



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska Vetenskaper

HMGB1 – en möjlig biomarkör för sepsis

Aime Ambrosen

Uppsala

2014

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2014:38*

HMGB1 – en möjlig biomarkör för sepsis
HMGB1 – a possible cursor for sepsis

Aime Ambrosen

Handledare: Ragnvi Hagman, Institutionen för Kliniska Vetenskaper

Examinator: Helene Hamlin, Institutionen för Kliniska Vetenskaper

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2014
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska Vetenskaper
Kurskod: EX0736 KV Nivå A2E, 30hp*

*Nyckelord: HMGB1, SIRS, Sepsis, Pyometra, hund
Key words: HMGB1, SIRS, Sepsis, Pyometra, dog*

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2014:38*

SAMMANFATTNING

Pyometra är en vanlig sjukdom hos äldre, okastrerade tikar. Oftast uppträder sjukdomen i efterlöpet då tiken står under progesteronpåverkan vilket gör livmodern mer mottaglig för bakteriella infektioner. Enligt studier är *Escherichia coli* den bakterie som vanligen isoleras från livmodern. Bakterierna härstammar troligtvis från tikens normalflora eller från urinvägarna. Kliniska symptom på livmoderinflammation kan vara sänkt allmäntillstånd, variga flytningar (om cervix är öppen), polyuri, polydipsi, feber, diarré och kräkningar. Rekommenderad behandling är ovariohysterektomi men det finns också möjlighet till medicinsk behandling i kombination med antibiotika i särskilda fall.

High Mobility Group Box 1 (HMGB1) är ett protein med både en intra- och extracellulär roll. Under inflammatoriska tillstånd eller vid skada frigörs proteinet från aktiverade makrofager och monocyter som har stimulerats med endotoxin eller proinflammatoriska cytokiner. Vid studier både inom human- och veterinärmedicin har det visats att plasmakoncentrationerna av HMGB1 stiger vid sjukdomar som bl a sepsis, pankreatit, akut lungskada och chock. HMGB1 koncentrationen ökade då successivt under de första 8 – 16 timmarna efter infektion hos sepsispatienter och kvarstod på den höjda nivån under minst 36 timmar. HMGB1 utpekades sålunda som en sen mediator av sepsis. Den ökade plasmakoncentrationen har associerats med allvarlighetsgraden på sjukdomen och hur bra patienten kommer att svara på behandling.

Syftet med studien var att undersöka om HMGB1 kan användas som en prognostisk markör för sepsis (blodförgiftning). Tikar med diagnosticerad pyometra undersöktes kliniskt och bedömdes vara positiva eller negativa för systemic inflammatory response syndrome (SIRS) enligt kliniska kriterier. Även de friska tikarna undersöktes kliniskt. Blodprov togs från samtliga tikar och samtidigt sattes blododlingar från tikarna i pyometragruppen för bakterieverifiering. Tikar i pyometragruppen med konstaterad SIRS bedömdes, enligt definitionen SIRS orsakat av infektion, ha sepsis. Serumkoncentrationerna av HMGB1 hos alla sjuka och friska tikar mättes med ett sandwich ELISA kit och resultaten bearbetades sedan statistiskt. Hos en tredjedel av tikarna från pyometragruppen mättes HMGB1 koncentrationen även en dag efter operation

Koncentrationen av HMGB1 var signifikant högre hos tikar med pyometra än hos friska kontrollhundar. Dock skilde sig inte HMGB1 koncentration hos de tikar som diagnosticerats med SIRS jämfört med de tikar som var SIRS negativa. Hundar med bakteriemi hade inte heller signifikant högre HMGB1 koncentrationer än tikar vars blododling var negativ. Resultaten visade också att HMGB1 nivåerna var signifikant högre vid proverna tagna en dag efter operation jämfört med dagen innan operation. Resultaten visade att man genom att mäta HMGB1 koncentrationen inte kan urskilja hundar med sepsis. Därmed verkar användningsområdet för HMGB1 som ensam biomarkör för sepsis vara begränsat. Då HMGB1 koncentrationen hos pyometratikar var högre än hos friska kontroller visar studien dock att HMGB1 kan komma att ha ett kliniskt värde som markör för inflammation ur ett övergripande perspektiv och tillsammans med andra markörer.

SUMMARY

Pyometra is a common disease of elderly, intact bitches. The illness mainly appears in metoestrus when the uterus is progesterone-stimulated and consequently is more sensitive for bacterial infections. The bacterial species most frequently isolated from the uterine content in pyometra is *Escherichia coli* which most probably originate from the normal flora of the bitch. The clinical manifestations of canine pyometra are associated with symptoms such as lethargy, purulent vaginal discharge (if the cervix is open), polydipsia, polyuria, fever, vomiting and diarrhea. Surgical treatment - ovariohysterectomy- is the treatment of choice but there is also a possibility in some cases to use medical treatment in combination with antibiotics.

High Mobility Group Box 1 (HMGB1) is a protein with diverse cellular functions - both intracellular and extracellular. During inflammatory or injurious conditions HMGB1 can be released by activated macrophages and monocytes in response to stimulation with bacterial endotoxin or proinflammatory cytokines. It has been shown in studies both in human- and veterinary medicine that serum HMGB1 levels increase in a number of diseases such as sepsis, pancreatitis, acute lung injury and shock. In the trials HMGB1 serum concentration increased gradually for 8-16 hours and remained elevated at least 36 hours in septic patients. HMGB1 is hence indicated as a late mediator of sepsis. The increased levels are suggested to be correlated with the severity and course of the diseases and are presumed to have a predictive value for the outcome.

The purpose of the present study was to explore HMGB1 as a prognostic biomarker for dogs with sepsis (blood poisoning). Bitches with a pyometra diagnosis were clinically examined and classified as either positive or negative for systemic inflammatory response syndrome (SIRS) according to established clinical criteria. The healthy bitches were similarly clinically examined. Blood samples were collected from all dogs in the study. Blood from bitches with pyometra were subjected to culturing to confirm bacterial growth and for typing of the bacterial strains. The SIRS-positive dogs with pyometra were classified as having sepsis according to the definition of SIRS caused by infection. The serum concentrations of HMGB1 were quantified with a sandwich ELISA kit for all dogs in the study, including all bitches with pyometra and healthy controls. The HMGB1 concentrations were also measured on one third of the dogs with pyometra one day after surgical treatment. The data were analyzed statistically.

Dogs with pyometra had significantly higher concentrations of serum HMGB1 compared with healthy control bitches. However the concentrations of serum HMGB1 did not differ significantly between dogs in the pyometra group with or without SIRS. The difference in HMGB1 levels was not significant between dogs with confirmed bacteremia and those with negative blood cultures. It was also shown that serum HMGB1 levels were elevated one day after surgery. The results of this study showed that dogs with sepsis could not be detected by measuring serum concentrations of HMGB1. This indicates that HMGB1 has limited potential as a single marker for sepsis. Because the HMGB1 concentrations were elevated in bitches with pyometra compared with healthy controls HMGB1, however, may have a value as a potential screening parameter together with other markers of infection and inflammation.

INNEHÅLL

Inledning.....	1
Litteraturoversikt.....	1
Pyometra.....	1
Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) - Sepsis.....	4
Prognostiska markörer.....	6
HMGB1.....	7
Material och metoder.....	8
Etisk prövning.....	8
Deltagande tikar.....	8
SIRS-status.....	9
Blodprover och provtagningar.....	9
HMGB1 värden – ELISA.....	10
Statistik.....	10
Resultat.....	11
Kliniska parametrar, hematologiska- och biokemiska värden.....	11
HMGB1.....	12
Diskussion.....	14
Referenser.....	16

INLEDNING

Inom humanmedicinen har ökade nivåer av ett extracellulärt protein - High Mobility Group Box 1 (HMGB1) - upptäckts i samband med sjukdomar och patologiska förhållanden som artrit, sepsis, pankreatit och disseminerad intravaskulär koagulation (DIC). Syftet med denna studie var att undersöka om HMGB1 kan användas som en prognostisk markör för sepsis (blodförgiftning) där tikar med konstaterad pyometra användes som modell för naturligt uppkommen allvarlig infektion. Vi ville också undersöka om koncentrationerna av HMGB1 var förhöjda hos tikar med pyometra och med Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) jämfört med hos tikar som inte konstaterades ha SIRS samt hos friska tikar.

