



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska vetenskaper

Cardiac troponin I- och EKG- förändringar vid experimentell endotoxinemi på häst

Ditte Johnsen

Uppsala

2010

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:69*

Cardiac troponin I- och EKG förändringar vid experimentell endotoxinemi på häst

Ditte Johnsen

Handledare: Katarina Nostell, Institutionen för Kliniska vetenskaper

Examinator: Bernt Jones, Institutionen för Kliniska Vetenskaper

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2010
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska vetenskaper
Kurskod: EX0239, Nivå X, 30hp*

Nyckelord: Cardiac troponin I, cTnI, endotoxinemi, EKG

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:69*

SUMMARY

The purpose of this study was to investigate if experimentally induced endotoxemia causes elevations in plasma cardiac troponin I (cTnI) concentrations in horses and to establish if there exists an association between cTnI levels and arrhythmias on ECG. Eight healthy Standardbred trotters received a 6 hour intravenous continuous rate infusion of endotoxin (total dose 500 ng/kg) under ECG registration. Blood samples for analysis of cTnI using an ultrasensitive assay, were collected before the start of the endotoxin infusion, every 60 minutes during the infusion, and 1, 2, 3, 6, 10 and 24 hours post infusion. One horse was excluded from the study as it had a high initial cTnI concentration. In all horses cTnI concentrations increased during the infusion and were significantly elevated compared to resting concentrations between 4 hours of infusion until 3 hours post- infusion. The prevalence of ventricular extrasystoles was generally low during the infusion period but increased during the first three hours post infusion in six of the seven horses. There was no connection between cTnI levels and the presens of atrial premature beats.

In conclusion this study shows that a continuous infusion with endotoxins causes elevations in cTnI concentrations in horses, indicating myocardial injury. The increased number of ventricular extrasystoles supports the presence of myocardial injury during the post infusion period. There seems to be a delay between elevated cTnI levels and clinically manifested impact on the heart. By analysing cTnI in horses with suspected endotoxemia one could improve the ability to detect horses at risk of developing serious arrhythmias at an early stage of endotoxemia.

SAMMANFATTNING

Syftet med denna studie var att undersöka om en experimentellt inducerad endotoxinemi orsakar stegringar i plasmakoncentrationen av cardiac troponin I (cTnI) samt om det finns ett samband mellan koncentrationen av cTnI och frekvensen arytmier registrerade på EKG. Åtta friska varmblodstravare fick en kontinuerlig intravenös infusion av endotoxiner (total dos 500 ng/kg) samtidigt som EKG registrerades. Blodprover togs varje timme under infusionen samt 1, 2, 3, 6, 10 och 24 timmar efter infusionens slut och analyserades avseende koncentrationen av cTnI med hjälp av en hyperkänslig analysmetod. En häst exkluderades från försöket då denna uppvisade en förhöjd initial koncentration av cTnI. Samtliga sju hästar uppvisade signifikanta stegringar i koncentrationen av cTnI som nådde sitt högsta medelvärde ($0.135 \pm 0.094 \mu\text{g/L}$) en timme efter infusionens slut. Plasmanivåerna av cTnI sjönk sedan successivt och var inte signifikant skilda från initialnivåerna vid 6, 10 och 24 timmar efter infusionens slut. Frekvensen ventrikulärt utlösta extraslag var generellt låg under infusionsperioden men antalet ökade markant under de första tre timmarna efter infusionens slut hos sex av sju hästar. Inget tydligt samband mellan koncentrationen av cTnI och atriellt utlösta extraslag kunde påvisas.

Resultaten från denna studie tyder på att hästar med experimentellt orsakad endotoxinemi får en stegring i koncentrationen av cTnI, tydande på en hjärtmuskelskada. Det finns även en tidsförskjutning mellan stegring av cTnI och uppkomsten av ventrikulärt utlösta arytmier. Genom att analysera förändringar av cTnI tidigt i ett förlopp med misstänkt endotoxinemi skulle man i framtiden kunna öka chanserna för att upptäcka patienter med risk för att utveckla allvarligare

rytmrubbningar.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

1. INTRODUKTION	1
1.1 Endotoxiner.....	2
1.2 Troponiner.....	2
1.2.1 Analysmetoder för troponin I.....	3
1.3 EKG förändringar vid endotoxinemi.....	4
2. MÅL	5
3. MATERIAL OCH METODER	6
3.1 Material.....	6
4. RESULTAT	8
4.1 Troponin I.....	8
4.2 Förändringar i hjärtfrekvens.....	8
5. DISKUSSION	10
6. LITTERATURFÖRTECKNING	13
7. TACK	15

