

FFIBM/827/159

Godkjent
Kjeller 14 februar 2002



Bjørn Arne Johnsen
Forskningsjef

**TIDLIG BEHANDLING MED HYDROKORTISON
OG/ELLER U-0126 HEMMER SYNTESEN AV FRIE
OKSYGENRADIKALER ETTER SKUDDSKADER
HOS GRIS**

GUNDERSEN Y, VAAGENES P, HAUGEN A H,
PHARO A, VALØ E Try, MYHRE O, ANDERSEN J
Mørch, SUNDNES K O, OS Ø, PILLGRAM-LARSEN J

FFI/RAPPORT-2002/00579

FORSVARETS FORSKNINGSINSTITUTT
Norwegian Defence Research Establishment
Postboks 25, 2027 Kjeller, Norge

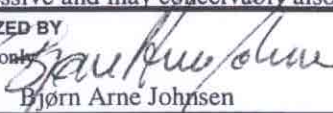
FORSVARETS FORSKNINGSPENNINGSTUTT (FFI)
Norwegian Defence Research Establishment

UNCLASSIFIED

P O BOX 25
 NO-2027 KJELLER, NORWAY

SECURITY CLASSIFICATION OF THIS PAGE
 (when data entered)

REPORT DOCUMENTATION PAGE

1) PUBL/REPORT NUMBER FFI/RAPPORT-2002/00579	2) SECURITY CLASSIFICATION UNCLASSIFIED	3) NUMBER OF PAGES 16
1a) PROJECT REFERENCE FFIBM/827/159	2a) DECLASSIFICATION/DOWNGRADING SCHEDULE -	
4) TITLE TIDLIG BEHANDLING MED HYDROKORTISON OG/ELLER U-0126 HEMMER SYNTESSEN AV FRIE OKSYGENRADIKALER ETTER SKUDDSKADER HOS GRIS Early treatment with hydrocortisone and/or U-126 inhibits the synthesis of oxygen free radicals after gun shot injuries in swine		
5) NAMES OF AUTHOR(S) IN FULL (surname first) GUNDERSEN Y, VAAGENES P, HAUGEN A H, PHARO A, VALØ E Try, MYHRE O, ANDERSEN J Mørch, SUNDNES K O, OS Ø, PILLGRAM-LARSEN J		
6) DISTRIBUTION STATEMENT Approved for public release. Distribution unlimited. (Offentlig tilgjengelig)		
7) INDEXING TERMS IN ENGLISH: IN NORWEGIAN: a) <u>Gun shot injuries</u> a) <u>Skuddskader</u> b) <u>Inflammation</u> b) <u>Systematisk inflammasjon</u> c) <u>MAP-kinase inhibitors</u> c) <u>MAP-kinase-hemmere</u> d) <u>Glucocorticosteroids</u> d) <u>Steroider</u> e) <u>Reactive oxygen species</u> e) <u>Frie oksygenradikaler</u>		
THESAURUS REFERENCE:		
8) ABSTRACT As part of a training course in War Surgery organised by the Norwegian Defence Medical Headquarter at Lahaugmoen camp we have studied the effect of hydrocortisone and the MAP-kinase inhibitor U-0126 on reactive oxygen species (ROS) synthesis after gun shot injuries in the pig. 17 animals (45-55 kg) were used for the experiments. In general anaesthesia the femoral artery was exposed and catheterised for blood analysis and monitoring purposes. The animals suffered a standardised trauma: one rifle shot hitting the right femur from a distance of 25 m, and one pistol shot to the left upper abdomen from close range. Immediate first aid treatment was instituted before transportation to a nearby field hospital for surgery. The animals were randomised into two groups. Group 1 (n=9) received hydrocortisone 250 mg iv, group 2 (n=8) a similar injection of normal saline. The injections were given 5 min after the last shot. Blood samples were drawn before trauma, immediately after hydrocortisone, and 60 min after shooting. Circulating granulocytes were isolated and the production of ROS measured. Granulocytes from 9 randomly chosen animals (5 from group 1, 4 from group 2) were <i>in vitro</i> treated with U-0126. Hydrocortisone moderately depressed ROS production. U-0126 reduced the synthesis of ROS by about two-thirds in both groups, independently of time point for blood sampling. We conclude that hydrocortisone inhibits of ROS synthesis after trauma. <i>In vitro</i> inhibition of the ERK pathway of the MAP-kinase signalling cascade proved more impressive and may conceivably also produce fewer side effects.		
9) DATE 14 February 2002	AUTHORIZED BY This page only  Bjørn Arne Johnsen	POSITION Director of Research

