

Farmakologisk påvirkning av den inflammatoriske responsen etter skuddskader hos gris

Sammendrag

Bakgrunn. Kraftige ytre stimuli øker produksjonen av frie oksygenradikaler. Forbigående reduksjon av syntesen vil kunne minske faren for flerorgansvikt. Vi har undersøkt hvor virkningsfulle hydrokortison og den ekstracellulære signalregulerte proteinkinasehemmeren U0126 er for dette formålet. Studien krevde et omfattende og kostbart apparat og ble derfor gjennomført som en del av Forsvarets årlige krigskirurgkurs.

Materiale og metoder. 17 griser (45–55 kg) ble utsatt for et standardisert traume: ett rifleskudd mot høyre lår og ett pistolskudd mot venstre øvre abdominalkvadrant. Sanitetssoldater gav umiddelbart førstehjelp. Fem minutter etter siste skudd fikk dyrene enten hydrokortison 250 mg intravenøst (gruppe 1, n = 9) eller NaCl 0,9 % (gruppe 2, n = 8). Akutt kirurgi ble utført på nærliggende feltsykehus. Blodprøver ble tatt før skyting, kort etter at hydrokortison var satt og 60 minutter etter siste skudd. Granulocytter fra ni tilfeldig utvalgte dyr (fem fra gruppe 1, fire fra gruppe 2) ble behandlet in vitro med U0126.

Resultater. Alle dyrene overlevde 60 minutter. Hydrokortison reduserte syntesen av frie oksygenradikaler. In vitro-behandling med U0126 reduserte produksjonen med to tredeler.

Fortolkning. Tidlig behandling med hydrokortison etter skade hemmer syntesen av frie oksygenradikaler. Resultatene tyder på at den ekstracellulære signalregulerte proteinkinaseveien er viktig for signaloverføringen ved traumer.

Engelsk sammendrag finnes i artikkelen på www.tidsskriftet.no

Artikkelen bygger på materiale publisert i *Critical Care Medicine* (25)

Yngvar Gundersen

yngvar.gundersen@ffi.no

Per Vaagenes

Oddvar Myhre

Jannike Mørch Andersen

Forsvarets forskningsinstitutt

Avdeling BM

Postboks 25

2027 Kjeller

Kvaliteten på akutt behandling av svære traumer er de siste tiårene blitt stadig bedre. Hurtig og effektiv førstehjelp (optimal væsketilførsel og kontroll med respirasjonen på skadestedet, rask transport til sykehus og akutt foreløpig kirurgi) har gjort det mulig å overleve med skader som tidligere var ensbetydende med en sikker død. Mange norske helsearbeidere har fått erfaring i akutt traumebehandling fra konflikt- og katastrofesituasjoner i FN-tjeneste eller i arbeid for humanitære organisasjoner (1–3). Innenlands drives det også utstrakt opplæring i effektivt traumemottak (4, 5) og akutt skadebegrensende kirurgi (6).

Selv med optimal og tilsynelatende vellykket primærbehandling vil en urovekkende høy andel av pasientene (opptil 30%) etter få dager utvikle alvorlig dysfunksjon eller svikt i flere organer (7, 8). En årsak til dette er sviktende balanse mellom den totale vevsdestruksjon og organismens evne til å gjenopprette et normalt «indre miljø». Posttraumatisk systemisk inflammatorisk responssyndrom med flerorgansvikt er en livstruende komplikasjon som krever behandling i intensivavdeling. Men trass i maksimal innsats vil tilstanden ofte langsomt forverre seg og til slutt ende med døden. I dag er dette den viktigste dødsårsak i de senere stadiene etter store skader (9).