1. INTRODUKTION

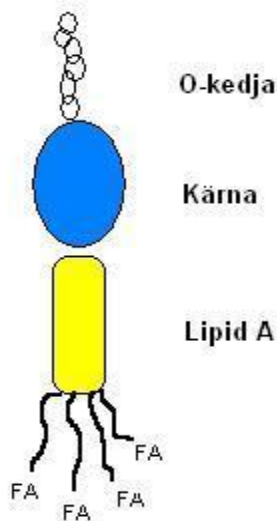
Endotoxinemi, det vill säga förekomsten av endotoxiner i blodet, har stor betydelse vid ett flertal olika sjukdomstillstånd hos både häst och människa och är förknippat med hög mortalitet (Marshall et al, 2004). Endotoxiner finns i cellväggen hos gram-negativa bakterier och frisätts i stora mängder när dessa dör. Hos häst förknippas endotoxinemi framförallt med gastrointestinala sjukdomar där endotoxiner läcker ut från tarmen till blodbanan. I en studie av kolikhästar fann man att 45-50% av dessa hade endotoxiner i blodet (King et al, 1988). Endotoxinemi förekommer också vid flera andra sjukdomstillstånd hos häst såsom vid svåra bakteriella infektioner (peritoniter, pleuriter och pneumonier) och hos föl med sepsis. I samband med sepsis och endotoxinemi får man ofta en kardiovaskulär påverkan i form av hypotension och ett minskat cardiac output. På människa har man sett att sepsis-patienter med kardiovaskulär påverkan har en högre dödlighet jämfört med sepsis-patienter utan kardiovaskulär påverkan (Parker et al, 1990).

Cardiac troponin I (cTnI) är ett hjärtspecifikt enzym som idag används som biomarkör för hjärtmuskelskada, främst på människa men även på andra djurslag (Favory et al, 2006). På humansidan används cTnI främst för att upptäcka ischemiska skador på hjärtat såsom hjärtinfarkter och myokarditer och en stegring ses ofta inom sex timmar efter hjärtmuskelskadans uppkomst (Ammann et al, 2001). Det finns även ett flertal studier som visar att cTnI ökar i samband med sepsis och endotoxinemi på människa (Thiru et al, 2000). Detta antas bero på indirekta ischemiska skador på hjärtmuskelcellerna men även direkta skador till följd av endotoxinerna och det inflammatoriska svaret de framkallar (Favory et al 2006). På häst finns rapporter om förhöjda cTnI koncentrationer hos föl med sepsis samt hästar med kolik (Slack et al, 2005; Diaz et al, 2009). Vetenskapliga studier om huruvida endotoxiner påverkar cTnI-värden på vuxna hästar saknas dock.

EKG-förändringar hos humanpatienter med sepsis är i liten grad beskrivet i litteraturen. Det finns dock beskrivet att tillstånd som ger upphov till endotoxinemi på häst kan framkalla hjärtarytmier och förändringar på EKG (Moore et al, 1992).

1.1 Endotoxiner

Endotoxiner är värmestabila lipopolysaccharider som är viktiga strukturella enheter i det yttre cellmembranet hos gram-negativa bakterier, till exempel *E.coli*. Lipopolysackariderna består av tre komponenter; O-kedjan, polysackaridkärnan och Lipid A-segmentet (se figur 1). O-kedjan består av en kedja av oligosackarider och skiljer sig strukturellt mellan olika serotyper av bakterier. Polysackaridkärnan innehåller KDO (3-deoxy-D-manno-oct-2-ulopyranosonic acid), ett socker som binder kärnan med Lipid A. Lipid A-delen anses vara den toxiska delen på lipopolysackaridmolekylen och är den delen som förankrar molekylen till det yttre cellmembranet på bakterien genom interaktion med cellmembranets fosfolipider (Kleinschmidt 2003).



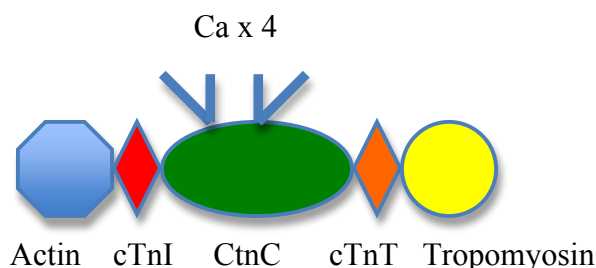
Figur 1. Struktur för lipopolysackarid, LPS.

Vid sjukdomstillstånd såsom kolik, peritonit, pleurit och penumoni kan gramnegativa bakterier läcka ut i blodbanan då slemhinna och kärlväggar skadas (Reed et al, 2004). Bakterierna kan i sin tur släppa ifrån sig endotoxiner som biprodukter, framförallt vid en snabb tillväxt av bakterier. Vid endotoxemi svarar kroppen genom att framkalla ett starkt inflammatoriskt svar som kallas severe inflammatory response syndrome (SIRS), vilket i sin tur kan leda till att de inre organen kollapsar; multiple organ dysfunction syndrome (MODS). Endotoxiner anses skada kroppens vävnader genom en direkt toxisk påverkan på cellerna men även indirekt genom att det starka inflammatoriska svaret skadar kroppens egna celler. Även cellerna i kärlväggar skadas och detta kan leda till att vätska diffunderar ut från blodbanan och blodtrycket sjunker. Sänkt blodtryck kan i sin tur leda till hypoperfusion med ischemi som följd och anses därmed vara ytterligare en indirekt faktor till varför endotoxiner kan skada kroppens vävnader, till exempel hjärtmuskulaturen.