LITTERATURÖVERSIKT

Pyometra

Livmoderinflammation är en av tikens vanligaste sjukdomar som främst drabbar medelålders/äldre individer under metöstrus (efterlöpet). I en del raser drabbas yngre tikar mer frekvent, vilket tyder på att det finns ärftliga faktorer i sjukdomsutvecklingen. I raser som till exempel Golden retriever, Bernen sennenhund och Rottweiler kan över 50 % av tikarna drabbas innan 10 års ålder (Egenvall *et al.*, 2001).

Pyometra visar sig oftast genom purulenta flytningar p g a en varfylld livmoder. Kliniska tecken på sjukdom som till exempel polyuri, letargi, anorexi samt kräkningar förekommer också ofta. Pyometra uppstår som följd av hormonell påverkan i samverkan med bakteriell infektion i livmodern. Sjukdomen kan ha ett långdraget förlopp men även vara akut och livshotande. Även reproduktionsmässigt är det viktigt att få större kunskap om etiologi och patogenes eftersom pyometra är en komplex sjukdom och mycket fortfarande är okänt om patogenesen (Hagman, 2012).

Patogenes

Under åren har det diskuterats om de hormonella förändringar i livmodern som leder till cystisk endometriehyperplasi (CEH) och/eller mucometra (vätska i lumen) predisponerar uterus för en sekundär infektion som i sin tur kan leda till pyometra (Fransson, 2003). Cystisk endometriehyperplasi anses bero på att endometriet utsätts för upprepade förhöjda progesteronnivåer under efterlöpet vilket leder till att livmoderns muskelaktivitet minskar, leukocytinivåerna minskar, cervix sluts och sekretionen från livmoderslemhinnas körtlar ökar. Om bakterier får tillträde erbjuder livmodern en god miljö för bakterietillväxt och i förlängningen att pyometra kan utvecklas (Sandholm *et al.*, 1975). Under senare år har studier visat att de två sjukdomstillstånden CEH och pyometra bör ses som två enskilda lidanden då de skiljer sig åt med avseende på både livmodermorfologi och klinisk bild. Vidare har studier visat att sjukdomstillstånden även kan uppstå oberoende av varandra (de Bosschere *et al.*, 2001).

Tikens hormonspel under löpningen har betydelse för utvecklingen av pyometra. Under proöstrus (förlöpet) når östrogenkoncentrationerna i blodet sin högsta nivå för att sedan avta

successivt under östrus (höglöpet). Progesteronkoncentrationerna stiger under höglöpet och är höga under hela metöstrus (efterlöpet) för att åter sjunka till normala nivåer under anöstrus (viloperioden mellan löpningarna). Östrogenet har en betydande roll för utvecklingen av pyometra genom att det gör endometriet mer känsligt för påverkan av progesteron. Effekter av progesteron är att det stimulerar endometriets körteltillväxt, proliferation och sekretion samt minskar livmoderns kontraktioner. Östrogen och progesteron samverkar på så sätt till att skapa en god livsmiljö för foster hos dräktiga tikar men även för bakterier i livmodern när pyometra utvecklas (Fransson, 2003)

Den vanligaste bakterien och som har isolerats i över 70% av sjukdomsfallen från livmodern vid pyometra är *Escherichia coli* (*E. coli*) (Hagman, 2006). Studier har visat att bakterien härstammar från tikens egen normalflora i vagina. Den Gram-negativa bakterien *E.coli* har också visat sig kunna fästa till speciella receptorer i endometriet när livmodern är under progesteronpåverkan vilket troligtvis har betydelse för sjukdomsförloppet. Ofta förekommer en samtidig infektion i urinvägarna vid pyometra och även där har *E.coli* hittats i epitelet. Då bakterien har en affinitet för slemhinnan i livmodern och epitelet i urinvägar har tikens egna försvarsmekanismer svårare att eliminera dessa (Hagman & Kühn, 2002).

Endotoxin (ET) eller lipopolysackarid (LPS) är en del av Gram-negativa bakteriers yttre cellvägg. Vid celldöd eller hög bakterietillväxt frigörs endotoxiner till blodbanorna. Endotoxin kan stimulera det generella immunsystemet och därmed stärka försvaret mot mikrober men om det frigörs i större mängder kan det leda till chock och död. Endotoxin är inte toxiskt i sig självt men samverkar med makrofager, trombocyter och kärlendotel vilket resulterar i frigörelse av fria syreradikaler, cytokiner (TNF, IL-1, IL-6, IL-8), tromboxan och prostaglandiner. (Fransson, 2003; Hagman, 2006). Ett visst mått av endotoxin frigörs normalt i små mängder från det gastrointestinala systemet men det förs vidare via blodbanorna och transporteras till levern där det oskadliggörs.

Bland annat Hagman (2006) har visat att tikar med pyometra har signifikant högre nivåer av endotoxin i blodet än friska tikar. Okano *et al.* (1998) fann högre halter endotoxin hos tikar som dog i sviterna av pyometra jämfört med dem som överlevde medan andra studier har kommit fram till varierande resultat angående endotoxinnivåer i samband med pyometra. Det kan konstateras att endotoxin medverkar i patogenesen av pyometra men att endotoxinnivåernas effekter är beroende av olika (individuella) parametrar bl a immunsystemet. Än så länge saknas en stabil och klinisk användbar metod för mätning av endotoxin.

Symptom

Ett vanligt symptom vid pyometra är variga, illaluktande flytningar från vulva. Övriga typiska symptom som kan noteras är sänkt allmäntillstånd, förhöjd andnings- och hjärtfrekvens, uttorkning, polyuri, polydipsi, buksmärta, anorexi, kräkningar och diarré. Tiken kan visa en eller ett flertal symptom beroende på sjukdomens allvarlighetsgrad (Sandholm *et al.*, 1975; Fransson, 2003). En livmoderinflammation kan vara både öppen och slutna. Den slutna ses oftast som allvarligare då man oftast inte ser några flytningar eftersom livmoderhalsen är slutna och tiken kan uppvisa gravare kliniska symptom. I en studie av Hagman *et al.* (2011)

hade 85% (74 av 85) av tikarna med pyometra purulenta och/eller blodiga flytningar dvs en öppen cervix. Symptomen kan komma långsamt men förloppet kan också vara akut vilket kan göra att sjukdomen kan vara svårdiagnosticerad.

Diagnos

Tikarna drabbas oftast under metöstrus (efterlöpet) då livmodern är under progesteronpåverkan. Tiden efter löpningen (upp till 8 veckor) tillsammans med övriga symptom som t ex polyuri och kräkningar ger indikationer för vidare undersökningar och misstanke om sjukdomen. Symptomen kan dock vara ospecifika – därför bör man alltid ta med pyometra som möjlig diagnos på en okastrerad tik under perioden efter löpning (Fransson, 2003). Fortsatt utredning innebär oftast röntgen och/eller ultraljudsundersökning av livmodern. För att kunna utesluta en dräktighet är ultraljudsundersökning mer fördelaktig då man vid ultraljudsundersökning bättre kan påvisa mindre mängd vätska i livmodern samt bedöma livmoderväggens utseende och status av äggstockarna vilket är svårt vid röntgenundersökning. Foster kan dessutom ses redan från 25 dagars ålder efter parning (efter 45 dagar på röntgen, då skelettet har kalcifierats) vilket ger bättre möjligheter att utesluta dräktighet (Barton, 2005).