Det er vist at nøytrofile granulocytter, som er en vital del av det ikke-spesifikke immunforsvaret, også er sentrale i utviklingen av systemisk inflammatorisk responssyndrom (10). Ved aktivering frigjøres en rekke potensielt toksiske produkter, blant annet frie oksygenradikaler og proteaser. Disse stoffene skiller ikke mellom eget og fremmed vev, og ukontrollert frigjøring kan derfor føre til omfattende skader på proteiner, nukleinsyrer, lipider og andre sentrale biologiske molekyler og strukturer. Den inflammatoriske reaksjonen er normalt avpasset etter størrelsen på det utløsende stimulus, men moderate skader kan «prime» granulocytterne slik at de reagerer ekstra kraftig på en ny

Fakta

- Større traumer aktiverer den inflammatoriske responsen
- Overaktivering kan gi akutte organskader og dessuten disponere for senere flerorgansvikt
- Tidlig farmakologisk behandling (hydrokortison, U0126) hemmer aktiveringen (målt ved produksjon av frie oksygenradikaler)

ytre påvirkning (second hit) (11). Korrekt akuttbehandling på skadested, under transport og i forbindelse med foreløpig kirurgi er derfor også en nøkkel til å kontrollere det posttraumatiske sykdomsforløpet.

Ved Forsvarets forskningsinstitutt arbeides det med et prosjekt for studier av traumer og blødningssjokk. I en rottemodell har vi vist at en moderat reduksjon av kroppstemperaturen hemmer inflammatorisk overaktivering (12). Men sammen med nødvendig væsketilførsel kan nedkjøling også forsterke ugunstige bivirkninger som blødningstendens og koagulasjonsforstyrrelser (13). Det har derfor vært ønskelig å vurdere alternative behandlingstiltak.

Inflammasjonsreaksjonen kan også påvirkes farmakologisk, eksempelvis med kortikosteroider eller stoffer som griper inn i signaloverføringen i det mitogenaktiverede proteinkinasesystemet (fig 1). Dette kaskadesystemet består av minst tre signalveier: p38, jun-N-terminal kinase (JNK) og ekstracellulær signalregulert proteinkinase (ERK). ERK-veien er kanskje den best karakteriserte, men man vet fremdeles lite om hvordan den mitogenaktiverede proteinkinase bidrar til den inflammatoriske responsen in vivo.

Hensikten med denne studien var å undersøke hvordan hydrokortison eller ERKhemmeren U0126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminofenyltio]butadien) modulerer den tidlige posttraumatiske produksjonen av frie oksygenradikaler.

Materiale og metoder

Dyremodell

Undersøkelsen ble utført på en etablert grisemodell brukt ved Forsvarets krigskirurgkurs på Lahaugmoen. Etisk godkjenning ble innhentet via veterinærtjenesten i Forsvaret.

Til de aktuelle eksperimentene ble det benyttet 17 griser med vekt 45–55 kg. Etter ankomst til forsøksområdet la veterinæren dyrene i narkose. De ble oralintubert og spontanventilerte deretter på tuben. Assistert håndventilasjon ble gitt etter behov. Deretter ble det satt lumbosakral epiduralanestesi med lidokain 2%. Dosen ble beregnet ut fra lengden fra hode til halerot slik at dyrene fikk 1 ml for de først 40 cm og 1,5 ml for hver påfølgende 10 cm (Strandes formel). Venekanyler ble lagt inn i to ørener for injeksjon av medikamenter og infusjon av væske. Til bruk for trykkmonitorering og blodprøvetaking ble venstre lyskearterie fripreparert og kateterisert med et Secalon-T-sentralvenekateter.

