dauer des positiven Glukoseverlaufes und des Insulinwertes nach 45 Minuten führt zu einer Steigerung der Spezifität des CGITs auf 100% bei der Klassifikation der Tiere als insulinsensitiv bzw. insulinresistent in dieser Untersuchung (*Dunbar* et al. 2016).

2.2 THERAPIEANSÄTZE BEI EMS

2.2.1 Diätetik und Bewegungsmanagement

Meist liegen die Ursachen des equinen metabolischen Syndroms in einer Kombination aus Bewegungsmangel und - im Verhältnis zum Verbrauch - übermäßiger Energiezufuhr. Der Ansatz, das Übergewicht und die dann für das EMS entscheidenden krankhaften Veränderungen im Glukose- beziehungsweise Insulinstoffwechsel mit einer reduzierten Fütterung und einem angepassten Bewegungsmanagement zu therapieren, ist daher äußerst nachvollziehbar. So sind sich die meisten Autoren einig, dass die Insulinresistenz übergewichtiger Pferde am besten durch eine Reduktion des Körpergewichts gemanagt werden sollte (*Frank* 2009, *Geor* 2010), welches durch eine Kombination aus Bewegung und Diät zu erreichen ist (*Pratt* et al. 2006, *Ungru* et al. 2012, *Morgan* et al. 2016).

Die Tatsache, dass eine Reduktion des Körpergewichts durch energiereduzierte Diät die Insulinsensitivität beim EMS-Patienten signifikant verbessert und positive Auswirkungen auf den basalen Insulinspiegel sowie den Glukose- und Insulinstoffwechsel hat, konnte wiederholt belegt werden (*Freestone* et al. 1992, *van Weyenberg* et al. 2008, *Dugdale* et al. 2010, *McGowan* et al. 2013, *Ungru* et al. 2013).

Dugdale et al. kommen dabei zu dem Schluss, dass eine Reduktion des Raufutters (Heu) auf 1% Trockenmasse pro kg des aktuellen Körpergewichts zu einem Gewichtsverlust ohne gesundheitliche Risiken führt (*Dugdale* et al. 2010). Detaillierte Diätempfehlungen für EMS Patienten wurden von weiteren Autoren veröffentlicht (*Frank* 2009, *Geor* und *Harris* 2009). Die Prävention von Übergewicht ist naturgemäß eine sinnvolle Strategie, um eine Insulin-induzierte Hufrehe zu verhindern (*Carter* et al. 2009b). Bezüglich einer speziellen Diät wurden neben reduzierter täglicher Energiezufuhr auch die Effekte von Futterzusätzen wie Chrom, Fruktooligosacchariden (FOS), Psyllium oder Magnesium untersucht. Die Supplementierung von Chromhefe zeigte einen geringen positiven Effekt auf den Insulinstoffwechsel (*Vervuert* et al. 2010), der aber in einer weiteren Studie nicht bestätigt werden konnte (*Chameroy* et al. 2011). Dabei wurden in der Untersuchung von *Vervuert* et al. (2010) 27

insulinresistente Pferde und Ponys in zwei Gruppen eingeteilt und erhielten, zusätzlich zur täglichen Heuration, entweder Hefe ohne Chrom oder Chromhefe in einer Dosierung von 25 µg Cr/kg KGW über einen Zeitraum von vier Wochen. Die Tiere der mit Chromhefe supplementierten Gruppe zeigten nach den vier Wochen eine deutliche, aber nicht signifikant geringere Insulinantwort im Stärketoleranztest als vor der Chromhefegabe. Weiterhin betonen die Autoren, dass alle Tiere auch nach der Supplementierung weiterhin abnorm hohe Insulinreaktionen aufwiesen (*Vervuert* et al. 2010).

Auch Ergebnisse zur zusätzlichen Fütterung von Fruktooligosacchariden sind nicht einheitlich. *Respondek* et al. (2010) zeigten in einer Placebo-kontrollierten cross-over Studie an acht übergewichtigen, insulinresistenten Araberwallachen, dass die Gabe von 45 g FOS/Pferd und Tag über sechs Wochen zu einer signifikanten Verbesserung der Insulinsensitivität im Vergleich zum Placebo Maltrodextrin führte. Obgleich sich weder Körpergewicht noch body condition score änderten wurde die Insulinsensitivität im FSIGT signifikant gesteigert und die Insulinantwort auf Glukose im Vergleich zum Placebo reduziert. Auch das Seruminsulin war nach der FOS-Supplementierung mit Werten von 14,4 ± 10,5 mU/L signifikant niedriger als die initialen Werte mit 27,6 ± 9,2 mU/L (*Respondek* et al. 2010). Hingegen konnten *McGowan* et al. keinen zusätzlichen Effekt durch 10 g FOS/100kg KGW und Tag nachweisen wenn die Tiere gleichzeitig auf eine energiereduzierte Diät gesetzt wurden. Auch hier betrug der Supplementierungszeitraum sechs Wochen (*McGowan* et al. 2013).

Die tägliche Fütterung von Psyllium über 60 Tage führte, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, zu signifikant ($p < 0,01$) niedrigeren postprandialen Blutzucker- und Insulinspiegeln bei gesunden, normalgewichtigen Pferden (*Moreaux* et al. 2011).

In der Untersuchung von *Winter* et al. (2016) an 5 Pferden mit phänotypischen Anzeichen für EMS und einem pathologischen CGIT konnte durch die tägliche Supplementierung von 30 mg Magnesiumaspartathydrochlorid/kg KGW über drei Monate bei drei Tieren ein physiologisches CGIT Ergebnis erreicht werden. Dieser Unterschied in den Blutwerten war nicht statistisch signifikant, was nach

Meinung der Autoren an der kleinen Anzahl an Tieren gelegen haben könnte. Weitere Untersuchungen mit höherer Fallzahl zur Supplementierung von Magnesium bei EMS Patienten sind daher abzuwarten.

Auch der Einfluss eines Trainingsprogrammes auf die Insulinsensitivität wird unterschiedlich bewertet. *Powell* et al. zeigten, dass bei reiner Heufütterung bereits nach einer Woche leichtem Training von 30 Minuten Trab an der Longe eine um 60% verbesserte Insulinsensitivität bei dicken Stuten erreicht werden konnte. Dabei ist zu erwähnen, dass dieser Effekt nach dem Absetzen des täglichen Bewegungsprogrammes wieder rückläufig war (*Powell* et al. 2002). Eine Untersuchung an 12 übergewichtigen oder sogar fettleibigen, insulinresistenten Wallachen konnte jedoch nach acht Wochen Training (viermal pro Woche mit steigender Belastungsintensität) keinen Einfluss auf die Insulinresistenz feststellen. Allerdings erhielten diese Tiere weiter täglich ein kg Kraftfutter (*Carter* et al. 2010). Als für den Besitzer wenig aufwändig und daher interessant zu bewerten ist die Tatsache, dass ein elektronisches Fütterungssystem zu einer Steigerung der täglich zurückgelegten Wegstrecke und einer signifikanten Reduktion des BCS, des CNS und der Körperfettanteils führt. Dabei konnte jedoch kein statistisch signifikanter Einfluss auf die Insulinsensitivität nachgewiesen werden (*de Laat* et al. 2016a).

2.2.2 Medikamente/Antidiabetika

In der Humanmedizin werden zahlreiche Medikamente zur Therapie des häufig aus dem metabolischen Syndroms entstehenden Diabetes mellitus Typ 2 angewendet. Dabei werden die Medikamente in insulinogene, also Wirkstoffe, die auf die ß-Zellen des Pankreas wirken und dort eine vermehrte Insulinfreisetzung bewirken, und nicht-insulinogene Therapeutika eingeteilt. In der Therapie des EMS ist eine weitere Steigerung der Insulinfreisetzung aufgrund der regelmäßig beim Pferd vorliegenden kompensierten Insulinresistenz und der damit einhergehenden Hyperinsulinämie unerwünscht. Daher kommen die insulinogenen, in der Humanmedizin genutzten Substanzen bei der EMS Therapie nicht zum Einsatz, werden jedoch der Vollständigkeit halber nachfolgend kurz erläutert.

Die insulinogenen Antidiabetika gehören den Stoffklassen der Sulfonylharnstoffe, Glinide, Dipeptidylpeptidase-IV Inhibitoren und Glukagon-like Peptid-1 Analoga an. Sulfonylharnstoffe und Glinide fördern die Freisetzung von Insulin durch Stimulation der ß-Zellen. Ebenso wird dies durch Dipeptidylpeptidase-IV Inhibitoren und Glukagon-like Peptid-1 Analoga bewirkt, welche die Insulinsekretion jedoch insbesondere nach der Nahrungsaufnahme beeinflussen.

Alpha-Glukosidaseinhibitoren, Biguanide, Thiazolidindione und SGLT2 Inhibitoren (Hemmer des Natrium-Glukose Co-Transporters 2) zählen zu den nicht-insulinogenen Stoffklassen. Alpha-Glukosidaseinhibitoren hemmen die Spaltung von Disacchariden im Bereich der Dünndarmmukosa und behindern somit deren Aufnahme aus dem Dünndarm. Biguanide besitzen mehrere, zum Teil ungeklärte, Wirkmechanismen. Sie verzögern die enterale Glukoseresorption, hemmen die hepatische Glukoneogenese, steigern die Insulinsensitivität des Gewebes und stimulieren die Glykolyse. Thiazolidindione steigern ebenfalls die Insulinsensitivität. Die SGLT2 Inhibitoren wirken im Bereich der renalen Glukoseausscheidung und steigern diese durch die Hemmung der renalen Rückresorption (*Waring* 2016).

Aus der Klasse der Alpha-Glukosidaseinhibitoren wurden nach aktuellem Kenntnisstand bisher keine Medikamente in der Pferdemedizin eingesetzt. Dies könnte durch die häufig auftretenden, unerwünschten Arzneimittelwirkungen im Bereich des Magen-Darm-Traktes beim Menschen (*Waring* 2016) begründet sein.

Biguanide wie **Metformin** sind Mittel der ersten Wahl der medikamentösen Therapie nach der Änderung des Lebensstils bei Menschen mit einem Typ 2 Diabetes mellitus (*Donath* 2016). Der Einsatz von Metformin zur Therapie von Pferden und Ponys mit dem equinen metabolischen Syndrom wurde bereits in mehreren Studien geprüft. Metformin in einer Dosierung von 15 mg/kg KGW führte zu einer verringerten basalen Insulinkonzentration bei 18 insulinresistenten Tieren (*Durham* et al. 2008). In einer weiteren Untersuchung an insulinresistenten Ponys und einer Kontrollgruppe konnten aber keine Veränderungen der

Insulinsensitivität, welche mithilfe des FSIGT untersucht wurde, beobachtet werden (*Tinworth* et al. 2012). Dies wird vor allem mit der schlechten oralen Bioverfügbarkeit von Metformin beim Pferd begründet (*Hustace* et al. 2009, *Tinworth* et al. 2010). Diese liegt bei nur 7,1% bei nüchternen und 3,9% bei gefütterten Tieren (*Hustace* et al. 2009). Interessant ist jedoch, dass durch eine Gabe von 30 mg/kg KGW Metformin die Glukose- und Insulinkonzentrationen nach Dextrosegabe per Nasenschlundsonde an sieben Pferde reduziert werden konnten. Somit scheint das Medikament auf der Ebene der verminderten Resorption von Kohlenhydraten zu wirken (*Rendle* et al. 2013). Daher wird der Einsatz von Metformin z.B. bei Hufrehepatienten mit EMS zur Abschwächung von postprandialen Hyperinsulinämien empfohlen (*Frank* und *Tadros* 2014, *Morgan* et al. 2015).

Pioglitazon, eine Substanz aus der Klasse der Thiazolidindione ist ein in der Humanmedizin eingeschränkt empfohlenes Antidiabetikum, da unerwünschte Wirkungen wie ein erhöhtes Risiko für Blasenkarzinome, Frakturen und Herzinsuffizienz durch die Anwendung von Pioglitazon beobachtet wurden. Bei einer Studie an sechs gesunden Pferden konnten mit einer Dosierung von 1 mg/kg KGW ähnlich hohe Wirkstoffspiegel im Blut erreicht werden, wie sie in der Humanmedizin als wirksam gelten. Bei den Pferden wurden keine unerwünschten Arzneimittelwirkungen während der 11-tägigen Verabreichung beobachtet (*Wearn* et al. 2011). In einer Untersuchung an Vollblutstuten, bei denen zuvor durch die intravenöse Gabe von LPS eine Insulinresistenz hervorgerufen worden war, konnte keine Wirkung auf die Insulinsensitivität bzw. Insulinresistenz nachgewiesen werden. Allerdings wurde ein veränderter Gehalt an Glukose- und Fetttransportern in Skelettmuskulatur und Unterhautfettgewebe nachgewiesen (*Suagee* et al. 2011).

Nicht zur Klasse der Antidiabetika gehört **Levothyroxin**, welches ebenfalls für die Behandlung von EMS diskutiert wird. Das Schilddrüsenhormon ist jedoch zur Anwendung bei lebensmittelliefernden Tieren in der EU verboten. In einer Langzeitstudie konnten signifikante Gewichtsverluste und eine Verbesserung der Insulinsensitivität nachgewiesen werden (*Frank* et al. 2008). Zu berücksichtigen ist, dass einige mit Levothyroxin behandelte Tiere Hyperaktivität und einen

gesteigerten Bewegungsdrang zeigen. Empfohlen wird es in den USA insbesondere zur Gewichtsreduktion bei fettleibigen Tieren, welche zum Beispiel aufgrund einer Reheerkrankung nicht trainiert werden können (*Frank* und *Tadros* 2014).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Bei der vorliegenden Untersuchung handelt es sich um eine prospektive randomisierte, Placebo-kontrollierte cross-over-Studie zur Wirkung von Metformin bei am equinen metabolischen Syndrom (EMS) erkrankten Pferden und Ponys.

3.1 MATERIAL UND METHODEN

3.1.1 Patienten

Es wurden EMS Patienten rekrutiert, welche eine lokale Adipositas oder Obesitas in Kombination mit einer anamnestischen Hufreheerkrankung aufwiesen. Desweiteren sollten die Patienten einen Nüchtern-Plasmainsulinwert über 30 µU/ml aufweisen. Hierfür erfolgten Voruntersuchungen und bei einem Nüchtern-Plasmainsulinwert über 30 µU/ml ein kombinierter Glukose-Insulin-Test. Eingeschlossen wurden nur Patienten, welche in beiden Blutuntersuchungen pathologische Veränderungen aufwiesen. Tragende oder säugende Stuten sowie Patienten, welche unter einem akuten Hufreheschub oder einer anderen akuten Erkrankung litten, wurden nicht in die Studie einbezogen.

3.1.1.1 Rekrutierung

Die Rekrutierung der Studienteilnehmer erfolgte teilweise aus dem Patientengut der Klinik für Pferde, Innere Medizin, an der Justus-Liebig-Universität Gießen. Desweiteren stellten überweisende Haustierärzte einen Kontakt zwischen Tierbesitzern und Untersuchern her.

Es wurden insgesamt 61 Patienten im Zeitraum von April 2010 bis Dezember 2011 aufgrund einer lokalisierten Adipositas oder Obesitas in Kombination mit einer anamnestischen Hufreheerkrankung vorgestellt.

3.1.1.2 Voruntersuchung

Bei der Terminvereinbarung zur Voruntersuchung wurden die Besitzer darauf hingewiesen, dass den Tieren vor der Blutentnahme für mindestens 10 Stunden das Futter entzogen werden sollte. Nach einer ausführlichen Anamneseerhebung mit besonderem Augenmerk auf den Verlauf der vorberichtlich erwähnten

Hufrehe, folgte eine klinische Untersuchung entsprechend der Lehre der Propädeutik des Pferdes. Weiterhin wurde, nach Reinigung der Punktionsstelle mit Isopropanol, eine Blutentnahme durch Punktion der Vena jugularis externa durchgeführt. Für die Untersuchungen wurde Blut in mit Heparin, Citrat, EDTA (Sarstedt, Nümbrecht) oder EDTA und Trasylol (Biocontrol, Mainz) versetzte Kunststoffblutprobengefäße verbracht. Die Blutproben wurden gekühlt transportiert und in der Klinik für Pferde, Innere Medizin, umgehend weiterverarbeitet (siehe Kapitel 3.1.1.4 Blutuntersuchungen).

3.1.1.3 Beurteilung des Ernährungszustandes

3.1.1.3.1 Body condition score

Zur Beurteilung des Ernährungszustandes wurde durch Adspektion und Palpation im Zuge der klinischen Untersuchung der body condition score anhand der Henneke Skala, welche in Tabelle 1 inhaltlich wiedergegeben ist, ermittelt.

3.1.1.3.2 Schätzung des Körpergewichts

Das Körpergewicht der Patienten wurde mittels eines im Bereich der Gurtlage angewendeten Gewichtsmaßbandes für Pferde und Ponys (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim) bestimmt.

Tab.: 1 Einteilung des Body condition score nach Henneke et al. (1983); Übersetzung durch Autorin

Score	Kurzfassung	Beschreibung
1	Mager	Extrem ausgemergelt, kein Fettgewebe erkennbar, Dornfortsätze, Rippen, Schweifansatz und Knochen von Widerrist, Schulter und Hals stehen extrem hervor
2	Sehr dünn	Ausgemergelt, dünne Bindegewebsschicht über den Knochen; Dornfortsätze, Rippen, Schweifansatz und die Knochen von Widerrist, Schulter und Hals sind sichtbar
3	Dünn	Dünne Fettschicht, einzelne Dornfortsätze und Rippen sind nicht mehr zu unterscheiden, Widerrist, Schultern und Hals auf den ersten Blick nicht übermäßig dünn
4	Relativ dünn	Dornfortsätze und Rippenumrisse sind erkennbar, der Schweifansatz ist je nach Rasse vorstehend, Widerrist, Schultern und Hals erscheinen nicht übermäßig dünn
5	Gut	Dornfortsätze und Rippen sind nicht sichtbar, die Rippen sind jedoch zu fühlen, der Schweifansatz ist weich, Widerrist, Schultern und Hals sind rundlich und glatt
6	Sehr gut	Rippenregion und Schweifansatz fühlen sich weich an; Fettablagerungen entlang von Widerrist, Hals und hinter den Schultern
7	Zu gut	Rippenzwischenräume sind fettgefüllt; der Schweifansatz fühlt sich weich an; Fettablagerungen entlang von Widerrist, Hals und hinter den Schultern
8	Dick	Die Rippen sind nur schwer zu fühlen; der Schweifansatz fühlt sich weich an; Fettablagerungen entlang von Widerrist und hinter den Schultern, der Hals ist umfangreich
9	Sehr dick	Ungleichmäßig verteiltes Fett auf den Rippen; Fettpolster am Schweifansatz, Widerrist, hinter den Schultern und am Hals

3.1.1.4 Blutuntersuchungen

Die Blutglukose wurde vor Ort unmittelbar nach der Blutentnahme aus einem mit Li-Heparin versetzten Blutprobengefäß mithilfe eines handelsüblichen Glukometers (Ascensia Elite®, Bayer HealthCare AG, Leverkusen) gemessen.

Um eine akute subklinische Erkrankung auszuschließen, wurden im Zentrallabor des Fachbereichs für Veterinärmedizin hämatologische Untersuchungen mithilfe des Advia 2120 (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen) durchgeführt und klinisch chemische Parameter mit dem ABX Pentra 400 (ABX Diagnostics, Horiba, Kyoto, JPN) bestimmt. Die Untersuchungen wurden durch die routinierten Labormitarbeiter des Zentrallabors (Professur für Klinische Pathophysiologie & Klinische Laboratoriumsdiagnostik) der Klinik für Kleintiere der JLU Gießen durchgeführt.

Für die Messung von Insulin, ACTH und Cortisol wurden Blutprobenröhrchen verwendet, in denen EDTA und Trasylol/Aprotinin (100 µl Aprotininlösung in einer Konzentration von 10.000 KIU/ml wirksame Substanz/3ml Probenvolumen) vorgelegt waren. Diese Blutprobenröhrchen wurden innerhalb von maximal drei Stunden zentrifugiert (10 min bei 2600 rpm) und das Plasma in Eppendorfgefäße (Sarstedt, Sarstedt) überführt. Das Plasma wurde bei 7 °C gekühlt und innerhalb von 24 Stunden in das Biocontrol Labor nach Ingelheim verbracht. Dort wurden die Proben am Tag nach der Probenentnahme durch erfahrene Mitarbeiter des Biocontrol Labors in Ingelheim untersucht (www.biocontrol.de).

Die Insulin- und Cortisolwerte wurde mithilfe eines beim Pferd etablierten Chemilumineszenz Immunoassays (CLIA) auf dem Gerät ADVIA Centaur XP der Firma Siemens bestimmt. Die Bestimmung des ACTH erfolgte mittels Chemilumineszenz Enzym Immunoassays (CLEIA) mit dem Gerät Immulite 2000 der Firma Siemens.

3.1.1.5 Folgeuntersuchung

Wie im Kapitel 3.1.1 (Patienten) erläutert, sollten nur Pferde und Ponys in die Studie eingeschlossen werden, bei denen der Nüchtern-Insulinwert als pathologisch anzusehen war. Auszuschließen waren Patienten, die klinisch oder durch ihren erhöhten ACTH-Wert eine PPID aufwiesen.

Bei 18 (29,5%) der 61 vorberichtlich und vom Ernährungszustand her in Frage kommenden Pferde und Ponys wurde zum Zeitpunkt der Voruntersuchung ein Nüchtern-Plasmainsulinwert von über 30 µU/ml ermittelt. Zudem konnte auf Basis der klinischen Untersuchung und der Laborparameter bei diesen Tieren kein Hinweis auf eine akute Erkrankung festgestellt werden. Diese Patienten wurden innerhalb von zwei Wochen nach der Voruntersuchung eingehender, im Rahmen der sogenannten Folgeuntersuchung, evaluiert.

Auch vor der Folgeuntersuchung wurden die Besitzer gebeten den Tieren mindestens 10 Stunden vor der geplanten Untersuchung das Futter zu entziehen. Dies erfolgte in der Regel am späten Abend, da die Untersuchungen in den frühen Morgenstunden durchgeführt wurden. Es erfolgte zunächst eine erneute klinische Untersuchung zur Kontrolle des aktuellen Gesundheitszustandes der Tiere. Blieb diese Kontrolle ohne besonderen Befund, so wurde anschließend zum Nachweis einer Störung des Glukosestoffwechsels und einer somit vorliegenden Insulinresistenz ein kombinierter Glukose-Insulin-Test durchgeführt.

3.1.1.6 Kombinierter Glukose-Insulin-Test

Der kombinierte Glukose-Insulin-Test (combined glucose-insulin test: CGIT) wurde nach dem Modell von Eiler et al. (2005) durchgeführt. Eine Modifikation des Verfahrens wurde dahingehend vorgenommen, dass zur Vereinfachung des Ablaufes im Feld auf die Probenentnahme nach fünf Minuten verzichtet wurde.

Den Patienten wurde nach Scheren, Reinigung und Desinfektion der Punktionsstelle für die Dauer des Tests ein Venenverweilkatheter (G 12 Vygonyle®, Vygon, Aachen) in eine Vena jugularis externa eingelegt. Um den Tieren ausreichend Zeit zur Beruhigung vor dem Testbeginn zu geben, wurden

nach dem Legen des Venenverweilkatheters weitere Vorbereitungen für den CGIT getroffen und nichtinvasive Untersuchungen, wie die Beurteilung des Ernährungszustandes und Ermittlung des Körpergewichtes, durchgeführt. Nach der ersten Probenentnahme (Zeitpunkt 0) bekamen die Patienten nacheinander 150 mg/kg Körpergewicht Glukose (G40, Braun, Melsungen) und 0,1 U/kg Körpergewicht Insulin (Insuman® Infusat 100 I.E./ml, Sanovi Aventis, Frankfurt) verabreicht. Um zu verhindern, dass eventuelle Reste der Glukose- und Insulinlösung im Venenverweilkatheter verblieben, wurden direkt im Anschluss 10 ml isotone Natriumchloridlösung (isotone Natriumchloridlösung ad us. vet., Braun, Melsungen) injiziert. Für das genaue Einhalten der Probenentnahmezeitpunkte wurde eine Stoppuhr genutzt. Diese wurde sofort nach Injektionsende der isotonen Kochsalzlösung gestartet. Um Ungenauigkeiten durch im Venenverweilkatheter verbliebene Blutreste zu vermeiden, wurden vor jeder Probenentnahme fünf ml Blut aspiriert und verworfen.

Blutglukose und Insulin wurden zu den in Tabelle 2 aufgeführten Zeitpunkten bestimmt.

Tab. 2: Messzeitpunkte des kombinierten Glukose-Insulin-Tests (min)

	0	1	15	25	35	45	60	75	90	105	120
Insulin	X					X			X		
Glukose	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Eine Störung der Glukoseregulationsfähigkeit wurde dann als gegeben angesehen, wenn 45 Minuten bis zum Wiedererreichen des Basalglukosewertes überschritten wurden.

3.1.2 Metformin-Studie

3.1.2.1 Einschlusskriterien

Um in die Placebo-kontrollierte Metformin-Studie eingeschlossen werden zu können, mussten die EMS Patienten folgende Kriterien erfüllen:

- lokale oder generalisierte Adipositas oder Obesitas
- anamnestische Hufreheerkrankung
- Nüchtern-Plasmainsulinwerte über 30 µU/ml
- Wiedererreichen des basalen Glukosewerts nach mehr als 45 Minuten im CGIT (s. 3.1.1.6)

Zudem kamen nur EMS Patienten in Frage, deren Haltungs- und Fütterungsbedingungen für den Zeitraum der Studie (sechs Monate) nach Aussage und Beratung der Besitzer gleichwohl nicht verändert werden konnten.

3.1.2.2 Ablauf

Waren alle Einschlusskriterien erfüllt, so wurden die Besitzer nochmals eingehend über den Studienablauf informiert. War nach der Erläuterung der Untersuchungsergebnisse ein Therapieversuch mit den erforderlichen Kontrolluntersuchungen von den Besitzern erwünscht, erfolgte die Zuteilung der Patienten zum jeweiligen Behandlungsschema mithilfe einer vorab erstellten Randomisierungsliste.

Bei Behandlungsschema 1 wurde den Patienten über drei Monate zweimal täglich 20 mg/kg Körpergewicht Metforminhydrochlorid (Metformin AL 1000, ALIUD Pharma, Laichingen) mit etwas Futter verabreicht oder von den Besitzern in Wasser aufgelöst mit einer Spritze ins Maul eingegeben. Nach den drei Monaten wurde als Placebo eine adspektorisch gleiche Menge an Macrogol (Macrogol 4000, Fagron, Barsbüttel) ebenfalls für drei Monate zweimal täglich verabreicht.

Macrogol 4000 ist als Hilfsstoff in den genutzten Metformintabletten enthalten und hat in den in der vorliegenden Studie verwendeten Mengen keine zu

erwartende pharmakologische Wirkung. Es war daher naheliegend, diese Substanz als Placebo in der eigenen Studie zu verwenden.

Patienten, die über die Randomisierungsliste dem zweiten Behandlungsschema zugeteilt wurden, erhielten die genannten Substanzen in umgekehrter Reihenfolge. Sowohl für die Autorin als auch für die Besitzer war nicht ersichtlich um welche Substanzen es sich jeweils handelte – die Studie erfolgte somit verblindet (s. 3.1.2.3)

Zum Zeitpunkt des Wechsels der Substanzen nach drei Monaten und am Ende des Behandlungszeitraumes, nach insgesamt sechs Monaten, wurden Kontrolluntersuchungen inklusive CGITs durchgeführt. Dabei wurde identisch wie bei der in Kapitel 3.1.1.5 erläuterten Folgeuntersuchung vorgegangen.