I undersökningen av en tik med misstänkt pyometra ingår också blodprovstagning. Vanligtvis ses en förhöjning av totala antalet vita blodceller, WBC (White blood cell counts), och neutrofila granulocyter samt en regenerativ vänsterförskjutning av neutrofila granulocyter vid differentialräkningen av vita blodceller. Anemi tillhör också ofta sjukdomsbilden och ofta är hunden dessutom dehydrerad. Ofta har sjuka tikar också förhöjda blodkoncentrationer av ALP (alkaliskt fosfatas). Hypoalbuminemi och hyperproteinemi hör också till sjukdomsbilden liksom förändrade njurfunktionsvärden (Fransson, 2003; Hagman, 2012).

Behandling

Den säkraste och mest effektiva behandlingen för pyometra är ovariohysterektomi (OHE) dvs bortoperation av tikens livmoder och äggstockar. Innan operationen behöver tikens allmäntillstånd oftast stabiliseras vilket innebär understödjande behandling bland annat i form av intravenös vätsketerapi (Hagman, 2012).

I de fall då tiken har ett gott allmäntillstånd med lindriga symptom och då ägaren vill behålla tikens fertilitet finns det i vissa fall möjlighet att behandla sjukdomen enbart medicinskt. Den medicinska behandlingen kan också användas till tikar som inte har så gott allmäntillstånd att de bedöms överleva en operation (Hagman, 2012). Idag används främst Aglepristone (Alizin vet®, Virbac, Nice, France) som är en progesteronreceptorblockerare med främsta användningsområde för induktion av abort av dräktiga tikar för medicinsk behandling. Behandling med progesteronreceptorblockerare kombineras alltid med antibiotika oralt vid pyometra. Resultatet av behandlingen är i majoriteten av fallen gott och behandlade tikar som har parats på nästa lopp har visat sig få normalstora kullar. Dock förekommer recidiv av sjukdomen i ca 20% av fallen (Gurbulak *et al.*, 2006).

Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) - Sepsis

Att diagnosticera sepsis på ett enkelt och snabbt sätt skulle kunna rädda många sjuka patienters liv både inom veterinär- och humanvården. Det är svårt att diagnosticera sepsis i ett tidigt stadium samtidigt som snabba insatser är viktiga för överlevnaden. De kliniska symptomen skiljer sig åt från fall till fall. Studier har visat att mellan 20-60% av hundar med sepsis överlever (Otto, 2007b).

Definition

SIRS kan beskrivas som ett systemiskt inflammationssvar på en ospecifik skada av infektiös eller icke infektiös orsak (Sibbald *et al.*, 1995). SIRS orsakas av en överproduktion av proinflammatoriska cytokiner men kan också bero på en obalans av pro- och antiinflammatoriska mediatorer. Förklaringen till varför SIRS manifesteras hos vissa individer anses vara att skyddande faktorer saknas i det nedärvda immunsystemet för att motverka de okontrollerade reaktionerna (Yu *et al.*, 2010).

Exempel på icke-infektiösa orsaker som kan leda till SIRS är ischemi, blödning, brännskador, trauma eller en kombination av ett flertal orsaker. Infektiösa tillstånd som t.ex. peritonit, pyometra, prostatit, prostataabscess, pyelonefrit, pneumoni, pyothorax och endokardit kan också leda till SIRS (Fransson, 2003).

Sepsis (blodförgiftning) definieras som förekomst av SIRS orsakat av en infektion (Sibbald *et al.*, 1995). Infektionen orsakas av (potentiella) patogena mikroorganismer som får fäste i kroppen på grund av att någon av kroppens barriärer (hud eller slemhinnor) har mist sin funktion (Lever & Mackenzie, 2007).

Om sepsis kompliceras av att en eller flera organ inte fungerar normalt (hypoxemi, oliguri, ändrad hjärnfunktion) benämns det som allvarlig sepsis. En septisk chock definieras av hypotension dvs om en cirkulatorisk kollaps inträffar när patienten dessutom har allvarlig sepsis (Vincent, 2008).

Patogenes

Pyometra är en sjukdom som ofta leder till SIRS. Antalet tikar med pyometra som klassificerats med SIRS (enligt Hauptman *et al.*, 1997) var över 50% i en studie av Fransson, (2003).

SIRS är ett generaliserat svar på en lokal inflammationsreaktion. Reaktionen aktiverar olika kaskadsystem som frigör endogena inflammationsmediatorer men fortsätter sedan istället som en okontrollerbar systemisk reaktion där mediatorerna i sin tur stimulerar andra mediatorer. Denna stimulering kan i sin tur fortsätta utan närvaro av det agens som startade förloppet (Purvis & Kirby, 1994).

Tikar med konstaterad pyometra utvecklar i de allra flesta fall sepsis. Pyometra orsakas av en bakteriell infektion. Vid sepsis fås ett generellt inflammatoriskt svar på molekyler från den bakterie som orsakat infektionen. I den yttre cellväggen hos Gram-negativa bakterier (t ex *E.coli*) ingår endotoxin som en komponent. Frisättningen av endotoxin ger en påverkan på

både cell- och organnivå. I svåra fall ger endotoxinet en systemisk påverkan på flera organsystem som t ex hypotension och ökad andnings- och hjärtfrekvens. Endotoxinet aktiverar bl a makrofager att producera cytokiner som IL-1, (interleukin-1) och TNF (tumor necrosis factor). Cytokinerna samspelar i sin tur med andra cytokiner och fibrinolys-, koagulations- och komplementsystem vilket leder till en aktivering av neutofila granulocyter. Neutrofilerna migrerar och adhererar till endotelet i kärlväggar i olika organ. Konsekvensen blir en ökad kärlgenomsläpplighet. Om blodkärlen blir skadade leder det till en sänkning av blodtrycket då vätskan läcker ut. Det leder också till att syretillförseln försämras till övriga organ. De aktiverade neutrofilerna släpper också ut bakteriedödande ämnen vilket spår på skadorna på blodkärlen och försvagar cirkulationen. Sepsis kan med andra ord ge en påverkan på lung- och hjärtfunktionen samt ge en ökad benägenhet för trombosbildning som ett resultat av en hämning av fibrinolysystemet. Patogenesen bakom sepsis är som synes komplex och inte helt utredd i alla delar. Sjukdomsmekanismerna är dock väl beskrivna av ett flertal författare bl a Barton (2005) och Cohen (2002).

Symptom

Kännetecknen för SIRS är bl a förändring av antalet vita blodkroppar, hjärt- och andningsfrekvens samt kroppstemperatur. Sänkt allmäntillstånd, hypotension, trombocytopeni, hypoglykemi, hypoalbuminemi och ökad kreatinin kan tillhöra symptomen. Tecken på infektion kan också finnas med i sjukdomsbilden men SIRS kan också manifesteras utan infektion (Barton, 2005).

Tecknen och symptomen på sepsis kan vara högst varierande. De beror på olika faktorer som virulens och patogenen, var infektionen börjar, individens mottaglighet och kondition. Tecken på sepsis kan t ex vara feber, kräkningar, tachypne och höjd andningsfrekvens men dessa symtom är inte specifika för sepsis vare sig enskilt eller tillsammans (Lever & Mackenzie, 2007). De vanligaste sjukdomarna hos hund som kan leda till sepsis är peritonit, pankreatit, pneumoni, pyometra och sårskador (Otto, 2007a).

Diagnostik

Kliniska kriterier som vanligen används idag för att diagnosticera SIRS hos hund har tagits fram av Hauptman *et al.* (1997). Enligt dessa kriterier måste minst två av följande parametrar vara uppfyllda för att SIRS ska föreligga: sänkt eller förhöjd kroppstemperatur ($<38,1^{\circ}\text{C}$ eller $>39,2^{\circ}\text{C}$), förhöjd hjärtfrekvens (>120 slag/min), ökad andningsfrekvens (>20 andetag/min) och ett onormalt antal WBC (<6 eller $>16 \times 10^3/\mu\text{L}$) eller mer än 3 % stavkärniga neutrofiler.