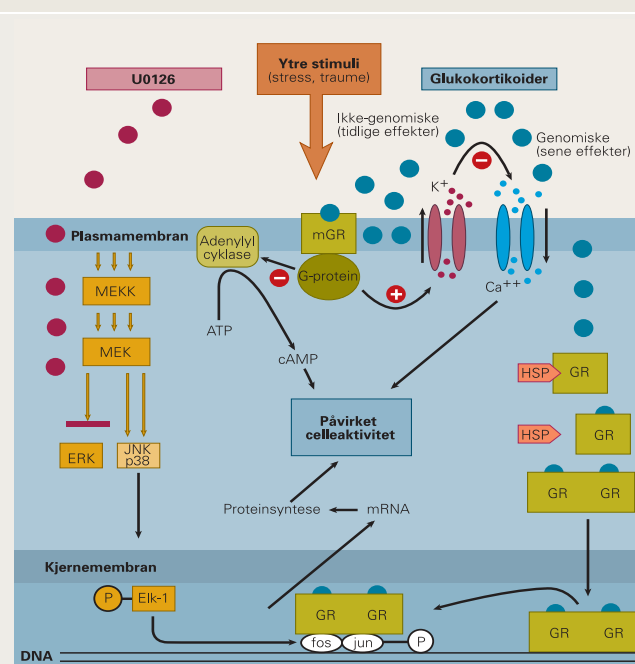
Eksperimentell prosedyre

Dyrene ble i narkose overført til nærliggende skytebane, opphengt i galge og utsatt for et standardisert traume som bestod av ett rifleskudd fra 25 m mot høyre lår, samt ett pistolskudd fra kort hold mot øvre abdomen (fig 2). Skuddretning og profil var avmerket av Forsvarets veterinærer. For å unngå akutt utblødning unngikk man bevisst å skade de store abdominalkarene. Sanitetsoldater gav førstehjelp umiddelbart. Respirasjonen ble kontrollert, sårene pakket og komprimert, og intravenøs væsketilførsel påbegynt. Grisene var på forhånd tilfeldig inndelt i to grupper. Gruppe 1 (n = 9) fikk fem minutter etter siste skudd hydrokortison 250 mg i ørevenen, gruppe 2 (n = 8) tilsvarende mengde fysiologisk saltvann. Dyrene ble deretter transportert til nærliggende felt-sykehus for akutt kirurgi. Skadeomfanget ble evaluert ved hjelp av Abbreviated Injury Scale (14). Blodtrykk, temperatur og arteriell oksygenmetning ble kontinuerlig overvåket under operasjonen. Væskebehandling (0,9% NaCl og dekstran 70/Ringer-acetat) ble gitt etter behov for å kompensere for blødning og opprettholde et akseptabelt blodtrykk. Studien ble avsluttet etter 60 minutter.

Prøvetaking

Blodprøver ble tatt umiddelbart etter at arteriekateteret var på plass (normalprøve, tidspunkt 0), fem minutter etter siste skudd (like før hydrokortison ble gitt) og 60 minutter etter skyting (sluttprøve). EDTA ble brukt som antikoagulant. Prøvene ble straks satt på is og transportert til laboratoriet ved Forsvarets forskningsinstitutt hvor plasma ble separert og nedfryst ved -70°C . Plasmaverdiene for

Figur 1



Forenklet skjema over signaloverføringen i den mitogenaktiverte proteinkinasekaskaden. Systemet består av de tre grenene ERK, JNK og p38. U0126 blokkerer den ekstracellulære signalregulerte proteinkinase (ERK). Aktivering av kaskaden fører blant annet til at transkripsjonsfaktoren Elk-1 blir aktivert.

Figuren antyder også de tre ulike virkningsmekanismene for steroider: 1) En klassisk mekanisme som påvirker genapparatet, og som dermed har en viss latenstid. 2) En ikke-genomisk reseptoravhengig mekanisme. Via et G-protein hemmer steroidene adenylylcyklasen og dermed omdanningen av ATP til cAMP. Dessuten øker utstrømningen av kalium samtidig som influks av kalsium minker. På denne måten hemmes en rekke kalsiumavhengige prosesser. 3) En ikke-genomisk reseptoravhengig mekanisme som interfererer direkte med membranfunksjonen. De ikke-genomiske effektene opptrer nesten umiddelbart.