3.1.2.3 Verblindung

Um die Verblindung sowohl der Untersucherin als auch der Besitzer sicherzustellen, wurden für jeden Patienten jeweils sechs Kisten mit je 62 neutralen Behältern vorbereitet. In die eine Hälfte der Behälter (3 Kisten à 62 Behälter) wurde entsprechend des Körpergewichts der Tiere die korrekte Menge an Metformin in zermörserter Form eingefüllt, während in die andere Hälfte der Behälter die gleiche Menge an Macrogol 4000 Pulver gefüllt wurde. Die in Pulverform in neutralen Behältern abgegebenen Substanzen waren adspektorisch nicht zu unterscheiden.

Die so vorbereiteten und gekennzeichneten Kisten wurden an die für die Randomisierung verantwortliche Person übergeben. Diese Person hatte keinerlei Kontakt zu den Patientenbesitzern oder Patienten und war nicht bei den Untersuchungen anwesend. Wurde ein Patient in die Studie eingeschlossen, so wählte diese Person anhand der zuvor erstellten Randomisierungsliste die entsprechende Kiste aus, entfernte die Kennzeichnung und übergab diese dann der Untersucherin. Kurz vor Ablauf des dreimonatigen Behandlungszeitraumes erhielt die Untersucherin dann die weiteren, ebenfalls nicht gekennzeichneten Pakete mit der anderen Substanz.

3.1.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch die Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung des Statistikprogrammpakets BMDP/Dynamic, Release 8.1, (DIXON, 1993) durchgeführt. Die Erstellung der grafischen Darstellungen erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel 2013.

Zur Beschreibung der Daten wurden bei quantitativen, annähernd normalverteilten Merkmalen arithmetische Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) berechnet und werden als MW ± SD angegeben. Da die Insulinwerte und die Dauer bis zum Erreichen der Ausgangsglukosewerte nicht normalverteilt waren, erfolgte die Datenbeschreibung durch die Angabe der Mediane, der Quartile (Median; 1./3. Quartil) sowie der kleinsten und größten Beobachtungen mit Darstellung im Box-and-Whisker-Plot.

Zur statistischen Prüfung des Gruppeneinflusses auf Signifikanz wurden t-Tests bei Normalverteilung beziehungsweise der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test bei schiefer Verteilung für einmalig erhobene Parameter (wie zum Beispiel das Alter) genutzt.

Um zu ermitteln, ob das Verum eine Wirkung auf den Glukosestoffwechsel besitzt, wurden die Ergebnisse nach Placebo- und nach Metformingabe mittels zweifaktorieller Varianzanalysen in der Modifikation für cross-over Modelle mit Messwiederholungen bezüglich der Behandlung ausgewertet. Einfaktorielle Varianzanalysen wurden eingesetzt, um eventuelle Unterschiede, die durch die Reihenfolge der Behandlungen begründet sind, festzustellen. Bei fehlenden Werten wurde ein Wald-Test durchgeführt.

Einige Patienten erreichten während der CGITs auch nach 120 Minuten nicht wieder den Ausgangsglukosewert. In diesem Fall wurde die Zeitdauer fiktiv auf 180 Minuten festgelegt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Friedman-Tests. Zudem wurde in diesem Fall noch explorativ ein Kruskal-Wallis-Test angewendet.

Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0{,}05$ zugrunde gelegt, d.h. Ergebnisse mit $p \leq 0{,}05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Zusätzlich wird der exakte p-Wert angegeben.

3.2 ERGEBNISSE

3.2.1 Ergebnisse der Voruntersuchung

Die Voruntersuchungen fanden an insgesamt 61 Patienten im Zeitraum von April 2010 bis Dezember 2011 statt. Die Tiere wurden aufgrund einer lokalisierten Adipositas oder Obesitas in Kombination mit einer anamnestischen Hufreheerkrankung vorgestellt. Die 27 Pferde und 34 Ponys waren zwischen sieben und 26 Jahre (15,3 ± 4,4) alt.

Im Rahmen der klinischen Untersuchung konnte bei keinem der vorgestellten Pferde und Ponys Hinweise auf das Vorliegen einer akuten Erkrankung festgestellt werden.

Da als Einschlusskriterium eine generalisierte oder lokalisierte Adipositas oder Obesitas vorgegeben war ist es nicht verwunderlich, dass der Ernährungszustand aller Pferde und Ponys als dick (7/9) bis adipös (9/9) einzustufen war. Der body condition score (nach Henneke et al. 1983) reichte von 7,5 – 9,0 (8,3 ± 0,5).

3.2.1.1 Nüchtern-Insulinwerte

Wie in Abb. 1 zu sehen, lagen die Nüchtern-Insulinwerte bei den initial untersuchten 61 Probanden zwischen 3 und 260 µU/ml. Die Insulinwerte erwiesen sich als deutlich linksschief verteilt und wiesen einen Median von 23,6 µU/ml mit einem 1. Quartil von 12,6 µU/ml und einem 3. Quartil von 38,0 µU/ml auf. Von den 61 adipösen Pferden und Ponys mit Hufrehe-Vorbericht zeigten 26 (43%) Nüchtern-Insulinwerte von unter 20 µU/ml. 12 der Tiere hatten Werte zwischen 20 und 30 µU/ml und 23 wiesen die für den Studieneinschluss geforderten Insulinkonzentrationen von über 30 µU/ml auf. Von diesen 23 Patienten zeigte ein Pony neben einem Nüchtern-Insulinwert von 82,6 µU/ml (in Abb. 1 als Kreis markiert) einen deutlich erhöhten ACTH Wert von 168 pg/ml, so dass es nicht in die Metformin-Studie aufgenommen werden konnte. Die Insulinwerte der verbleibenden 22 Patienten (36% der initial untersuchten Tiere) sind in Abb. 2 dargestellt. Der Median der Nüchtern-Insulinwerte bei diesen Tieren betrug 44,7 µU/ml mit einem 1. Quartil von 37,1 µU/ml und einem 3. Quartil

von 108 µU/ml. Zwei Patienten zeigten mit 241 und 260 µU/ml auffällig hohe Nüchtern-Insulinwerte.

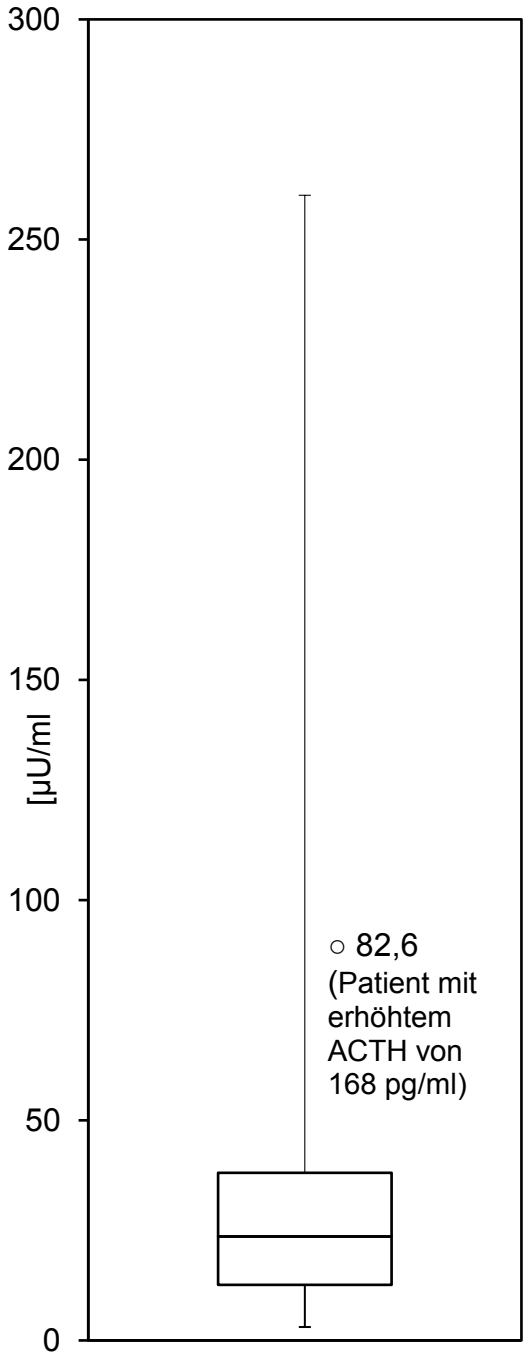

Abb. 1: Box-Plot der Nüchtern-Insulinwerte aller 61 adipösen Pferde und Ponys mit Hufrehe- Anamnese

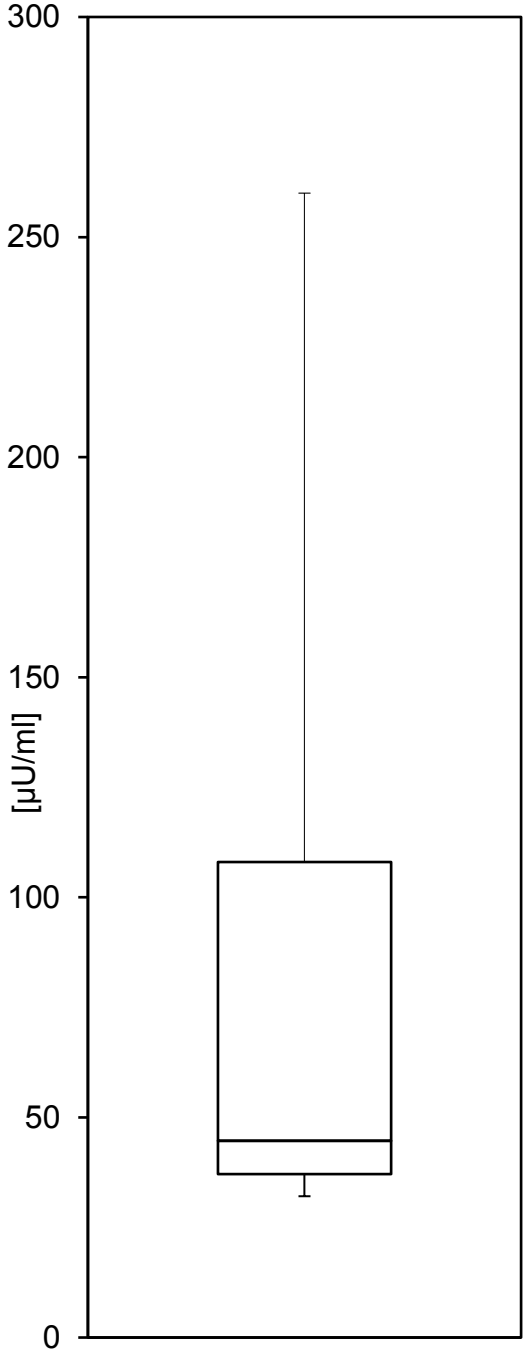

Abb. 2: Box-Plot der Nüchtern-Insulinwerte der 22 Pferde und Ponys mit Hyperinsulinämie > 30 µU/ml und ohne erhöhtes ACTH

3.2.1.2 Hämatologie

Die 60 adipösen Patienten mit Hufrehe-Anamnese und ACTH-Werten im Referenzbereich zeigten keine relevanten Veränderungen der hämatologischen Blutparameter. Wenn sie in Abhängigkeit von ihren Nüchtern-Insulinwerten in zwei Gruppen (< bzw. > 30 µU/ml) eingeteilt wurden, bestanden keine signifikanten Unterschiede (Tab. 3). In der Patientengruppe mit Nüchtern-Insulinwerten < 30 µU/ml befanden sich 22 Ponys und 16 Pferde, in der Gruppe mit Werten > 30 µU/ml 10 Ponys und 12 Pferde.

Tab. 3: Hämatologie der Patienten in der Voruntersuchung (n=60)

	Einheit	Referenzbereich	Nüchtern-Insulin < 30 µU/ml (n=38)	Nüchtern-Insulin > 30 µU/ml (n=22)
WBC	10^9/l	4,37 - 8,96	7,41 ± 1,32	7,37 ± 1,61
Neutrophile	10^9/l	2,22 - 5,80	4,20 ± 1,20	3,83 ± 0,75
Lymphozyten	10^9/l	0,99 - 3,48	2,66 ± 0,78	2,97 ± 0,99
Monozyten	10^9/l	0,07 - 0,37	0,28 ± 0,11	0,27 ± 0,12
Eosinophile	10^9/l	0,00 - 0,35	0,20 ± 0,13	0,21 ± 0,15
Basophile	10^9/l	< 0,18	0,03 ± 0,03	0,04 ± 0,08
Hkt	l/l	0,29 - 0,44	0,35 ± 0,06	0,37 ± 0,04
PLT	10^9/l	90 - 270	178 ± 40	175 ± 49

WBC: white blood cell count = Leukozytenzahl
Hkt: Hämatokrit
PLT: platelet count = Thrombozytenzahl

3.2.1.3 Klinisch chemische Blutparameter

Auch bei den chemischen Blutparametern wurden keine klinisch als relevant zu bewertenden Veränderungen bei den 60 Probanden festgestellt. Eine Auswertung der Blutparameter nach Einteilung der Patienten in eine Gruppe mit Nüchtern-Insulinwerten unter 30 µU/ml und eine mit Werten über 30 µU/ml zeigte, dass die Tiere mit Hyperinsulinämie höhere Triglyceridwerte aufwiesen (Tab. 4). Dieser Unterschied erwies sich im t-Test als statistisch signifikant ($p = 0,001$). Die Tiere mit einem Nüchtern-Insulin von > 30 µU/ml wiesen dabei Triglyceridwerte von 0,70 ± 0,30 mmol/l auf, was über dem Referenzbereich von 0,05 – 0,52 mmol/l des untersuchenden Labors liegt. Die Patienten mit physiologischen oder leicht erhöhten Nüchtern-Insulinwerten lagen mit 0,47 ± 0,21 mmol/l im Referenzbereich. Interessanterweise gab es keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bei den anderen klinisch-chemischen Parametern, auch nicht bei den Glukosewerten.

Die hohen Standardabweichungen der GLDH Aktivitäten lassen sich in beiden Gruppen auf jeweils drei Pferde zurückführen, die mit Werten von 79, 27, und 21 U/l in der Gruppe der Pferde mit Nüchtern-Insulinwerten < 30 µU/ml und 103, 25 und 24 U/l in der Gruppe der Patienten mit Nüchtern-Insulinwerten > 30 µU/ml auffielen.

Die Magnesiumwerte lagen in beiden Gruppen knapp unterhalb des Referenzbereichs des untersuchenden Labors.

Abschließend ist zu erwähnen, dass auch bei individueller Betrachtung die Tiere mit Nüchtern-Insulinwerten > 30 µU/ml keine Veränderungen in ihren klinisch-chemischen Blutparametern zeigten, die auf schwerwiegende Organveränderungen hätten schließen lassen.

Tab. 4: Ergebnisse der klinisch chemischen Blutuntersuchung

	Einheit	Referenz-bereich	Nüchtern-Insulin < 30 µU/ml (n=38)	Nüchtern-Insulin > 30 µU/ml (n=22)
Harnstoff	mmol/l	3,18 - 7,31	4,58 ± 1,14	4,53 ± 1,56
Kreatinin	µmol/l	69 - 155	101 ± 21	93 ± 18
Na^+	mmol/l	132 - 138	135 ± 1,9	135 ± 2,2
Cl	mmol/l	94 - 102	101 ± 2,0	100 ± 2,2
K^+	mmol/l	2,6 - 4,9	3,8 ± 0,7	3,8 ± 0,5
Ca^{++}	mmol/l	1,51 - 1,74	1,62 ± 0,09	1,66 ± 0,10
Phosphor	mmol/l	0,47 - 1,33	0,89 ± 0,21	0,94 ± 0,19
Mg^{++}	mmol/l	0,47 - 0,62	0,46 ± 0,07	0,46 ± 0,05
Gesamteiweiß	g/l	58,0 - 74,0	67,5 ± 5,1	67,3 ± 4,6
Albumin	g/l	29,9 - 37,9	32,07 ± 2,64	31,80 ± 2,85
Globulin	g/l	23,1 - 42,1	35,5 ± 5,0	35,5 ± 4,7
Bilirubin gesamt	µmol/l	9,12 - 46,49	16,73 ± 6,23	15,94 ± 8,35
Bilirubin direkt	µmol/l	3,18 - 7,51	5,06 ± 1,03	4,44 ± 1,09
Triglyceride	**mmol/l**	**0,05 - 0,52**	**0,47 ± 0,21**	**0,70* ± 0,30**
Alkalische Phospatase	U/l	< 292	139 ± 35	147 ± 43
GLDH	U/l	< 15	7,6 ± 12,9	11,5 ± 21,5
Gamma GT	U/l	< 106	45 ± 34	37 ± 21
Amylase	U/l	n.b.	1,8 ± 2,2	2,3 ± 3,3
Lipase	U/l	n.b.	6,5 ± 1,6	6,2 ± 1,5
AST	U/l	< 487	390 ± 113	387 ± 128
Creatinkinase	U/l	< 320	268 ± 72	277 ± 55
LDH	U/l	< 571	488 ± 127	539 ± 192
Fibrinogen	g/l	1,25 - 3,29	1,94 ± 1,64	1,83 ± 0,74
Glukose	mmol/l	4,2 - 6,4	4,2 ± 0,9	4,4 ± 0,9

* statistisch signifikant
n.b.: nicht bestimmt

3.2.1.4 Cortisol und ACTH

Die Cortisolwerte der 61 Tiere lagen im arithmetischen Mittel bei 2,6 ± 1,2 µg/dl, wobei ein Pferd mit einem Wert von 6,9 µg/dl geringfügig oberhalb des Referenzbereiches von 1,0 - 6,7 µg/dl des untersuchenden Labors lag. Dieses Pferd nahm aufgrund seines physiologischen Nüchtern-Insulinwertes nicht an der cross-over-Studie teil.

Die ACTH Konzentration lag bei 22,5 ± 18,7 pg/ml. Dabei wies ein Pony einen Wert von 168 pg/ml auf (Cortisol: 2,7 µg/dl; Nüchtern-Insulin: 82,6 µU/ml). Damit überschritt es selbst den im Herbst geltenden Referenzbereich des Labors für ACTH und wurde daher nicht in die weiteren Untersuchungen einbezogen. Die Teilnehmer des cross-over Versuchs, die die Studie beendeten (n = 14) wiesen ACTH-Werte von 8 bis 40 pg/ml (17,4 ± 10,0 pg/ml) auf.

3.2.1.5 Auswertung des ersten CGITs

Nach den Voruntersuchungen standen 18 der 22 Pferde und Ponys, welche einen erhöhten Nüchtern-Insulinwert über 30 µU/ml aufwiesen, für den kombinierten Glukose-Insulin-Test zur Verfügung. Bei den anderen vier Patienten bestand seitens der Besitzer kein Interesse an weiteren Untersuchungen oder einem medikamentellen Therapieversuch.

Die intravenöse Gabe von Glukose und Insulin führte bei diesen 18 untersuchten Patienten erwartungsgemäß zu einem raschen und deutlichen Anstieg des Blutglukosewertes auf bis zu 19,2 mmol/l nach einer Minute. Bei zwei der 18 Patienten fielen die Blutglukosewerte innerhalb von 45 min auf Werte unterhalb des individuellen initialen Basalblutglukosewertes ab. Diese zwei Pferde kamen aufgrund der somit als physiologisch zu bewertenden Fähigkeit, ihre Blutglukose zu regulieren, für weitere Untersuchungen oder eine medikamentöse Therapie nicht in Frage.

Beispielhaft sind der physiologische und pathologische Verlauf der Blutglukosewerte beim kombinierten Glukose-Insulin-Test in Abb. 3 dargestellt. Bei einer physiologischen Blutglukoseregulationsfähigkeit wird erwartet, dass die Blutglukose im Testverlauf innerhalb von 45 Minuten unter den initial

gemessenen Basalwert absinkt. Der CGIT wurde in der eigenen Untersuchung als pathologisch interpretiert, wenn die Blutglukosekonzentration nicht innerhalb von 45 Minuten unter den Ausgangswert absank.

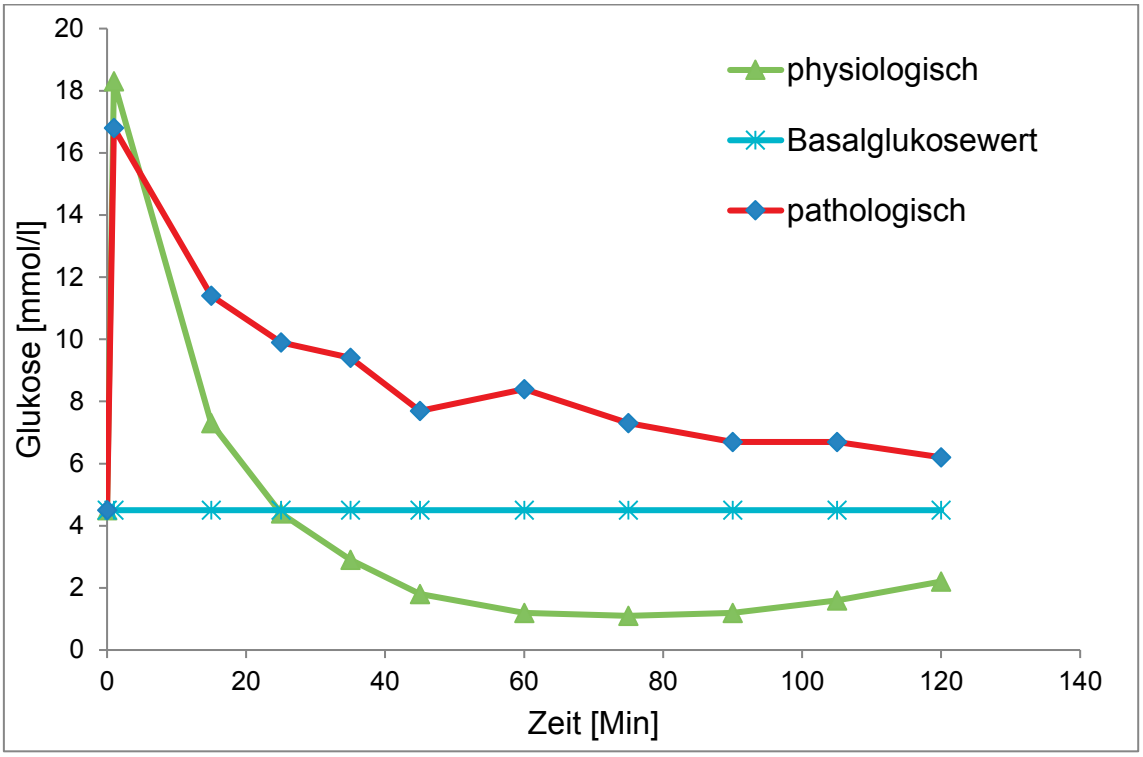

Abb. 3: CGIT-Verläufe bei zwei Probanden mit zufällig gleichem initialen Blutglukose-Basalwert von 4,5 mmol/l

Aufgrund ihrer pathologisch erhöhten Glukosewerte 45 Minuten nach Beginn des intravenösen kombinierten Glukose-Insulin-Tests konnten schließlich 16 Pferde und Ponys in die Studie eingeschlossen werden.

3.2.2 Ergebnisse rekrutierter Patienten

3.2.2.1 Initial eingeschlossene Patienten und Studienabbrecher

Wie in Tabelle 5 dargestellt setzte sich das Patientengut für den cross-over Versuch zunächst aus neun Wallachen und sieben Stuten zusammen. Es handelte sich um vier Warmblutpferde, vier Shetlandponys, zwei Islandpferde, zwei Ponys ohne klare Rassezugehörigkeit und jeweils ein arabisches Vollblut, Norweger, Quarter-Horse-Isländer-Mix und ein Appaloosa. Das Alter der Tiere lag zwischen acht und 26 Jahren (14,6 ± 4,7 Jahre). Das zu Beginn der Studie per Gewichtsmaßband ermittelte Körpergewicht lag zwischen 180 und 750 kg (403,1 ± 180,0 kg)

Tab. 5: Übersicht der in den cross-over Versuch eingeschlossenen Patienten

Nr.	Rasse	Alter (Jahre)	Sex	Gewicht (Maßband kg)	BCS	Start-Substanz
1	Warmblut	21	Stute	600	8,0	Met
2	Norweger	10	Stute	547	9,0	Met
3	Shetlandpony	13	Wallach	192	8,0	Plac
4	Warmblut	14	Stute	750	9,0	Met
5	Shetlandpony	12	Wallach	206	7,5	Met
6	Shetlandpony	8	Wallach	250	9,0	Plac
7	Warmblut	15	Wallach	550	7,5	Met
8	Araber	15	Stute	500	8,0	Met
9	Pony	8	Wallach	250	7,5	Met
10	Quarter-Mix	17	Stute	506	8,0	Plac
11	Pony	12	Wallach	240	9,0	Plac
12	Isländer	19	Wallach	414	8,0	Plac
13	Shetlandpony	11	Wallach	180	8,5	Met
14	Isländer	26	Wallach	420	8,0	Met
15	Appaloosa*****	16	Stute	500	7,5	Plac
16	Warmblut*****	16	Stute	656	8,0	Plac

***** Drop-outs (s. Text) Met: Metformin Plac: Placebo

Bei den Patienten 15 und 16 konnte die Studie aufgrund von akuten Erkrankungen (akuter Hufreheschub bzw. schwere Gliedmaßenverletzung) nicht zu Ende geführt werden. Die für diese Pferde erhobenen Daten wurden daher nicht in die Auswertungen einbezogen. Beide Pferde erkrankten innerhalb der ersten drei Monate und waren zu diesem Zeitpunkt der Placebo-Gruppe zugeordnet. Aufgrund dieser „drop-outs“ haben neun der auswertbaren 14 Probanden die Studie mit dem Verum Metformin begonnen.

Der schwere akute Reheschub, der bei der 16-jährigen Appaloosa-Stute (Nr. 15) zur Euthanasie aus Tierschutzgründen führte, ließ sich auch nach erneuter Analyse der klinischen und labordiagnostischen Daten nicht prognostizieren. Die klinischen Untersuchungen sowohl bei der Voruntersuchung als auch direkt vor dem initialen CGIT waren, auch hinsichtlich der Gliedmaßenpulsation und des Gangbildes, unauffällig. Der Nüchtern-Insulinwert in der Voruntersuchung lag mit einem Wert von 37,1 µU/ml deutlich im unteren Bereich der verbleibenden 14 Probanden mit einem Median (1./3. Quartil) von 49,4 (39,7/108,8) µU/ml. Auch die Insulinwerte während des initialen CGITs waren zu den Zeitpunkten 0, 45 und 90 Minuten mit Werten von 17, 160 und 58 µU/ml im Vergleich zu den Werten der anderen 14 Patienten nicht auffällig. Deren Insulinwerte lagen zu den entsprechenden Zeitpunkten bei 9 (6,2/11,7) µU/ml, 236 (163/261) µU/ml und 75,8 (40,6/163,8) µU/ml.

Eine 16-jährige Warmblutstute (Nr. 16) erlitt eine mit einer hochgradigen einseitigen Lahmheit einhergehende Verletzung der oberflächlichen Beugesehne. Die Stute wurde daraufhin über mehrere Wochen mit nichtsteroidalen Antiphlogistika therapiert, wodurch eine weitere Teilnahme an der Studie nicht möglich war.