SIRS är dock beskrivet i allmänna termer och med breda marginaler för kriterierna. Allmäntillståndet hos patienterna kan skifta och därmed vara av olika allvarlighetsgrad (Otto, 2007b).

Diagnosen på sepsis ställs definitivt via en positiv blododling med stöd av klinisk undersökning och symptom. Dock är blododling ett trubbigt instrument då den saknar hög specificitet och sensitivitet, kan kontamineras och är tidskrävande (Hall, 2011).

Behandling

Omhändertagandet av patienter med sepsis beror på den bakomliggande orsaken eller problemet men följande behandlingsprinciper ligger till grund för behandling av alla sepsisfall (Vincent, 2008; Otto, 2007b):

- Att kontrollera infektionen genom att identifiera, lokalisera och bekämpa infektionen.
- Att förhindra att en okontrollerad inflammationskaskad uppstår
- Att snabbt sätta in vätskebehandling för att upprätthålla blodcirkulationen.
- Att förhindra organsvikt
- Att identifiera patienter med predisposition för att utveckla sepsis

Att diagnosticera SIRS/sepsis i ett tidigt skede samt snabbt insätta insatser är viktigt då prognosen blir sämre om SIRS/sepsis övergår i septisk chock och MODS (multiple organ dysfunction syndrome) (Otto, 2007b).

Prognostiska markörer

De tikar som har ett gott allmäntillstånd och vanligen med en öppen livmoderinflammation har en bättre prognos än de tikar som har stängd pyometra vilket ger större förutsättningar att klara operation och eftervård (Hagman, 2012).

Okano *et al.* (1998) mätte endotoxinhalten hos friska tikar och dem med god respektive dålig prognos vid pyometra. Resultaten av studien visade att endotoxinhalten var förhöjd hos tikar med dålig prognos jämfört med de övriga grupperna och drog slutsatsen att en ökad endotoxinhalt kan kopplas till en sämre prognos. Det konstaterades också att nivåerna av endotoxin var lägre hos tikar med öppen pyometra än med stängd. Vissa tikar med pyometra fick inte höga endotoxinvärden. Detta ansåg Otto (2007b) berodde på vilka bakterier som orsakade infektionen (Gram-positiva istället för de vanligare Gram-negativa) Hagman *et al.* (2006) fick vid ett liknande försöksupplägg en signifikant högre endotoxinnivå hos tikar med pyometra än friska kontroller men spridningen av värden hos individer i grupperna var stora.

Inom veterinärmedicinen används C-reaktivt protein (CRP) – ett akutfasprotein - som en markör för inflammation. CRP syntetiseras av hepatocyter när de aktiverats av proinflammatoriska cytokiner. Koncentrationen av CRP i blod ökar vid olika inflammatoriska sjukdomar och ökningen är i flertalet sjukdomar korrelerad till allvarlighetsgraden och utfallet av sjukdomen (Fransson, 2003). CRP som enda analys är dock inte ett tillräckligt specifikt svar för att avgöra prognos utan olika parametrar måste sammanvägas (Ishida *et al.*, 2011; Pierrakos & Vincent, 2010).

Postoperativa komplikationer t ex fördröjd sårhäkning och sårinfektion kan förekomma. Dabrowski *et al.* (2009) har visat att postoperativa infektioner kan förutses om fortsatta förhöjda värden på serumnivåer av CRP kan följas över tid jämfört med hos dem som avläkte utan komplikationer där CRP-nivåerna successivt sjönk.

Försök har också gjorts för att hitta andra biomarkörer för SIRS för diagnos av sepsis vid pyometra där det bl a visades att IL-7, IL-15 och IL-18 hade förhöjda koncentrationer hos pyometratikar med SIRS (Karlsson *et al.*, 2012).

HMGB1

HMGB1 är ett protein som uttrycks i kärnan och i cytoplasman i eukaryota celler och finns i celltyper som t ex monocyter, makrofager, enterocyter, dendritiska celler, endotelceller, pituicyter och "natural killer cells" (NK-celler). Proteinet har 100% likhet i aminosyrasammansättningen hos hund, människa, mus och råtta (Wang *et al.*, 2004). Strukturellt är proteinet uppbyggt av tre domäner, två homologa DNA-bindande motiv (en A och en B-box) vardera bestående av ca 80 aminosyror och en negativt laddad C-terminus. Wang *et al.* (2004) har visat att C-terminus kan binda till RAGE – (receptor for advanced glycation end products) – en medlem av superimmunoglobulinfamiljen - och orsakar på så sätt förlängd inflammationstid, organdysfunktion, tumörväxt och septikemi. Boxarna fungerar på olika sätt om de särskiljs från HMGB1. A-boxen tävlar med HMGB1 om bindningsställen och verkar som en antagonist till HMGB1 (Andersson *et al.*, 2002). De proinflammatoriska egenskaperna av HMGB1 inklusive cytokinfrisättning finns i B-boxen. B-boxen aktiverar makrofager så att TNF-alfa och andra cytokiner frigörs. Intracellulärt binder HMGB1 till DNA och ingår i uppbyggnaden av DNA:t. HMGB1 stabiliserar även nukleosomstrukturen och reglerar transkriptionen, reparation och rekombination (Bae, 2012; Klune *et al.*, 2008).

HMGB1 frigörs passivt vid cellnekros och vid cellskada. HMGB1 inducerar ett inflammationssvar och sänder en signal till omgivande immunceller om skada (Wang, *et al.*, 2004; Andersson *et al.*, 2002). Däremot så frigörs inte HMGB1 från apoptotiska celler och triggas därför inte igång ett inflammationssvar även om cellerna inte fagocyterats. HMGB1 är bundet till kromatinet i apoptotiska celler och släpps därför inte ut i den extracellulära miljön (Huang *et al.*, 2010).

Vid skada eller under ett pågående inflammatoriskt svar kan HMGB1 frigöras aktivt. Makrofager och monocyter som stimuleras av endogena proinflammatoriska cytokiner som t ex TNF (tumour necrosis factor), interferon, interleukin, eller exogent bakteriellt endotoxin (lipopolysaccarid) avger HMGB1. Försök har visat att HMGB1 frisätts från cellkärnan till cytoplasmiska organeller i LPS aktiverade monocyter och utsöndras via en vesikelmedierad sekretorisk väg (Yang *et al.*, 2002). HMGB1 har en senarelagd utsöndring *in vivo* i jämförelse med utsöndringen av proinflammatoriska cytokiner hos människa och djur (Klune *et al.*, 2008). Då koncentrationerna av nämnda cytokiner och HMGB1 inte korrelerar tidsmässigt tyder det på att dessa reaktioner inte är kopplade (van Zoelen *et al.*, 2007).

Om HMGB1 produktionen hindras t ex genom att tillsätta anti-HMGB1 antikroppar (A-box delen av HMGB1), etylpyruvat eller niktotin, minskas allvarlighetsgraden av sepsis även om åtgärden sätts in flera timmar efter att sepsis har konstaterats (van Zoelen *et al.*, 2007).

I försök där möss injicerades med lipopolysaccarid kunde halten HMGB1 detekteras först efter 8 timmar och steg därefter upp till 36 timmar efter injektion för att sedan avta (Wang *et al.*, 2004).

Inom humanmedicinen har det visats att serumnivåerna av HMGB1 är förhöjda hos patienter med sepsis, chock, blödning och i synovialvätskan vid artrit. Förhöjda HMGB1 koncentrationer har också setts hos patienter i humanvården som lider av akuta lungskador och pankreatit (Karlsson *et al.*, 2008). I forskningsstudier har det framkommit att när endotoxin administrerades till möss ökade halten HMGB1 efter ca 8 timmar och för att sedan stegvis öka upp till 16-32 timmar efter infektion. HMGB1 var förhöjt upp till 72 timmar efter att de högsta koncentrationerna hade uppmätts (Wang *et al.*, 2004).