1.2 Troponiner

Troponiner är enzymkomplex som reglerar kontraktioner av muskelfibriller genom att

kontrollera interaktionen mellan proteinerna actin och myosin. Troponinkomplexen består av tre enheter; troponin T (TnT) som binder till tropomyosin och underlättar kontraktionen; troponin I (TnI) som binder till actin och hämmar kopplingen mellan actin och myosin och troponin C (TnC) som binder calciumjoner (se figur 2). I både skelett- och hjärtmuskelceller finns troponinkomplex bestående av troponin C, T och I.



Figur 2. Schematisk struktur för troponinkomplexet och dess interaktion med actin och tropomyosin.

Funktionen av troponiner i hjärt- och skelettmuskelceller är densamma men cTnI i hjärtmuskelcellen har en strukturellt annorlunda form än TnI för skelettmuskelcellen vilket gör att cTnI är specifikt för hjärtat. TnC har samma struktur oberoende av om den härstammar från skelett eller hjärtmuskulatur och är därmed inte någon bra markör för skador på hjärtmuskulaturen.

Vid sepsis och endotoxinemi stimuleras neutrofiler, makrofager och endotel att producera cytokiner såsom tumor necrosis factor alfa (TNF α), interleukin-1(IL-1) och interleukin-6 (IL-6) samt fria radikaler (van Bockel et al, 2003). Dessa anses ge upphov till skador på cellmembran på bland annat hjärtmuskelceller (Favory et al, 2006). Endotoxinerna tros även ge direkta skador på kärlbädden samt ge upphov till ischemi vilket indirekt bidrar till skador på hjärtmuskelcellerna. Vid en skada på hjärtmuskelcellerna läcker cTnI ut i blodbanan.

Den största delen av cTnI är bundet till myofilamenten och endast en liten del, cirka 2,8 % av den totala mängden, finns fritt i cytoplasman i hjärtmuskelcellen (den så kallade cytoplasmafraktionen). Cytoplasmafraktionen når blodbanan först vid en hjärtmuskelskada. Resultat från forskning på humansidan visar att det verkar finnas en korrelation mellan mängden cTnI som läckt ut i blodet och risken för hjärtarytmier (Rajan et al, 2004).

1.2.1 Analyismetoder för troponin I

De prover för cTnI som idag tas på Universitetsdjursjukhuset analyseras via en tvåstegsanalysmetod (Architect I 2000) på Avdelningen för klinisk kemi på Akademiska sjukhuset i Uppsala. Denna analysmetod har en lägsta detektionsnivå på 0,022 $\mu\text{g/L}$ och friska hästar ligger normalt under detektionsgränsen för denna metod. Det finns olika nya hyperkänsliga analysmetoder med lägsta detektionsgräns på 0.001 $\mu\text{g/L}$. En av dessa är Access AccutnI assay som framställts av företaget Beckman Coulter. CV-värdet (coefficient of variation), det vill säga hur mycket variation som kan påvisas mellan två analyser av samma prov är mindre än 10% för denna metod för humana prover (Venge et al, 2009).

På häst finns ännu inga normalvärden för friska individer registrerade för de nya hyperkänsliga analysmetoderna.

1.3 EKG förändringar vid endotoxinemi

EKG-förändringar hos patienter med sepsis är i liten grad beskrivet i litteraturen. Förändringar förknippade med septiskt chock hos människor kan innefatta QRS-komplex med lägre amplitud, förlängda QT- intervall, skänkelblock, förkortade QRS-intervall med deformerade och positiva J-punkter (Martinez et al, 2009). EKG är en relativt okänslig metod för att upptäcka hjärtmuskelskador då man sett att hjärtarytmier inte behöver förekomma trots att man har en manifest hjärtmuskelskada (Pellander et al. 2010). I läroböcker står beskrivet att hästar med sepsis/endotoxinemi kan utveckla extraslag och att detta troligen är till följd av en myokardit (Reed et al, 2004). Vid myokarditer kan så kallade ektopiska loki bildas i antingen kammaren eller förmaket vilka kan utlösa extraslag.

Inga vetenskapliga studier rörande EKG- förändringar på hästar med sepsis och- eller endotoxinemi har ännu publicerats. Ett abstract från en prospektiv fallstudie har dock visat att hästar med kolik i många fall får förhöjda nivåer av cTnI samt att höga cTnI-värden är korrelerade till kammararytmier (Diaz e al, 2009). Vidare är allvarliga koliker hos hästar ofta associerat med endotoxinemi (Reed et al, 2004).

2. MÅL

Målet med studien var att studera om hästar med experimentellt inducerad endotoxinemi får förhöjda koncentrationer av cTnI i plasma och dessa i så fall var associerade med eventuella arytmier på EKG genom att:

- Studera förloppet av eventuella förändringar i cTnI över tid.
- Studera eventuell utveckling av extraslag till följd av endotoxinerna och om dessa i så fall var atriellt eller ventrikulärt utlösta.
- Om förändringar i cTnI var associerade med risken för extraslag.