3.2.2.2 Patienten mit vollständiger Studienteilnahme

In die statistische Auswertung des cross-over Versuchs gingen die Daten von 9 Wallachen und 5 Stuten ein. Es handelte sich um 3 Warmblutpferde, 4 Shetlandponys, 2 Islandpferde, 2 Ponys ohne klare Rassezugehörigkeit und jeweils ein arabisches Vollblut, einen Norweger und einen Quarter-Horse-

Isländer-Mix. Das Alter der Tiere lag bei Beginn der Studie zwischen 8 und 26 Jahren (14,4 ± 5,1 Jahre). Es ergaben sich, wie aus Tabelle 6 ersichtlich, keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Körpergewichts und des BCS zwischen Metformin-Gabe und Placebo bei den 14 Patienten, die über den gesamten Studienzeitraum beobachtet werden konnten. Allerdings zeigte Patient 10 einen deutlichen Gewichtsverlust von 506 kg zu Studienbeginn über 478 kg auf 466 kg zu Studienende. Dies zeigt sich auch in Tabelle 6 bei den Mittelwerten über den Studienzeitraum.

Tab. 6: Körpergewicht (KGW) und Body condition score (BCS) im insgesamt sechsmonatigen Studienverlauf (n=14)

	Studienbeginn	Nach Metformin	Nach Placebo
KGW Maßband (kg)	403,5 ± 180,6	382,3 ± 166,1	383,9 ± 161,3
BCS (1-9)	8,2 ± 0,6	8,0 ± 0,5	8,1 ± 0,5

Im Zeitraum der Medikamentengabe wurden keine unerwünschten Arzneimittelwirkungen beobachtet. Die Gabe der Substanzen erfolgte bei neun Tieren mithilfe einer Maulspritze und bei fünf Patienten über das Futter. Die Besitzer beschrieben die Akzeptanz in einer Phase der Studie als deutlich höher, welche sich nach Entblindung als Placebophase herausstellte. Alle Besitzer versicherten aber, dass ihnen die Eingabe der Substanzen regelmäßig gelungen sei bzw. das Futter – wenn auch teilweise verzögert – stets vollständig aufgenommen wurde.

3.2.3 Ergebnisse des ersten CGITs

3.2.3.1 Flächen unter dem Glukoseverlauf

Um die kombinierten Glukose-Insulin-Tests mittels eines Parameters vergleichen zu können, wurde die „area under the curve“ (AUC), also die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve für den Glukoseverlauf bei den Probanden berechnet. Für eine bessere Vergleichbarkeit der interindividuell recht unterschiedlichen Testergebnisse wurden zusätzliche Flächenberechnungen durchgeführt. Die

Variationen und deren Ergebnisse sind in Tabelle 7 wiedergegeben und werden nachfolgend unter zu Hilfenahme von Abbildungen erläutert.

Tab. 7: Flächen unter den Glukosekurven (AUC) im ersten kombinierten Glukose-Insulin-Test (n = 14)

	Einheit	MW	SD	MIN	MAX
AUC	mmol/l x 120	848	167	637	1211
^{b}AUC	mmol/l x 120	345	156	133	719
AUC_{60}	mmol/l x 60	519	73	428	625
$^{b}AUC_{60}$	mmol/l x 60	267	67	174	379

AUC: Fläche unter der Glukosekurve bis 120 Minuten (Abb. 4)

^{b}AUC: Fläche unter der Glukosekurve bis 120 Minuten, um den basalen Glukosewert bereinigt (Abb. 5)

AUC_{60}: Fläche unter der Glukosekurve bis 60 Minuten (Abb. 6)

$^{b}AUC_{60}$: Fläche unter der Glukosekurve bis 60 Minuten, um den basalen Glukosewert bereinigt (Abb. 7)

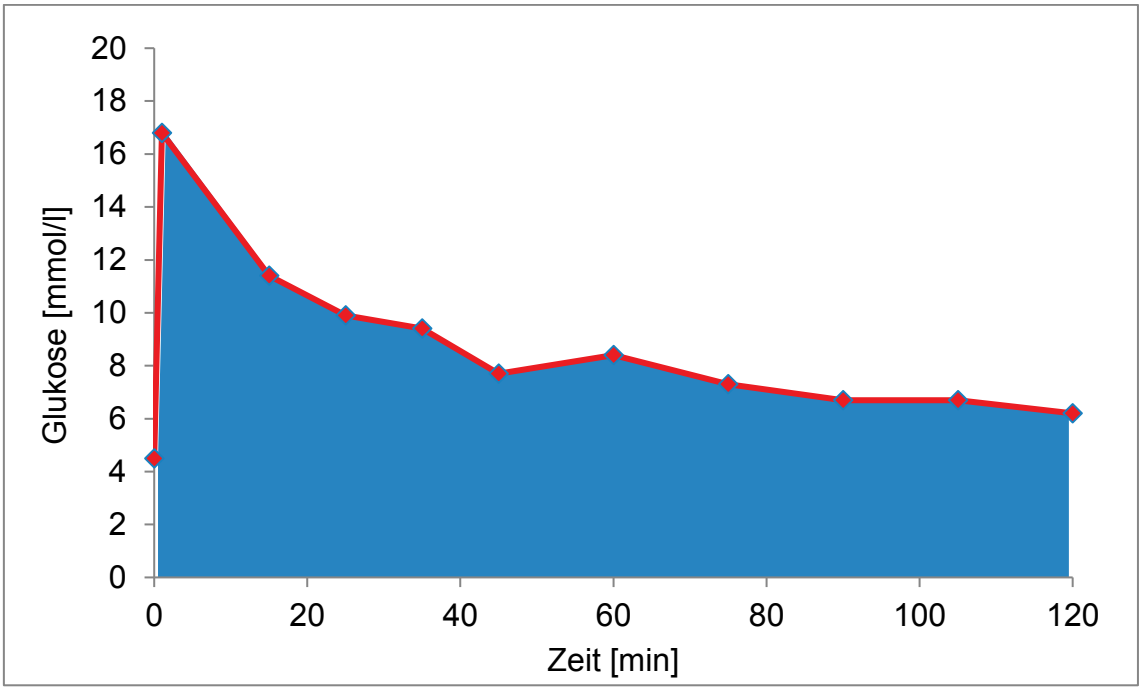

Abb. 4: Fläche unter der Glukosekurve bis 120 Minuten bei pathologischem CGIT (Patient 11)

Die Glukose-AUC des Probanden Nr. 11 ist als blaue Fläche in Abb. 4 beispielhaft dargestellt. Bei allen 14 Patienten ergaben sich AUC-Werte von 848 ± 167 mmol/l x 120 Minuten. Da die Patienten unterschiedliche Ausgangs-Glukosewerte zu Beginn der kombinierten Glukose-Insulin-Tests zeigten, wurden die Glukose-AUC Werte, um den Basalglukosewert zum Zeitpunkt 0 bereinigt, erneut berechnet (^{b}AUC). Damit entfällt, wie in Abb. 5 dargestellt, die Fläche unterhalb des ersten Glukosewertes. Somit gehen in die ^{b}AUC nur Flächen ein, welche sich allein aufgrund des kombinierten Glukose-Insulin-Tests ergeben. Diese lag bei den 14 Probanden bei 345 ± 156 mmol/l x 120 Minuten.

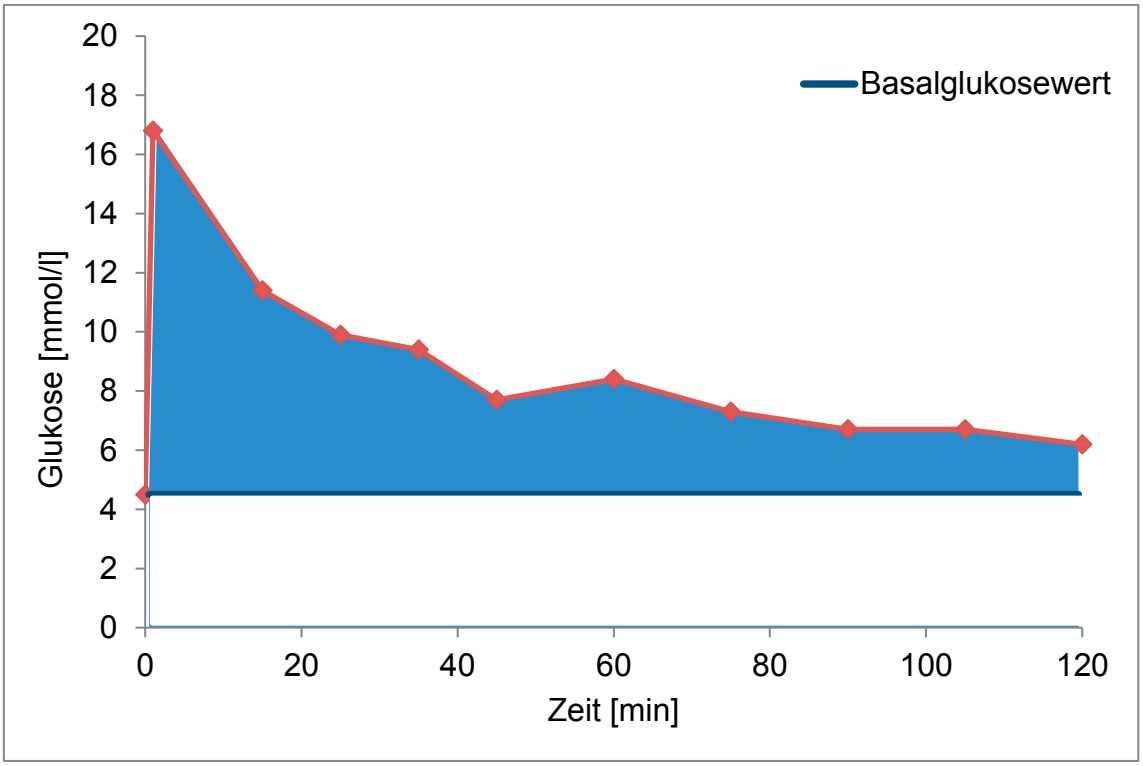

Abb. 5: Fläche unter der Glukosekurve, die um den Basalglukosewert bereinigt wurde (^{b}AUC) des Patienten 11

Für die Interpretation der Ergebnisse der CGITs sind insbesondere die ersten 45 Minuten des Testverlaufes interessant. Die eigenen Patienten erreichten ihren basalen Glukosewert frühestens nach 60 Minuten, teilweise aber nicht einmal nach 120 Minuten. Daher wurden die Flächenberechnungen, wie in Abb. 6 beispielhaft dargestellt, nochmals lediglich mit den Werten bis zum Zeitpunkt 60 Minuten durchgeführt (AUC_{60}). Diese betrug 519 ± 73 mmol/l x 60 min und wies eine deutlich geringere Standardabweichung (14,1% des Mittelwertes) auf als die reine Glukose-AUC Berechnung (19,7% des MW) oder die ^{b}AUC (45,2% des MW).

Weiter sind als Kombination aus den beiden oben erläuterten, zusätzlichen Flächenberechnungen die Werte bis 60 Minuten und zusätzlich um den Basalglukosewert bereinigt ($^{b}AUC_{60}$) wiedergegeben. Dies ist zum besseren Verständnis schematisch in Abb. 7 dargestellt. Hierbei ergaben sich Werte von 267 ± 67 mmol/l x 60 min, woraus sich eine Standardabweichung von 25,1 % des Mittelwertes ergibt.

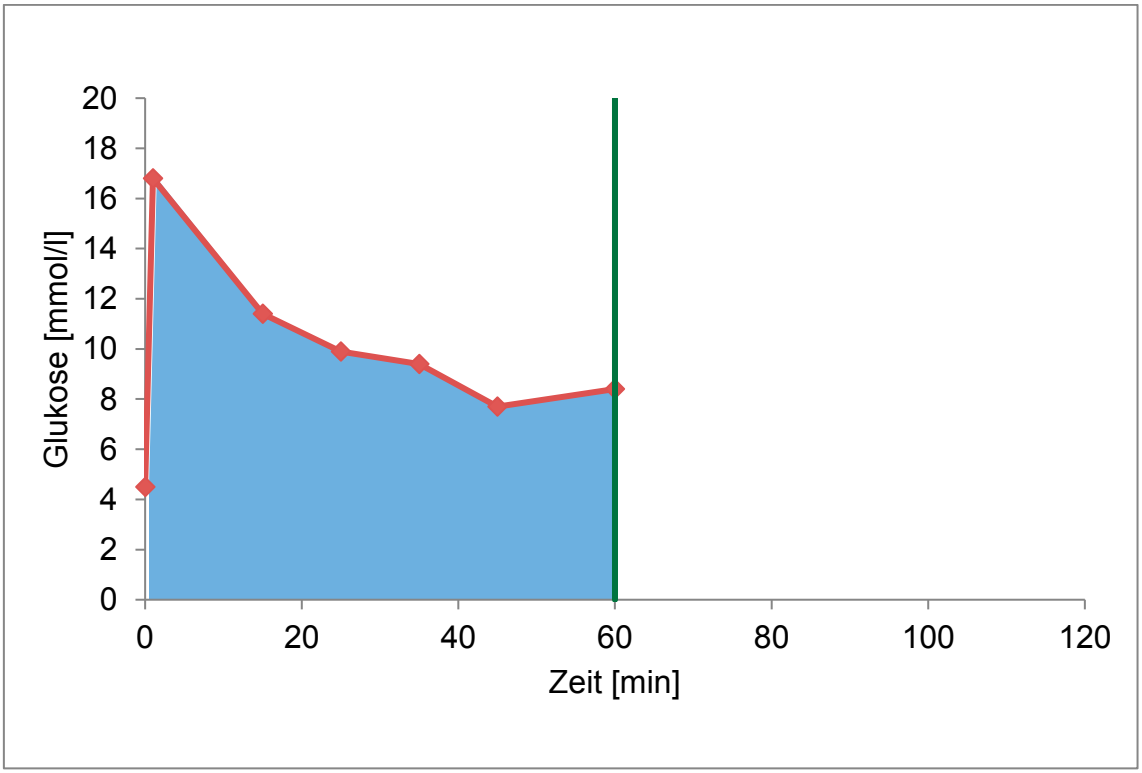

Abb. 6: Schematische Darstellung der AUC_{60}: Fläche unter der Glukosekurve bis 60 Minuten (Patient 11)

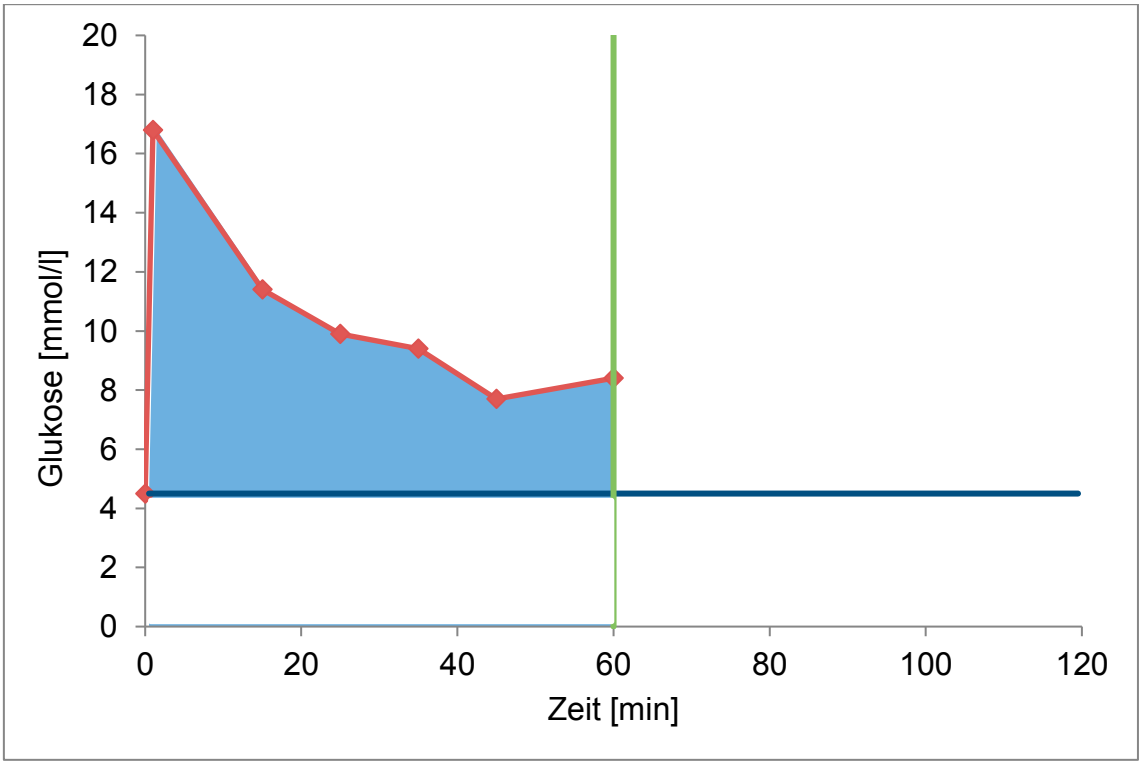

Abb. 7: $^{b}AUC_{60}$: Fläche unter der Glukosekurve bis 60 Minuten und um den Basalglukosewert bereinigt (Patient 11)

3.2.3.2 Dauer bis zum Erreichen des Basalglukosewertes

Nach dem Anstieg des Blutzuckerspiegels durch die intravenöse Gabe der 150 mg/kg Glukose dauerte es bei den 14 eigenen Patienten beim ersten kombinierten Glukose-Insulin-Test mindestens 60 Minuten, bis der basale Glukosewert (t_B) wieder erreicht wurde. Der Median aller Tiere lag bei 180 Minuten mit einem 1. Quartil von 111 und einem 3. Quartil von 180 Minuten. Hierbei ist zu beachten, dass die Glukosewerte lediglich bis zu einem Zeitraum von 120 Minuten real gemessen wurden. Von den 14 untersuchten Pferden und Ponys erreichten beim ersten kombinierten Glukose-Insulin-Test bis zu diesem Zeitpunkt nur fünf Tiere Werte, die ihrem Basalglukosewert entsprachen. Je ein Pferd war nach einem Untersuchungszeitraum von 60, 75 und 90 Minuten und zwei nach 120 Minuten wieder bei den jeweiligen Basalglukosewerten angelangt. Bei den anderen neun Patienten wurde als Zeit bis zum Erreichen des Basalglukosewertes der fiktive Maximalwert von 180 Minuten eingesetzt.

3.2.3.3 Insulinkonzentration während des ersten CGITs

Die Plasmainsulinkonzentration wurde im Verlauf der kombinierten Glukose-Insulin-Tests direkt vor (0 Minuten) Injektion von Glukose und Insulin sowie 45 und 90 Minuten nach Applikation (Ins 0, 45, 90) bestimmt. Für den ersten CGIT im Rahmen der Voruntersuchung sind die Werte in Abb. 8 dargestellt. Die Insulinwerte waren nicht normal verteilt und werden daher als Median (1./3. Quartil) angegeben. Die Plasmainsulinkonzentration betrug initial 9 (6,2/11,7) µU/ml, was bezogen auf die Ergebnisse der Voruntersuchung, bei der alle diese Patienten Plasmainsulinkonzentrationen > 30 µU/ml aufwiesen, deutlich niedriger ist.

Nach 45 Minuten zeigten die Tiere Plasmainsulinkonzentrationen von 236 (163/ 261) µU/ml mit einem Minimum von 146 µU/ml und einem Maximum von 309 µU/ml. Somit lagen die Plasmainsulinkonzentrationen bei allen eigenen Pferden und Ponys zu diesem Zeitpunkt über dem in der Literatur als pathologisch angegebenen Grenzwert von über 100 µU/ml. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die β-Zellen des Pankreas Insulin im pathologisch erhöhten Bereich sezernierten. Dies belegt, dass trotz niedrigerer basaler Insulinwerte als in der

Voruntersuchung die Probanden korrekterweise in die Studie eingeschlossen wurden. Nach 90 Minuten betrugen die Insulinkonzentrationen noch 75,8 (40,6/163,8) µU/ml.

Besonders auffällig war, dass bei Patient 5 und 12 nach 45 Minuten niedrigere Insulinwerte gemessen (219 bzw. 245 µU/ml) wurden als nach 90 Minuten (373 bzw. 252 µU/ml). Es handelte sich bei beiden um Ponys, die bereits in der Voruntersuchung mit 162 und 260 µU/ml auffällig hohe Nüchtern-Insulinwerte aufwiesen.

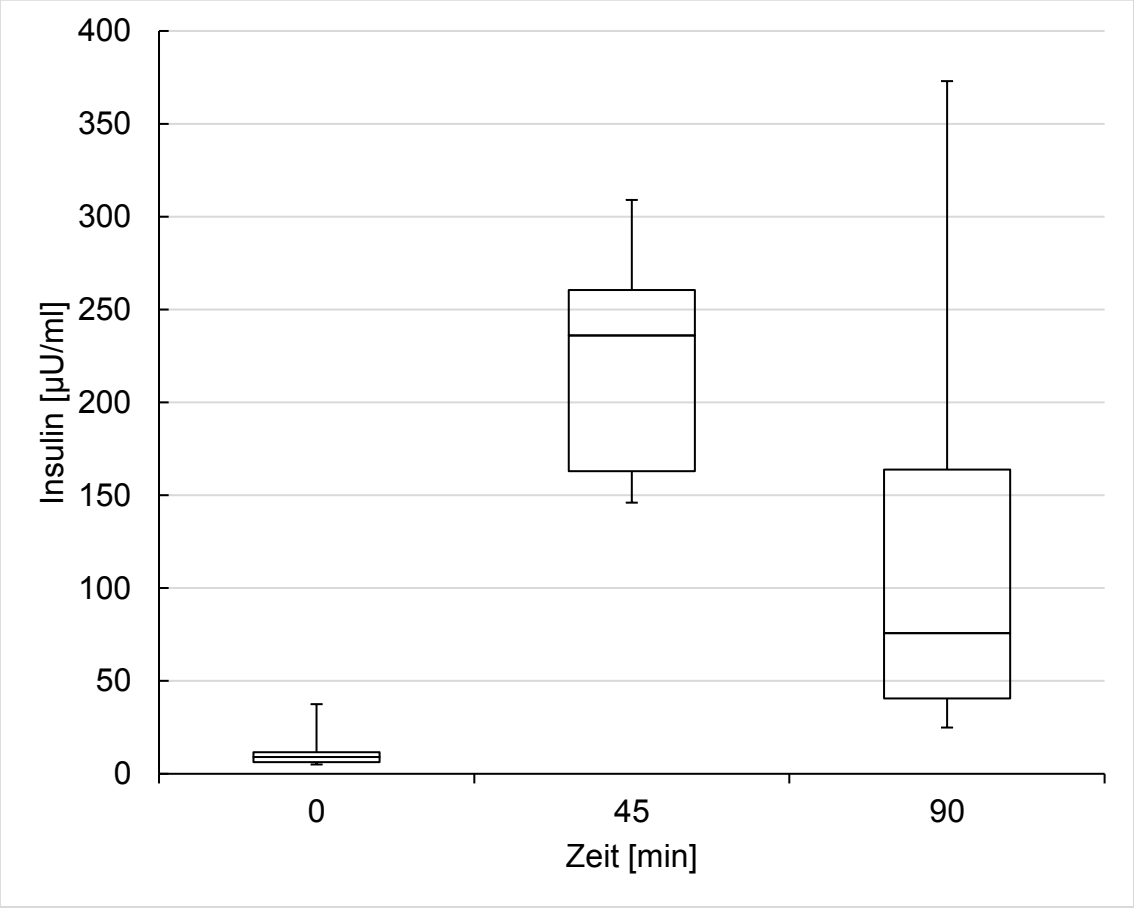

Abb. 8: Plasmainsulinkonzentrationen beim ersten CGIT (n=14)

3.2.4 Ergebnisse der cross-over Studie

Vorangestellt sei, dass keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der jeweils dreimonatigen Gabe von Metformin und dem Placebo Macrogol feststellbar waren. Dies bezieht sich sowohl auf das Körpergewicht, den body condition score, röntgenologische Parameter zur Beurteilung der Hufrehe (Fedtke 2015) als auch bezogen auf den Schwerpunkt der eigenen Arbeit, die labordiagnostischen Parameter während der CGITs: es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen Metformin und Placebo in den Glukose-AUCs, der Dauer bis zum Erreichen des Basalglukosewertes sowie den Plasmainsulinwerten während der kombinierten Glukose-Insulin-Tests.

Auch die Reihenfolge der Substanzverabreichung, also ob die Tiere zuerst Metformin und dann das Placebo erhielten (n=9) oder umgekehrt (n=5) besaß keinen Einfluss auf die Ergebnisse.

Weiterhin ist festzuhalten, dass der zeitliche Ablauf der Untersuchungen an sich, also ob die Untersuchungen zu Beginn, nach drei oder sechs Monaten durchgeführt wurden, ebenfalls keinen Einfluss auf die Ergebnisse hatte.

3.2.4.1 Kombinierte Glukose-Insulin-Tests

In Abb. 9 sind vergleichend die Verläufe der Mittelwerte der Glukosemessungen während der CGITs dargestellt. Wie aus der Grafik ersichtlich, lagen die Mittelwerte der Glukosemessungen zu den einzelnen Zeitpunkten sehr eng beieinander und verliefen parallel zueinander.