Syftet med försöket var att undersöka om HMGB1 kunde användas i kliniskt arbete för att kunna diagnosticera fall med misstänkt sepsis. I studien ingick tikar med konstaterad pyometra som är en allvarlig infektionssjukdom som i de flesta fall leder till sepsis. Vi ville också undersöka om HMGB1 kunde ha ett värde som en inflammationsmarkör för tikar med konstaterad pyometra och SIRS. Vi mätte koncentrationen av HMGB1 och gjorde en jämförelse mellan pyometradiagnosticerade tikar med respektive utan konstaterad SIRS samt med koncentrationerna hos friska tikar.

MATERIAL OCH METODER

Etisk prövning

Studien var godkänd av Uppsalas djurförsöksetiska nämnd (C242/7) innan försöket påbörjades. Vid inskrivningen av patienterna informerades djurägarna om försöksupplägget och tillfrågades om de önskade att deras hund fick delta i studien. Djurägarna gav sitt skriftliga medgivande för deltagande på ett särskilt avsett formulär.

Deltagande tikar

Både kontrollgrupp och pyometragrupp bestod av tikar i olika åldrar och av olika raser inklusive blandraser. Kontrollgruppen (friska tikar utan tecken på livmoderpåverkan enligt information från hundägaren) rekryterades bland tikar som inkom till Universitetsdjursjukhuset, (UDS), Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU), Uppsala för blodprovsgivning eller normalkastration samt friska, intakta undervisningshundar och personhundar på UDS. En allmän klinisk undersökning inkluderande bedömning av allmäntillstånd (normal, lindrigt nedsatt, måttligt nedsatt eller mycket nedsatt) gjordes på samtliga tikar innan blodprovstagning. Parametrar för att bedöma SIRS-status (rektaltemperatur samt andnings- och hjärtfrekvens) noterades speciellt.

Två kontrollhundar exkluderades från studien efter det att en senare ultraljudsundersökning visade misstanke på hydro/mucometra.

Tikar i pyometragruppen inkom till UDS på grund av sjukdomssymptom och misstänkt pyometra vilket diagnosticerades genom klinisk undersökning, blodprover, röntgen och/eller ultraljudsundersökning. Även här låg tyngdpunkten i den kliniska undersökningen på temperatur samt hjärt- och andningsfrekvens för att kunna konfirmera/utesluta SIRS. Tikarna hade inga andra pågående sjukdomar och hade inte heller behandlats med antiinflammatoriska läkemedel inom de två sista månaderna innan de rekryterades till studien. Pyometradiagnosticerade tikar behandlades i samtliga fall med ovariohysterektomi (OHE).

Kriterierna för tikar i pyometragruppen var en kliniskt diagnosticerad pyometra enligt vedertagna rutiner på UDS, SLU, Uppsala. I studien ingick totalt 27 tikar med pyometra (pyometragrupp) och 23 friska tikar (kontrollgrupp)

SIRS-status

Alla tikar i pyometra- och kontrollgrupperna klassificerades som SIRS positiva (SIRS+) eller SIRS negativa (SIRS-) enligt definitionerna fastställda av Hauptman *et al.* (1997). Som SIRS+ klassades den tik som uppfyllde två eller flera av dessa kriterier: sänkt eller förhöjd kroppstemperatur ($<38,1^{\circ}\text{C}$ eller $>39,2^{\circ}\text{C}$), förhöjd hjärtfrekvens (>120 slag/min), ökad andningsfrekvens (>20 andetag/min) och ett onormalt antal WBC (<6 eller $>16 \times 10^3/\mu\text{L}$) eller mer än 3 % stavkärniga neutrofiler (Hauptman *et al.*, 1997).

I fallgruppen klassificerades 20 tikar av 27 som SIRS-positiva (SIRS+). Alla tikar i pyometragruppen hade diagnosticerats positiva för pyometra (se ovan) och betraktades därmed ha sepsis.

Efter operation (ovariohysterektomi) brukar normal eftervårdstid på UDS vara i 1 – 2 dagar. Bara i fall med efterföljande komplikationer eller där tikens allmäntillstånd är nedsatt leder till att tiken stannar kvar för vård i ytterligare några dagar.

Tikar med konstaterad pyometra betecknades som P+ och friska kontroller som P-.

Blodprover och provtagningar

I pyometragruppen togs blodprovet från en permanentkanyl som anlades i distala *v. cephalica* före operationen (OHE). I kontrollgruppen togs blodprovet i samband med den kliniska undersökningen. Nio tikar ur fallgruppen provtogs på samma sätt även dagen efter operation för senare analys av HMGB1. Serum från proverna tagna postoperativt analyserades samtidigt med övriga (preoperativa) prover.

Blod samlades upp aseptiskt i en spruta vid operationstillfället (6 ml) och tillsattes till anaeroba och aeroba blododlingsflaskor (BOF, Substratlab, Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA), Uppsala) för bakterieodling. Bakterieodling och antimikrobiell resistensbestämning utfördes vid enheten för bakteriologi, SVA, Uppsala

Blodrov togs i rör med tillsatt EDTA och heparin samt i rör utan tillsats (Vacutainer®, Becton-Dickinson, Stockholm, Sverige). Analyserna genomfördes av laboratoriet för klinisk

patologi, UDS, SLU. De parametrar som undersöktes var WBC inklusive differentialräkning (stavkärniga granulocyter, segmentkärniga granulocyter, eosinofiler, basofiler, lymfocyter och monocyter), ALAT, gallsyror och kreatinin. Proverna centrifugerades så att plasma och serum kunde frysas in i aliquoter vid -80°C för senare analys.

Ett bakteriologiskt prov togs från livmoderinnehållet direkt efter operationen med steril bomullssvabb (Culturette®, Becton-Dickinson, Stockholm, Sverige). Bakterieodling och resistensbestämning utfördes av enheten för bakteriologi, SVA, Uppsala.

Delar av livmoderhornen från tikarna i pyometragruppen fixerades postoperativt i formalin för senare makroskopisk och histopatologisk undersökning för verifiering av diagnosen pyometra vid laboratoriet för klinisk patologi, UDS, SLU.

HMGB1 värden – ELISA

För att mäta serumkoncentrationerna av HMGB1 hos sjuka och friska tikar användes ett sandwich ELISA kit (ST51011; IBL-International, Hamburg, Tyskland). Detta test är främst avsedd för människa men har också använts och validerats för hundplasma (Ishida *et al.*, 2011). Ett sandwich ELISA använder antikropparnas vilja att binda till specifika receptorer. Plattan som består av 96 hål fylls med en känd mängd antikroppar mot HMGB1. Provet (plasma) tillsätts och HMGB1-antigenet i plasman binder till antikroppar i brunnen. Plattan tvättas med en buffert ett flertal gånger för att ta bort obundet antigen. Sedan tillsätts ett enzymkonjugat innan plattan återigen tvättas för att avlägsna obundet antikropp – enzymkonjugat. Ytterligare en tillsats görs som får enzymet att omvandlas till ett fluorescerande ljus och kunna avläsas i en spektrofotometer. Provernas giltighet bekräftades genom jämförelse mot en kontroll – rekombinant HMGB1 från gris som medföljde kitet. Varje prov analyserades i duplikat.

Statistik

Kolmogorov-Smirnovs, D'Agostino, och Pearson omnibus, Shapiro-Wilk, tester användes för att undersöka om uppmätt data var normaldistribuerad. Statistiska analyser vid beräkning av positiva kontra negativa blododlingar samt mellan alla grupper (P+SIRS-, P+SIRS+, P-SIRS-) utfördes med hjälp av ett oparigt t-test.

Korrelationen mellan serumkoncentrationen av HMGB1 och WBC undersöktes med hjälp av Spearman's test och linjära regressionsanalyser.

