

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Studie war es, die Existenz einer Enteroinsularen Achse bei Equiden und etwaige rassespezifische Unterschiede bezüglich ihrer Funktion zwischen Ponys und Großperden zu ermitteln. Ein besonderes Interesse galt dabei dem Glucose-abhängigen Insulinotropen Polypeptid (GIP), das beim Monogastrier einen der bisher identifizierten Hauptfaktoren der Enteroinsularen Achse darstellt und gleichzeitig über einen anabolen Effekt im Lipidmetabolismus verfügt.

Die Funktion der Enteroinsularen Achse manifestiert sich in einer Potenzierung der durch oral aufgenommene Glucose stimulierten Insulinsekretion, so daß sich signifikant höhere Plasmainsulinkonzentrationen einstellen als nach einer Glucoseinfusion, die zu vergleichbaren Glucosespiegeln führt. Neben der Insulinsekretion induziert intestinal absorbierte Glucose auch die GIP-Ausschüttung, während eine intravenöse Glucosegabe keinen solchen Effekt besitzt.

Fünf Großperden verschiedener Zuchten, ein Wallach sowie vier Stuten, und vier Shetlandponywallache wurden folgenden Versuchen unterzogen: Nach einer 12stündigen Fastenperiode wurde ein oraler Glucosetoleranztest oGTT (5,6 mmol/kg LM) durchgeführt. Das Plasma der entnommenen Blutproben wurde auf die Gehalte der Glucose, des GIP, des Insulins, der Triglyceride und der Freien Fettsäuren untersucht. Während eines zweiten Experiments erhielten die Tiere eine Infusion von 1 mmol Glucose / kg LM (intravenöser Glucosetoleranztest i.v.GTT), um die Konzentrationen der Plasmaparameter beider Versuche miteinander vergleichen zu können. Zur GIP-Analyse mußte ein heterologer Radioimmunoassay (RIA) mit Doppelantikörpertechnik erstellt werden, dessen Hauptkomponenten aus synthetischem porcinen GIP, einem entsprechenden spezifischen Antiserum vom Kaninchen sowie einem präzipitierenden Ziegenanti-Kaninchen-IgG als zweitem Antikörper bestanden. Die Nachweisgrenze des RIAs lag bei 9 pmol GIP / l. Die Präzision dieser Methode dokumentierte sich in einem Intraassayvariationskoeffizienten von 2,38 %, in einem Interassayvariationskoeffizienten von 6,17 bis 11,24 % und einer Wiederfindung zwischen 95,80 und 100,42 %. Diese Werte lagen im Rahmen vergleichbarer Verfahren.

Ponys und Großperden entwickelten während des i.v.GTTs identische Glucoseprofile, wohingegen es nach oraler Glucoseverabreichung bei den Großperden zu signifikant niedrigeren Anstiegen der Plasmaglukosekonzentrationen kam als bei den Ponys. Zwei der vier Ponys wiesen eine Glucoseintoleranz auf, die sich in einem ausbleibenden Abfall der Glucosespiegel auf die Ausgangswerte am Versuchsende widerspiegelte. Wie erwartet induzierte nur die orale Glucose-

zufuhr einen signifikanten Anstieg der Plasma-GIP-Konzentrationen, wobei sich 150 Minuten nach Versuchsbeginn ein Maximum einstellte, das dem 3fachen Ausgangswert entsprach. Statistisch abgesicherte Unterschiede zwischen den beiden Rassen konnten nach keiner der Applikationsformen entdeckt werden. Sowohl während des oGTTs als auch während des i.v.GTTs wiesen Ponys und Großpferde vergleichbare Insulinprofile auf. Nach der oralen Glucoseverabreichung kam es bei den Ponys zu einer signifikant höheren Insulinsekretion, wohingegen die Großpferde während beider Belastungstests identische Plasma-insulinspiegel zeigten. Bei zwei der Ponys wurde im Rahmen des oGTTs eine Hyperinsulinämie mit bis zu ca. 7fach höheren maximalen Insulinwerten als bei den übrigen Versuchstieren festgestellt. Auch die Plasma-GIP-Spiegel eines dieser Tiere überstiegen die Konzentrationen der anderen Probanden. Die gemittelten Insulin-Glucose-Raten aller Versuchstiere waren während des oGTTs signifikant höher als während des i.v.GTTs. Bei dem für die Ponys und Großpferde gesonderten statistischen Vergleich der Insulin-Glucose-Raten war dieser behandlungsabhängige Unterschied weniger deutlich aber immer noch präsent. Die Plasmatriglyceridkonzentrationen fielen nur bei den Großpferden und dabei nur nach oraler Glucoseapplikation signifikant ab, woraus statistisch gesichert niedrigere Triglyceridendwerte während des oGTTs resultierten. Bei den Ponies hatte keiner der durchgeführten Glucosetoleranztests einen Effekt auf die Triglyceridspiegel. Bei beiden Rassen sanken die Plasma-FFS-Spiegel während beider Belastungstests im gleichen Maße ab, verblieben jedoch während des oGTTs länger auf einem niedrigen Niveau, was sich in signifikant niedrigeren Endwerten nach der oralen Glucosegabe dokumentierte.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung rechtfertigen die Schlußfolgerung der Existenz einer Enteroinsularen Achse bei Equiden, die, gemessen an den Insulin-Glucose-Raten und den GIP-Konzentrationen, keine rassespezifischen Unterschiede zwischen den Großpferden und den Ponys zeigte. Wie erwartet bildet oral verabreichte Glucose auch bei Equiden einen potenten Stimulus für die GIP-Ausschüttung. Diese glucoseabhängige Regulation der GIP-Sekretion kann zusammen mit dem Nachweis der Existenz einer Enteroinsularen Achse als Indiz für den Insulinotropismus des GIP auch bei Equiden interpretiert werden. Im Hinblick auf das Hyperlipämiesyndrom hat diese Studie den Verdacht einiger Autoren auf eine generelle Insulinresistenz bei Ponys teilweise bestätigt, da zwei der vier Versuchsponys eine Hyperinsulinämie und eine Glucoseintoleranz zeigten. Da sich diese jedoch nur während des oGTTs manifestierten und in einem Fall von einer, im Vergleich zu den anderen Probanden höheren GIP-Ausschüttung begleitet wurden, besteht die Möglichkeit der Involvierung der Enteroinsularen Achse an der Insulinhypersekretion der Ponys.