ISBN 82-464-0581-0

UNCLASSIFIED

SECURITY CLASSIFICATION OF THIS PAGE
 (when data entered)

INNHold

	Side	
1	INNLEDNING	7
2	METODER	9
2.1	Dyremodell	9
2.2	Eksperimentell prosedyre	10
2.3	Prøvetaking	10
2.4	Måling av DCF fluorescens	10
2.5	Statistisk analyse	11
3	RESULTATER	11
3.1	Basalverdier	11
3.2	Klinikk og overlevelse	11
3.3	Fysiologiske variable	11
3.4	Fluoroscensspektroskopi	12
4	DISKUSJON	13
4.1	Viktigste funn	13
4.2	Dyremodell	13
4.3	Kortikosteroider	13
4.4	ERK-hemmeren UO126	14
4.5	Oppsummering	14
5	LITTERATUR	15
	Fordelingsliste	17

TIDLIG BEHANDLING MED HYDROKORTISON OG/ELLER U-0126 HEMMER SYNTESSEN AV FRIE OKSYGENRADIKALER ETTER SKUDDSKADER HOS GRIS

1 INNLEDNING

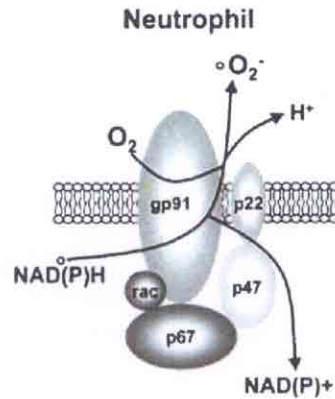
Den akutte behandlingen av svære traumer har de siste tiårene utviklet seg enormt. Takket være rask og effektiv førstehjelp (optimal væsketilførsel og kontroll med respirasjonen på skadestedet, rask transport til sykehus og akutt foreløpig kirurgi) er det nå mulig å overleve med skader som tidligere var ensbetydende med en sikker død. Men selv om primærbehandlingen tilsynelatende har vært vellykket, vil en urovekkende høy andel etter få dager utvikle svikt i flere organer. Denne livstruende komplikasjonen (posttraumatisk systemisk inflammatorisk responssyndrom (SIRS) med flerorgansvikt) må tas hånd om på intensivavdeling og krever store ressurser. Maksimal og langvarig innsats vil likevel ikke kunne hindre at mange går til grunne, og alvorlig SIRS med svikt i flere organer er etter hvert blitt den viktigste årsaken til død i de senere stadier etter store skader. Som antydning er denne situasjonen et resultat av moderne medisin. Ved effektiv primær traumebehandling kan ulykkesofrene reddes fra en rask død. Men i mange tilfeller har man ikke oppnådd annet enn å utsette døden, som nå inntreffer etter uker med intensivbehandling. Trass i omfattende forskning ser tilstanden ut til å bli stadig hyppigere.

De grunnleggende mekanismene bak denne uønskede utviklingen begynner etter hvert å tre klarere fram. Aktivering av sirkulerende hvite blodlegemer (blant dem nøytrofile granulocytter) spiller en sentral rolle. Organismen blir normalt uopphørlig utsatt for bakterier, virus, toksiner, mv. uten at det fører til noen form for sykdom. Det ikke-spesifikke immunforsvaret (som innbefatter granulocytene) identifiserer, reagerer på og fjerner raskt enhver uønsket inntrenger ved hjelp av et helt arsenal endogent produserte substanser. En tilsvarende aktivering finner også sted i forbindelse med store vevsskader og raskt blodtap. I utgangspunktet, før førstehjelpens, kirurgi og intensivbehandlingens tidsalder, økte denne reaksjonen sannsynligvis sjansene for å overleve. Men de ytre forutsetningene har i løpet av få år forandret seg dramatisk. Tilsvarende forandringer i genapparatet har ikke vært mulig. Det som tidligere økte sjansene for å overleve, kan dermed i enkelte tilfeller tvert om bli en trussel for hele organismens eksistens.