Wilcoxon matched pair test användes till att jämföra serumkoncentrationen av HMGB1 före och en dag efter ovariohysterektomi hos tikar med pyometra samt vid analysen av pre- och postoperativa värden.

Nivån för signifikans sattes vid $p < 0,05$. Ett p-värde $< 0,05$ innebar enstjärnig signifikansnivå, $p < 0,01$ klassificeras som tvåstjärnig signifikansnivå och $p < 0,001$ trestjärnig signifikansnivå.

Alla analyser genomfördes med hjälp av Graph Pad Prism 4.0c.

RESULTAT

Kliniska parametrar, hematologiska- och biokemiska värden

Resultaten av kliniska parametrar (rektaltemperatur, andnings- och hjärtfrekvens) och blodprovsanalyser (WBC inklusive differentialräkning, stavkärniga granulocyter, segmentkärniga granulocyter, eosinofiler, basofiler, lymfocyter och monocyter), ALAT, gallsyror och kreatinin för samtliga tikar i studien är sammanfattade i Tabell 1.

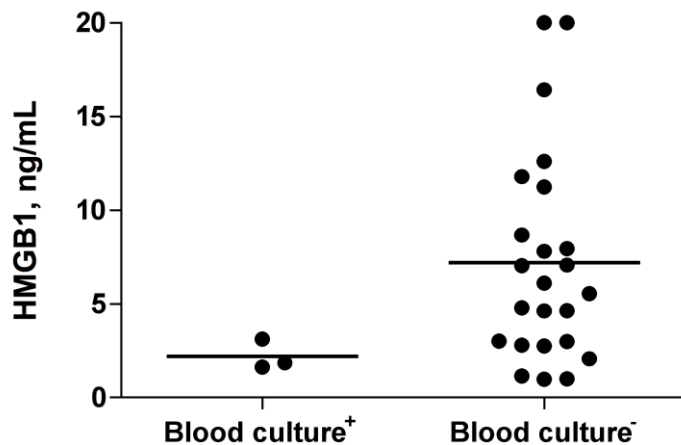
Tabell 1. Kliniska- och laboratorievärden i fall- och kontrollgrupp

Parameter	P+SIRS ⁺ (n = 20)	P+SIRS ⁻ (n = 7)	Kontroller (n = 23)
Temperatur (°C)	39.3 (38.9 – 39.7)	38.5 (38.2 – 38.9)	38.2 (38.1 – 38.3)
HR (slag/min)	100 (86.5 – 127)	100 (85 – 100)	96 (84 – 102)
RR (andetag/min)	29 (24.5 – 82.5)	16 (16 – 18)	16 (16 – 21)
WBC (celler x 10 ⁹ /L)	20.7 (18.2 – 25.6)	11.5 (10.4 – 14.2)	9.8 (8.2 – 12)
PBN (%)	26.4 (10.8 – 74.7)	16.8 (2.9 – 36.7)	0.77 (0.0 – 4.76)
Lymfocyter (celler x 10 ⁹ /L)	1.8 (1.0 - 2.6)	1.45 (0.95 – 1.75)	2.4 (1.7 – 3.3)
Monocyter (celler x 10 ⁹ /L)	2.35 (1.65 – 3.8)	0.4 (0.25 – 1.6)	0.4 (0.3 – 0.7)
Eosinofiler (celler x 10 ⁹ /L)	0.0 (0.0 – 0.65)	0.4 (0.05 – 0.6)	0.5 (0.2 – 1.4)
Basofiler (celler x 10 ⁹ /L)	0.0 (0.0 – 0.0)	0.0 (0.0 – 0.0)	0.0 (0.0 - 0.1)
ALAT (µ kat/L)	0.3 (0.2 – 0.4)	0.4 (0.3 – 1.4)	0.5 (0.4 – 0.7)
Gallsyra (g/L)	1.85 (0.65 – 3.95)	2.5 (0.8 – 2.6)	3.8 (1.8 – 5.7)
Kreatinin (µ mol/L)	62 (54.5 – 76)	53 (48 – 62)	76 (61 – 80)

P+: tikar med konstaterad pyometra, *SIRS*: Systemic inflammatory response syndrome, *Kontroller*: friska, intakta tikar. *Data visas som median (interkvartil variationsbredd)*. *HR*: hjärtfrekvens, *RR*: andningsfrekvens, *WBC*: totalantal vita blodceller, *PBN*: procent stavkärniga neutrofiler, *ALAT*: alanine aminotransferas

Proverna visade att samtliga tikar i pyometragruppen hade bakterietillväxt vid odling av livmoderinnehållet.

Tre tikar hade ett positivt svar (bakterieväxt) på utförd blododling. Alla hundar med bakteriemi (positiv bakterieväxt) tillhörde pyometragruppen, varav en med pyometra och konstaterad SIRS och två med pyometra utan konstaterad SIRS (Figur 1).

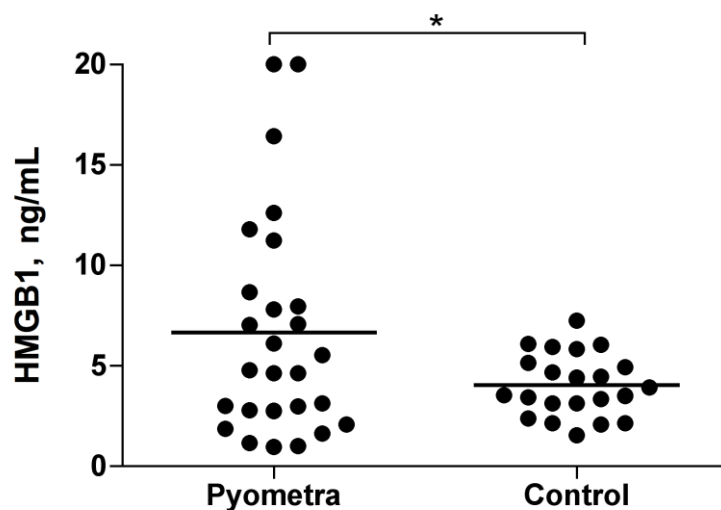


Figur 1. HMGB1 koncentration hos tikar med pyometra där blododlingen var positiv (Blood Culture +) respektive negativ (Blood Culture -) för bakterietillväxt. Linjerna visar medelvärdet av koncentrationen HMGB1 för varje grupp.

Vårdtiden på UDS, SLU efter OHE-operation är normalt 1–2 dagar. En tik som befanns SIRS-negativ och åtta SIRS-positiva hundar fick förlängd vårdtid (mellan 3–5 dagar) pga komplikationer efter operationen och/eller nedsatt allmäntillstånd. Ingen tik dog i sviterna av pyometra eller sepsis.

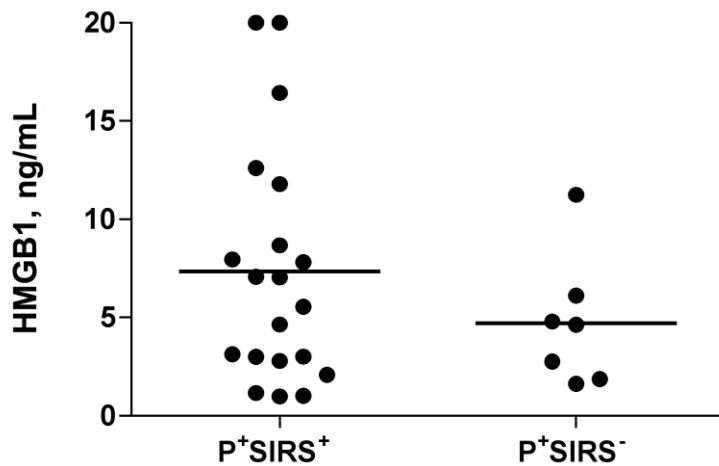
HMGB1

HMGB1 koncentrationen i serum visade sig vara signifikant högre ($p < 0,05$) hos hundar som har pyometra jämfört med friska kontrollhundar. I pyometrgruppen var medelvärdet $6,655 \pm 1,060$ ng/mL och för kontrollhundarna $4,049 \pm 0,3325$ ng/mL (Figur 2).