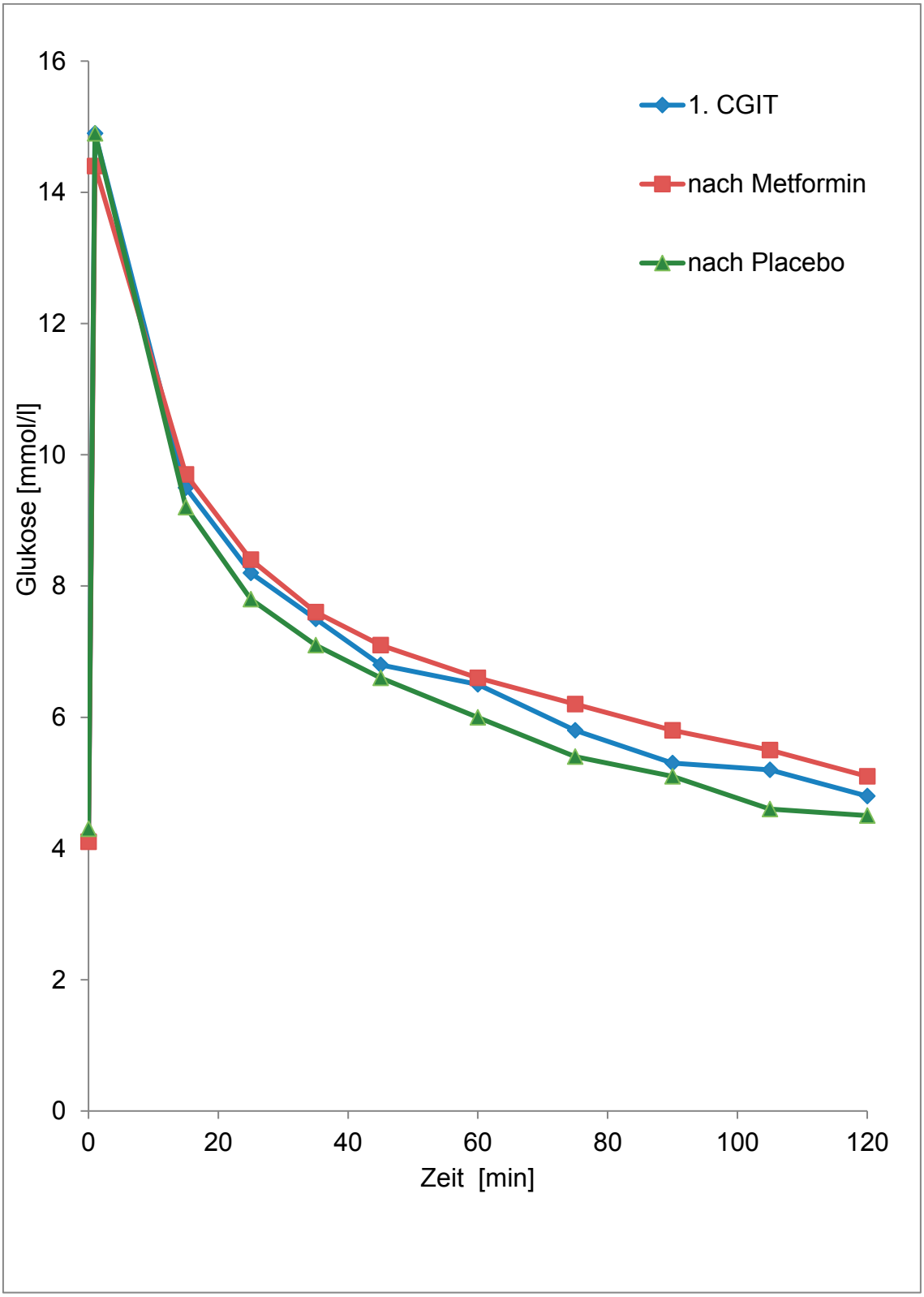

Abb. 9: Blutglukoseverläufe während der CGITs zu Studienbeginn (1. CGIT) und nach je drei Monaten Metformin- bzw. Placebogabe (jeweils n=14; Mittelwerte)

3.2.4.2 Glukose AUCs bei den drei CGITs

Die Flächen unter der Glukosekurve wurden nach Gabe von Metformin oder Placebo ebenso berechnet wie in Kapitel 3.2.2.1 erläutert. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 8, 9, 10 und 11 dargestellt. Obgleich keine statistisch signifikanten Unterschiede bestanden sei darauf hingewiesen, dass die mittleren AUCs nach Placebogabe regelmäßig die kleinsten waren.

Leider fehlten bei Patient 10 beim CGIT nach Metformingabe, aufgrund von Problemen im Untersuchungsablauf, zwei Glukosewerte (Messung nach 75 und 90 Minuten). Die Glukosewerte dieses Patienten wurden daher nicht in die statistischen Berechnungen der AUCs einbezogen. Gleichwohl wurden die Untersuchungsergebnisse in die Berechnungen der AUCs bis zum Messzeitpunkt 60 Minuten einbezogen, da bis zu diesem Zeitpunkt alle Ergebnisse als korrekt betrachtet werden können.

Tab. 8: Glukose AUCs (mmol/l x 120 min)

	MW	SD	MIN	MAX
1. CGIT	848	167	637	1211
nach Metformin	892	263	505	1578
nach Placebo	831	197	571	1265

Tab. 9: Um den Basalglukosewert bereinigte AUCs (mmol/l x 120 min)

	MW	SD	MIN	MAX
1. CGIT	345	156	133	719
nach Metformin	403	173	121	774
nach Placebo	300	105	175	535

Tab. 10: AUCs bis 60 Minuten (mmol/l x 60 min)

	MW	SD	MIN	MAX
1. CGIT	519	73	428	625
nach Metformin	524	140	326	874
nach Placebo	500	116	293	725

Tab. 11: Um den Basalglukosewert bereinigte AUCs bis 60 Minuten (mmol/l x 60 min)

	MW	SD	MIN	MAX
1. CGIT	267	67	174	379
nach Metformin	278	104	62	472
nach Placebo	237	81	59	413

3.2.4.3 Individuelle Glukoseverläufe bei den drei CGITs

In den Abbildungen 10 bis 23 sind die individuellen Glukoseverläufe der drei CGITs für die einzelnen Patienten dargestellt. Wie aus den Abbildungen hervorgeht, sind fast alle Glukosekurven ähnlich und zeigen außer bei Patient 10 einen als pathologisch zu wertenden Verlauf der Glukosewerte in den drei CGITs. Nur bei zwei der Patienten kam es zu Glukosewerten > 20 mmol/l (Nr 3 und Nr 14), weshalb in diesen Abbildungen eine Skalierung bis 25 auf der Y-Achse gewählt wurde. Bemerkenswert ist, dass bei 10 der 14 Patienten die Verläufe, insbesondere ab der Glukosemessung 15 Minuten nach Testbeginn, erstaunlich identisch erscheinen.

Auffällige Diskrepanzen sind bei einzelnen Glukosekurven der Patienten 3, 5, 6 und 10 festzustellen. Diese korrelieren jedoch nicht mit der Substanzgabe. In Bezug auf die deutlichsten intraindividuellen Unterschiede in den Glukoseverläufen fallen insbesondere Patient 3 (Abb. 12), Patient 5 (Abb. 14) und Patient 6 (Abb. 15) auf. Patient 3, ein 13-jähriger Shetlandponywallach, weist beim CGIT nach Metformingabe eine deutlich höher verlaufende Glukosekurve auf, als nach dem 1. CGIT und einen fast physiologischen Verlauf nach Placebo. Bei Patient 5, einem 12-jährigen Shetlandponywallach, ist die Glukosekurve nach Placebogabe die deutlich höchste, während der 1. CGIT und 2. CGIT nach Metformingabe fast erstaunlich gleiche Glukoseverläufe aufweisen. Auffällig war, dass diese beiden Patienten deutlich höhere Plasmainsulinwerte zum Zeitpunkt 0 bei den jeweils auffälligen CGITs aufwiesen als die übrigen Patienten. Diese betrugen 212 µU/ml bei Patient 3 und 317 µU/ml bei Patient 5. Bei diesen beiden Patienten konnten keine Besonderheiten nachvollzogen werden, welche ursächlich für diese hohen Werte sein könnten. Auch bei Patient 6, einem 8-jährigen Shetlandponywallach, fällt die höhere Glukosekurve nach

Metformingabe auf. Dieses Tier hatte in den Tagen vor dem Metformin-CGIT Zugang zu frischem Gras und zeigte 45 Minuten nach Testbeginn den höchsten Insulinwert von 2290 µU/ml in der eigenen Untersuchung. Bei Patient 10, einer 17-jährigen Quarter-Horse-Mix Stute, sind die Glukosekurven nach Metformin- und nach Placebogabe als physiologisch zu werten. Leider fehlen bei diesem Tier beim CGIT nach Metformingabe, aufgrund von Problemen im Untersuchungsablauf, zwei Glukosewerte (Messung nach 75 und 90 Minuten). Die jeweiligen individuellen Besonderheiten der Patienten werden in Kapitel 3.2.5 ausführlicher erläutert.