Forkortinger: MEK1 – mitogenaktivert proteinkinase kinase kinase; MEK2 – mitogenaktivert proteinkinase kinase; ERK1/2 – ekstracellulær signalregulert proteinkinase; JNK – jun-N-terminal kinase; GR – glukokortikoidreseptor; mGR – membranbundet glukokortikoidreseptor; ATP – adenosintrifosfat; cAMP – syklisk adenosinmonofosfat; HSP – heat shock protein

IL-6 og markører for organskade i lever (ALAT og ASAT) og nyre (kreatinin og karbamid) ble målt ved tidspunkt 60 minutter. Laktat og kortisol i plasma ble bestemt ved tidspunkt 0 og 60, hemoglobin og hematokrit ved 0, 5 og 60.



Figur 2 Anestesert forsøksgris opphengt i galge. Veterinær har avmerket innskudd på høyre lår og abdomen med kryss. Skuddbanen gjennom øvre del av abdomen er også antydnet

2,7-diklorofluorescein (DCF) fluorescens

Syntesen av frie oksygenradikaler ble målt i granulocytter tappet ved tidspunktene 0, 5 og 60 minutter. Granulocytene ble isolert fra fullblod ved at plasma ble fjernet og erstattet med saltvann. Blandingen ble deretter resuspendert og grandientsentrifugert etter Bøyums metode (15). Målingene ble gjort ved hjelp av den fluorescerende proben 2,7-diklorofluorescein-diacetat (DCFH-DA), som diffunderer fritt over celledmembranen (16). Intracellulært avspaltes acetatgruppene av esteraser. Det gjenværende 2,7-diklorofluorescein (DCFH) fluorescerer ikke, men oksideres umiddelbart av frie oksygenradikaler til 2,7-diklorofluorescein (DCF), som er fluorescerende (530 nm). Fluorescensen fra DCF antas å gjenspeile cellenes generelle oksidative status (17). Målingene ble gjort ved 37°C i spektrometer hvert andre minutt i 60 minutter. Granulocytter fra ni tilfeldig valgte dyr (fem fra gruppe 1, fire fra gruppe 2) ble testet på samme måte etter behandling med 20 $\mu\text{mol/l}$ U0126.

Statistisk analyse

Resultatene er angitt som middelerverdi \pm standardfeil. På grunn av stor spredning i produksjonen av frie oksygenradikaler i normalsituasjonen er verdiene angitt som prosentandel av utgangsverdien, som er satt til 100 for hvert enkelt dyr. Vi har brukt parett t-test for å vurdere forskjeller innen gruppene, t-test mellom gruppene. En p-verdi mindre enn 0,05 er ansett som statistisk signifikant.

Resultater

Basalverdier

Det var ingen signifikante forskjeller i utgangsverdiene mellom gruppene (tab 1).

Klinikk og overlevelse

Alle dyrene fikk sammenliknbare skader som ved hjelp av Abbreviated Injury Scale ble vurdert til AIS 2. Samtlige 17 dyr overlevde de første 60 minuttene.

Fysiologiske variabler

Skuddskadene førte til alvorlig blødning med raskt blodtap hos alle dyrene. Hemoglobinverdiene falt raskt; det samme gjaldt verdiene for hvite blodceller og blodplater (tab 1). Systolisk blodtrykk gikk også signifikant ned, men ved hjelp av liberal væsketilførsel ble det stort sett holdt på akseptable nivåer. ASAT og ALAT ble brukt som mål for lever-

Tabell 1 Utvalgte fysiologiske variabler (gjennomsnitt ± standardfeil)