Når det uspesifikke immunforsvaret blir aktivert, utløser det en rekke kaskadereaksjoner. Et utall inflammatoriske mediatorer og molekyler kommer ut i sirkulasjonen. Mange av disse er sterkt vevstoksiske og ute av stand til å skille mellom eget og fremmed vev. De to viktigste celledoksiske substansene produsert av aktiverte granulocytter er frie oksygenradikaler (ROS – reactive oxygen species) og proteaser. ROS angriper spontant proteiner, nukleinsyrer, lipider og andre sentrale biologiske molekyler. De ser videre ut til å være essensielle for proteasenes celledoksemekanisme og kan også selv aktivere flere proinflammatoriske kaskadereaksjoner. Overproduksjon av ROS kan altså utløse en svær generalisert betennelsesprosess (SIRS) som ødelegger celledoksjonen, fører til svikt i livsviktige organer og til slutt død. Mange studier har påvist en sammenheng mellom nivået av ROS og graden av organskade.

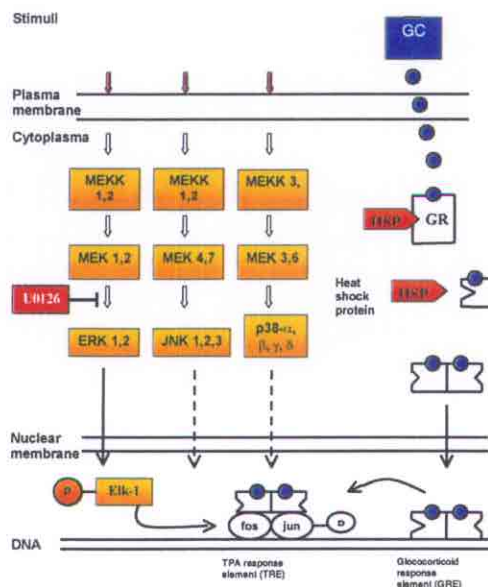
Nøytrofile granulocytter er sentrale i førstelinjeforsvaret mot invaderende mikroorganismer. Effektiviteten er ikke minst avhengig av granulocyttenes evne til å reagere med økt produksjon

av ROS etter et ytre stimulus ("respiratory burst"). Under fysiologiske forhold skjer dette først og fremst ved hjelp av NADPH-oksidasen, et delvis membranbundet enzymsystem som består av



Figur 1: NADPH oksidase i nøytrofile granulocytter. Det membranbundne flavocytochromet b_{558} , som består av $gp91^{phox}$ og $p22^{phox}$, overfører elektroner fra NADPH til O_2 . $p47^{phox}$ og $p67^{phox}$ finnes normalt i cytoplasma, men translokerer til cellemembranen ved aktivering. Det lille G-proteinet Rac har en regulatorfunksjon. (Fra Griendling et al)

de tre cytoplasmakomponentene $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ og Rac-2, samt av et membranbundet flavocytochrom (b_{558}) bestående av $gp91^{phox}$ og $p22^{phox}$. NADPH-oksidasen transporterer elektroner fra NADPH på cytosolsiden av cellemembranen til oksygen på utsiden. Derved dannes de frie oksygenradikalene superoksid (O_2^-) og hydrogenperoksid (H_2O_2). Avhengig av ytre stimuli er normalt fungerende granulocytter i stand til å aktivere og deaktivere dette enzymkomplekset meget raskt (Se figur 1).