Figur 2. Signifikant ($p < 0,05$) högre koncentration av HMGB1 i serum från hundar med pyometra i jämförelse med friska kontroller. Linjen visar medelvärdet i varje grupp.

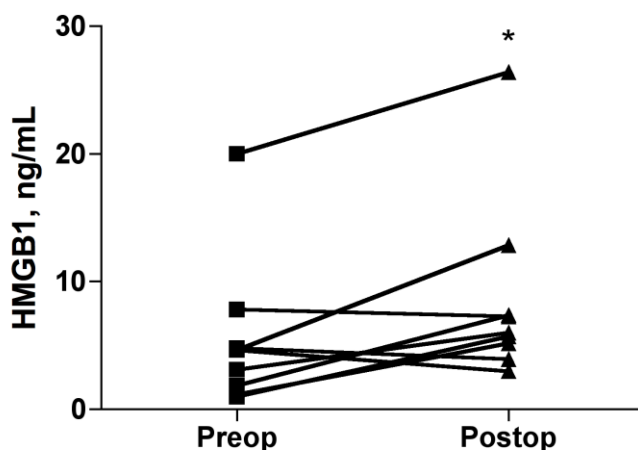
Däremot skilde sig inte koncentrationerna av HMGB1 signifikant mellan SIRS-positiva och SIRS-negativa tikar i pyometragruppen (Figur 3).



Figur 3. Koncentrationen av HMGB1 hos hundar med sepsis d v s tikar med pyometra och SIRS (P+SIRS+) i jämförelse med tikar med pyometra men utan SIRS (P+SIRS-).

Tikar med bakteriemi skilde sig inte heller signifikant åt avseende HMGB1 koncentrationerna i jämförelse med tikar med negativ blododling (Figur 1).

Sju av de nio tikar som provtogs dagen efter operation hade signifikant förhöjda koncentrationer av HMGB1 postoperativt i jämförelse med provet taget före operation (Figur 4).



Figur 4. Koncentrationen HMGB1 i serum före (Preop) och efter (Postop) ovariohysterectomi hos hundar med pyometra. Postop-provet är taget en dag efter operation hos nio tikar. Koncentrationen HMGB1 har ökat signifikant ($p < 0,05$) efter operation.

Koncentrationen av HMGB1 var signifikant korrelerad med totala antalet vita blodceller (WBC) hos hundar med pyometra. HMGB1 koncentrationen provades mot alla SIRS-kriterier och befanns endast korrelera med WBC (med en signifikans av $p = 0,0002$) men inte mot andningsfrekvens ($p=0,0598$), hjärtfrekvens ($p=0,4718$) eller rektaltemperatur ($p=0,4335$).

DISKUSSION

Inom humanmedicinen har HMGB1 påvisats i höga koncentrationer i blodet vid ett flertal sjukdomar och skador som t ex sepsis. Denna studie ville undersöka om pyometra gav ökade koncentrationer av HMGB1, om ökade nivåer av extracellulärt HMGB1 kunde associeras med allvarlighetsgraden av pyometra och om HMGB1 därmed kan vara en lämplig prognostisk markör.

Våra försök visade att serumkoncentrationerna av HMGB1 var signifikant förhöjda hos tikar med pyometra jämfört med hos friska tikar. Resultatet indikerar att det finns en potentiell roll för HMGB1 som prognostisk markör för livmoderinflammation. I tidigare studier har van Zoelen *et al.* (2007) visat att HMGB1 fungerar som markör för primära och sekundära infektioner hos människa.

Resultaten kunde dock inte påvisa någon signifikant skillnad i koncentrationerna av HMGB1 mellan SIRS-positiva (sepsis) och SIRS-negativa (ej sepsis) tikar med pyometra. Detta tyder på att användningen av HMGB1 verkar vara begränsad som markör för sepsis då det inte går att bedöma sjukdomens svårighetsgrad med mätning av koncentrationen av HMGB1. Däremot kan HMGB1 ha ett kliniskt värde som markör för inflammation generellt om man inte efterfrågar omfattningen av inflammationen.

I motsats till dessa resultat fann Ishida *et al.* (2011) signifikanta skillnader mellan plasmakoncentrationer av HMGB1 hos hundar med olika inflammationssjukdomar med SIRS och utan SIRS. Men, inga signifikanta skillnader sågs mellan hundar som hade värden överstigande referensområdena hos SIRS-positiva och SIRS-negativa hundar vilket enligt Ishida *et al.* (2011) indikerar att värdet av HMGB1 som diagnostisk markör är begränsat. Yu *et al.* (2010) undersökte HMGB1 i plasma hos hundar med SIRS för att prova om det fanns möjlighet att förutsäga dödlighet inom gruppen. Det framkom att höga HMGB1 koncentrationer var associerade med sämre prognos oavsett etiologi.

Karlsson *et al.* (2008) hade i sina försök inom humanmedicinen sett att HMGB1 koncentrationen steg något hos patienter med allvarlig sepsis i jämförelse med friska kontroller. De konstaterade dock i följdstudier att mätning av HMGB1 koncentrationen inte var av betydelse för att kunna förutsäga utgången av sjukdomen (överlevande eller ej) eller om patienten skulle drabbas av organsvikt.

Förutsättningarna för att använda HMGB1 som ensam biomarkör för sepsis ser ut att vara begränsade särskilt om ett enskilt prov tas vid ett enda tillfälle. Sepsis har vitt skilda etiologier och inflammationssvaret varierar över tid. Kinetiken hos HMGB1 beror på orsaken till infektionen och proteinet kan också frigöras från olika organ beroende på var infektionen har sitt ursprung.

I jämförelse mellan tikar med påvisbar bakteriemi och tikar med negativ blododling skilde sig HMGB1 nivåerna inte signifikant åt mellan grupperna. En negativ blododling kan bero på att det endast finns ett litet antal bakterier per volymenhet blod och då särskilt om bakterietillväxten ännu inte har kommit igång. Andra felkällor är kontamination och att patienten redan i ett tidigare skede har behandlats med antibiotika. Att odla blod tar ett dygn och ofta fordras snabba beslut vid insatser vid sepsis – därför sätts behandling i de allra flesta fall in innan resultatet från odlingen finns tillgänglig. Hall *et al.* (2011) visade i sin studie att vid 80% av sepsisfallen hittades ingen patogen som orsakade sjukdomen. Trots detta är nuvarande bästa standard för sepsis en blododlingsbaserad diagnos i kombination med kliniska fynd.

Resultaten av denna studie visade att koncentrationen av HMGB1 hade stigit signifikant i prov taget en dag efter operation jämfört med prov tagna före operation hos tikar med pyometra. Liknande resultat sågs också i försök gjorda av Ishida *et al.* (2011) som fann att HMGB1 koncentrationen nådde sitt högsta värde 72 timmar efter operation hos hundar diagnostiserade med SIRS. En del av förklaringen kan finnas i att operationen i sig själv orsakar en inflammation som ger utslag i en HMGB1 stegring. Studier inom humanmedicinen har visat att den höjning i HMGB1 koncentrationen som ses under de första 12 timmarna efter operation härstammar från skadade celler eller från en redan existerande pool av immunceller. Stegningen efter 12 timmar orsakas istället av immunceller som aktivt syntetiserar HMGB1. I ett försök av Wang *et al.* (2004) där LPS administrerades på hund som modell för endotoxemi var serumkoncentrationerna av HMGB1 som högst efter 16-32 timmar efter tillförsel, vilket är senare än maxkoncentrationen uppnås för flertalet cytokiner.