3. MATERIAL OCH METODER

3.1 Material

I försöket användes åtta varmblodiga travare, fem ston och tre valacker i åldern tre till nio år. Samtliga hästar ägdes av Institutionen för kliniska vetenskaper, Sveriges Lantbruksuniversitet. Hästarna stod på halm och vistades dagligen i hage. Hästarna utfodrades med enbart hö och färskt vatten. Ingen av de hästar som ingick i studien uppvisade några sjukdomstecken vid en rutinmässig klinisk undersökning (kontroll av hjärt- och andningsfrekvens/rytm, temperatur, tarmmotorik, perifer puls, färg på- och kapillär återfyllnad av slemhinnor, lymfknotor). Samtliga hästar var utan anmärkning vid endoskopi och blodprov med avseende på hematologi fem dagar innan försökets start.

3.2 Metod

Försöket var en prospektiv experimentell studie där hästarna infunderades med endotoxiner under sex timmar. På försöksdagen lades två permanentkanyler i vardera jugularven, en för infusionen av endotoxiner¹ och en för blodprovsdragning². Ett trådlöst EKG applicerades med hjälp av klisterelektroder på hästens bröstorg och mage och kopplades till en dator som sedan kunde lagra informationen. Hästen ställdes sedan in i sin box i minst 30 minuter för vila och utfodring. Därefter gavs en kontinuerlig infusion av *E.coli* endotoxin 055:B55³ (84ng/kg/timme, total dos 500ng/kg kroppsvikt utspätt i 1000 ml koksalt⁴) under sex timmar med hjälp av en infusionspump. Blodprov⁵ togs vid infusionens början (noll-prov), därefter varje timme under den sex timmar långa infusionen samt 1,2,3,6,10 och 24 timmar efter infusionens slut. Samtliga blodprov centrifugerades omedelbart efter provtagning och plasma separerades och frystes ned till -80°C.

Hästarnas allmäntillstånd samt hjärtfrekvens och kroppstemperatur registrerades före infusionens början, var 60 minut under infusionen samt vid 1,2,3, 6, 10 och 24 timmar. Av djurskyddsskäl kontrollerades status regelbundet under de första 72 timmarna efter infusionens slut.

Hjärtfrekvens och rytm registrerades kontinuerligt med ett trådlöst EKG under infusionen samt tre timmar efter infusionens slut. Data från EKG:t lagrades till dataprogrammet Televet 100⁶.

¹ Intranule, 2,0 x 105 mm. Vygon, Ecouen, France

² Milacatch, 1,3 x 13cm, 14 gauge x 5.25 inch, Mila International, Inc, Erlanger, KY, USA

³ Escherichia coli O55: B5 endotoxin, ready made solution, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

⁴ Sodium-chloride (9mg/ml), Fresenius Kabi, Uppsala, Sweden

⁵ BD Vacutainer LH (Lithium Heparin) 10 ml, BD, Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK

⁶ Televet 100 Version 4.0, Rösch & Associates, Frankfurt am Main, Germany

3.3 Analys

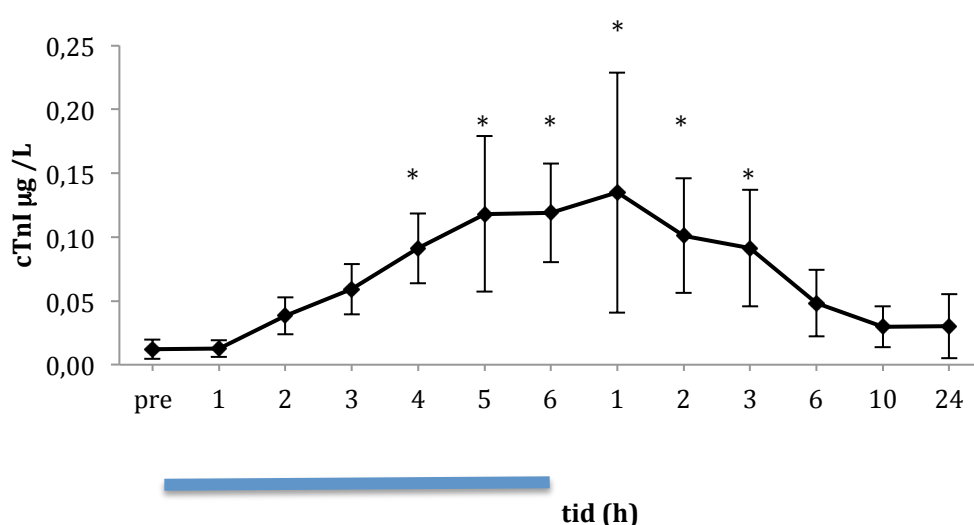
Proverna för cTnI analyserades med en ny hyperskänslig metod på AccutnI assay från Beckman Coulter⁷ vid Avdelningen för klinisk kemi, Akademiska sjukhuset, Uppsala. Innan analyserna utfördes tinades den frysta plasman i rumstemperatur. Två analyser kördes på varje prov. Lägsta detektionsnivå för analysmetoden var 0.001 µg/L och CV var 10,5 %.