Figur 2 Skjematisk framstilling av de tre signalveiene i MAP-kinasesystemet med virkningssted for UO126. Den klassiske virkningsmekanismen for steroider (via genomet) er også tatt med

Kroppens celler lever i et miljø i konstant forandring. For å fungere normalt må de ha et apparat som kan motta ytre signaler, overføre dem til cellenes indre og utløse en rask og hensiktsmessig respons. Kommunikasjonen foregår via en rekke signalveier der mitogenaktivert protein (MAP) kinase spiller en viktig rolle. Tallrike laboratorieforsøk verden over har vist at aktivering av dette kaskadesystemet av kinaser er nært knyttet til flere fysiologiske responser i forbindelse med stress. Deriblant er også viktige effektorfunksjoner i nøytrofile granulocytter, eksempelvis "oxidative burst" med produksjon av ROS. Som vist på figur 2 består MAP-kinasesystemet av minst tre signalveier: p38, jnk (jun N-terminal kinase) og ERK (extracellular signal-regulated kinase). Av disse er ERK-veien kanskje den som er best karakterisert, men man vet fremdeles svært lite om hvordan MAP-kinase-kaskaden bidrar til den inflammatoriske responsen *in vivo*.

Det rimelig å tenke seg at en forbigående reduksjon av ROS-nivået kan hemme den posttraumatiske inflammasjonsreaksjonen og dermed hindre eller redusere den livstruende flerorgansvikten. Dette kan oppnås på ulike måter. Vi har tidligere undersøkt hvordan en moderat reduksjon av kroppstemperaturen påvirker disse reaksjonene (FFI-rapport 05069/2000). I de fleste tilfeller vil det sannsynligvis være mer rasjonelt og effektivt å anvende farmakologiske midler. Det enkleste er naturligvis å bruke medikamenter som er registrert og i vanlig klinisk bruk, for eksempel steroider. De antiinflammatoriske egenskapene til glukokortikoidene har lenge vært kjent. Virkningsmekanismen er ifølge den klassiske teorien knyttet til forandringer i ekspresjon av spesifikke gener, noe som skulle tilsi en viss latenstid før virkningen blir synlig. Denne modellen har imidlertid ikke vært forenlig med alle kliniske observasjoner. De siste årene er det vist at steroidene også virker via ikke-genomiske mekanismer, noe som forklarer hvordan visse effekter kan vise seg i løpet av sekunder. Flere undersøkelser har vist at glukokortikoider hemmer produksjonen av ROS både *in vitro* og hos normale forsøkspersoner *in vivo*. Dessverre er steroidene lite målrettede og har en rekke bivirkninger, spesielt etter langvarig bruk. En har derfor gjennom lang tid forsøkt å finne fram til smalere medikamenter med gunstigere profil.

Stoffer som modulerer signaloverføringen gjennom MAP-kinase-systemet er i denne forbindelsen svært aktuelle. Vi har tidligere i laboratorieforsøk sett på hvordan spesifikke hemmere av de ulike signalveiene i MAP-kinasesystemet påvirker produksjonen av ROS. Basert på disse forsøkene ønsket vi i den foreliggende studien å undersøke hvordan produksjonen av ROS etter skade blir påvirket av behandling med hydrokortison og den spesifikke ERK-hemmeren U0126. Begge stoffene virker umiddelbart på NADPH-oksidase-komplekset og har således samme endelige virkningspunkt. I tillegg påvirker de genomet, noe som også sikrer en mer langvarig virkning.

2 METODER

2.1 Dyremodell

Studien ble gjort på en etablert grisemodell i tilslutning til Forsvarets "Kurs i krigskirurgi" på Lahaugmoen. Til de aktuelle eksperimentene ble det i alt brukt 17 griser med vekt mellom 45 og 55 kg. Etter ankomst til forsøksområdet, ble dyrene lagt i generell narkose. For å sikre

fullstendig smertefrihet under navlenivå ble det i tillegg satt lumbosakral epiduralanestesi. Dyrene ble oralintubert, men spontanventilerte på tube med assistert håndventilasjon etter behov. En venflon ble lagt inn i en ørevene. Til bruk for monitorering og blodprøvetaking ble venstre lyskearterie fripreparert og kateterisert med et Secalon-T sentralvenekateter.