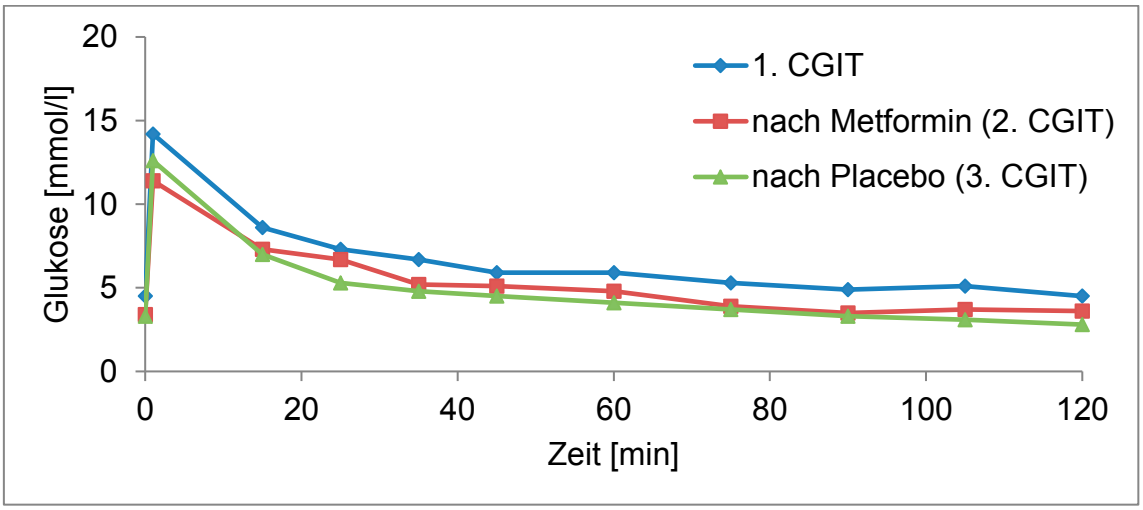

Abb. 10: Glukoseverlauf bei den drei CGITs von Patient Nr. 1

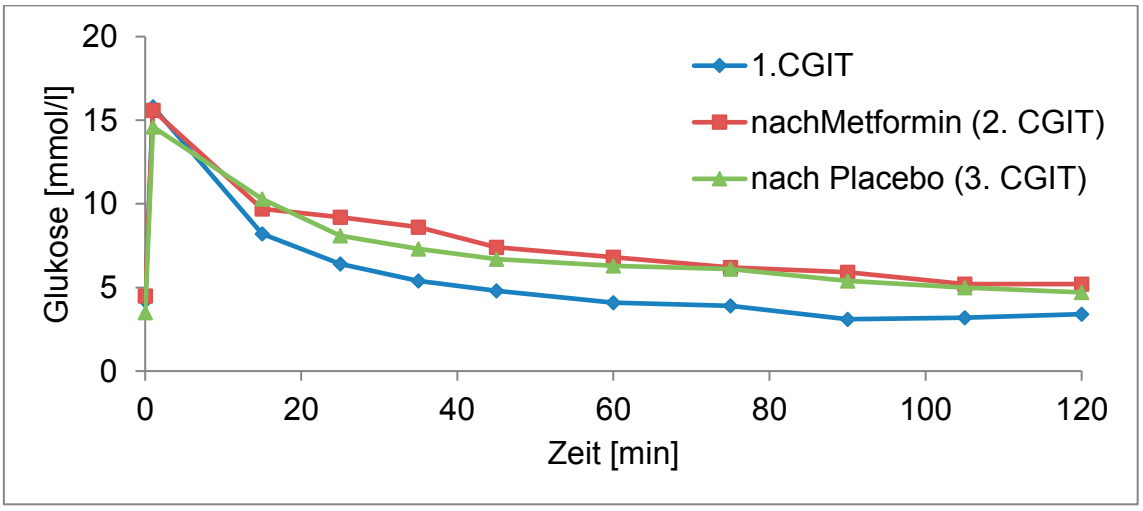

Abb. 11: Glukoseverlauf bei den drei CGITs von Patient Nr. 2

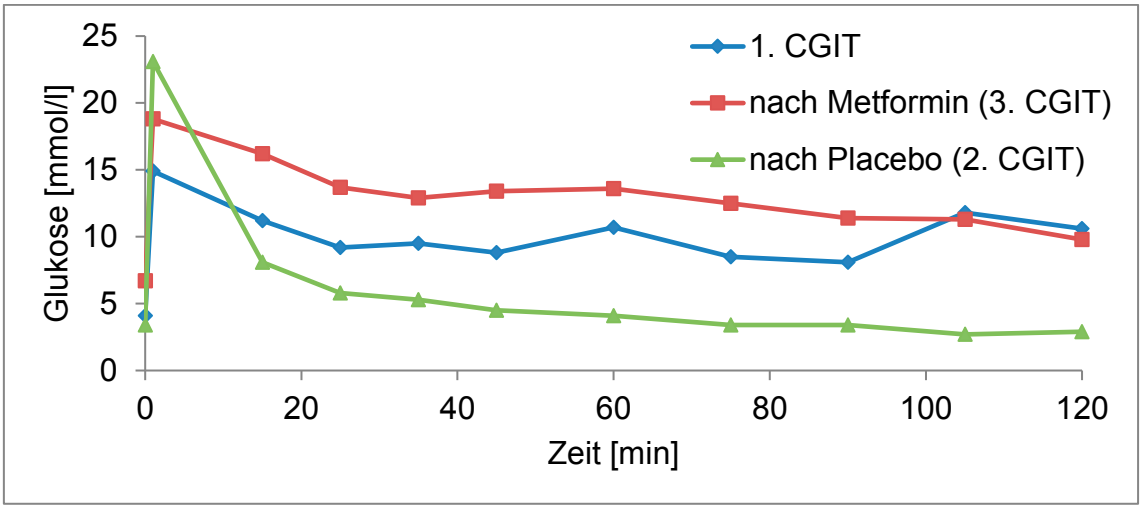

Abb. 12: Glukoseverlauf bei den drei CGITs von Patient Nr. 3

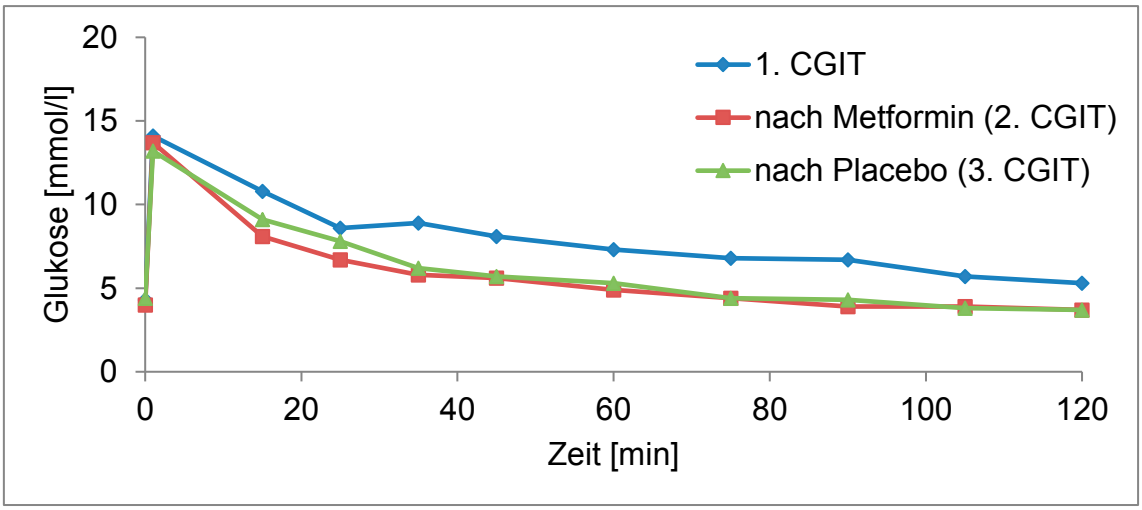

Abb. 13: Glukoseverlauf bei den drei CGITs von Patient Nr. 4

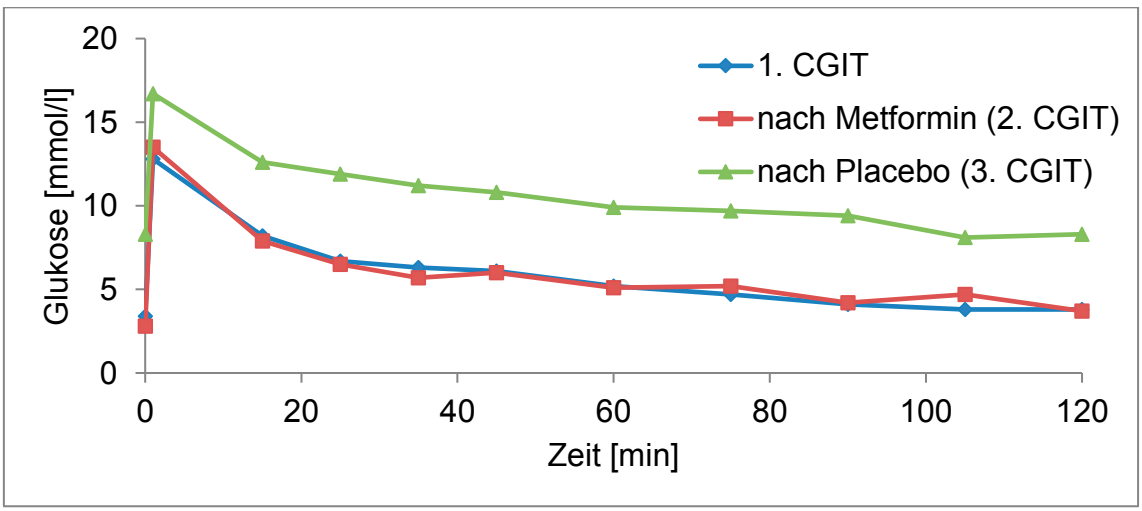

Abb. 14: Glukoseverlauf bei den drei CGITs von Patient Nr. 5

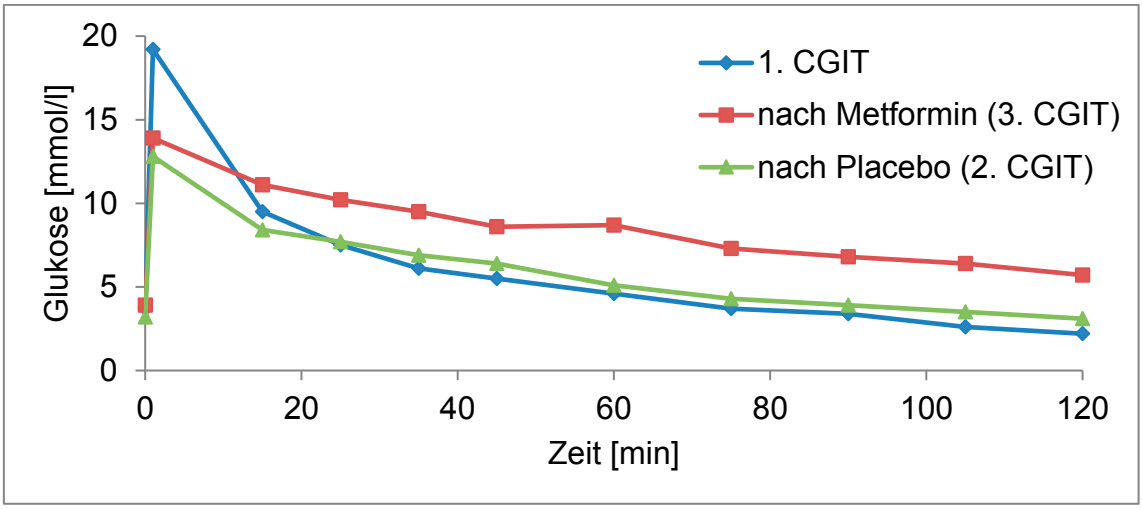

Abb. 15: Glukoseverlauf bei den drei CGITs von Patient Nr. 6

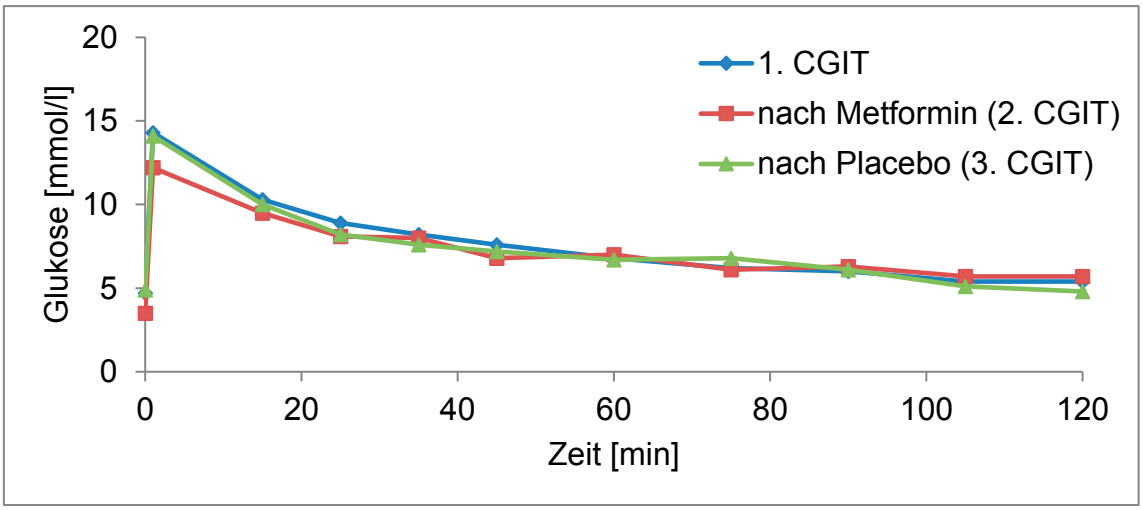

Abb. 16: Glukoseverlauf bei den drei CGITs von Patient Nr. 7

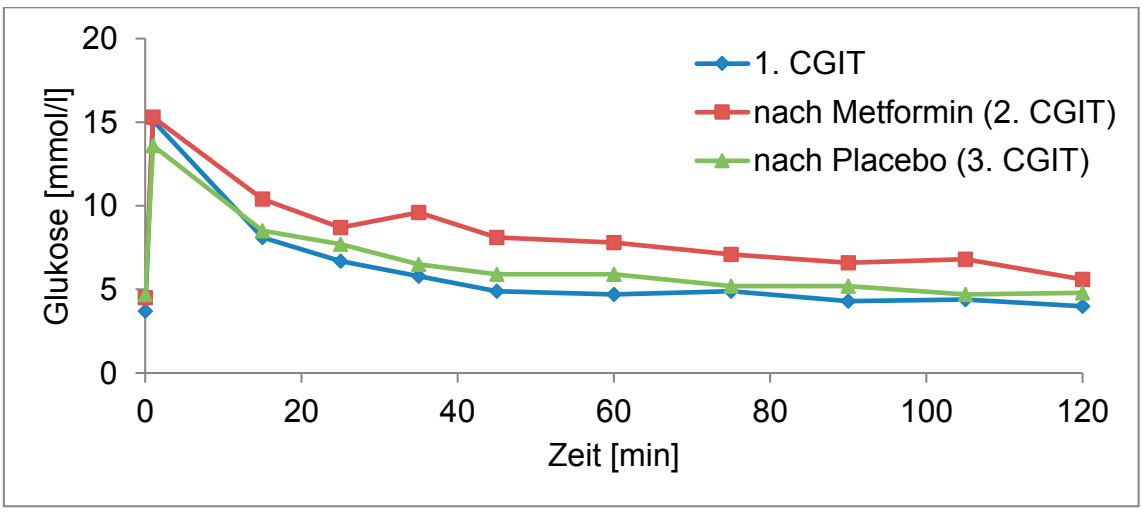

Abb. 17: Glukoseverlauf bei den drei CGITs von Patient Nr. 8

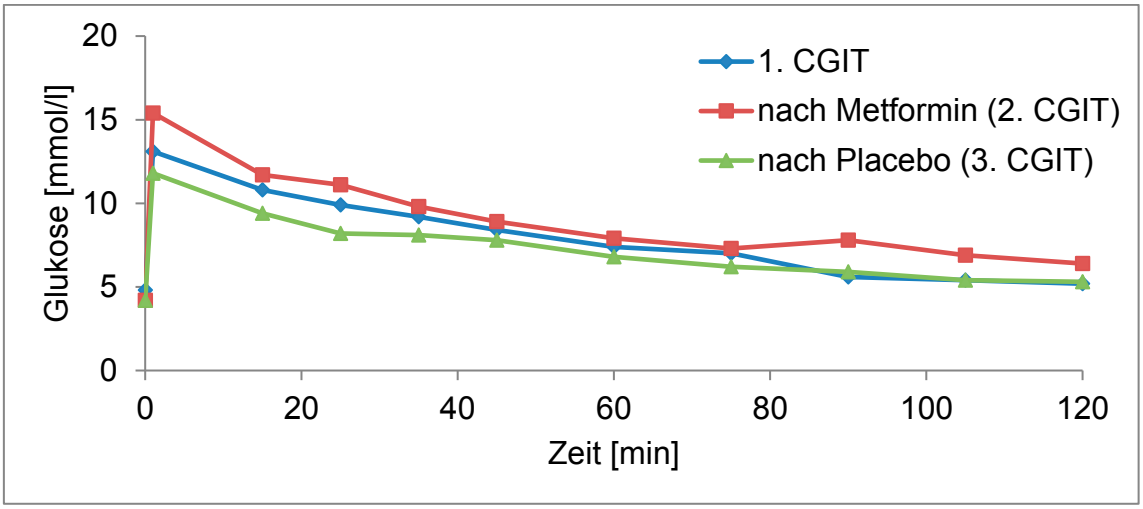

Abb. 18: Glukoseverlauf bei den drei CGITs von Patient Nr. 9

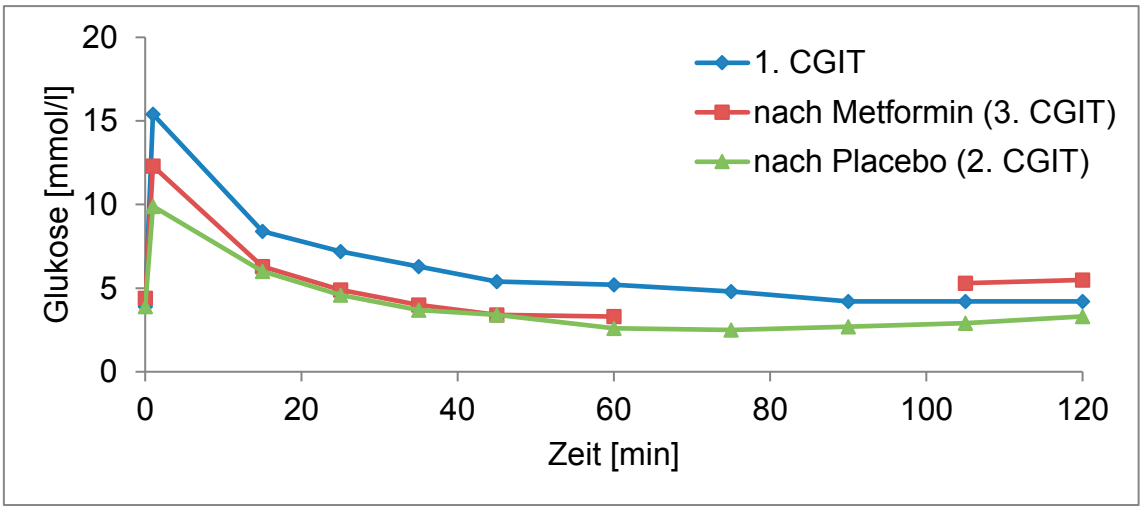

Abb. 19: Glukoseverlauf bei den drei CGITs von Patient Nr. 10

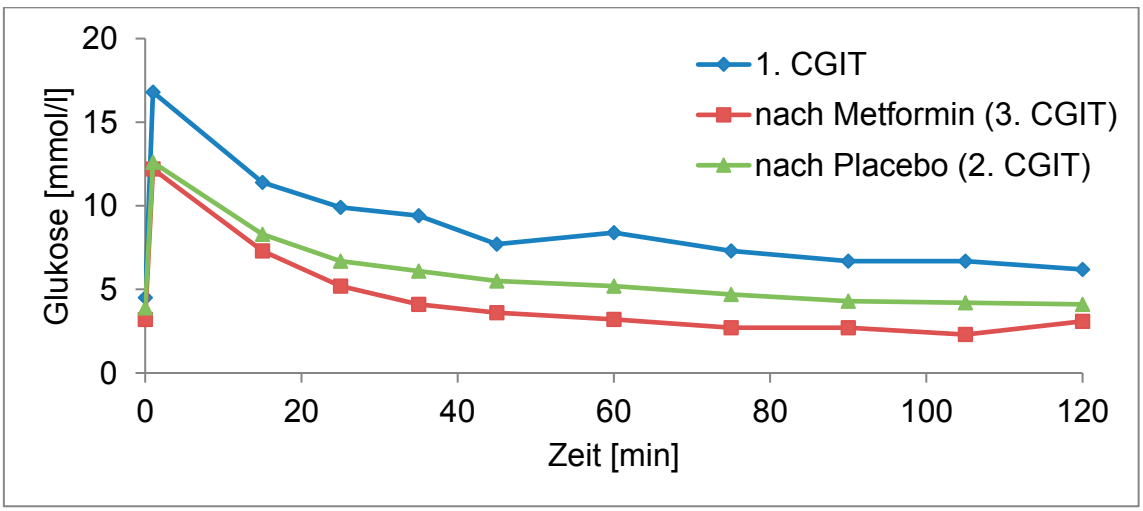

Abb. 20: Glukoseverlauf bei den drei CGITs von Patient Nr. 11

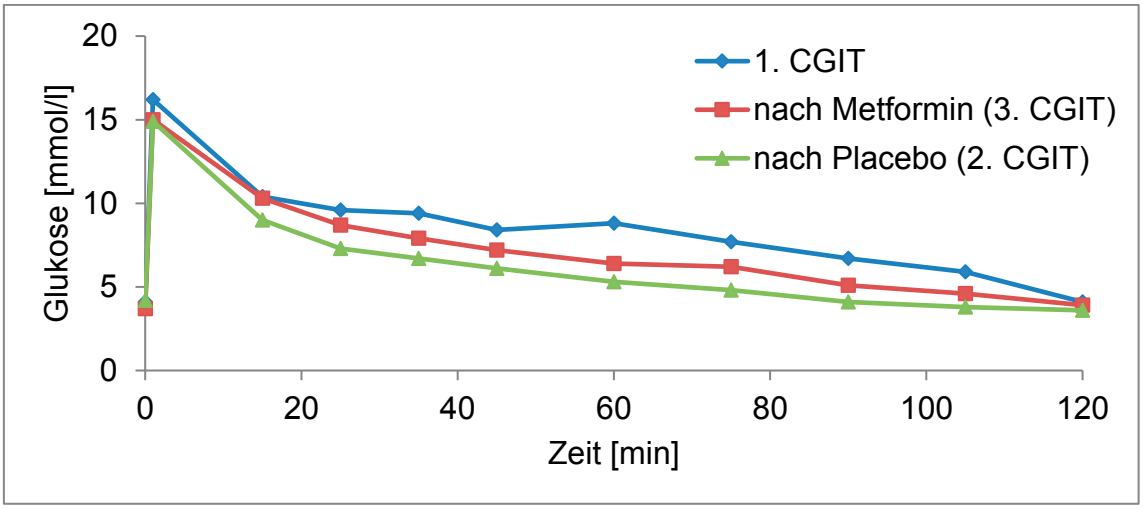

Abb. 21: Glukoseverlauf bei den drei CGITs von Patient Nr. 12

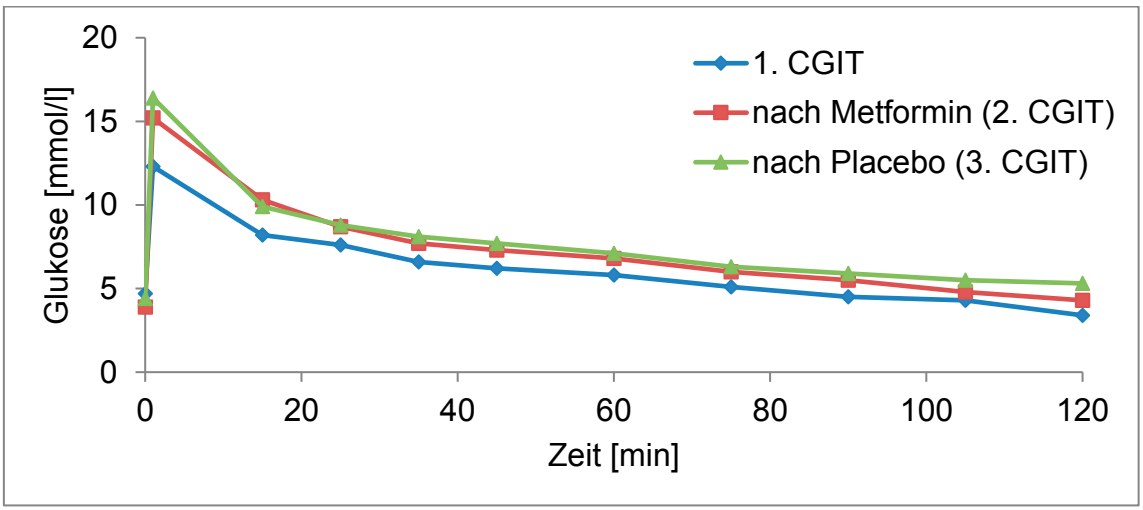

Abb. 22: Glukoseverlauf bei den drei CGITs von Patient Nr. 13

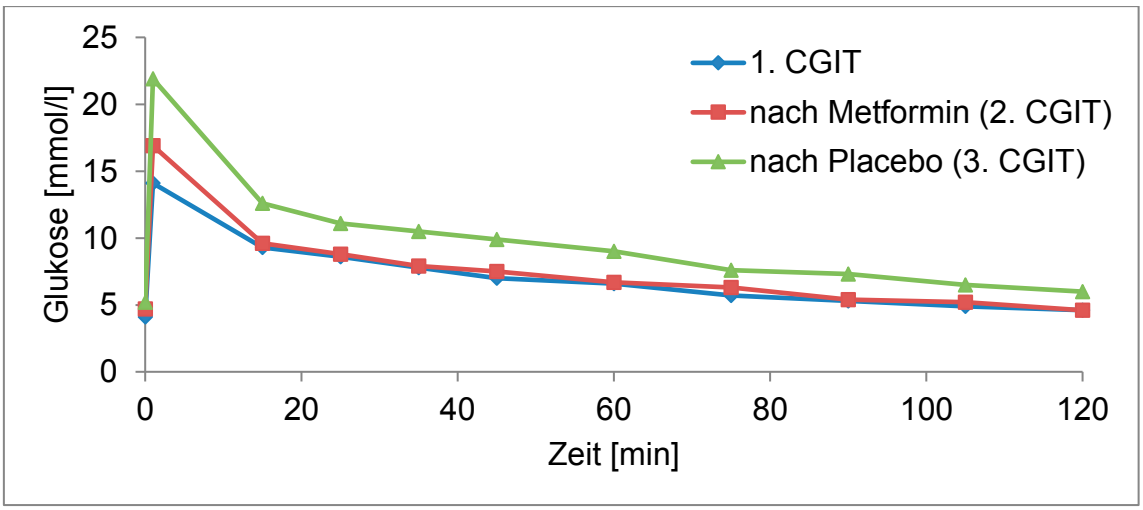

Abb. 23: Glukoseverlauf bei den drei CGITs von Patient Nr. 14

3.2.4.4 Dauer bis zum Erreichen des Basalglukosewertes

Von den 14 Pferden und Ponys erreichten beim ersten kombinierten Glukose-Insulin-Test bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes von 120 Minuten fünf Tiere Werte, die ihrem Basalglukosewert entsprachen. Bei der Untersuchung nach Metformingabe waren es vier Tiere und bei der Untersuchung nach Placebogabe neun. Bei der Mehrzahl der Patienten wurde folglich als Zeit bis zum Erreichen des Basalglukosewertes der fiktive Maximalwert von 180 Minuten eingesetzt. Hieraus resultieren die in Abb. 24 dargestellten Mediane und Quartile.

Nach Metformingabe betrug die Zeit bis zum Erreichen des initialen Glukosewertes im Median 180 Minuten mit einem 1. Quartil von 87 und einem 3. Quartil von 180 Minuten. Nach der Gabe des Placebos waren es im Median nur 148 Minuten mit einem 1. Quartil von 86 und einem 3. Quartil von 180 Minuten.

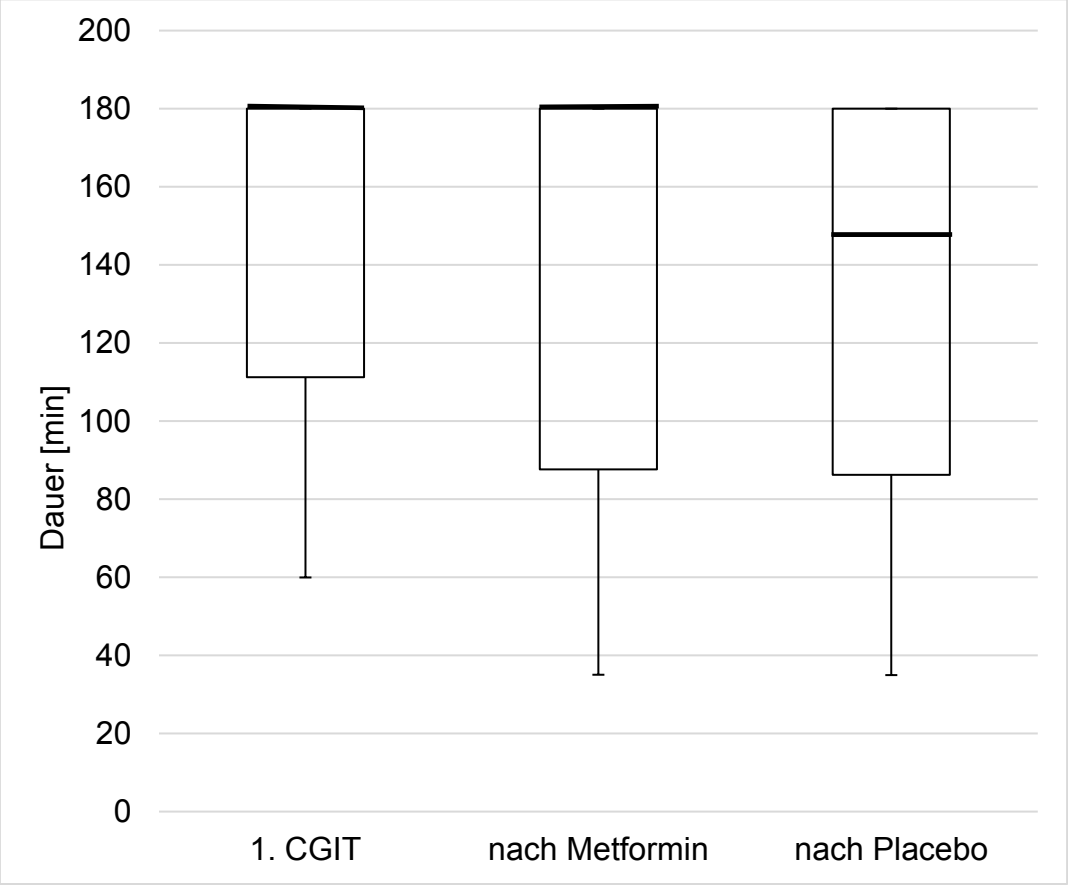

Abb. 24: Zeit (min) bis zum Wiedererreichen des Basalglukosewertes.

Auffällig war, dass der Patient 10 sowohl nach der Metforminphase als auch nach der Placebogabe bereits nach 35 Minuten seinen Basalglukosewert wieder erreicht hatte und somit in diesen CGITs eine physiologische Blutglukoseregulationsfähigkeit aufwies. Bei dem ersten CGIT vor Studienbeginn erreichte die Stute innerhalb des untersuchten Zeitraumes von 120 Minuten nicht wieder ihren Ausgangsglukosewert. Individuelle Besonderheiten zu diesem Patienten werden in Kapitel 3.2.5 ausführlicher erläutert.

3.2.4.5 Insulinkonzentrationen während der CGITs

Die bei den CGITs jeweils zum Zeitpunkt 0 gemessenen Plasmainsulin-Konzentrationen (Abb. 25) zeigten nach dreimonatiger Behandlung mit Metformin mit Werten von 7,2 (4,5/15,9) µU/ml keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Werten nach der ebenfalls dreimonatigen Gabe des Placebos mit 12,7 (5,1/18,5) µU/ml. Sowohl nach der Placebo-Gabe als auch nach der Metforminphase wies jeweils ein Pferd eine deutlich höhere Plasmainsulinkonzentration als die anderen 13 Patienten auf (in der Abbildung als Punkte dargestellt, die Werte gingen in die Berechnung der Mediane ein).

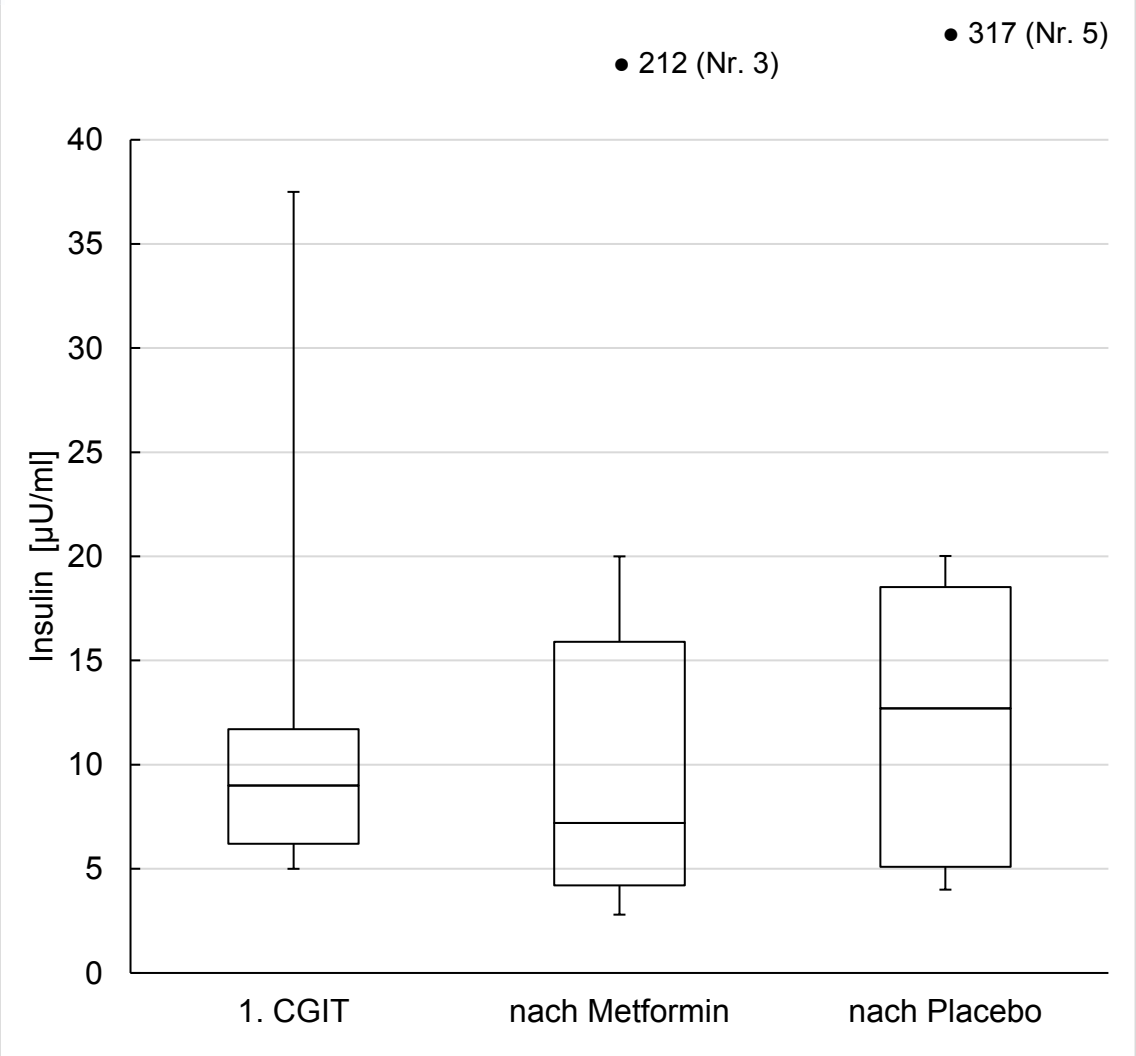

Abb. 25: Plasmainsulinkonzentrationen vor den CGITs (0 Minuten)

Auch 45 Minuten nach Beginn der CGITs konnte zwischen den Plasmainsulinkonzentrationen nach Placebogabe mit Werten von 226 (184/267) µU/ml und nach Metformingabe mit 235 (155/247) µU/ml kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Auffällig ist hier ein Patient (Nr. 6) mit einem deutlich höheren Wert von 2290 µU/ml nach der Phase der Metformingabe. Dies ist in der nachfolgenden Abb. 26 als Punkt dargestellt – der Wert ging in die Berechnungen gleichwohl ein. Dieses Pony hatte in den Tagen vor der Untersuchung freien Zugang zu frischem Gras. Beim 1. CGIT und nach Placebogabe lagen die Insulinwerte nach 45 Minuten bei diesem Tier bei 268 µU/ml beziehungsweise 259 µU/ml.

Wie in Kapitel 3.2.4.4 (Dauer bis zum Erreichen des Basalglukosewertes) erwähnt, zeigte Patient 10 im Gegensatz zu der ersten Untersuchung in den CGITs nach Placebo und nach Metformingabe eine physiologische Blutglukoseregulationsfähigkeit. Auch die Insulinwerte nach 45 Minuten waren bei diesem Patienten mit Werten von 93,7 und 73,1 µU/ml in einem, laut Literatur, physiologischen Bereich von unter 100 µU/ml. Bei der Untersuchung nach Placebogabe zeigte ein weiteres Pferd (Nr. 4) mit einem Wert von 63 µU/ml eine solch niedrige Plasmainsulinkonzentration nach 45 Minuten. Dieses Pferd wies jedoch weiterhin eine gestörte Glukoseregulationsfähigkeit auf, da es während des CGITs erst nach 90 Minuten wieder seinen Ausgangsglukosewert erreichte.

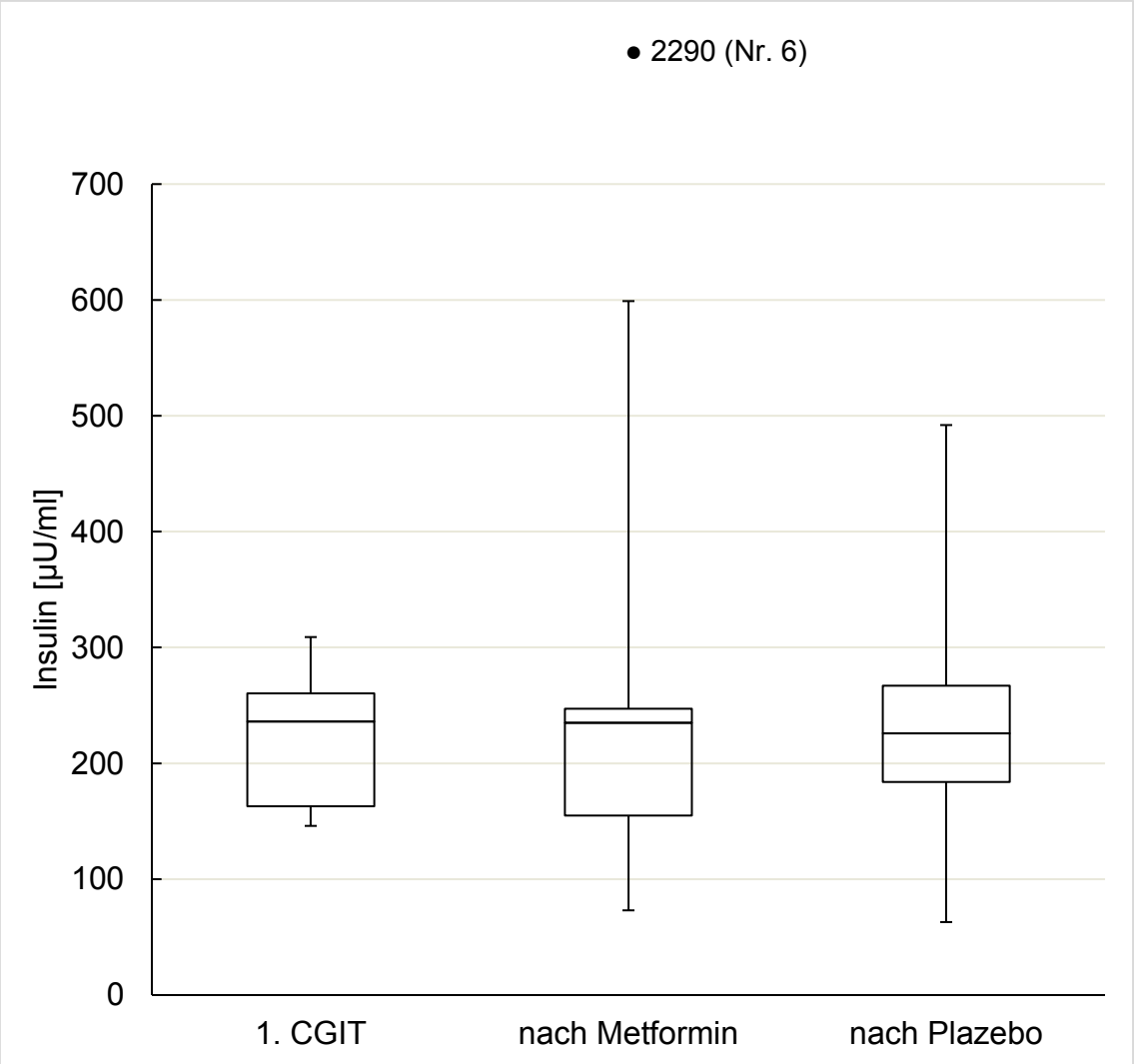

Abb. 26: Plasmainsulinkonzentrationen während der CGITs (45 Minuten)

Die in Abb. 27 dargestellten Plasmainsulinkonzentrationen 90 Minuten nach Beginn der CGITs verdeutlichen, dass sich auch hier keine Unterschiede zwischen den Werten nach Placebo- beziehungsweise Metforminfütterung ergaben. Die Insulinkonzentration betrug nach Placebogabe 84 (50/139) µU/ml und nach Metformingabe 75 (51/127) µU/ml.

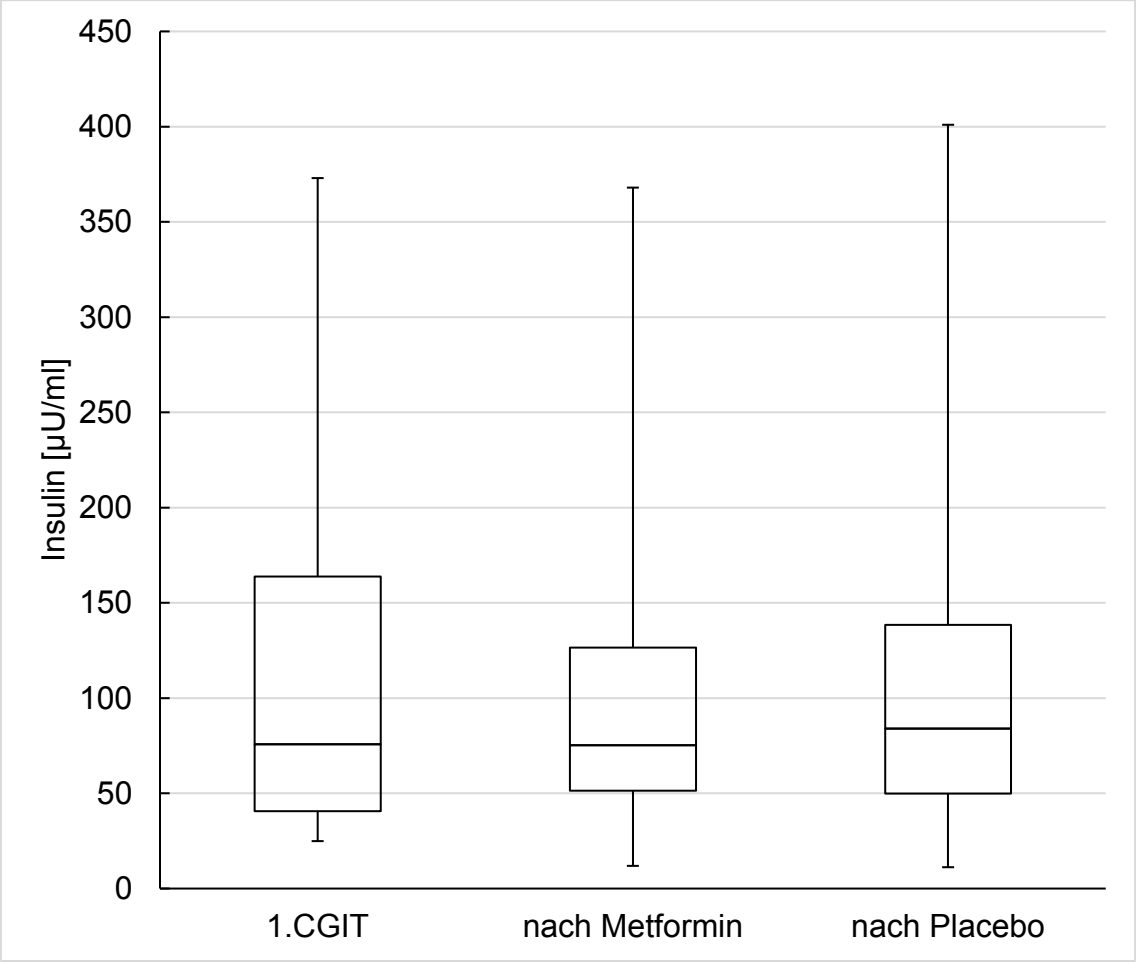

Abb. 27: Plasmainsulinkonzentration während der CGITs (90 Minuten)

3.2.4.6 Cortisolwerte während der CGITs

Wie aus der folgenden Tabelle 12 ersichtlich ist, hatte die Gabe von Metformin oder Placebo keine Auswirkungen auf die Cortisolkonzentrationen während der kombinierten Glukose-Insulin-Tests. Weiterhin verdeutlichen die als gering zu bewertenden Anstiege der Werte während der Tests den geringen Einfluss der durchgeführten Untersuchungen auf die Tiere in Bezug auf Cortisol als Stressindikator. Der Referenzbereich des untersuchenden Labors liegt bei 1,0 - 6,7 µg/dl.