⁷ Access Systems AccuTnI Assay, Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA, USA

4. RESULTAT

4.1 Troponin I

En häst, häst F, hade ett initialvärde som markant översteg initialvärdena för de andra individerna i studien. Det kunde därför inte uteslutas att den hade en bakomliggande hjärtmuskelskada, varför den exkluderades ur studien. Övriga hästar hade alla låga initial-koncentrationer av cTnI i plasma (medelkoncentration $0.012 \pm 0.007 \mu\text{g/L}$, range $0.008\text{-}0.028 \mu\text{g/L}$). cTnI-koncentrationen ökade under infusionsperioden hos alla hästar och nådde det högsta värdet $0.135 \pm 0.094 \mu\text{g/L}$ (range $0.088\text{-}0.308 \mu\text{g/L}$) en timme efter infusionens slut (se figur 3). Därefter sjönk koncentrationen av cTnI och vid kontroll 6, 10 och 24 timmar efter infusionens slut var värdena för cTnI ej signifikant skilda från initialvärdena.

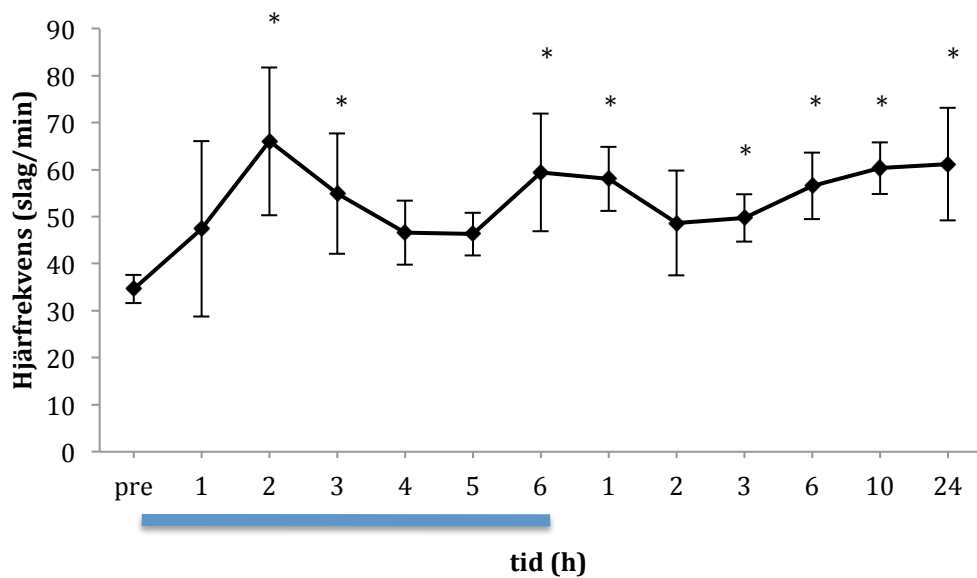


Figur 3. Plasmakoncentrationen av cTnI före, under (blå linje) samt efter infusion med endotoxin (medelvärde \pm SD). Plasmakoncentrationen av cTnI var signifikant högre jämfört med initiala värden vid 4, 5 och 6 timmars infusion samt de tre första timmarna efter infusionens slut. Inga signifikanta skillnader sågs efter 6, 10 och 24 timmar efter infusionens slut.

* signifikant skild från före infusion ($p \leq 0.05$), $n=7$

4.2 Förändringar i hjärtfrekvens

Medelvärdet för hjärtfrekvensen innan infusionens start var 35 ± 3 slag/minut. Under infusionen steg hjärtfrekvensen hos samtliga hästar och nådde ett högsta medelvärde (66 ± 16 slag/minut) efter 2 timmars infusion (Fig. 4). Efter infusionens slut varierade medelhjärtfrekvensen över tid med två peak- värden; ett vid infusionens slut och ett cirka 24 timmar efter infusionens slut. Vid slutkontrollen 72 timmar efter infusionens slut skilde sig hjärtfrekvensen inte från värdena innan infusionens start.



Figur 4. Hjärtfrekvens (slag/min) före, under (blå linje) samt efter infusion med endotoxin. Hjärtfrekvensen steg under infusionen och var signifikant högre än nollvärdet vid 2,3,och 6 timmars infusion samt 1,2,6,10 och 24 timmar post-infusion. Medelvärde \pm SD, $n=7$. *Signifikant skild från före infusion ($p \leq 0.05$),

4.3 Extraslag

	0-3h inf.		4-6h inf.		0-3h post inf.	
	VES	SVES	VES	SVES	VES	SVES
Häst A	1	2	1	13	11	9
Häst B	109	24	321	5	32	3
Häst C	7	6	1	6	99	72
Häst D	0	3	1	2	22	6
Häst E	1	2	0	1	4	4
Häst G	1	1	3	0	46	26
Häst H	0	0	0	0	22	18