2.2 Eksperimentell prosedyre

Dyrene ble deretter i narkose overført til nærliggende skytebane, opphengt i galge og utsatt for et standardisert traume: Ett rifleskudd fra 25 m mot høyre lår, samt ett pistolskudd fra kort hold mot øvre abdomen. For å unngå akutt utblødning og død før kirurgien kunne påbegynnes, unngikk man bevisst å skade leveren og de store abdominalkarene. Sanitetssoldater satte umiddelbart i gang førstehjelp. Respirasjonen ble kontrollert, sårhulene pakket og komprimert, og intravenøs væsketilførsel påbegynt. Grisene var på forhånd tilfeldig inndelt i to grupper. Gruppe 1 (n=9) fikk 5 minutter etter siste skudd hydrokortison (Solu-Cortef®) 250 mg i ørevenen, gruppe 2 (n=8) tilsvarende mengde fysiologisk saltvann. Dyrene ble deretter transportert til nærliggende feltsykehus for akutt og livreddende kirurgi. Skadeomfanget ble evaluert ved hjelp av *Abbreviated Injury Scale* (AIS). Blodtrykk, temperatur og arteriell oksygenmetning ble kontinuerlig overvåket under operasjonen. Forsøkene ble avsluttet etter 60 minutter. Væskebehandling (NaCl og dextran 70/Ringer) ble gitt etter behov for å kompensere for blødning og opprettholde et akseptabelt blodtrykk.

2.3 Prøvetaking

Blodprøver ble tatt på tre ulike tidspunkter: Umiddelbart etter at arteriekateteret var på plass i lyskepulsåren (normalprøve, tidspunkt 0), 5 minutter etter siste skudd (like før Solu-Cortef ble gitt) og 60 minutter etter skyting (sluttprøve). Ved tidspunktene 0 og 5 ble det tappet 30 ml blod, mens volumet ble økt til 50 ml ved 60 minutter for å kompensere for uttynning av alle blodkomponenter som følge av blødning og væsketilførsel. EDTA ble brukt som antikoagulas. Prøvene ble straks satt på is og etter forsøkets slutt transportert til laboratoriet. Plasmaverdiene for de tidlige cytokinene TNF α og IL-6, markører for organskade i lever (ALAT og ASAT) og nyre (kreatinin og urea) ble målt ved tidspunkt 60 min. Laktatverdiene ble bestemt ved tidspunkt 0 og 60, hemoglobin og hematokrit ved 0, 5 og 60.

2.4 Måling av DCF fluorescens

Syntesen av ROS ble målt i granulocytter tappet ved tidspunktene 0, 5 og 60 minutter. Granulocytene ble isolert fra fullblod etter Bøyums metode. Produksjonen av ROS ble målt ved hjelp av den fluorescerende proben 2,7-diklorofluorescin-diacetat (DCFH-DA). DCFH-DA diffunderer fritt over cellemembranen. Intracellulært avspaltes acetatgruppen av esteraser. Det gjenværende DCFH fluorescerer ikke, men oksyderes umiddelbart av ROS til DCF, som er fluorescerende (530 nm). Den intracellulære fluorescensen ble målt hver annet minutt i 60 minutter i spektrometer. ROS ble også målt etter behandling med protein kinase C-aktivatoren PMA (PMA 10^{-7} M). Granulocytter fra 9 tilfeldig valgte dyr (5 fra gruppe 1, 4 fra gruppe 2) ble testet på samme måte etter behandling med ERK-hemmeren U0126.

2.5 Statistisk analyse

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

3 RESULTATER

3.1 Basalverdier

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

Tab. 1

Haemodynamics and blood biochemistry (mean \pm SEM)