Gruppe	Kontroller (n = 8)		Hydrokortison (n = 9)	
	0	60	0	60
Tid (min)	0	60	0	60
Systolisk blodtrykk (mm Hg)	110,0 ± 2,0	96,0 ± 15,4 ¹	100,0 ± 10,0	93,6 ± 6,1 ¹
S _a O ₂ (%)	96,9 ± 0,8	87,5 ± 5,6 ¹	96,3 ± 1,1	91,8 ± 2,7 ¹
Hb (g/100 ml)	10,5 ± 0,2	5,1 ± 0,6 ¹	10,5 ± 0,2	5,1 ± 0,5 ¹
Leukocytter (· 10 ⁹ /l)	17,3 ± 1,0	5,4 ± 0,8 ¹	16,8 ± 1,1	6,8 ± 0,7 ¹
Trombocytter (· 10 ⁹ /l)	556 ± 49	249 ± 39 ¹	589 ± 41	283 ± 33 ¹
Laktat (mmol/l)	1,8 ± 0,2	3,8 ± 0,5 ¹	2,3 ± 0,4	4,0 ± 0,6 ¹
Kortisol (nmol/l)	114,9 ± 17,6	99,2 ± 30,2	95,3 ± 12,7	1 934,6 ± 515,2 ^{1, 2}

ASAT, ALAT, karbamid, kreatinin og IL-6 forandret seg ikke fra sine normale utgangsverdier
¹ P < 0,05 sammenliknet med utgangspunktet
² P < 0,05 mellom gruppene

celleintegritet, kreatinin/karbamid for nyrefunksjon. Ingen av disse verdiene beveget seg utenfor normalområdet. Dette gjaldt også IL-6-nivået. Derimot steg laktatverdiene signifikant i begge gruppene.

Fluorescensspektroskopi

Spontan produksjon av frie oksygenradikaler fra granulocytene var uforandret etter fem minutter. Etter 60 minutter hadde syntesen i kontrollgrisene økt til 111,6 ± 8,5 % av utgangsverdiene (ikke signifikant), mens tilsvarende tall for hydrokortisongrisene var 78,4 ± 4,9 % (p < 0,05). På dette tidspunktet

var det også en statistisk signifikant forskjell mellom gruppene. Behandling med U0126 førte til at produksjonen falt med mer enn to tredeler, uavhengig av tidspunkt eller forutgående behandling med hydrokortison (fig 3).

Diskusjon

Store skader og blødning aktiverer raskt immunkompetente celler, inklusive sirkulerende granulocytter. Dette ble reflektert i tendensen til økt produksjon av frie oksygenradikaler 60 minutter etter skyting. Hydrokortison 250 mg gitt intravenøst kort

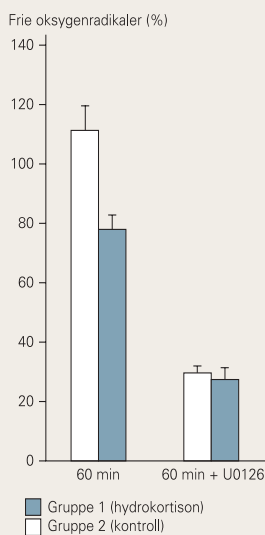
tid etter traume hemmet syntesen moderat. Den etterfølgende in vitro-behandlingen med U0126 førte til et kraftig fall, uavhengig av tidligere in vivo-aktivering eller behandling med hydrokortison.

En rekke studier har vist at både organfunksjon og overlevelse kan bedres ved forbigående å redusere overproduksjon av frie oksygenradikaler etter skade. Moderat hypotermi gir en slik effekt (12). Også kortikosteroider hemmer granulocytffunksjonen, fortrinnsvis ved å regulere ekspresjonen av gener som styrer produksjonen av inflammatoriske proteiner (18, 19). Virkningen går delvis via transkripsjonsfaktoren NFκB som regulerer transkripsjonen av mRNA til en rekke sentrale substanser i den inflammatoriske kaskaden. Steroidenes virkning blir derfor meget bred, men lite selektiv. At disse medikamentene i tillegg har en akutt ikke-genomisk virkningsmekanisme, er etter hvert blitt overbevisende dokumentert. Det er imidlertid usikkert hvordan den akutte syntesen av frie oksygenradikaler blir påvirket. Dandona og medarbeidere fant for eksempel at hydrokortison gitt til friske forsøkspersoner (100 mg per 60–100 kg) maksimalt reduserte produksjonen med 74 % etter to timer. Etter én time var reduksjonen like under 60 % (19). Derimot kunne Toft og medarbeidere ikke finne at forbehandling med metylprednisolon (30 mg/kg) påvirket nivået av frie oksygenradikaler etter større kirurgiske inngrep (kardiopulmonal bypass) (20).