Tab. 12: Cortisol (µg/dl) bei den drei CGITs im Studienverlauf zu den Zeitpunkten 0, 45 und 90 Minuten

	0	45	90
1. CGIT	3,7 ± 1,6	4,3 ± 2,5	4,5 ± 2,3
nach Metformin	3,2 ± 0,8	4,1 ± 2,0	4,1 ± 1,6
nach Placebo	2,7 ± 0,8	3,5 ± 1,7	3,1 ± 1,4

3.2.4.7 ACTH-Werte während der CGITs

Die zu den Zeitpunkten 0, 45 und 90 Minuten während der kombinierten Glukose-Insulin-Tests entnommenen Blutproben wurden auch auf ihre ACTH-Konzentration untersucht. Da die Werte nicht normal verteilt waren, sind sie in Tabelle 13 als Median mit 1. und 3. Quartil angegeben. Auffällig sind die teilweise deutlich höheren Werte nach Metformin- und Placebogabe im Vergleich zum 1. CGIT. Dies ist bis auf einen Wert im Juli in Höhe von 62 pg/ml zum Zeitpunkt 0 bei Patient 3 ausschließlich auf sieben Werte von Tieren zurückzuführen, bei denen der jeweilige CGIT zwischen Ende August und Oktober durchgeführt wurde. Im Spätsommer/Herbst kann es physiologischerweise zu gravierenden Überschreitungen der sonst geltenden Referenzwerte kommen. In den klinischen Untersuchungen konnten bei keinem der Tiere Hinweise auf das Vorliegen einer PPID festgestellt werden.

Tab. 13: ACTH (pg/ml) bei den drei CGITs im Studienverlauf zu den Zeitpunkten 0, 45 und 90 Minuten

	0	45	90
1. CGIT	14,5 (12,3/19,8)	17,5 (14,3/26,8)	19 (14/32,3)
nach Metformin	29,0 (16,3/117,8)	34,5 (21,5/110,8)	25,0 (13,8/60)
nach Placebo	25,5 (14,3/55,3)	27,0 (19,5/34,5)	22,5 (19,3/30)

3.2.5 Individuelle Besonderheiten

Individuelle Besonderheiten hinsichtlich der Untersuchungsergebnisse waren, wie auszugsweise bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben bei vier der 14 Patienten festzustellen. Zusammenfassend waren bei den Patienten 3, 5 und 6 zu unterschiedlichen Untersuchungsphasen beziehungsweise Zeitpunkten auffällig hoch verlaufende Glukosekurven der CGITs und hohe Insulinwerte festzustellen. Patient 10 fiel hingegen durch niedrige Glukosekurven und Insulinwerte und eine als physiologisch zu wertende Dauer bis zum Erreichen des Basalglukosewertes während der CGITs nach Metformin- und nach Placebogabe auf. Die einzelnen Besonderheiten werden nachfolgend ausführlich erläutert.

Bei den Patienten 3, 5 und 6 handelt es sich um je einen 13-, 12- und 8-jährigen Shetlandponywallach. Diese zeigten in den CGITs nach Metformingabe (Nr. 3 und 6) beziehungsweise nach Placebogabe (Nr. 5) auffällig hohe Glukoseverläufe im Vergleich zu ihren anderen CGITs. Dabei fielen zusätzlich zu den hohen Glukosekurven auch deutlich höhere Insulinwerte auf, als dies bei den restlichen Patienten der Fall war. Im Einzelnen zeigte Patient 3 einen Plasmainsulinwert zum Zeitpunkt 0 von 212 µU/ml und Patient 5 einen Wert von 317 µU/ml. Patient 6 zeigte einen Insulinwert von 2290 µU/ml 45 Minuten nach Testbeginn. Bei Patient 3 und 5 konnten keine Besonderheiten nachvollzogen werden, welche ursächlich für diese Auffälligkeiten sein könnten. Patient 6 hatte in den Tagen vor dem auffälligen Metformin-CGIT Zugang zu frischem Gras.

Zudem fiel im Verlauf der Untersuchungen insbesondere Patient 10, eine 17-jährige Quarter-Horse-Mix Stute, auf. Ein Überblick der Parameter dieses

Patienten ist in Tab. 14 dargestellt. Dieser Patient erreichte sowohl nach der Metforminphase als auch nach der Placebogabe bereits nach 35 Minuten wieder seinen Basalglukosewert und wies somit in diesen CGITs eine physiologische Blutglukoseregulationsfähigkeit auf. Bei dem ersten CGIT vor Studienbeginn erreichte die Stute innerhalb des untersuchten Zeitraumes von 120 Minuten nicht wieder ihren Ausgangsglukosewert. Weiterhin zeigte die Stute bei den CGITs nach Metformin- und nach Placebogabe nach 45 Minuten einen Plasmainsulinwert von 93,7 µU/ml beziehungsweise 73,1 µU/ml. Im ersten CGIT wies sie hingegen einen Insulinwert von 148 µU/ml zu diesem Zeitpunkt auf. Weiterhin auffällig war die deutliche Gewichtsreduktion von 506 kg über 478 kg zu 466 kg im Studienverlauf. Warum es zu dieser Gewichtsabnahme kam konnte leider nicht nachvollzogen werden. Die Besitzer gaben an, dass es zu keinen Veränderungen des Managements im Studienzeitraum gekommen sei. Bei diesem Tier fehlen leider beim CGIT nach Metformingabe, aufgrund von Problemen im Untersuchungsablauf, zwei Glukosewerte (Messung nach 75 und 90 Minuten). Des weiteren hatte die Stute zu diesem Zeitpunkt versehentlich Zugang zu Futter erhalten, was die ansteigenden Glukosewerte zu den Zeitpunkten 105 und 120 Minuten nach Testbeginn erklärt. Die Glukosewerte dieses Patienten wurden daher nicht in die statistischen Berechnungen der über 120 Minuten errechneten AUCs einbezogen. Gleichwohl wurden die Untersuchungsergebnisse in die Berechnungen der AUCs bis zum Zeitpunkt 60 Minuten einbezogen, da bis zu diesem Zeitpunkt alle Ergebnisse als korrekt betrachtet werden können.

Tab. 14 Untersuchungsergebnisse von Patient 10 mit wiedererlangter Glukoseregulationsfähigkeit

	Voruntersuchung	1. CGIT	nach Metformin	nach Placebo
basale Glukose [mmol/l]	3,7	3,9	4,4	3,9
basales Insulin [µU/ml]	54,1	6,0	5,7	4,3
t_B [min]	n.d.	180	35	35
Insulin 45 min [µU/ml]	n.d.	148,0	73,1	93,7
Insulin 90 min [µU/ml]	n.d.	24,9	11,9	11,2
Körpergewicht [Maßband kg]	506	506	466	478
BCS [1 - 9]	8	8	7,5	7,5

n.d.: nicht durchgeführt

4 DISKUSSION

4.1 DISKUSSION VON MATERIAL UND METHODEN

4.1.1 Diskussion der Auswahl der Studienteilnehmer

Für die Untersuchungen wurden 61 EMS verdächtige Patienten während eines relativ langen Zeitraumes von zwei Jahren vorgestellt. Außer den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen wurde der Einfluss von Metformin auf röntgenologische Hufreheparameter untersucht. Diese Ergebnisse wurden durch die zweite Untersucherin ausgewertet (*Fedtke* 2015).

Die Zahl der für die Studie geeigneten Teilnehmer wurde durch mehrere Faktoren eingeschränkt und somit auch der Rekrutierungszeitraum verlängert. Zum einen kamen nur Tiere in Frage, die nicht an einer akuten Erkrankung litten. Der Einfluss von systemischen Entzündungen auf den Insulinstoffwechsel bei Pferden wurde unter anderem in einer 2008 veröffentlichten Untersuchung nachgewiesen. Hier wurde bei 15 erwachsenen Stuten eine systemische Entzündung durch die Gabe von Lipopolysacchariden (LPS) initiiert. Im Anschluss daran beurteilten die Untersucher die Insulinsensitivität mittels euglykämischer hyperinsulinämischer Clamp-Technik (EHCT). Des weiteren wurde die Expression von Interleukin 1 und 6 sowie des Tumornekrosefaktors α untersucht. Aus den Ergebnissen schlussfolgern die Autoren, dass sich eine Insulinresistenz auch als Folge einer systemischen Entzündung entwickelt und insbesondere das Fettgewebe dazu beiträgt (*Vick* et al. 2008).

Weiterhin zeigten *Tóth* et al. (2009a) in einer Untersuchung an 24 Pferden, dass auch Tiere, welche aufgrund einer iatrogen erzeugten Endotoxämie und/oder einer Kohlenhydratüberladung eine klinische Hufrehe entwickelten (7 von 24), einen signifikanten Abfall ($p < 0,001$) ihrer Insulinsensitivität aufwiesen. In der eigenen Untersuchung wurde durch die klinischen Untersuchungen sichergestellt, dass ausschließlich Tiere im chronischen, nicht erheblich schmerzhaften Rehestadium bzw. mit nur vorberichtlich bekannter Rehe in die Studie aufgenommen wurden.

Als weiterer limitierender Faktor sollten, wie in Kapitel 3.1.1 erläutert, erst Patienten in die Studie aufgenommen werden, die eine nüchtern-Hyperinsulinämie > 30 µU/ml aufwiesen. Dieser Wert liegt über dem im Consensus Statement zum equinen metabolischen Syndrom als Grenzwert zur Hyperinsulinämie angegebenen 20 µU/ml (*Frank* et al. 2010). Bei einem Grenzwert von 20 µU/ml wären von den 61 initial untersuchten Tieren 12 weitere Patienten für die weiterführenden Untersuchungen in Frage gekommen (dann insgesamt 35 von 61; d.h. 57%). Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass der in der Literatur angegebene Grenzwert für die Insulinbestimmung mittels RIA gilt. In der eigenen Untersuchung wurde ein CLIA eingesetzt. Bei einem Vergleich von ELISA, RIA und CLIA durch *Warnken* et al. (2016) zur Messung von equinem Insulin wurde deutlich, dass je nach Methode signifikant unterschiedliche Ergebnisse bei den gleichen Proben zu messen waren. Der CLIA bietet dabei den weitesten analytischen Bereich, kommt aber bei Proben mit einem Insulingehalt von unter 100 µU/ml zu deutlich niedrigeren Ergebnissen als der ELISA und der RIA. Daher sollten Referenzbereiche oder cut-off Werte nach Meinung der Autoren methodenspezifisch betrachtet werden. Die 2016 veröffentlichten Referenzbereiche für einen CLIA, welche mit dem IMMULITE 2000® ausgewertet wurden, entstanden aus einer Untersuchung an 130 erwachsenen Ponys. Für diese Population wurde ein Referenzbereich von 2,0 – 21,2 mU/l erstellt und eine gute Durchführbarkeit des Verfahrens ohne signifikanten Verlust der Insulinaktivität bei Lagerung über drei Tage festgestellt (*Köller* et al. 2016). Bei der eigenen Untersuchung wurde zur Durchführung des CLIA ein anderes Gerät des gleichen Herstellers verwendet. Die Wahl eines Grenzwertes von 30 µU/ml für die eigene Untersuchung war sinnvoll, da die Tiere möglichst schon nach der Voruntersuchung als insulinresistent eingestuft werden sollten. Da in der eigenen Untersuchung zudem ein CLIA zur Bestimmung des Insulins verwendet wurde, war die Sicherheit mit diesem Test und einem Grenzwert von 30 µU/ml insulinresistente Tiere zu detektieren höher als mit einem RIA bei gleichem Grenzwert. Damit sollte die Anzahl der weiterführenden aufwändigeren CGITs begrenzt werden.

Andererseits ist zu berücksichtigen, dass wahrscheinlich nicht alle insulinresistenten Tiere ein hohes basales Plasmainsulin aufwiesen. Dies stellten auch *Frank* et al. (2006) fest, denen bei einer Gruppe von sieben fettleibigen insulinresistenten Pferden ein Tier mit einem niedrigen basalen Insulin von 17 µU/ml auffiel. In der 2016 veröffentlichten Untersuchung von Dunbar et al. waren sieben von 12 Tieren mithilfe des frequently sampled intravenous glucose toleranz test (FSIGT) als insulinresistent klassifiziert worden, obwohl alle Plasmainsulinwerte unter 20 µU/ml lagen (*Dunbar* et al. 2016). Auch in der eigenen Untersuchung fielen niedrige Insulinwerte trotz gestörter Glukoseregulationsfähigkeit auf. So zeigten nur 2 der 16 initial in die Studie eingeschlossenen Patienten zum Zeitpunkt des ersten CGITs, welcher innerhalb von zwei Wochen nach der Voruntersuchung durchgeführt wurde, Nüchtern-Insulinwerte > 30 µU/ml. Gleichwohl wiesen alle diese Tiere einen pathologischen CGIT auf. Es ist also anzunehmen, dass nicht alle insulinresistenten Tiere durch den gewählten Grenzwert als Einschlusskriterium erkannt wurden, da nicht bei allen direkt ein dynamisches Testverfahren zur Messung der Insulinsensitivität angewandt wurde.

Um das Ziel der eigenen Untersuchung erreichen zu können war es aber zunächst wesentlich, sicher insulinresistente Tiere zu identifizieren. Durch den Grenzwert von > 30 µU/ml wurde die Phase der Rekrutierung zwar verlängert, da mit einem niedrigeren Grenzwert früher ausreichend Patienten vorhanden gewesen wären. Andererseits zeigten trotz des relativ hohen Grenzwertes bei der Folgeuntersuchung nur 16 von 18 Tieren ein pathologisches Ergebnis des CGITs. Somit war das Vorgehen zur Auswahl der Studienteilnehmer für die eigene Untersuchung sinnvoll, da der Aufwand für direkt erfolgte dynamische Tests im Feld, um sicher deutlich insulinresistente Probanden zu identifizieren, zu hoch gewesen wäre.

4.1.2 Diskussion des Studienablaufes

Die Reihenfolge der Substanzverabreichung (Metformin oder Placebo) erfolgte anhand einer Randomisierungsliste in verblindeter Form. Allerdings oblag die Verabreichung der jeweiligen Substanzen den Besitzern, worin eine gewisse

Unsicherheit in der Zuverlässigkeit der Medikamentengabe lag. Da eine täglich zweimalige tierärztliche Applikation über jeweils drei Monate jedoch praktisch nicht umzusetzen war, wurde dies über die Abgabe von genau abgezählten und portionierten Substanzbehältern, welche aufgehoben und leer an die Untersucher zurückzugeben waren, abgesichert.

Die Fütterungs- und Haltungsbedingungen der Pferde und Ponys unterlag aufgrund der jeweils dreimonatigen Dauer der beiden Studienphasen jahreszeitlichen Schwankungen. Dies hatte möglicherweise einen Einfluss auf die Plasmainsulinkonzentration der Patienten. So stellten *McIntosh* et al. (2007) fest, dass Weidepferde im Frühjahr (April) signifikant höhere Insulinkonzentrationen ($p < 0,001$) aufwiesen als zu dieser Zeit im Stall gehaltene und mit Heu gefütterte Tiere. Dabei waren hohe Korrelationen zwischen dem Gehalt an nicht-strukturellen Kohlenhydraten ($r = 0,69$), wie Stärke und Fruktan oder Zucker ($r = 0,67$) im Futter und der Plasmainsulinkonzentration festzustellen. Da die basale Insulinkonzentration in der eigenen Studie als ein Einschlusskriterium genutzt wurde, hätte es, bei im April bei Weidegang eingeschlossenen Probanden, zu fälschlicherweise in die Studie aufgenommenen Tieren kommen können. Zehn der für die eigenen Untersuchungen eingeschlossenen Patienten wurden im Frühjahr rekrutiert. Davon fünf Tiere im März, drei im April und zwei im Mai. Zwei der im März und eines der im April rekrutierten Tiere hatte Weidegang. Da alle diese Tiere einen pathologischen Verlauf ihrer CGITs zeigten lässt sich ein fälschlicher Studieneinschluss durch dieses Kriterium ausschließen. So konnten *Funk* et al. (2012) bei der wiederholten Durchführung von CGITs an neun gesunden Pferden keine jahreszeitlichen Unterschiede feststellen.

Das Fütterungs- und Bewegungsmanagement unterlag in der eigenen Studie nicht der Kontrolle der Untersucher. Dies entspricht den Umständen im Alltag und repräsentiert somit praxisnahe Bedingungen. Die Besitzer hatten vor Beginn der Studie angegeben, dass ihnen eine Optimierung des Haltungs- und Fütterungsmanagements nicht möglich sei. Dies war für die sechsmonatige Studie wichtig, da in zahlreichen Untersuchungen ein großer Einfluss einer energiereduzierten Diät und der damit verbundenen Gewichtsabnahme auf die

Insulinsensitivität beschrieben wurde. So führte eine Reduktion des Futters bei übergewichtigen Ponys zu einer signifikanten Gewichtsreduktion in Kombination mit einer verbesserten Insulinsensitivität (*van Weyenberg* et al. 2008, *Dugdale* et al. 2010, *Ungru* et al. 2012). Dies wurde auch durch die Untersuchung von *McGowan* et al. (2013) bestätigt, bei der eine Diät durch Reduktion der Heuration auf 1,25% des Körpergewichts als Trockenmasse bei 12 EMS Patienten ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion des basalen Insulins ($p = 0,02$) und der Insulinkonzentration nach 45 Minuten im CGIT ($p = 0,03$) führte. Auch ein körperliches Training kann schon nach einer Woche zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität um bis zu 60% ohne Gewichtsreduktion führen (*Powell* et al. 2002). Dies widerspricht jedoch den Ergebnissen der Studie von Carter et al., bei der 12 übergewichtige insulinresistente Wallache unterschiedlich intensiv trainiert wurden. Bei diesen Tieren zeigte sich zwar eine Reduktion von Körpergewicht und Fettmasse, aber keine Verbesserung der Insulinsensitivität (*Carter* et al. 2010).

Dagegen zeigte Patient 10 im Verlauf der eigenen Studie eine deutliche Gewichtsreduktion von 506 kg über 478 kg zu 466 kg. Obgleich die Besitzer angaben, im Management keine Veränderungen vorgenommen zu haben. Klinisch blieb das Pferd ohne besondere Befunde. Diese Gewichtsabnahme wurde beim zweiten und dritten CGIT von als physiologisch zu wertenden Untersuchungsergebnissen begleitet. Dabei sank bei diesem Patienten der Blutglukosewert innerhalb von 35 Minuten wieder unterhalb des basalen Wertes. Das Plasmainsulin betrug nach 45 Minuten bei der zweiten Untersuchung nur 93,7 µU/ml beziehungsweise 73,1 µU/ml bei der dritten Untersuchung. Alle Einschlusskriterien waren auch bei diesem Patienten selbstverständlich erfüllt worden. Beispielsweise lag der Nüchtern-Insulinwert in der Voruntersuchung bei 54,1 µU/ml. Zudem erreichte dieser Patient innerhalb von zwei Stunden beim ersten CGITs nicht wieder das Niveau seines Ausgangsblutglukosewertes. Auch der Plasmainsulinwert nach 45 Minuten betrug 148 µU/ml. Diese Ergebnisse verdeutlichen die gerechtfertigte Aufnahme des Patienten in die Studie.

Außer bei Patient 10 kam es im Untersuchungszeitraum zu keinen auffälligen Veränderungen hinsichtlich des Körpergewichts oder des BCS (Kapitel 3.2.2.1,

Tab. 5), was darauf rückschließen lässt, dass es wie von den Besitzern angegeben zu keinen erheblichen Veränderungen im Bereich des Managements gekommen war.

4.1.3 Diskussion der durchgeführten Untersuchungen

Die in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen orientierten sich an dem für das equine metabolische Syndrom existierenden consensus statement des American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM). Darin werden das basale Plasmainsulin und der intravenöse kombinierte Glukose-Insulin-Test nach *Eiler* et al. (2005) als sinnvolle Untersuchungen für die Diagnose des EMS genannt (*Frank* et al. 2010). Da die basale Plasmainsulinkonzentration einen guten Indikator für eine Insulinresistenz darstellt (*Treiber* et al. 2005, *Frank* et al. 2006) und wenig aufwändig ist, wurde sie nach dem klinischen Bild als erstes labordiagnostisches Kriterium für einen Studieneinschluss gewählt.

4.1.3.1 Diskussion des CGITs

Zum Zeitpunkt des Studienbeginns im Jahr 2010 standen mehrere dynamische Testmethoden zur Beurteilung der Glukoseregulationsfähigkeit bzw. der Diagnose einer Insulinresistenz beim Pferd zur Verfügung. Die Methoden zur quantitativen Bestimmung der Insulinsensitivität wie der EHCT und der FSIGT, gelten als am besten etablierte Methoden, kamen jedoch aufgrund des hohen Aufwandes (s. Kapitel 2.1.4.2 und 2.1.4.6) für die Durchführung im Feld nicht in Frage (*Frank* et al. 2006, *Brojer* et al. 2013). Der CGIT ist in der freien Praxis gut durchführbar, auch wenn er einen recht hohen Zeitaufwand von mindestens 180 Minuten pro Proband und Test erfordert. Als weiterer positiver Aspekt unterscheiden sich die Glukose- und Insulinverläufe von EMS-Patienten beim CGIT deutlich von den Verläufen bei gesunden Tieren und sind einfach zu interpretieren (*Eiler* et al. 2005, *Dunbar* et al. 2016). Somit wären eindeutige Unterschiede zu erwarten gewesen, wenn das Medikament einen Einfluss auf die Insulinresistenz gehabt hätte.

Als alternatives Testverfahren hätten sich auch orale Tests angeboten, welche jedoch von Faktoren wie der Fressgeschwindigkeit, der Magenentleerung und

der intestinalen Absorption abhängig sind (*Kronfeld* et al. 2005). Weiterhin erreichte der zeitlich kürzere CGIT im Vergleich mit dem FSIGT, dem OST und der basalen Insulinkonzentration an 12 Pferden eine gute Sensitivität (85,7%) und bessere Spezifität (40%) im Vergleich mit dem OST. Eine gemeinsame Berücksichtigung der Dauer des positiven Glukoseverlaufes und des Insulinwertes nach 45 Minuten führt zu einer Steigerung der Spezifität des CGITs auf 100% bei der Klassifikation der Tiere als insulinsensitiv bzw. insulinresistent (*Dunbar* et al. 2016). Brojer et al. bemängelten den Einfluss von Stressfaktoren wie Transport und Umgebungswechsel auf die Glukosekurve beim CGIT (*Brojer* et al. 2013). Diese Einflussfaktoren konnten in der eigenen Studie durch die Tatsache, dass die Tiere in ihrer gewohnten Umgebung untersucht wurden, vermieden werden.

Bei den eigenen CGITs wurde kurzwirksames Humaninsulin mit sofort einsetzender Wirkung verwendet. Dies entspricht den Angaben in der Literatur (*Eiler* et al. 2005, *Frank* et al. 2006, *Funk* et al. 2012, *Brojer* et al. 2013, *Dunbar* et al. 2016). Aus arzneimittelrechtlichen Gründen wurde erwogen, ob nicht das für Hunde zugelassene Caninsulin® ebenso hätte verwendet werden können. Dabei handelt es sich jedoch um ein Zink-Insulin, welches zu der Gruppe der Verzögerungsinsuline gehört und nicht zur intravenösen sondern nur zur subkutanen Verabreichung zugelassen ist. Um mit den publizierten Studien vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde folglich das schnellwirksame Insulin verwendet.

Die wiederholte Durchführung des CGITs wurde in der eigenen Studie gut von den Tieren toleriert, was den Erfahrungen von *Eiler* et al. (2005) entspricht. Auch in den Studien von Brojer et al. (2013), Funk et al. (2012) und Dunbar et al. (2016) wurden keine unerwünschten Arzneimittelwirkungen erwähnt.

Der CGIT erscheint somit insgesamt als geeigneter dynamischer Test zur Beurteilung des Glukosestoffwechsels in der eigenen Untersuchung und hätte aller Voraussicht nach Einflüsse von Metformin auf die Glukoseregulationsfähigkeit der EMS Patienten aufzeigen können.

4.1.3.2 Diskussion der Auswertung des CGITs

Während bei der ursprünglichen Entwicklung des CGITs die Ausprägung der positiven und negativen Glukosephase betrachtet wurden (*Eiler* et al. 2005), werteten nachfolgende Studien auch andere Aspekte aus. In einem Vergleich von sieben übergewichtigen, insulinresistenten Pferden mit fünf normalgewichtigen Tieren wurden die Dauer der positiven Glukosephase und die AUCs von Glukose sowie Insulin betrachtet. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede in allen drei Aspekten und bestätigten eindeutig die Klassifikation der Tiere in insulinresistent und insulinsensitiv im Vergleich mit der alleinigen Betrachtung der Glukosekurve (*Frank* et al. 2006). In den Untersuchungen von Brojer et al. (2013) und Dunbar et al. (2016) wurden, wie in der eigenen Studie, zusätzlich die Insulinwerte nach 45 Minuten betrachtet. Dabei bewerteten Dunbar et al. (2016), wie im consensus statement von 2010 beschrieben, einen Insulinwert von >100 µU/ml nach 45 Minuten auch als beweisend für eine Insulinresistenz. Funk et al. definierten jedoch zusätzlich einen Insulinwert von > 20 µU/ml nach einer Testdauer von 75 Minuten als pathologisch. In Anlehnung an die Empfehlungen von 2010 wurden in der eigenen Studie die Dauer der positiven Glukosekurve (hier als Dauer bis zum Wiedererreichen des Basalglukosewertes benannt) und die Insulinwerte nach 0, 45 und 90 Minuten betrachtet. Für die Messung der Insulinwerte nach 90 Minuten wurden bislang in der Literatur keine Grenzwerte festgelegt. Zusätzlich wurden die Flächen unter den Glukosekurven (AUC_{Glu}) mit zusätzlichen Berechnungen ausgewertet. Ein Vergleich der Ergebnisse der eigenen Untersuchung mit jenen anderer Studien ist also anhand der gewählten Auswertungskriterien gut möglich.

4.1.4 Diskussion der Wahl von Macrogol als Placebo

Die Substanz Macrogol 4000 als Placebo für die Metformin Studie einzusetzen beruht in erster Linie darauf, dass es sich dabei um die Trägersubstanz in dem eingesetzten Medikament (Metformin AL 1000) handelt. Macrogol 4000, also Polyethylenglykol mit einer mittleren Molekülmasse von 4000 g/mol ist ein hochmolekularer mehrwertiger Alkohol, der in Form eines geruchs- und geschmacksneutralen weißen Pulvers vorliegt. Es wird in der Humanmedizin als

Laxans bei Obstipationen unter anderem in der Pädiatrie angewendet (*Dziechciarz* et al. 2015). Polyethylenglykol wird weder absorbiert noch metabolisiert sondern wirkt lediglich aufgrund seiner starken Wasserbindung im Darmlumen. Dabei kommen Dosierungen von 0,2-0,8 g/kg KGW bei Kindern und bis zu maximal 60 g pro Person und Tag bei Erwachsenen zum Einsatz (*Belsey* et al. 2010, *Dziechciarz* et al. 2015). In einer Untersuchung an fünf gesunden Stuten mit einer Dosierung von 1,5 g/kg KGW konnte nur eine geringfügige Erweichung des Kotes festgestellt werden (*Gomes* und *Ribeiro Filho* 2012). In der eigenen Studie wurden bei Verwendung von 2 x tgl. ca. 20 mg/kg (geringe Abweichungen waren aufgrund der Anpassung an die adspektorische Menge an Metformin möglich) keine unerwünschten Arzneimittelwirkungen festgestellt. Weiterhin war die Akzeptanz des geschmacksneutralen Präparates bei den Tieren, wie auch in der Humanmedizin beschrieben (*Dziechciarz* et al. 2015), hoch. Abschließend ist zu erwähnen, dass alle an der Studie teilnehmenden Patienten im Arzneitmittelanhang des Equidenpasses als nicht für die Lebensmittelgewinnung dienende Tiere eingetragen waren. Daher lagen auch aus arzneimittelrechtlicher Sicht keine Aspekte gegen den Einsatz von Macrogol oder Metformin vor.