Group	controls (n=8)	hydrocortisone (n=9)	controls	hydrocortisone
Time	0 min	0 min	60 min	60 min
Systolic arterial pressure (mm Hg)	110.0 \pm 12.0	100.0 \pm 10.0	96.0 \pm 415.4 *	93.6 \pm 6.1 *
S _a O ₂ (%)	96.9 \pm 0.8	96.3 \pm 1.1	87.5 \pm 5.6 *	91.8 \pm 2.7 *
Hb (g/dl)	10.5 \pm 0.2	10.5 \pm 0.2	5.1 \pm 0.6 *	5.1 \pm 0.5 *
White blood cells (10 ⁹ /l)	17.3 \pm 1.0	16.8 \pm 1.1	5.4 \pm 0.8 *	6.8 \pm 0.7 *
Lactate (mmol/l)	1.8 \pm 0.2	2.3 \pm 0.4	3.8 \pm 0.5 *	4.0 \pm 0.6 *
Cortisol (nmol/l)	114.9 \pm 17.6	95.3 \pm 12.7	99.2 \pm 30.2	1934.6 \pm 515.2*#

AST, ALT, BUN, creatinine, and IL-6 did not change from baseline

* p< 0.05 compared to baseline; # p<0.05 between groups

3.2 Klinikk og overlevelse

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

3.3 Fysiologiske variable

Skuddskadene førte til alvorlig blødning med raskt blodtap hos alle dyrene. Dette gjenspeilet seg i et betydelig og parallelt fall i blodprosent (hemoglobin) som vist på figur 3 (Se også tabell 1). Det var et tilsvarende fall i hvite blodlegemer. Systolisk blodtrykk falt signifikant, men holdt seg likevel stort sett på akseptable nivåer. Dette skyldtes ikke minst liberal væsketilførsel, som var ganske lik mellom gruppene. Gruppe 1 fikk i alt NaCl 2,5 \pm 0,3 l og Dextran/Ringer 1,8 \pm 0,3 l, mens de tilsvarende tallene for gruppe 2 var 2,4 \pm 0,4 og 2,0 \pm 0,2 l. Laktat steg signifikant fra

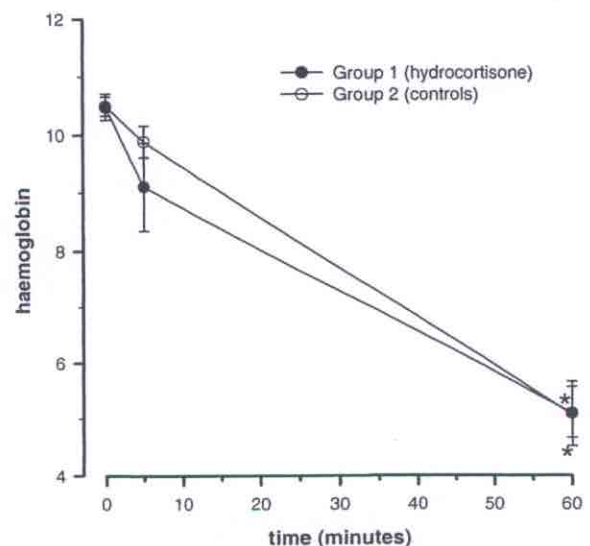


Fig. 3: Hemoglobinfall etter skudd mot høyre lår og øvre abdomen. * p< 0,05 sammenliknet med foregående måling.

basalverdiene, uten at det var mulig å finne noen forskjell mellom gruppene. Det ble også gjort analyser for å undersøke organ-funksjonen (transaminasene ASAT og ALAT som mål for levercelleintegritet, kreatinin/urea for nyrefunksjon). Ingen av dem økte fra utgangsverdiene. Det var heller ingen økning i de proinflammatoriske cytokinene IL-6 eller TNF- α .

3.4 Fluoroscensspektroskopi

Den spontane produksjonen av ROS fra granulocytene er vist på figur 4. Etter 60 minutter hadde syntesen av ROS i kontrollgrisene økt til $111,6 \pm 8,5$ % av utgangsverdiene (NS), mens tilsvarende tall for dyrene som fikk hydrokortison, var $78,4 \pm 4,9$ % ($p < 0,05$). På dette

tidspunktet var det også en statistisk signifikant forskjell mellom de to gruppene. Etter stimulering med PMA fant vi samme tendens, men stor spredning av resultatene medvirket til at forskjellen mellom gruppene ikke lenger var signifikant. I hydrokortisongruppa falt ROS til $78,9 \pm 3,9$ % ($p < 0,05$), mens de tilsvarende tallene for kontrollene var $125,1 \pm 18,5$ % (NS). Behandling med U0126 førte til at produksjonen av ROS falt med mer enn to tredeler, uavhengig av tidspunkt eller forutgående behandling med hydrokortison (Se tabell 2).