Flere faktorer kan tenkes å medvirke til slike tilsynelatende forvirrende resultater: sammensetning av den undersøkte populasjonen, styrke og standardisering av utløsende stimulus, tidspunkt for behandlingsstart i forhold til traumat, spesiesforskjeller, steroidtype, dose, osv. I den foreliggende studien hadde vi fordelene av å bruke et opplegg som er standardisert gjennom mange år. De to gruppene var svært like med hensyn til sentrale variabler som alder og vekt, skadeomfang, tid fra skade til behandlingsstart, transporttid og behandlingsopplegg fra førstehjelp til akutt kirurgi. Hydrokortison senket produksjonen av frie oksygenradikaler. Mekanistiske studier har vist at steroidene hemmer både fosforylering og translokasjon av p47^{phox}, et nøkkeelement i nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat-oksidasen (21) (fig 4). Våre resultater antyder at effekten er nokså moderat, og det var bare mulig å oppdage signifikante forskjeller ved å bruke relative verdier og la det enkelte dyr fungere som sin egen kontroll.

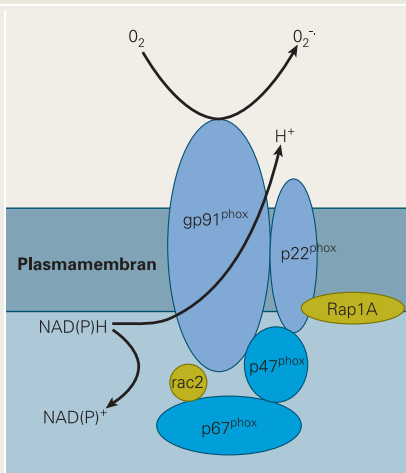
Tidspunktet for steroidinjeksjonen i forhold til traumat ser også ut til å spille en avgjørende rolle. Vi målte ingen økt aktivitet i blodprøver tatt fem minutter etter skyting, det vil si like før steroidene ble tilført. Granulocytene var på dette tidspunktet sannsynligvis bare beskjedent aktivert eller ikke aktivert i det hele tatt. Andre studier har vist at økt oksidativt stress fører til redusert

Figur 3



Produksjon av frie oksygenradikaler i sirkulerende granulocytter. Søylene til venstre viser hvordan hydrokortison 250 mg, gitt fem minutter etter skade, signifikant hemmer produksjonen av frie oksygenradikaler etter 60 minutter. I kontrollgruppen stiger produksjonen svakt (ikke signifikant). Det er en statistisk signifikant forskjell mellom gruppene. Den kraftige virkningen av påfølgende in vitro-behandling med U0126 (20 µmol/l) er vist til høyre. Verdiene i normalsituasjonen er satt til 100 %

Figur 4



Modell av nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat (NADPH)-oksidasen i granulocytter. Det membranbundne flavocytochromet b₅₅₈, som består av gp91^{phox} og p22^{phox}, overfører elektroner fra NADPH til oksygen. G-proteinet Rap1A er kontinuerlig bundet til plasmamembranen og assosiert med b₅₅₈. p47^{phox}, p67^{phox} og det lille G-proteinet rac2 finnes normalt i cytoplasmaet. Når granulocytene blir aktivert, translokerer ekvimolare mengder p47^{phox}, p67^{phox} og rac2 til cellemembranen. NADPH er først aktivt når alle disse komponentene er bundet sammen i cellemembranen. Frie oksygenradikaler blir da syntetisert enten ekstracellulært eller inn i et fagosom

følsomhet for steroider, og senere behandling ville derfor kanskje ha vært mindre effektiv (22).