Vid undersökningar om HMGB1 koncentrationen kunde relateras till någon av SIRS-kriterierna fann vi att HMGB1 och WBC var korrelerade. Mätning av WBC sker rutinmässigt på kliniker för att upptäcka förhöjda WBC värden som indikerar en pågående inflammatorisk process. Troligtvis visar förhöjda HMGB1 koncentrationer på liknande inflammatoriska tillstånd som WBC och det bör undersökas om provtagning av HMGB1 tillför någon ny information utöver analys av WBC.

Efter att ha undersökt HMGB1 koncentrationerna hos tikar med pyometra och friska tikar kunde det konstateras att det fanns en signifikant skillnad mellan dessa grupper. Skillnaden indikerar att HMGB1 kan vara en möjlig markör för livmoderinflammation. Dock behövs ytterligare studier för att klargöra HMGB1 eventuella framtida användbarhet som markör för förekomsten av infektion och inflammation.

REFERENSER

- Andersson, U., Erlandsson-Harris, H., Yang, H., Tracey, K.J. (2002). HMGB1 as a DNA-binding cytokine. *Journal of Leukocyte Biology* 72:1084-1091.
- Bae, J.S. (2012). Role of High Mobility Group Box 1 in inflammatory disease: focus on sepsis. *Archives of Pharmacal Research* 35:9 1511-1523.
- Barton, L. (2005). Sepsis and the Systemic Inflammatory Response Syndrome. I; Ettinger, S.J. and Feldman, E.C. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 6th edition. St. Louis, Saunders, pp. 452-454-
- Cohen, J. (2002). The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420: 885-891.
- Dabrowski, R., Kostro, K., Lisiecka, U., Szczubial, M., Krakowski, L. (2009). Usefulness of C-reactive protein, serum amyloid A component, and haptoglobin determinations in bitches with pyometra for monitoring early post-ovariohysterectomy complications. *Theriogenology* 72: 471-476.
- De Bosschere, H., Ducatelle, R., Vermeirsch, H., van Den Broeck, W., Coryn, M. (2001). Cystic endometrial hyperplasia – pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected? *Theriogenology* 55:1509-1519.
- Egenvall, A., Hagman, R., Bonnett B.N., Hedhammar, Å., Olson, P., Lagerstedt, A-S. (2001). Breed risk of pyometra in insured dogs in Sweden. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 15:530-538.
- Fransson, B.A. (2003). Systemic inflammatory response in canine pyometra. *Doctoral thesis Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Veterinaria* 161, pp 48.
- Gibot, S., Massin, F., Cravoisy, A., Barraud, D., Nace, L., Levy, B., Bollaert, P-E. (2007). High-mobility group box 1 protein plasma concentrations during septic shock. *Intensive Care Medicine* 33:1347-1353.
- Gurbulak, K., Pancarci, S. M., Ekici, H., Konuk, C., Kirsan, I., Ucmak, M., Toydemir, S. (2005).. Use of aglepristone and aglepristone + intrauterine antibiotic for the treatment of pyometra in bitches. *Acta Veterinaria Hungarica* 53(2):249-255.
- Hagman, R., Kühn, I. (2002). *Escherichia coli* strains isolated from the uterus and urinary bladder of bitches suffering from pyometra: comparison by restriction enzyme digestion and pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology* 84 143-153.
- Hagman, R., Lagerstedt, A-S., Hedhammar, Å., Egenvall, A. (2011). A breed-matched case-control study of potential risk-factors for canine pyometra. *Theriogenology* 75 1251-1257.
- Hagman, R. (2012). Clinical and molecular characteristics of pyometra in female dogs. *Reproduction in Domestic Animals* 47 (Suppl. 6) 323-325.
- Hagman, R., Kindahl, H., Lagerstedt, A-S. (2006). Pyometra in bitches induces elevated plasma endotoxin and prostaglandin F2alpha metabolite levels. *Acta Veterinaria Scandinavica* 47:55-67.
- Hall, T.C., Bilku, D.K., Al-Leswas, D., Horst, C., Dennison, A.R. (2011). Biomarkers for the differentiation of sepsis and SIRS: the need for the standardization of diagnostic studies. *Irish Journal of Medical Science* 180:793-798.
- Hauptman, J.G., Walshaw, R., Olivier, N.B. (1997). Evaluation of the sensitivity and specificity of diagnostic criteria for sepsis in dogs. *Veterinary Surgery* 26:393-397.

- Huang, W., Tang, Y., Li, L. (2010). HMGB1, a potent proinflammatory cytokine in sepsis. *Cytokine* 51:119-126.
- Ishida, A., Ohno, K., Fukushima, K., Nakashima, K., Takahashi, M., Goto-Koshino, Y., Fujino, Y., Tsujimoto, H. (2011). Plasma High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) in dogs with various diseases; comparison with C-Reactive Protein. *Journal of Veterinary Medical Science* 73(9), 1127-1132.
- Karlsson, I., Hagman, R., Johannisson, A., Wang, L., Wernersson, S. (2012). Cytokines as immunological markers for systemic inflammation in dogs with pyometra. *Reproduction in Domestic Animals* 47(Suppl.6): 337-341.
- Karlsson, S., Pettilä, V., Tenhunen, J., Laru-Sompa, R., Hynninen, M., Ruokonen, E. (2008).. HMGB1 as a predictor of organ dysfunction and outcome in patients with severe sepsis. *Intensive Care Medicine* 34:1046-1053.
- Klune, J.R., Dhupar, R., Cardinal, J., Billiar, T.R., Tsung, A. (2008). HMGB1: Endogenous danger signaling. *Molecular Medicine* 14(7-8), 476-484.
- Lever, A., Mackenzie, I. (2007). Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. *BMJ* 335:879-883.
- Okano, S., Tagawa, M., Takase, K. (1998). Relationship of the blood endotoxin concentration and prognosis in dogs with pyometra. *Journal of Medical Science* 60(11):1265-1267.
- Otto, C.M. (2007a). Clinical trials in spontaneous disease in dogs: a new paradigm for investigation of sepsis *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 17(4), 359-367.
- Otto, C.M. (2007b). Sepsis in veterinary patients: what do we know and where can we go? *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 17(4), 329-332.
- Pierrakos, C., Vincent, J-L. (2010). Sepsis biomarkers: a review. *Critical Care* 14:R15.
- Purvis, D., Kirby, R. (1994). Systemic inflammatory response syndrome, septic shock. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 24, 1225-1247.
- Sandholm, M., Vasenius, H., Kivistö, AK. (1975). Pathogenesis of canine pyometra . *Journal of the American Veterinary Medical Association* 167 1006-1010.
- Sibbald, W.J., Doig, G., Inman, K.J. (1995). Sepsis, SIRS and infection. *Intensive Care Medicine* 21:299-301.
- Vincent, J-L. (2008). Clinical sepsis and septic shock – definition, diagnosis and management principles. *Langenbeck's Archives of Surgery* 393:817-824.
- Wang, H., Yang, H., Tracey, K.J. (2004). Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *Journal of Internal Medicine* 255:320-331.
- Yang, H., Wang, H., Czura, C.J., Tracey, K.J. (2002). HMGB1 as a cytokine and therapeutic target. *Journal of Endotoxin Research* 8:6 469-472.
- Yu, D.H., Nho, D.H., Song, R.H., Kim, S.H., Lee, M.J., Nemzek, J.A., Park, J. (2010). High-mobility group box 1 as a surrogate prognostic marker in dogs with systemic inflammatory response syndrome. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 20(3) 298-304.
- van Zoelen, M.A.D., Laterre, P-F., van Veen, S.Q., van Till, J.W.O., Wittebole, X., Breeser, P., Tanck, M.W., Dugernier, T., Ishizaka, A., Boermeester, M.A., van der Poll, T. (2007). Systemic and local high mobility group box 1 concentrations during severe infection. *Critical Care Medicine* Vol 35, No 12 2799-2804.