4.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

In der eigenen Untersuchung sollte ein möglicher Einfluss von Metformin auf den Glukosestoffwechsel bei am equinen metabolischen Syndrom erkrankten Pferden und Ponys untersucht werden.

4.2.1 Diskussion der Ergebnisse der Voruntersuchung

Die Voruntersuchungen für die eigene Studie wurden an 61 adipösen, anamnestisch an Hufrehe erkrankten Pferden und Ponys durchgeführt. Dennoch zeigten 43% der Tiere (n=26) Nüchtern-Insulinwerte von unter 20 µU/ml. Die wichtigste Ursache dürfte die geringe diagnostische Sensitivität des basalen Insulins sein. Ein weiterer Grund könnte in der Abhängigkeit der basalen Insulinkonzentration von der Futterzusammensetzung liegen. So waren in einer Untersuchung von *Carter* et al. (2009b) an 13 gesunden Wallachen die höchsten Insulinwerte (61,7 ± 15,7 mU/L) festzustellen, wenn gleichzeitig eine Fettleibigkeit und Überfütterung durch eine kraftfutterreiche Diät vorlagen. Lagen lediglich Obesitas oder eine die getreidehaltige Fütterung vor, so bewegte sich die nüchtern-Insulinkonzentration um 3,5 ± 0,3 mU/L. Sie unterschied sich damit nicht von den Studienphasen in denen die Tiere normalgewichtig waren und eine kraftfutterreiche Diät erhielten, oder in denen sie zwar übergewichtig waren, aber nur mit Heu gefüttert wurden. Die Autoren schlussfolgern, dass „eine basale Hyperinsulinämie aus einer Interaktion des Grades der Insulinresistenz und der Konzentration an leichtverdaulichen Kohlenhydraten in der Futterration resultiert“ (Übersetzung der Autorin). Dies entspricht auch den Erfahrungen von *Hoffman* et al. (2003) und *McIntosh* et al. (2007). Alle in der eigenen Studie untersuchten Tiere waren vorberichtlich an Hufrehe erkrankt und erhielten daher in den meisten Fällen eine Futterration mit möglichst geringen Konzentrationen an leichtverdaulichen Kohlenhydraten. Dies könnte eine Erklärung für den hohen Anteil an physiologischen Nüchtern-Insulinwerten bei den untersuchten fettleibigen Tieren sein. Hauptsächlich ist aber relevant, dass die einmalige Messung des basalen Plasmainsulins nicht sensitiv ist (*Dunbar* et al. 2016). So beobachteten auch *Frank* et al. (2006) ein Tier mit einem Plasmainsulinwert von unter 20 µU/ml in einer Gruppe von sieben sicher insulinresistenten, fettleibigen

Tieren. Gleichwohl gilt die Messung der basalen Insulinkonzentration im Plasma als die einfachste Methode um einen Hinweis auf ein Problem im Bereich der Insulinsensitivität zu bekommen (*Treiber* et al. 2005, *Frank* et al. 2006) und wurde somit auch als Einschlusskriterium für die eigene Studie gewählt.

In der eigenen Untersuchung existierten bis auf die Triglyceridwerte keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Untersuchung der hämatologischen und klinisch chemischen Blutparameter zwischen der Gruppe der Tiere mit Nüchtern-Insulinwerten über 30 µU/ml und der mit Werten unter 30 µU/ml. Dies entspricht den Ergebnissen von *Elzinga* et al. (2016), welche eine signifikante ($p = 0,002$) Erhöhung der Triglyceridwerte bei EMS Patienten ($n = 14$) im Vergleich mit einer Kontrollgruppe ($n = 9$) feststellten. Laut Consensus statement können bei EMS Patienten in Einzelfällen Veränderungen des Hämatokrits hinsichtlich einer Anämie und eine Erhöhung der GGT-Aktivität beobachtet werden (*Frank* et al. 2010). In der eigenen Untersuchung konnten keine Auffälligkeiten hinsichtlich des Hämatokrits festgestellt werden. Je drei Individuen aus beiden Gruppen (Nüchtern-Insulinwerte > und < 30 µU/ml) zeigten Erhöhungen der GLDH-Werte (s. Kap. 3.2.1.3).

Die in der Voruntersuchung durchgeführten Blutuntersuchungen dienten anhand des Nüchtern-Insulinwertes als Einschlusskriterium. Desweiteren sollten Tiere mit Erkrankungen, welche zu Veränderungen der Organparameter geführt hätten erkannt und von der Studie ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen führten zum Ausschluss eines Tieres mit Hyperinsulinämie aufgrund eines erhöhten ACTH-Wertes (s. Kap. 3.2.1.4), lieferten ansonsten aber keine unerwarteten Ergebnisse.

4.2.2 Diskussion der Ergebnisse der CGITs

Der kombinierte Glukose-Insulin-Test erlaubt anhand der Glukose- und Insulinverläufe eine klare Unterscheidung von insulinresistenten und gesunden Tieren (*Eiler* et al. 2005, *Dunbar* et al. 2016). In der eigenen Untersuchung standen von den 22 Tieren mit Nüchtern-Insulinwerten > 30 µU/ml 18 Patienten für einen CGIT zur Verfügung. Bei 16 dieser 18 Patienten waren die von *Frank* et al. (2006), *Funk* et al. (2012), *Brojer* et al. (2013) und *Dunbar* et al. (2016) als

pathologisch beschriebenen Auffälligkeiten festzustellen. Dies betraf sowohl den Verlauf der Glukosewerte über die Zeit, als auch die Dauer bis zum Wiedererreichen der Basalglukosewerte und die Insulinwerte nach 45 Minuten. Dies klassifizierte diese Tiere in der eigenen Studie als insulinresistent beziehungsweise wies das Vorliegen einer Störung der Glukoseregulationsfähigkeit nach. Die Korrelation ($r = -0,57$) von Insulinresistenz und Übergewicht beziehungsweise Fettleibigkeit wurde unter anderem in der Untersuchung von *Vick* et al. (2007) belegt. Allerdings scheint dies, zumindest im Anfangsstadium, auch sehr von der Fütterung der Tiere abhängig zu sein. So konnten *Bamford* et al. (2016) und auch *Lindase* et al. (2016b) keine Veränderungen der Insulinsensitivität bei insgesamt 15 Tieren ($n = 6$ und $n = 9$) feststellen, bei denen über einen Zeitraum von 20 beziehungsweise 22 Wochen eine Fettleibigkeit durch eine fettbasierte Diät herbeigeführt worden war. Dem gegenüber steht der Fütterungsversuch von *Carter* et al. (2009b), bei dem die Gewichtszunahme durch eine 16 Wochen andauernde, kraftfutterreiche Diät erreicht wurde. Hierbei konnte nicht nur eine signifikante ($p < 0,05$) Reduktion der Insulinsensitivität festgestellt werden, sondern es entwickelten zudem drei der Probanden milde Hufrehesymptome. In der eigenen Untersuchung zeigten 89% der adipösen Tiere einen pathologischen Verlauf des CGITs. Und auch bei den für den kompletten Studienzeitraum von sechs Monaten zur Verfügung stehenden 14 Patienten veränderten sich die Ergebnisse nur bei einem Tier in Assoziation mit einer unbeabsichtigten Reduktion des Körpergewichts. Es ist also anzunehmen, dass in einem chronischen Stadium von Übergewicht und Insulinresistenz bei unveränderter Fütterung beides auch aufrecht erhalten wird.

Cortisol ist ein Stresshormon und kann in verschiedenen Situationen auch beim Pferd in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen werden. So fanden *Ayala* et al. (2012) in einer Untersuchung an 95 erkrankten Tieren im Vergleich zu 24 Kontrollpferden signifikante Erhöhungen der Cortisolwerte. In der eigenen Untersuchung lagen die Cortisolwerte sowohl in der Voruntersuchung als auch während der CGITs innerhalb des Referenzbereiches des untersuchenden Labors von 1,0 - 6,7 µg/dl. Dies sind nach Kenntnis der Autorin die ersten Daten zu Cortisolwerten, welche während der Durchführung von kombinierten Glukose-

Insulin-Tests gewonnen wurden. Die Ergebnisse lassen die Annahme zu, dass Stress als Einflussfaktor auf die Ergebnisse der CGITS bei den untersuchten Tieren zu vernachlässigen ist. Die basalen Cortisolwerte betrugen in der eigenen Untersuchung beim 1. CGIT 3,7 ± 1,6 µg/dl, nach Metformin 3,2 ± 0,8 µg/dl und nach Placebo 2,7 ± 0,8 µg/dl. Dass das totale Plasmacortisol auch bei EMS Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrolltieren nicht erhöht ist bestätigten auch *Hart* et al. (2016) in einer Untersuchung an insgesamt 97 Tieren. Dabei zeigten die EMS Pferde (n = 12) Werte von 4,1 ± 1,6 µg/dl und die Ponys (n = 8) Werte von 7,7 ± 7,3 µg/dl. Allerdings waren die Cortisolwerte bei den fettleibigen Kontrolltieren (n = 35; Cortisol: 4,8 ± 1,8 µg/dl) signifikant höher im Vergleich mit den mageren Kontrolltieren (n = 22; Cortisol: 3,8 ± 1,1 µg/dl). Da in der eigenen Untersuchung ausschließlich übergewichtige Tiere untersucht wurden können hierzu keine vergleichenden Ergebnisse betrachtet werden.

Insgesamt sind die Ergebnisse der kombinierten Glukose-Insulin-Tests in der eigenen Untersuchung gut zu interpretieren und ließen eine klare Klassifikation der Tiere anhand bisheriger Literaturangaben zu. Nach Kenntnis der Autorin ist die eigene Untersuchung die erste Studie bei der EMS Patienten über einen Zeitraum von sechs Monaten dreimalig mittels eines CGITs untersucht wurden.

4.2.3 Diskussion der vergleichenden Betrachtung nach Metformin- und nach Placebogabe

Aktuell existieren mehrere Studien mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen zum Einsatz von Metformin beim Pferd. Dabei konnten in den Untersuchungen von *Vick* (2006), *Durham* et al. (2008) und *Rendle* et al. (2013) durchaus positive Auswirkungen von Metformin auf den Glukosestoffwechsel nachgewiesen werden. Die Studie von *Tinworth* et al. 2012) unterstützt diese Ergebnisse jedoch nicht. Das in der Humanmedizin am häufigsten genutzte orale Antidiabetikum wird dennoch in praxi auch sehr oft beim equinen metabolischen Syndrom eingesetzt.

Ebenso wie in der eigenen Untersuchung konnten *Tinworth* et al. (2012) in ihrer Untersuchung an sechs insulinresistenten Ponys mit regionaler Adipositas keine signifikanten Veränderungen erreichen. Allerdings gaben die Autoren lediglich

zweimal täglich 15 mg/kg über 3 Wochen während in der eigenen Untersuchung zweimal täglich 20 mg/kg über 3 Monate verabreicht wurden. Einschlusskriterium dieser ebenfalls Placebo-kontrollierten cross-over Studie war wie in der eigenen Untersuchung, ein pathologischer CGIT. Die Insulinsensitivität wurde zu Beginn und am Ende der Studie mithilfe eines FSIGT untersucht. Anders als in der eigenen Untersuchung zeigten die Tiere jedoch einen vergleichsweise niedrigen BCS von „nur“ 6 ± 0,9 (Skala von 0-9) und keine Hufrehe. Die eigenen Patienten hatten hingegen einen BCS von 8,2 ± 0,6 und waren vorberichtlich an Hufrehe erkrankt. Ob die Tiere der o.g. Autoren daher tatsächlich an einem klinisch relevanten equinen metabolischen Syndrom erkrankt waren, erscheint daher fraglich.

Bei der Untersuchung von *Durham* et al. (2008) hingegen wurden 18 insulinresistente Patienten mit rezidivierender Hufrehevorgeschichte behandelt. Der Einschluss der Tiere in die Studie erfolgte anhand der berechneten Proxies und die Werte vor der Behandlung dienten als Kontrolle für die Untersuchungsergebnisse nach der Therapie. Auch hier wurde Metformin in einer Dosierung von 15 mg/kg KGW zweimal täglich p.o. für einen unterschiedlich langen Zeitraum von 6 bis maximal 220 Tagen angewendet. Die Beurteilung erfolgte nicht mittels eines dynamischen Tests, sondern durch die Berechnung von Proxies für Insulinsensitivität, Insulinresistenz und der Funktion der ß-Zellen des Pankreas. Dabei konnten nach 6-14 Tagen unter Metformin signifikante Verbesserungen festgestellt werden. Der Nüchtern-Insulinwert sank beispielsweise von 24,4 µU/ml auf 8,7 µU/ml ($p = 0,006$). Diese Veränderungen waren jedoch bei Tieren mit einer Behandlungsphase von 28-220 Tagen kaum noch deutlich. Im Gegensatz zur eigenen Untersuchung zeigten auch die von Durham et al. (2008) untersuchten Tiere einen geringen BCS von 6,3 auf einer Skala von 1 bis 9 und erhielten eine Diät mit einem niedrigen glykämischen Index und keinen oder kaum Weidegang.

Auch *Vick* (2006) fand in einer Placebo-kontrollierten Studie an 14 adipösen Stuten mit einem BCS von > 7 eine signifikante Verbesserung der Insulinsensitivität nach einer täglichen Gabe von 3 g Metformin p.o. über 30 Tage. Allerdings konnte auch hier keine Veränderung mehr festgestellt werden

nachdem die Therapie über weitere 60 Tage fortgesetzt wurde. Die Beurteilung der Insulinsensitivität erfolgte in dieser Studie mittels eines wiederholt durchgeführten EHCT. Die Autoren interpretieren die Ergebnisse als eine zunächst scheinbare Verbesserung der Insulinsensitivität, welche sich jedoch zu dem späteren Untersuchungszeitpunkt nicht bestätigte. *Durham* et al. (2008) hingegen sind nicht komplett von einer fälschlich festgestellten Verbesserung überzeugt, sondern deuten einen initialen Effekt vielmehr als eine möglicherweise abnehmende Effizienz von Metformin welche mit einem verschlechterten Insulinsensitivitätsstatus assoziiert ist. Im Gegensatz zur eigenen Studie wurden bei beiden Untersuchungen positive Effekte nach einem recht kurzzeitigen Einsatz von Metformin (6 – 30 Tage) festgestellt. In der eigenen Untersuchung erfolgte die erneute Beurteilung der Insulinsensitivität/ des Glukosestoffwechsels hingegen erst nach einem Zeitraum von drei Monaten. Dabei konnte, ebenso wie in den beiden anderen Untersuchungen kein positiver Effekt von Metformin auf den Glukosestoffwechsel/ die Insulinsensitivität festgestellt werden.

Auch eine aktuellere Studie von *Rendle* et al. (2013) befasste sich mit der einmaligen Gabe von Metformin eine Stunde vor einem OGT an sieben gesunde Pferde. Hierbei konnte durch eine Dosierung von 30 mg/kg KGW eine signifikant reduzierte Glukose- und Insulinantwort auf die Dextrosegabe auch nach einer iatrogen induzierten Insulinresistenz durch Dexamethason nachgewiesen werden. Dabei reduzierten sich beispielsweise die Spitzenkonzentrationen von Glukose von 5,3 mmol/l auf 4,2 mmol/l mit Metformin (bei Insulinresistenz von 6,5 mmol/l auf 5,1 mmol/l) und der Insulinwert nach 120 Minuten von 17 iU/l auf 2 iU/l (bei IR von 37 iU/l auf 14 iU/l). Die Autoren schlussfolgern, dass Metformin möglicherweise, ähnlich wie bei anderen Tieren oder dem Menschen, die Glukoseaufnahme in den Darm reduziert.

Zusammenfassend bestehen die Unterschiede der Studien, welche einen positiven Effekt von Metformin auf den Glukosestoffwechsel nachgewiesen haben zur eigenen Studie zum einen in der Auswahl der Studientiere, welche meist nicht ausgeprägt fettleibig oder klinisch eindeutig an EMS erkrankt waren und zum zweiten in der Untersuchungsdauer. In der eigenen Untersuchung

wurde ein möglicher vorübergehender Effekt einer kurzfristigen Gabe von Metformin nicht untersucht und kann daher auch nicht mit den dazu genannten Untersuchungen verglichen werden. Allerdings ist ein kurzfristiger Effekt von Metformin für die wirklich am EMS erkrankten Tiere ohne Nutzen, da diese auf eine dauerhafte Verbesserung ihrer Insulinresistenz angewiesen sind. Die eigene Studie ist nach Kenntnis der Autorin die erste, welche den Einfluss von Metformin auf den Glukosestoffwechsel bei am EMS erkrankten Pferden und Ponys im Feld überprüft hat.

Die von *Hustace* et al. (2009) nachgewiesene schlechte Bioverfügbarkeit von Metformin beim Pferd von 7,1% bei nüchternen und 3,9% bei gefütterten Tieren ist als eine wahrscheinliche Ursache der ungenügenden Wirksamkeit zu nennen. Andererseits argumentieren einige Autoren mit der Annahme, dass die orale Metformingabe, ähnlich wie beim Menschen, bereits die Aufnahme von leichtverdaulichen Kohlehydraten aus dem Dünndarm reduziert. So lassen sich beim Menschen 30 bis 300 mal höhere Konzentrationen an Metformin im Jejunum nachweisen als im Plasma. Dieser Effekt soll laut den Autoren durch eine Akkumulation der Substanz in der Dünndarmmukosa zustande kommen (*Bailey* et al. 2008). Desweiteren reduziert Metformin die Glukoseabsorption im Darm durch eine veränderte Regulation von zwei Glukosetransportern im Darm von Ratten (*Sakar* et al. 2010). Allerdings hätte ein Einfluss auf die Nahrungsverwertung durch reduzierte Blutglukosekonzentrationen und weniger hyperinsulinämische Reaktionen auch in der eigenen Studie durch die lange Untersuchungsdauer in den Auswertungen der CGITs, dem Körpergewicht und dem Body condition score im Vergleich mit dem Placebo nachweisbar sein müssen.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die in der eigenen, randomisierten, verblindeten Cross-over Studie erhobenen Ergebnisse keine statistisch signifikanten oder klinisch relevanten Unterschiede zwischen der dreimonatigen Gabe von Metformin oder Placebo auf den Glukosestoffwechsel bei EMS Patienten aufwiesen. Auch der BCS und das Körpergewicht unterschieden sich nicht statistisch signifikant. Aufgrund dieser Ergebnisse kann

eine medikamentöse Therapie mit Metformin bei EMS Patienten nicht empfohlen werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In einer Placebo-kontrollierten, doppelt verblindeten, randomisierten Studie im cross-over Design wurde untersucht, ob das orale Antidiabetikum Metformin einen Einfluss auf den Glukosestoffwechsel bei EMS-Patienten besitzt. Eingeschlossen wurden adipöse, anamnestisch an Hufrehe erkrankte Pferde und Ponys mit einem Nüchtern-Insulinwert > 30 µU/ml und einem kombinierten Glukose-Insulin-Test (CGIT) nach Eiler et al. (2005), bei dem der basale Blutglukosewert nach 45 Minuten nicht wieder erreicht wurde. Die Tiere erhielten zuerst entweder Metformin (2 x tgl. 20 mg/kg KGW p.o.) oder ein Placebo (Macrogol, Trägersubstanz der Metformintabletten). Die Substanzen wurden nach 3 Monaten gewechselt, wobei weder der Autorin noch den Besitzern bekannt war, ob Placebo oder Metformin verabreicht wurde. Nach drei und nach sechs Monaten wurden klinische Untersuchungen, die Ermittlung von Körpergewicht und Body condition score (BCS) sowie CGITs wiederholt. Um den Glukosestoffwechsel zu beurteilen wurden als Hauptzielparameter die Glukose AUC (AUC_{Glu}) und die Dauer der positiven Glukosephase (t_B) ermittelt sowie die Insulinwerte nach 45 Minuten (Ins_{45}) verglichen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse in Modifikation für Cross-over Modelle.

Von 61 initial vorgestellten Patienten wurden 16 Probanden in die Studie eingeschlossen (8 Pferde und 8 Ponys). Zwei Pferde konnten wegen eines Hufreheschubes bzw. einer Verletzung die Studie nicht beenden. Die Ergebnisse der Hauptzielparameter bei den verbliebenen 14 Probanden wiesen keinerlei statistisch signifikanten oder klinisch relevanten Unterschiede nach Metformin- beziehungsweise Placebogabe auf.

Zusammenfassend konnte somit in diesem RCT an EMS-Patienten im Feld im Gegensatz zu früheren Publikationen kein positiver Einfluss von Metformin auf den pathologischen Glukosestoffwechsel nachgewiesen werden.

7 SUMMARY

A randomised, placebo controlled and double blinded cross-over trial was set up to evaluate effects of the oral antidiabetic Metformin on glucose regulation in patients suffering from the equine metabolic syndrome (EMS). Included were equines with a history of laminitis, a basal insulin > 30 µU/ml after an overnight fast and a combined i.v. Glucose Insulin Test (CGIT) according to Eiler et al. (2005), with a blood glucose concentration above baseline after 45 minutes. Patients at first either got Metformin (20 mg/kg bw bid) or they received at first as a placebo the substance Macrogol, which is the carrier substance in the metformin product. Substances were changed after 3 months. After 3 and 6 months, clinical examinations, body weight and Body condition score (BCS) as well as CGITs were repeated. To evaluate glucose regulation, glucose AUCs (AUC_{GLU}) and time for returning to baseline (t_B) were calculated and insulin levels after 45 min (Ins_{45}) compared. For statistical analysis, a two factorial ANOVA in a modification for cross-over study design was applied.

16 of 61 initially examined equines were included (8 horses and 8 ponys) in the trial. However, two horses were lost: one due to a severe laminitic bout while receiving placebo and another one due to an injury.

The results of the remaining 14 equines showed no statistically significant or clinically relevant differences after receiving Metformin or placebo for three months.

In summary, this RCT with EMS patients in a field study failed to detect any positive influence of Metformin on pathological glucose regulation.

8 LITERATUR

Asplin K. E., Curlewis J. D., McGowan C. M., Pollitt C. C., *Sillence M. N.* (2011): Glucose transport in the equine hoof. Equine Vet. J. 43, 196–201

Asplin K. E., Patterson-Kane J. C., Sillence M. N., Pollitt C. C. und *McGowan C. M.* (2010): Histopathology of insulin-induced laminitis in ponies. Equine Vet. J. 42, 700–706

Asplin K. E., Sillence M. N., Pollitt C. C. und *McGowan C. M.* (2007): Induction of laminitis by prolonged hyperinsulinaemia in clinically normal ponies. Vet. J. 174, 530–535

Ayala I., Martos N. F., Silvan G., Gutierrez-Panizo C., Clavel J. G. und *Illera J. C.* (2012): Cortisol, adrenocorticotropic hormone, serotonin, adrenaline and noradrenaline serum concentrations in relation to disease and stress in the horse. Res. in Vet. Sci. 93, 103–107

Bailey C. J., Wilcock C. und *Scarpello J. H. B.* (2008): Metformin and the intestine. Diabetologia 51, 1552–1553

Bamford N. J., Potter S. J., Harris P. A. und *Bailey S. R.* (2014): Breed differences in insulin sensitivity and insulinemic responses to oral glucose in horses and ponies of moderate body condition score. Domest. Anim. Endocrinol. 47, 101–107

Bamford N. J., Potter S. J., Harris P. A. und *Bailey S. R.* (2016): Effect of increased adiposity on insulin sensitivity and adipokine concentrations in horses and ponies fed a high fat diet, with or without a once daily high glycaemic meal. Equine Vet. J. 48, 368–373

Banse H. E. und *McFarlane D.* (2014): Comparison of three methods for evaluation of equine insulin regulation in horses of varied body condition score. J. Equine Vet. Sci. 34, 742–748

Belsey J. D., Geraint M. und *Dixon T. A.* (2010): Systematic review and meta analysis: polyethylene glycol in adults with non-organic constipation. International journal of clinical practice 64, 944–955

Bertin F. R. und *Sojka-Kritchevsky J. E.* (2013): Comparison of a 2-step insulin-response test to conventional insulin-sensitivity testing in horses. Domest. Anim. Endocrinol. 44, 19–25

Bertin F. R., Taylor S. D., Bianco A. W. und *Sojka-Kritchevsky J. E.* (2016): The effect of fasting duration on baseline blood glucose concentration, blood insulin concentration, glucose/insulin ratio, oral sugar test, and insulin response test results in horses. J. Vet. Intern. Med. 30 (5), 1726–1731

Borer K. E., Bailey S. R., Menzies-Gow N. J., Harris P. A. und *Elliott J.* (2012): Effect of feeding glucose, fructose, and inulin on blood glucose and insulin concentrations in normal ponies and those predisposed to laminitis. J. Anim. Sci. 90, 3003–3011

Brojer J. T., Lindase S., Hedenskog J., Alvarsson K. und *Nostell K.* (2013): Repeatability of the combined glucose-insulin tolerance test and the effect of a stressor before testing in horses of 2 breeds. J. Vet. Intern. Med. 27, 1543–1550

Budras K.-D. (2005): Hufrehe- ein aktueller Überblick. Pferde Spiegel 3, 126–132

Budras K.-D. (2006): Hufrehe (Pododermatitis diffusa aseptica), Morbus apparatus suspensorii ossis ungularis. In: Dietz O. und Huskamp B. (Hrsg.): Handbuch Pferdepraxis, 3. Aufl. Enke, Stuttgart, 972–979

Buff P. R., Johnson P. J., Wiedmeyer C. E., Ganjam V. K., Messer N. T. und *Keisler D. H.* (2006): Modulation of leptin, insulin, and growth hormone in obese pony mares under chronic nutritional restriction and supplementation with ractopamine hydrochloride. Vet. Ther. 7 (1), 64–72

Burns T. A., Geor R. J., Mudge M., McCutcheon L., Hinchcliff K. und *Belknap J.* (2010): Proinflammatory cytokine and chemokine gene expression profiles in subcutaneous and visceral adipose tissue depots of insulin-resistant and insulin-sensitive light breed horses. J. Vet. Intern. Med. 24, 932–939

Caltabilota T. J., Earl L. R., Thompson D. L., JR, Clavier S. E. und *Mitcham P. B.* (2010): Hyperleptinemia in mares and geldings: assessment of insulin sensitivity from glucose responses to insulin injection. J. Anim. Sci. 88, 2940–2949

Carter R. A., Geor R. J., Staniar W. B., Cubitt T. A. und *Harris P. A.* (2009a): Apparent adiposity assessed by standardised scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies. Vet. J. 179, 204–210

Carter R. A., McCutcheon L. J., George L. A., Smith T. L., Frank N. und *Geor R. J.* (2009b): Effects of diet-induced weight gain on insulin sensitivity and plasma hormone and lipid concentrations in horses. Am. J. Vet. Res. 70 (10), 1250–1258

Carter R. A., Treiber K. H., Geor R. J., Douglass L. und *Harris P. A.* (2009c): Prediction of incipient pasture-associated laminitis from hyperinsulinaemia, hyperleptinaemia and generalised and localised obesity in a cohort of ponies. Equine Vet. J. 41 (2), 171–178

Carter R. A., McCutcheon L. J., Valle E., Meilahn E. N. und *Geor R. J.* (2010): Effects of exercise training on adiposity, insulin sensitivity, and plasma hormone and lipid concentrations in overweight or obese, insulin-resistant horses. Am. J. Vet. Res. 71 (3), 314–321