U0126 virket omgående og kraftig. Produksjonen av frie oksygenradikaler falt med mer enn to tredeler, uavhengig av tidligere aktivering eller behandling med hydrokortison. Laboratorieundersøkelser har antydning at den ekstracellulære signalregulerte proteinkinase spiller en sentral rolle for å utløse effektorfunksjonene i nøytrofile granulocytter (23). Det er derfor ingen overraskelse at blokkade hemmet produksjonen av frie oksygenradikaler, men virkningen var langt sterkere enn antatt. Selv om U0126 skal være meget selektiv, kan uspesifikke effekter ikke utelukkes. Sammenlikningen med hydrokortison blir heller ikke helt rettferdig ettersom U0126 bare ble testet *in vitro*. Foreløpig finnes det ikke resultater der U0126 er brukt i intakte dyremodeller etter traume, men enkeltrapporter tyder på at den ekstracellulære signalregulerte proteinkinaseveien er sentral for den inflammatoriske responsen også *in vivo* (24).

Konklusjon

Resultatene antyder at akutt injeksjon av hydrokortison hemmer den umiddelbare in-

flammatoriske responsen etter store skader. Det samme gjelder kanskje i enda høyere grad den ekstracellulære signalregulerte proteinkinasehemmeren U0126, men fremdeles mangler forsøk med U0126 på intakte dyremodeller.

Forfatterne takker Forsvarets sjefveterinær, Øystein Os, Forsvarets overlege i kirurgi, Johan Pillgram-Larsen, og Forsvarets overlege i anesteologi, Knut Ole Sundnes, for bistand og samarbeid.

Litteratur

Komplett litteraturliste finnes i artikkelen på www.tidsskriftet.no

8. Rose S, Marzi I. Mediators in polytrauma – pathophysiological significance and clinical relevance. *Langenbeck's Arch Surg* 1998; 383: 199–208.
10. Yao Y-M, Redl H, Bahrami S, Schlag G. The inflammatory basis of trauma/shock-associated multiple organ failure. *Inflamm Res* 1998; 47: 201–10.
11. Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Kim FJ, Banerjee A, Peterson VM. Postinjury neutrophil priming and activation: an early vulnerable window. *Surgery* 1995; 118: 358–64.
19. Dandona P, Suri M, Hamouda W, Aljada A, Kumbkarni Y, Thusu K. Hydrocortisone-induced inhibition of reactive oxygen species by polymorphonuclear neutrophils. *Crit Care Med* 1999; 27: 2442–4.
20. Toft P, Christiansen K, Tønnesen E, Nielsen CH, Lillevang S. Effect of methylprednisolone on the oxidative burst activity, adhesion molecules and clinical outcome following open heart surgery. *Scand Cardiovasc J* 1997; 31: 283–8.
21. Dahlgren C. Difference in extracellular radical release after chemotactic factor and calcium ionophore activation of the oxygen radical-generating system in human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1987; 930: 33–8.
22. Ito K, Lim S, Caramori G, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM. Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression, and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages. *FASEB J* 2001; 15: 1110–2.
23. Dewas C, Fay M, Gourgerot-Pocidallo M-A, El-Benna J. The mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced p47^{phox} phosphorylation in human neutrophils. *J Immunol* 2000; 165: 5238–44.
24. Jaffee BD, Manos EJ, Collins RJ, Czerniak PM, Favata MF, Magolda RL et al. Inhibition of MAP kinase kinase (MEK) results in an anti-inflammatory response *in vivo*. *Biochem Biophys Res Com* 2000; 268: 647–51.
25. Gundersen Y, Vaagenes P, Myhre O, Andersen JM, Pharo A, Haugen A-H et al. Hydrocortisone and the mitogen-activated protein kinase inhibitor U0126 acutely suppress reactive oxygen species generation from circulating granulocytes after gunshot injuries in the pig. *Crit Care Med* 2002; 31: 166–70.