Tabell 1. Antal supraventrikulära (SVES) och ventrikulära (VES) extraslag för alla sju hästar under den tidiga infusionsperioden (0-3 timmar), sena infusionsperioden (4-6 timmar) samt under de första tre timmarna efter infusionens slut.

h inf. = tidsangivelse i timmar under tiden för infusion

h post inf. = tidsangivelse i timmar för tiden efter infusionens slut

5. DISKUSSION

Denna studie visar att hästar med experimentellt inducerad endotoxemi får stegringar av cTnI. Detta överensstämmer med resultat från tidigare studier på människor med sepsis och på försöksdjur med experimentellt inducerad endotoxemi där man sett stegringar i cTnI i blod eller plasma (Thiru et al, 2000; Ammann et al, 2001; Peek et al, 2008). Enligt vår kännedom är detta den första studie där man under standardiserade förhållanden påvisat att hästar uppvisar stegrade cTnI-koncentrationer efter en långtids lågdos-infusion med endotoxiner. Tidigare finns rapporterat förhöjda cTnI koncentrationer hos föl med sepsis och hästar med kolik, en grupp individer som sannolikt har endotoxemi (Barton et al 1998; Diaz et al 2009). Samtliga hästar fick markanta men korvariga stegringar av cTnI i plasma under försöket vilket tyder på att hjärtmuskulaturen skadats till följd av infusionen av endotoxiner. Då detta inte var en terminal studie ha ingen histopatologi utförts på hjärtmuskulaturen vilket skulle vara önskvärt för att kunna konstatera en hjärtmuskelskada. Vid en histopatologisk undersökning av hjärtat skulle man även kunna studera om det fanns något samband mellan grad av stegring av cTnI och grad av skada på hjärtmuskulaturen.

Misstanken om en hjärtmuskelskada som grund till cTnI- stegringen styrks ytterligare av det faktum att samtliga hästar som ingick i försöket uppvisade en ökad mängd ventrikulärt utlösta extraslag under de första tre timmarna efter infusionens slut. Hos sex av sju hästar föregicks de ventrikulärt utlösta extraslagen av en peak i koncentrationen av cTnI. Dessa resultat tyder på att det är myokardskadan som utlöser arytmier och inte arytmier i sig som orsakar förhöjning av cTnI. Det fanns däremot inget uppenbart samband mellan peaken av cTnI och uppkomsten av supraventrikulärt utlösta extraslag. Detta överensstämmer med resultaten från en studie på ormbitna hundar där inget samband mellan höga cTnI koncentrationer och förekomsten av arrytmier kunde upptäckas (Pellander et al, 2010). Vidare kunde ingen tydlig koppling mellan graden av cTnI-stegring och mängden ventrikulärt utlösta extraslag påvisas. Detta är i motsats till en tidigare studie på kolikhästar där man rapporterat ett samband mellan graden av cTnI-stegring och förekomsten av ventrikulärt utlösta arytmier (Diaz et al, 2009).

En häst, häst B, hade ett flertal ventrikulärt och atriellt utlösta extraslag tidigt under infusionen. Det går inte att utesluta att denna häst kan ha haft en påverkan på hjärtats retledningssystem innan försöket påbörjades. Denna häst exkluderades dock inte ur försöket då den hade normala cTnI värden och inga kliniska tecken på hjärtpåverkan. En annan förklaring kan vara individuella skillnader i känsligheten för endotoxinets effekter på myokardet och hjärtats retledningssystem.

Orsaken till den ökade hjärtfrekvensen i samband med infusionen av endotoxiner är svårbedömd. Endotoxinerna skulle, med sin toxiska påverkan på kroppens celler och det stresspåslag som detta ger, direkt kunna vara en av orsakerna till den förhöjda hjärtfrekvensen. Även en förhöjd kroppstemperatur till följd av en frisättning av cytokiner såsom prostaglandiner, TNF α och interleukiner skulle kunna ligga till grund för tillståndet. Den förhöjning av hjärtfrekvens som registrerades cirka 20 timmar efter infusionens slut skulle kunna bero på en eventuell hjärtmuskelskada som gör sig klinisk påvisbar först senare i processen. Denna sena förändring i hjärtfrekvens skulle även kunna vara kompensatorisk till följd av ett hypovolemiskt tillstånd.

I denna studie gavs hästarna en långtidsinfusion av endotoxiner för att efterlikna en klinisk situation, till skillnad från tidigare studier som ofta använt sig av en bolusdos av endotoxiner. Det inflammatoriska svaret verkar emellertid ändå vara kraftigare vid sjukdomsframkallade fall av endotoxinemi då hästarna i denna studie endast uppvisade milda och kortvariga tecken på endotoxinemi (takykardi, feber, hyperemiska slemhinnor) jämfört med hästar med sjukdomsframkallad endotoxinemi. Detta skulle kunna bero på att en större mängd endotoxiner träder in i blodbanan vid till exempel en kraftig kolik. Det skulle även kunna bero på att hästar med sjukdomsframkallad endotoxinemi även har en kraftig bakteriemi eller sepsis och att det är bakterierna i sig som framkallar ett ännu starkare inflammatoriskt svar.