## 7 SUMMARY

**Reinhard Dühlmeier:** Investigations on the enteroinsular axis in equines. Adaptation of a heterologous radioimmunoassay to determine the concentrations of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) in equine plasma

The aim of this study was to determine a possible existence of an enteroinsular axis in equines. In the case of such a mechanism it was of interest, whether there are functional differences between horses and ponies. In monogastrics the glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) is regarded as one of the main components of the enteroinsular axis. Furthermore it shows an anabolic effect in the metabolism of lipid.

The enteroinsular axis increases the secretion of insulin, that is stimulated by oral ingested glucose. Therefore, in the case of equal plasma glucose concentration an oral donation of glucose leads to a higher concentration of insulin in blood compared to an intravenous infusion of this monosaccharide. In addition to the secretion of insulin the intestinal absorption of glucose induces a GIP secretion whereas an intravenous glucose load has no effect.

Five horses of different breeds, one gelding and four mares, and four shetland-pony geldings were subjected to experimental procedure as follow: Animals were fasted for 12 hours. After this period of time an oral glucose tolerance test oGTT was performed (5,6 mm glucose / kg bodyweight). Bloodplasma was analyzed for concentrations of glucose, GIP, insulin, triglycerides and free fatty acids (FFA). The experiment was repeated with an intravenous infusion of 1 mmol glucose / kg bodyweight. (intravenous glucose tolerance test i.v.GTT) to compare the blood parameters of both tests. It was necessary to develop a heterologues radioimmunoassay (RIA) with doubleantibody technique for the quantification of GIP. Its main compounds were synthetic porcine GIP, a corresponding specific antiserum, raised in rabbit, and a precipitating goat-anti-rabbit-IgG as second antibody. The sensitivity of this assay was about 9 pmol GIP / litre. The precision of the RIA was revealed by an intraassay coefficient of variance of 2,58 %, an interassay coefficient of variance from 6,17 to 11,24 % and a recovery between 95,80 and 100,42 %. These data were in the range of comparable methods.

Both groups of equines, horses and ponies showed identical glucose profiles in case of the intravenous application of glucose. When administered orally, a

significant lower increase of glucose concentration in plasma was observed in the horses compared to the ponies. Two of the four ponies were defined as glucose intolerant during the oGTT, according to a missing decrease of glucose blood concentration back to the basal level. As expected only the oral administration of glucose lead to a significant increase of plasma GIP concentrations to a maximum of threefold basal level after 150 minutes in both races, whereas differences between ponies and horses could not be detected. The insulin profiles of ponies and horses were similar during oGTT and i.v.GTT. The ponies showed a higher secretion of insulin in case of the oral glucose tolerance test, whereas horses exhibited a similar secretion in both experiments, oGTT and i.v.GTT. For two of the ponies a hyperinsulinemia was determined with a maximal plasma insulin concentration up to sevenfold increased compared to the mean of all other animals in the experiment. Also the GIP level of one of these individuals was higher. The mean insulin-glucose-ratios of both groups in total were significantly higher in case of oGTT compared to i.v.GTT. When calculated for each individual group, this difference was less obvious but still significant. Only after oral application of glucose the group of horses showed a decline of concentrations of triglycerides in plasma, which resulted in a final blood concentration that was lower when compared to the i.v.GTT. In opposite to these results neither the oral nor the intravenous application of glucose to ponies had any effect on the concentration of triglycerides. In both experimental procedures and in all races the concentrations of free fatty acids in blood decreased in a similar amount. In case of oGTT the FFA remained on the low level for a longer time than during i.v.GTT.

The results of this study suggest the existence of an enteroinsular axis in equines, that shows no race specific differences according to the insulin-glucose-ratios and the levels of GIP in plasma. As expected only the oral administrations of glucose stimulates the GIP secretion in horses and ponies as was reported for other monogastrics. The glucose dependent regulation of GIP secretion in combination with the existence of an enteroinsular axis as results of this study suggest the existence of an insulinotropic effect of GIP in equines. Some authors reported a general insulin resistance as being responsible for the syndrome of hyperlipemia in ponies. The hyperinsulinemia and the glucose intolerance of two of the ponies in the experiments seem to underline this assumption. These observations only occurred in case of oGTT and were accompanied with an increased GIP level in one pony. Therefore the enteroinsular axis may play a possible role in the hypersecretion of insulin in ponies.