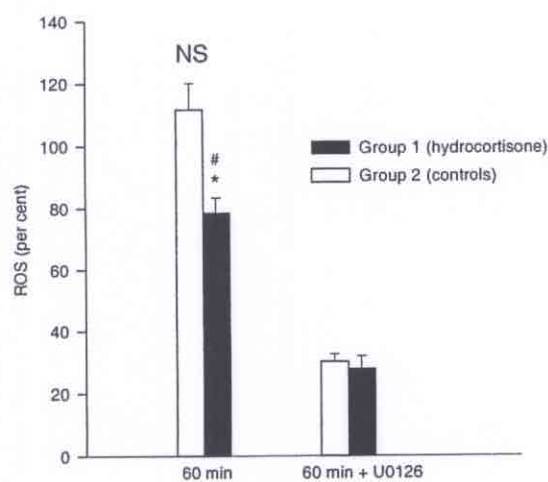


Fig. 4: Hemmende effekt av hydrokortison og U0126 på ROS-produksjonen i sirkulerende granulocytter 60 minutter etter skuddskade. * $p < 0,05$ sammenliknet med basalverdi; # $p < 0,05$ mellom gruppene.

Tab 2

Effect of treatment with the ERK-inhibitor U0126 on ROS production in granulocytes (per cent of production in untreated cells; mean \pm SEM)

	Time after gun shot injury (minutes)	
	0	60
Remaining ROS production (per cent)		
Hydrocortisone (n=5)	$29,2 \pm 5,2$	$27,6 \pm 4,2$
Controls (n=4)	$32,8 \pm 6,5$	$30,0 \pm 2,4$

4 DISKUSJON

4.1 Viktigste funn

Store skader og blødning aktiverer meget raskt immunkompetente celler, inklusive sirkulerende granulocytter. Dette ble reflektert i den økte produksjonen av ROS målt i blod som ble tappet 60 minutter etter skyting. Hydrokortison 250 mg gitt intravenøst kort tid etter skyting hadde en moderat hemmende virkning på syntesen av frie oksygenradikaler. Den etterfølgende *in vitro*-behandlingen av samme celletype med ERK-hemmeren U0126 førte til et kraftig fall i ROS-syntesen, uavhengig av tidligere *in vivo*-aktivering eller behandling med hydrokortison.

4.2 Dyremodell

Studien ble gjennomført i tilslutning til Forsvarets årlige "Kurs i krigskirurgi" som primært er beregnet på å øve nøkkelpersonell opp i å behandle omfattende skuddskader. Her i landet har slike skader vært sjeldne, men det betyr samtidig at det er relativt få som har den nødvendige erfaring på dette feltet. Desto viktigere er det at et slikt kurs blir realistisk og omfatter flest mulig ledd i behandlingsskjeden fra førstehjelp på skadestedet, via transport, mottak, anestesi og væskebehandling til den akutte livreddende kirurgien.

Under planleggingen av vår undersøkelse var det viktig å legge opp forberedelse og innsamling av dataene på en slik måte at det ikke skulle komme i konflikt med krigskirurgikursets primære formål. Ikke minst takket være positiv innstilling og et meget godt samarbeid med de ansvarlige fra Forsvarets side tror vi denne målsettingen ble oppfylt.

Selv om vi på grunn av omstendighetene måtte gjøre enkelte tilpasninger, blant annet når det gjaldt lengden på observasjonsperioden, har selve dyremodellen mange unike sider som vi mener det er viktig å utnytte også i mer basal forskningssammenheng. Forholdene er realistiske, men både planlegging og gjennomføring av et så omfattende opplegg krever store ressurser. Uten tilknytning til krigskirurgikurset ville det derfor ha vært urealistisk å gjennomføre en studie av denne typen. Når resultatene skal vurderes, er det også en fordel at det ble brukt relativt like store og sammenlignbare dyr, skadene var omfattende og standardiserte, og det hele ble gjennomført i løpet av få dager.