Det finns en rad tänkbara orsaker till att cTnI ökar vid endotoxinemi såsom stress, ischemi, en direkt påverkan av endotoxinet på myokardet eller ett inflammatoriskt svar med cytokinfrisättning (Roongsritong et al, 2004). Cytokiner såsom TNF α , IL-1, IL-6 som produceras av vita blodkroppar till följd av endotoxinemi har visats orsaka nedsatt funktion i myokardet samt ökad membranpermeabilitet (Kumar et al, 1996). För att styrka denna tes skulle prover för dessa cytokiner varit önskvärt under samma tidsintervall som proverna för cTnI. Detta gjordes ej i denna studie varför vi bara kan spekulera om ett eventuellt samband mellan cytokinfrisättningen och stegringen i cTnI. Dock uppvisade alla hästar i försöket symptom på endotoxinemi såsom förhöjd kroppstemperatur, mörka slemhinnor, takykardi, takypneé vilket gör att man kan förmoda att de hade ett inflammatoriskt svar med cytokinfrisättning. De förhöjda cTnI koncentrationerna skulle också kunna inducerats av takykardin som i sin tur kan ge upphov till en minskad syresättning av myokardet som ett resultat av en minskad diastolisk fyllnad i kombination med ett ökat syrebehov (DeGennaro et al, 2008).

I en klinisk situation är det svårt att bedöma om rytmrubbningar och läckage av cTnI är en direkt följd av endotoxiner. Vid till exempel kraftiga koliker skulle dragningar i vagus, elektrolytrubbningar samt blodtrycksfall till följs av vätskeutträde i tarmen kunna ge upphov till rytmrubbningar utan en direkt endotoxinpåverkan. Teoretisk skulle en mycket stressad häst efter lång transport in till klinik kunna få ett utträde av cTnI i blodbanan. Tidigare rapporter visar att hästar efter hård fysisk ansträngning såsom distansritter och travlopp kan få stegringar av cTnI (Holbrook et al, 2006; Nostell et al, 2008) I denna typ av stressfall är det troligt att det är cytosolfractionen av cTnI som läcker ut till följd av ett kraftigt adrenalinpåslag och ökad hjärtfrekvens. Vidare skulle samtidiga trauman mot hjärtmuskulaturen, tromber till följd av andra åkommor såsom klaffinsufficienser samt annan toxinpåverkan kunna ge en falsk bild om att det är just endotoxinerna vid till exempel ett kolikfall som ligger till grund för läckage av cTnI.

De analysmetoder för cTnI som idag används på Universitetsdjursjukhuset har en nedre detektionsgräns på 0,022 $\mu\text{g/L}$. Detta innebär att en påverkan på hjärtmuskeln i samband med endotoxinemi kan ha pågått ett par timmar innan man idag kliniskt kemiskt kan påvisa detta. I klinisk verksamhet idag antas att en stegring av cTnI ofta kan påvisas först några timmar efter en hjärtmuskelskada. Detta skulle kunna bero på att den metod som idag används har en för hög nedre detektionsgräns för att kunna påvisa små men för diagnostik, behandling och prognos viktiga stegringar i cTnI. Genom att använda en känsligare metod med lägre detektionsgräns för cTnI, skulle man i framtiden kunna öka chanserna att tidigare påvisa en eventuell hjärtmuskelskada. Detta skulle i sin tur kunna leda till att adekvat behandling sätts in i

ett tidigare skede vilket därmed skulle öka sannolikheten för tillfrisknande hos vissa patienter. Fler studier krävs dock innan känsligare metoder kan användas i daglig diagnostik då fastställande av kriterier och gränser för cTnI-värden för akut hjärtmuskelskada måste vara väl utvärderade.

Studien har ett antal begränsningar, såsom det relativt lilla försöksmaterialet samt avsaknaden av en kontrollgrupp. Det hade också varit informativt att ha registrerat EKG under en längre tid för att påvisa hur länge efter infusionens slut extraslag och arytmier förekom. För att utesluta att förändringarna i förekomst av extraslag inte var en normalvariation hos de hästar som ingick i försöket hade en långtidsregistrering av EKG innan försökets start även varit önskvärd. Att det skulle röra sig om en normalvariation är dock mindre troligt då antalet ventrikulära extraslag ökade under infusionens gång samt att man i ett tidigare försök där man utförde ett 24-timmars EKG på 9 friska hästar inte såg några ventrikulära extraslag (Raekallio, 1992).

Sammanfattningsvis visar denna studie att en långtids infusion med endotoxin orsakar förhöjda koncentrationer av cTnI i plasma hos hästar och att denna stegring har ett samband med antalet ventrikulärt utlösta extraslag under post-infusionsperioden. Det verkar också finnas en tidsförskjutning mellan stegring av cTnI och förekomsten av rytmrubbningar. Genom att analysera förändringar av cTnI tidigt i ett förlopp med misstänkt endotoxinemi skulle man i framtiden kunna öka chanserna för insättning av adekvat behandling och omvårdnad av dessa hästar. Detta skulle i sin tur öka möjligheterna för tillfrisknande hos dessa patienter.