Chameroy K. A., Frank N., Elliott S. B. und *Boston R. C.* (2011): Effects of a supplement containing chromium and magnesium on morphometric measurements, resting glucose, insulin concentrations and insulin sensitivity in laminitic obese horses. Equine Vet. J. 43 (4), 494–499

Chameroy K. A., Frank N., Elliott S. B. und *Boston R. C.* (2016): Comparison of plasma active glucagon-like peptide 1 concentrations in normal horses and those with equine metabolic syndrome and in horses placed on a high-grain diet. J. Equine Vet. Sci. 40, 16–25

de Laat M. A., McGowan C. M., Sillence M. N. und *Pollitt C. C.* (2010): Equine laminitis: Induced by 48 h hyperinsulinaemia in Standardbred horses. Equine Vet. J. 42 (2), 129–135

de Laat M. A., Sillence M. N., McGowan C. M. und *Pollitt C. C.* (2012): Continuous intravenous infusion of glucose induces endogenous hyperinsulinaemia and lamellar histopathology in Standardbred horses. Vet. J. 191, 317–322

de Laat M. A., Hampson B. A., Sillence M. N. und *Pollitt C. C.* (2016a): Sustained, low-intensity exercise achieved by a dynamic feeding system decreases body fat in ponies. J. Vet. Intern. Med. 30, 1732–1738

de Laat M. A., McGree J. M. und *Sillence M. N.* (2016b): Equine hyperinsulinemia: investigation of the enteroinsular axis during insulin dysregulation. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 310, 61-72

de Laat M. A. und *Sillence M. N.* (2017): The repeatability of an oral glucose test in ponies. Equine veterinary journal 49, 238–243

DeFronzo R. A., Tobin J. D. und *Andres R.* (1979): Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 237, 214-223

Donath M. (2016): Behandlung von Typ-2-Diabetes: Praxisnahe Empfehlungen. Praxis 105, 699–702

Dornblüth O. und *Pschyrembel W.* (2004): Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 260. Aufl. de Gruyter, Berlin

Dugdale A. H. A., Curtis G. C., Cripps P., Harris P. A. und *Argo C. M.* (2010): Effect of dietary restriction on body condition, composition and welfare of overweight and obese pony mares. Equine Vet. J. 42 (7), 600–610

Dunbar L. K., Mielnicki K. A., Dembek K. A., Toribio R. E. und *Burns T. A.* (2016): Evaluation of four diagnostic tests for insulin dysregulation in adult light-breed horses. J. Vet. Intern. Med. 30, 885–891

Durham A. E., Rendle D. I. und *Newton J. R.* (2008): The effect of metformin on measurements of insulin sensitivity and β cell response in 18 horses and ponies with insulin resistance. Equine Vet. J. 40 (5), 493–500

Durham A. E., Hughes K. J., Cottle H. J., Rendle D. I. und *Boston R. C.* (2009): Type 2 diabetes mellitus with pancreatic β cell dysfunction in 3 horses confirmed with minimal model analysis. Equine Vet. J. 41 (9), 924–929

Dziechciarz P., Horvath A. und *Szajewska H.* (2015): Polyethylene glycol 4000 for treatment of functional constipation in children. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 60, 65–68

Eiler H., Frank N., Andrews F. M., Oliver J. W. und *Fecteau K. A.* (2005): Physiologic assessment of blood glucose homeostasis via combined intravenous glucose and insulin testing in horses. Am. J. Vet. Res. 66 (9), 1598–1604

Elzinga S., Wood P. und *Adams A. A.* (2016): Plasma lipidomic and inflammatory cytokine profiles of horses with equine metabolic syndrome. J. Equine Vet. Sci. 40, 49–55

Fedtke A. (2015): Fehlender Einfluss von Metformin auf röntgenologische Hufreheparameter beim equinen metabolischen Syndrom. Inaugural-Dissertation, Gießen, Justus-Liebig Universität Gießen

Frank N. (2009): Equine Metabolic Syndrome. J Equine Vet Sci. 29, 259–267

Frank N. (2011): Equine Metabolic Syndrome. Vet. Clin. N. Am. Equine Pract 27, 73–92

Frank N., Elliott S. B., Brandt L. E. und *Keisler D. H.* (2006): Physical characteristics, blood hormone concentrations, and plasma lipid concentrations in obese horses with insulin resistance. JAVMA 228 (9), 1383–1390

Frank N., Elliott S. B. und *Boston R. C.* (2008): Effects of long-term oral administration of levothyroxine sodium on glucose dynamics in healthy adult horses. Am. J. Vet. Res. 69 (1), 76–81

Frank N., Geor R. J., Bailey S. R., Durham A. E. und *Johnson P.* (2010): Equine metabolic syndrome. J. Vet. Intern. Med. 24, 467–475

Frank N. und *Geor R. J.* (2014): Current best practice in clinical management of equine endocrine patients. Equine Vet. Educ. 26, 6–9

Frank N. und *Tadros E. M.* (2014): Insulin dysregulation. Equine Vet. J. 46, 103–112

Freestone J. F., Beadle R., Shoemaker K., Bessin R. T., Wolfsheimer K. J. und *Church C.* (1992): Improved insulin sensitivity in hyperinsulinaemic ponies through physical conditioning and controlled feed intake. Equine Vet. J. 24, 187–190

Funk R., Wooldridge A., Stewart A., Behrend E., Kemppainen R., Zhong Q. und *Johnson A.* (2012): Seasonal changes in the combined glucose-insulin tolerance test in normal aged horses. J. Vet. Intern. Med. 26 (4), 1035–1041

Garcia M. C. und *Beech J.* (1986): Equine intravenous glucose tolerance test: glucose and insulin responses of healthy horses fed grain or hay and of horses with pituitary adenoma. Am. J. Vet. Res. 47, 570–572

Gentry L. und *Thompson D.* (2004): The relationship between body condition score and ultrasonic fat measurements in mares of high versus low body condition. J. Equine Vet. Sci. 24, 198–203

Geor R. J. (2010): Nutrition and exercise in the management of horses and ponies at high risk for laminitis. J. Equine Vet. Sci. 30 (9), 463–470

Geor R. J. und *Frank N.* (2009): Metabolic syndrome — From human organ disease to laminar failure in equids. Vet. Immunol. Immunopathol. 129, 151–154

Geor R. J. und *Harris P.* (2009): Dietary management of obesity and insulin resistance: countering risk for laminitis. Vet. Clin. N. Am. Equine Pract. 25, 51–65

German A. J. (2006): The growing problem of obesity in dogs and cats. J. Nutr. 136, 1940S–1946S

Giles S. L., Rands S. A., Nicol C. J. und *Harris P. A.* (2014): Obesity prevalence and associated risk factors in outdoor living domestic horses and ponies. PeerJ 2, e299

Gomes C. und *Ribeiro Filho J. D.* (2012): Efeitos laxativos do polietilenoglicol 3350 e de soluções eletrolíticas em equinos. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 64, 833–840

Hart K. A., Wochele D. M., Norton N. A., McFarlane D., Wooldridge A. A. und *Frank N.* (2016): Effect of age, season, body condition, and endocrine status on serum free cortisol fraction and insulin concentration in horses. J. Vet. Intern. Med. 30, 653–663

Henneke D. R., Potter G. D., Kreider J. L. und *Yeates B. F.* (1983): Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. Equine Vet. J. 15, 371–372

Hoffman R. M., Boston R. C., D. Stefanovski, D. S. Kronfeld und *P. A. Harris* (2003): Obesity and diet affect glucose dynamics and insulin sensitivity in Thoroughbred geldings. J. Anim. Sci. 81, 2333–2342

Hustace J. L., Firshman A. M. und *Mata J. E.* (2009): Pharmacokinetics and bioavailability of metformin in horses. Am. J. Vet. Res. 70, 665–668

Jansson A., Stéfansdóttir G. J. und *Ragnarsson S.* (2016): Plasma insulin concentration increases linearly with body condition in Icelandic horses. Acta. Vet. Scand. 58, 1–3

Jeffcott L. B., Field J. R., McLean J. G. und *O'Dea K.* (1986): Glucose tolerance and insulin sensitivity in ponies and Standardbred horses. Equine Vet. J. 18, 97–101

Jensen R., Danielsen S. und *Tauson A.-H.* (2015): The prevalence of obesity in mature Icelandic horses in Denmark. Acta. Vet. Scand. 57, O9

Johnson P. J. (2002): The equine metabolic syndrome. Vet. Clin. N. Am. Equine Pract. 18, 271–293

Johnson P. J., Wiedmeyer C. E., LaCarrubba A., Ganjam V. und *Messer N. T.* (2010): Laminitis and the equine metabolic syndrome. Vet. Clin. N. Am. Equine Pract. 26, 239–255

Johnson P. J., Wiedmeyer C. E., LaCarrubba A., Ganjam V. K. S. und *Messer N. T.* (2012): Diabetes, insulin resistance, and metabolic syndrome in horses. J. Diabetes Sci. Technol. 6 (3), 534–540

Kahn R. C. (1978): Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness. A necessary distinction. Metabolism 27, 1893–1902

Karikoski N. P., Horn I., McGowan T. W. und *McGowan C. M.* (2011): The prevalence of endocrinopathic laminitis among horses presented for laminitis at a first-opinion/referral equine hospital. Domest. Anim. Endocrinol. 41, 111–117

Kashyap S. R. und *DeFronzo R. A.* (2007): The insulin resistance syndrome: physiological considerations. Diab. Vasc. Dis. Res. 4, 13–19

Knowles E. J., Harris P. A., Elliott J. und *Menzies-Gow N. J.* (2016): Use of the oral sugar test in ponies when performed with or without prior fasting. Equine Vet. J., 1–6

Köller G., Bassewitz K. und *Schusser G. F.* (2016): Referenzbereiche von Insulin, insulinahnlichem Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) und adrenokortikotropem Hormon bei Ponys. Tierärztliche Praxis (G) 44, 19–25

Kronfeld D. S., Treiber K. und *Geor R. J.* (2005): Comparison of nonspecific indications and quantitative methods for the assessment of insulin resistance in horses and ponies. JAVMA 226 (5), 712–719

Kyaw-Tanner M und Pollitt CC (2004): Equine laminitis: Increased transcription of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) occurs during the developmental phase. Equine Vet. J. 36, 221-225

Lefebvre A.-M., Laville M., Vega N., Riou J. P., Gaal L. v., Auwerx J. und *Vidal H.* (1998): Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. Diabetes 47, 98–103

Lindase S., Nostell K. und *Brojer J. T.* (2016a): A modified oral sugar test for evaluation of insulin and glucose dynamics in horses. Acta. Vet. Scand. 58, 55–63

Lindase S. S., Nostell K. E., Muller C. E., Jensen-Waern M. und *Brojer J. T.* (2016b): Effects of diet-induced weight gain and turnout to pasture on insulin sensitivity in moderately insulin resistant horses. Am. J. Vet. Res. 77, 300–309

Litzke, L.-F.: "Hufrehe" In: Litzke L.-F. (Hrsg.) (2012): Der Huf. Lehrbuch des Hufbeschlages ; 19 Tabellen, 6. Aufl. Enke, Stuttgart, S.241

McGowan C. M. (2010): Endocrinopathic laminitis. Vet. Clin. N. Am. Equine Pract. 26, 233–237

McGowan C. M., Dugdale A. H., Pinchbeck G. L. und *Argo C. M.* (2013): Dietary restriction in combination with a nutraceutical supplement for the management of equine metabolic syndrome in horses. Vet. J. 196, 153–159

McIntosh B., Kronfeld D. und *Geor R. J.* (2007): Circadian and seasonal fluctuations of glucose and insulin concentrations in grazing horses. In: McIntosh B. (Ed.): Circadian and seasonal variation in pasture nonstuctural carbohydrates and the physiological response of grazing horses, 52–63

Moreaux S. J. J., Nichols J. L., Bowman J. G. und *Hatfield P. G.* (2011): Psyllium lowers blood glucose and insulin concentrations in horses. J. Equine Vet. Sci. 31, 160–165

Morgan R., Keen J. und *McGowan C.* (2015): Equine metabolic syndrome. Vet. Rec. 177, 173–179

Morgan R. A., Keen J. A. und *McGowan C. M.* (2016): Treatment of equine metabolic syndrome. A clinical case series. Equine Vet. J. 48, 422-426

Nourian A. R., Asplin K. E., McGowan C. M., Sillence M. N. und *Pollitt C. C.* (2009): Equine laminitis: Ultrastructural lesions detected in ponies following hyperinsulinaemia. Equine Vet. J. 41 (7), 671–677

O'Rourke R. W., Metcalf M. D., White A. E., Madala A., Winters B. R., Maizlin I. I., Jobe B. A., Roberts C. T., JR, Slifka M. K. und *Marks D. L.* (2009): Depot-specific differences in inflammatory mediators and a role for NK cells and IFN-gamma in inflammation in human adipose tissue. Int. J. Obes. (Lond) 33 (9), 978–990

Owers R. und *Chubbock S.* (2013): Fight the fat! Equine Vet. J. 45, 5

Pollitt C. C. (2004): Equine laminitis. Clin.Tech. Equine Pract. 3, 34–44

Powell D. M., Reedy S. E., Sessions D. R. und *Fitzgerald B. P.* (2002): Effect of shortterm exercise training on insulin sensitivity in obese and lean mares. Equine Vet. J. 34, 81–84

Pratt S. E., Geor R. J. und *McCutcheon L.* (2005): Repeatability of 2 methods for assessment of insulin sensitivity and glucose dynamics in horses. J. Vet. Intern. Med. 19, 883–888

Pratt S. E., Geor R. J. und *McCutcheon L. J.* (2006): Effects of dietary energy source and physical conditioning on insulin sensitivity and glucose tolerance in Standardbred horses. Equine Vet. J. 36, 579–584

Radin M. J., Sharkey L. C. und *Holycross B. J.* (2009): Adipokines: a review of biological and analytical principles and an update in dogs, cats, and horses. Vet. Clin. Pathol. 38, 136–156

Rendle D. I., Rutledge F., Hughes K. J., Heller J. und *Durham A. E.* (2013): Effects of metformin hydrochloride on blood glucose and insulin responses to oral dextrose in horses. Equine Vet. J. 45, 751–754

Respondek F., Myers K., Smith T. L., Wagner A. und *Geor R. J.* (2010): Dietary supplementation with short-chain fructo-oligosaccharides improves insulin sensitivity in obese horses. J. Anim. Sci. 89, 77–83

Rijnen K. E. P. M. und *van der Kolk J. H.* (2003): Determination of reference range values indicative of glucose metabolism and insulin resistance by use of glucose clamp techniques in horses and ponies. Am. J. Vet. Res. 64 (10), 1260–1264

Roberts M. C. und *Hill F. W. G.* (1973): The oral glucose tolerance test in the horse. Equine Vet. J. 5, 171–173

Sakar Y., Meddah B., Faouzi M., Cherrah Y., Bado A. und *Cucroc R.* (2010): Metformin-induced regulation of the intestinal D-glucose transporters. J. Physiol. Pharmacol. 61, 301–307

Schuver A., Frank N., Chameroy K. A. und *Elliott S. B.* (2014): Assessment of insulin and glucose dynamics by using an oral sugar test in horses. J Equine Vet. Sci. 34, 465–470

Shanik M. H., Xu Y., Skrha J., Dankner R., Zick Y. und *Roth J.* (2008): Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse? Diabetes Care 31 Suppl 2, 262-268

Smith S., Harris P. A. und *Menzies-Gow N. J.* (2016): Comparison of the in-feed glucose test and the oral sugar test. Equine Vet. J. 48, 224–227

Stephenson H. M., Green M. J. und *Freeman S. L.* (2011): Prevalence of obesity in a population of horses in the UK. Vet. Rec. 168, 131

Suagee J., Corl B. A., Wearn J., Crisman M. V., Hulver M., Geor R. J. und *McCutcheon L.* (2011): Effects of the insulin-sensitizing drug pioglitazone and lipopolysaccharide administration on insulin sensitivity in horses. J. Vet. Intern. Med. 25, 356–364

Suagee J. K., Corl B. A., Crisman M. V., Pleasant R. S., Thatcher C. D. und *Geor R. J.* (2013): Relationships between body condition score and plasma inflammatory cytokines, insulin, and lipids in a mixed population of light-breed horses. J. Vet. Intern. Med. 27, 157–163

Thatcher C., Pleasant R., Geor R. J. und *Elvinger F.* (2012): Prevalence of overconditioning in mature horses in southwest virginia during the summer. J. Vet. Intern. Med. 26, 1413–1418

Tinworth K. D., Edwards S., Harris P. A., Sillence M. N., L. Peter Hackett und *Glenys K. Noble* (2010): Pharmacokinetics of metformin after enteral administration in insulin-resistant ponies. Am. J. Vet. Res. 71 (10), 1201–1206

Tinworth K., Wynn P., Boston R. C., Harris P., Sillence M., Thevis M., Thomas A. und *Noble G.* (2011): Evaluation of commercially available assays for the measurement of equine insulin. Domest. Anim. Endocrinol. 41, 81–90

Tinworth K. D., Boston R. C., Harris P. A., Sillence M. N., Raidal S. L. und *Noble G. K.* (2012): The effect of oral metformin on insulin sensitivity in insulin-resistant ponies. Vet. J. 191, 79–84

Tóth F., Frank N., Chameroy K. A. und *Boston R. C.* (2009a): Effects of endotoxaemia and carbohydrate overload on glucose and insulin dynamics and the development of laminitis in horses. Equine Vet. J. 41 (9), 852–858

Tóth F., Frank N., Elliott S. B., Perdue K., Geor R. J. und *Boston R. C.* (2009b): Optimisation of the frequently sampled intravenous glucose tolerance test to reduce urinary glucose spilling in horses. Equine Vet. J. 41 (9), 844–851

Tóth F., Frank N., Martin-Jimenez T., Elliott S. B., Geor R. J. und *Boston R. C.* (2010): Measurement of C-peptide concentrations and responses to somatostatin, glucose infusion, and insulin resistance in horses. Equine Vet. J. 42 (2), 149–155

Treiber K., Kronfeld D. S., Hess T., Boston R. C. und *Harris P. A.* (2005): Use of proxies and reference quintiles obtained from minimal model analysis for determination of insulin sensitivity and pancreatic beta-cell responsiveness in horses. Am. J. Vet. Res. 66 (12), 2114–2121

Treiber K., Kronfeld, Hess T., Byrd B. M., Splan R. K. und *Staniar W. B.* (2006a): Evaluation of genetic and metabolic predispositions and nutritional risk factors for pasture-associated laminitis in ponies. JAVMA 228 (10), 1538–1545

Treiber K. H., Kronfeld D. S. und *Geor R. J.* (2006b): Insulin resistance in equids: Possible Role in Laminitis. J. Nutr. 136, 2094S-2098S

Ungru J., Coenen M., Vervuert I., Bluher M., Raila J. und *Boston R. C.* (2012): Effects of body weight reduction on blood adipokines and subcutaneous adipose tissue adipokine mRNA expression profiles in obese ponies. Vet. Rec. 171, 528

Ungru J., Schmengler U., Boston R. C., Coenen M. und *Vervuert I.* (2013): Effekte einer Körpergewichtsreduktion auf die Insulinsensitivität bei adipösen Ponys. Pferdeheilkunde 29 (3), 327–334

van Weyenberg S., Hesta M., Buyse J. und *Janssens G. P. J.* (2008): The effect of weight loss by energy restriction on metabolic profile and glucose tolerance in ponies. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 92, 538–545

Vervuert I., Oßwald B., Cuddeford D. und *Coenen M.* (2010): Effects of chromium yeast supplementation on postprandial glycaemic and insulinaemic responses in insulin-resistant ponies and horses. Pferdeheilkunde 26 (2), 245–250

Vick M. M. (2006): Obesity is associated with altered metabolic and reproductive activity in the mare: effects of metformin on insulin sensitivity and reproductive cyclicity. Reprod. Fertil. Dev. 18 (6), 609–617

Vick M. M., Adams A. A., Murphy B. A., Sessions D. R., Horohov D. W., Cook R. F., Shelton B. J. und *Fitzgerald B. P.* (2007): Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity in the horse. J. Anim. Sci. 85, 1144–1155

Vick M. M., Murphy B. A., Sessions D. R., Reedy S. E., Horohov D. W., Cook R. F. und *Fitzgerald B. P.* (2008): Effects of systemic inflammation on insulin sensitivity in horses and inflammatory cytokine expression in adipose tissue. Am. J. Vet. Res. 69 (1), 130–139

Völzke H., Ittermann T., Schmidt C. O., Baumeister S. E., Schipf S., Alte D., Biffar R., John U. und *Hoffmann W.* (2015): Prevalence trends in lifestyle-related risk factors. Dtsch. Arztebl. Int. 112, 185–192

Waller A., Burns T. A., Mudge M., Belknap J. und *Lacombe V.* (2011): Insulin resistance selectively alters cell-surface glucose transporters but not their total protein expression in equine skeletal muscle. J. Vet. Intern. Med. 25, 315–321

Walsh D. M., McGowan C. M., McGowan T., Lamb S. V., Schanbacher B. J. und *Place N. J.* (2009): Correlation of plasma insulin concentration with laminitis score in a field study of equine cushing's disease and equine metabolic syndrome. J. Equine Vet. Sci. 29, 87–94

Waring W. S. (2016): Antidiabetic drugs. Medicine 44, 138–140

Warnken T., Huber K. und *Feige K.* (2016): Comparison of three different methods for the quantification of equine insulin. BMC Vet. Res. 12, 196, 1-10

Wearn J. M. G., Crisman M. V., Davis J. L., Geor R. J., Hodgson D. R., Suagee J. K., Ashraf-Khorassani M. und *McCutcheon L. J.* (2011): Pharmacokinetics of pioglitazone after multiple oral dose administration in horses. J. Vet. Pharmacol. Therap. 34, 252–258

Winter J. C., Liertz S., Merle R., Aschenbach J. R. und *Gehlen H.* (2016): Orale Supplementierung von Magnesiumaspartat-hydrochlorid bei Pferden mit Equinem Metabolischen Syndrom. Pferdeheilkunde 32 (4), 372–377

Wyse C. A., K. A. McNie, V. J. Tannahil J. K. Murray und *S. Love* (2008): Prevalence of obesity in riding horses in Scotland. Vet. Rec. 162, 590–591

9 ANHANG

9.1 TABELLENVERZEICHNIS

Tab.: 1: Einteilung des Body Condition Score nach Henneke et al. (1983); Übersetzung durch Autorin ..... - 28 -
Tab. 2: Messzeitpunkte des kombinierten Glukose-Insulin-Tests (min) ... - 31 -
Tab. 3: Hämatologie der Patienten in der Voruntersuchung (n=60) ..... - 38 -
Tab. 4: Ergebnisse der klinisch chemischen Blutuntersuchung ..... - 40 -
Tab. 5: Übersicht der in den Cross-over-Versuch eingeschlossenen Patienten ..... - 43 -
Tab. 6: Körpergewicht (KGW) und Body condition score (BCS) im insgesamt sechsmonatigen Studienverlauf (n=14) ..... - 45 -
Tab. 7: Flächen unter den Glukosekurven (AUC) im ersten kombinierten Glukose-Insulin-Test (n = 14) ..... - 46 -
Tab. 8: Glukose AUCs (mmol/l x 120 min) ..... - 54 -
Tab. 9: Um den Basalglukosewert bereinigte AUCs (mmol/l x 120 min) .. - 54 -
Tab. 10: AUCs bis 60 Minuten (mmol/l x 60 min) ..... - 54 -
Tab. 11: Um den Basalglukosewert bereinigte AUCs bis 60 Minuten (mmol/l x 60 min) ..... - 55 -
Tab. 12: Cortisol (µg/dl) bei den drei CGITs im Studienverlauf zu den Zeitpunkten 0, 45 und 90 Minuten ..... - 67 -
Tab. 13: ACTH (pg/ml) bei den drei CGITs im Studienverlauf zu den Zeitpunkten 0, 45 und 90 Minuten ..... - 68 -
Tab. 14 Untersuchungsergebnisse von Patient 10 mit wiedererlangter Glukoseregulationsfähigkeit ..... - 70 -

9.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Box-Plot der Nüchtern-Insulinwerte aller 61 adipösen Pferde und Ponys mit Hufrehe- Anamnese ..... - 37 -
Abb. 2: Box-Plot der Nüchtern-Insulinwerte der 22 Pferde und Ponys mit Hyperinsulinämie > 30 µU/ml und ohne erhöhtes ACTH ..... - 37 -
Abb. 3: CGIT-Verläufe bei zwei Probanden mit zufällig gleichem initialen Blutglukose-Basalwert von 4,5 mmol/l ..... - 42 -

Abb. 4: Fläche unter der Glukosekurve bis 120 Minuten bei pathologischem CGIT (Patient 11) ..... - 47 -
Abb. 5: Fläche unter der Glukosekurve, die um den Basalglukosewert bereinigt wurde (^{b}AUC) des Patienten 11 ..... - 48 -
Abb. 6: Schematische Darstellung der AUC_{60}: Fläche unter der Glukosekurve bis 60 Minuten ..... - 49 -
Abb. 7: $^{b}AUC_{60}$: Fläche unter der Glukosekurve bis 60 Minuten und um den Basalglukosewert bereinigt ..... - 49 -
Abb. 8: Plasmainsulinkonzentrationen beim ersten CGIT (n=14) ..... - 51 -
Abb. 9: Blutglukoseverläufe während der CGITs zu Studienbeginn (1. CGIT) und nach je 3 Monaten Metformin und Placebo (jeweils n=14; Mittelwerte) ..... - 53 -
Abb. 10: Glukoseverlauf bei den drei CGITs von Patient Nr. 1 ..... - 56 -
Abb. 11: Glukoseverlauf bei den drei CGITs von Patient Nr. 2 ..... - 56 -
Abb. 12: Glukoseverlauf bei den drei CGITs von Patient Nr. 3 ..... - 57 -
Abb. 13: Glukoseverlauf bei den drei CGITs von Patient Nr. 4 ..... - 57 -
Abb. 14: Glukoseverlauf bei den drei CGITs von Patient Nr. 5 ..... - 57 -
Abb. 15: Glukoseverlauf bei den drei CGITs von Patient Nr. 6 ..... - 58 -
Abb. 16: Glukoseverlauf bei den drei CGITs von Patient Nr. 7 ..... - 58 -
Abb. 17: Glukoseverlauf bei den drei CGITs von Patient Nr. 8 ..... - 58 -
Abb. 18: Glukoseverlauf bei den drei CGITs von Patient Nr. 9 ..... - 59 -
Abb. 19: Glukoseverlauf bei den drei CGITs von Patient Nr. 10 ..... - 59 -
Abb. 20: Glukoseverlauf bei den drei CGITs von Patient Nr. 11 ..... - 59 -
Abb. 21: Glukoseverlauf bei den drei CGITs von Patient Nr. 12 ..... - 60 -
Abb. 22: Glukoseverlauf bei den drei CGITs von Patient Nr. 13 ..... - 60 -
Abb. 23: Glukoseverlauf bei den drei CGITs von Patient Nr. 14 ..... - 60 -
Abb. 24: Zeit (min) bis zum Wiedererreichen des Basalglukosewertes ..... - 61 -
Abb. 25: Plasmainsulinkonzentrationen vor den CGITs (0 Min.) ..... - 63 -
Abb. 26: Plasmainsulinkonzentrationen während der CGITs (45 Min.) ..... - 65 -
Abb. 27: Plasmainsulinkonzentration während der CGITs (90 Minuten) ..... - 66 -

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6653-6

Photo cover: © Petra Eckerl @ fotolia.de