6. LITTERATURFÖRTECKNING

Artiklar

- Ammann P, Fehr T, Minder EI, et al. Elevation of troponin I in sepsis and in septic shock. *Intensive Care Med.* 2001; 27: 965-969.
- Barton MH, Morris DD, Norton N, et al. Hemostatic and fibrinolytic indices in neonatal foals with presumed septicemia. *J Vet Intern Med* 1998; 12:26–35.
- DeGennaro L, Brunetti ND, Cuculo A, et al. Increased troponin levels in nonschemic cardiac conditions and noncardiac disease. *Journal of Interventional Cardiology.* 2008 Apr;21(2):129-39. Epub 2008 Jan 28.
- Diaz OS, Durando, MM, Birks EK et al. Cardiac troponin I concentrations in horses referred for colic. *JVIM* 2009; 23, 777.
- Favory R, Nevriere R. Significance and interpretation of elevated troponin in septic patients. *Crit Care.* 2006;10(4):224. Review.
- Holbrook TC, Birks EK, Sleeper MM, Durando M. Endurance exercise is associated with increased plasma cardiac troponin I in horses. *Equine Vet J Suppl.* 2006 Aug;(36):27-31.
- King J, Gerring E. Detection of endotoxin in cases of equine colic. *Vet Rec* 1988;123, 269 -71
- Kleinschmidt JH. Membrane protein folding on the example of outer membrane protein A of *Escherichia coli*. *Cell Mol Life Sci.* 2003 Aug;60(8):1547-58.
- Kumar A, Thota V, Dee L, et al. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med.* 1996; 183: 949-958.
- Marshall JC, Foster D, Vincent J-L, et al. Diagnostic and prognostic implications of endotoxemia in critical illness:results of the MEDIC study. *JID,* 2004; 190: 527-534.
- Martinez JD, Babu RV, Sharma G. *Escherichia coli* septic shock masquerading as ST-segment elevation myocardial infarction. *Postgrad Med.* 2009 Mar;121(2):102-5.
- Moore JN, Morris DD. Endotoxemia and septicemia in horses: experimental and clinical correlates. *J Am Vet Med Assoc* 1992; 200:1903-1914.
- Nostell K, Häggström J. Resting concentrations of cardiac troponin I in fit horses and effect of racing. *J Vet Cardiol.* 2008 Dec;10(2):105-9. Epub 2008 Nov 18.
- Parker J, Shelhamer JH, Bacharach SL, et al. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann Intern Med.* 1984; 100:483-490.
- Peek SF, Apple FS, Murakami MA, et al. Cardiac isoenzymes in healthy Holstein calves and calves with experimentally induced endotoxemia. *Can J. Vet. Res* 2008; 72: 356-361.

- Pelander L, Ljungvall I, Häggström J. Myocardial cell damage in 24 dogs bitten by common European viper (*Vipera berus*). *Vet. Record* 166, 687-690.
- Raekallio M. Long term ECG recording with Holter monitoring in clinically healthy horses. *Acta Vet Scand.* 1992;33(1):71-5.
- Rajan GP, Zellweger R. Cardiac troponin I as a predictor of arrhythmia and ventricular dysfunction in trauma patients with myocardial contusion. *J Trauma.* 2004 Oct;57(4):801-8; discussion 808.
- Roongsritong C, Warraich I, Bradley C. Common causes of troponin elevations in the absence of acute myocardial infarction: incidence and clinical significance. *Chest* 2004; 125:1877-1884
- Slack JA, McGuirk SM, Erb HN, et al. Biochemical markers of cardiac injury in normal, surviving septic, or nonsurviving septic neonatal foals *J Vet Intern Med.* 2005; 19:577-80.
- Thiru Y, Pathan N, Bignall S, et al. A myocardial cytotoxic process is involved in the cardiac dysfunction of meningococcal septic shock. *Crit Care Med* 2000; 28:2979-2983.
- Van Bockel EA, Tulleken JE, Ligtenberg JJ, et al. Troponin in septic and critically ill patients. *Chest* 2005, 127: 687-688.
- Venge P, Johnston N, Lindahl B, James S. Normal plasma levels of cardiac troponin I measured by the high-sensitivity cardiac troponin I access prototype assay and the impact on the diagnosis of myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol.* 2009 Sep 22;54(13):1165-72.

Böcker

- Reed, S M. Bayly, W M. Sellon, D C. 2004. *Equine internal medicine*, 2nd ed. Elsevier: Saunders.

7. TACK

Ett stort tack till min handledare Katarina Nostell för att du introducerade mig till försöket och för att du var så engagerad genom hela processen. Tack även till Anna Sundström och Jacob Norström Ridderborg för en fin gemenskap under arbetets gång.