4.3 Kortikosteroider

Mange studier har vist at det er mulig å hemme produksjonen av ROS etter skade, og at dette kan ha en gunstig virkning på organfunksjon og overlevelse. I en tidligere studie på rotter i blødningssjokk har vi selv observert slike effekter når kroppstemperaturen ble senket til 33 °C. Mange har også vist at kortikosteroider hemmer granulocytffunksjonen, fortrinnsvis ved å regulere ekspresjonen av gener som styrer produksjonen av sentrale inflammatoriske proteiner. At disse medikamentene også har en akutt ikke-genomisk virkningsmekanisme har vært mer omdiskutert. Dandona *et al* fant at hydrokortison gitt til friske forsøkspersoner (100 mg per 60-100 kg) maksimalt reduserte ROS med 74 % etter 2 timer. Etter 1 time var reduksjonen like under 60 %. Derimot kunne Toft *et al* ikke finne at forbehandling med metylprednisolon (30 mg/kg) overhodet påvirket ROS-nivået etter større kirurgiske inngrep (kardiopulmonal bypass).

Mange faktorer kan tenkes å være ansvarlige for slike tilsynelatende forvirrende resultater. Det er nok å nevne stikkord som steroidtype, dose, tidspunkt for injeksjon i forhold til et eventuelt traume, styrke og standardisering av utløsende stimulus, sammensetning av den undersøkte populasjonen, speciesforskjeller osv. I den foreliggende studien mener vi å ha fått til et maksimalt standardisert opplegg som gjør de to gruppene lett sammenlignbare. Dette gjelder sentrale variabler som alder og størrelse på dyrene, skadeomfang, tidspunkt for behandlingsstart og behandlingsmåte. Hydrokortison viste seg å ha en signifikant hemmende effekt på ROS-produksjonen, et utfall som ikke er overraskende, og som kan forklares ut fra mekanistiske studier gjort i mange laboratorier. Det er overbevisende vist at steroider hemmer både translokasjon og fosforylering av p47^{phox}, et nøkkelement i NADPH-oksidasen. Våre resultater antyder at effekten er relativt moderat. Selv om vi fikk det samme generelle inntrykket etter at granulocytene ble stimulert med PMA, forsvant den statistiske signifikansen mellom gruppene. PMA stimulerer cellene maksimalt og ufysiologisk, slik at det kanskje er grunn til å legge større vekt på resultater uten denne ekstra aktiveringen. Likevel bør resultatene tolkes med en viss forsiktighet. Det er også grunn til å peke på tidspunktet for steroidinjeksjonen. Vi målte ingen økt ROS-aktivitet i blodprøver tatt 5 minutter etter skyting, det vil si like før steroidene ble tilført. Andre studier har vist at økt oksidativt stress fører til redusert følsomhet for steroider. Vi må derfor anta at hydrokortisoninjeksjonen ble gitt på et kritisk tidspunkt og at senere behandling kanskje ville ha vært mindre effektiv.

4.4 ERK-hemmeren U0126

Behandling med ERK-hemmeren U0126 viste seg å ha en rask og kraftig virkning. ROS-produksjonen falt med mer enn 2/3, uavhengig av tidligere behandling med hydrokortison eller aktivering. Det var ikke tegn til synergistisk effekt mellom de to stoffene. I laboratorieundersøkelser er det vist at ERK 1/2 regulerer p47^{phox} enten direkte eller indirekte via andre kinaser og spiller en sentral rolle i å utløse effektorfunksjonene i nøytrofile granulocytter. Det er således ingen overraskelse at blokade av ERK hemmer ROS-produksjonen, men virkningen var langt sterkere enn på forhånd antatt. Selv om andre har vist at U0126 er 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 enkeltrapper tyder på at ERK-veien er sentral for den inflammatoriske responsen også *in vivo*.

4.5 Oppsummering

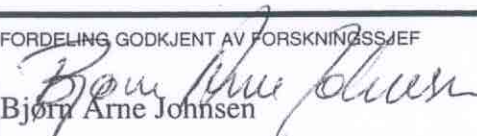
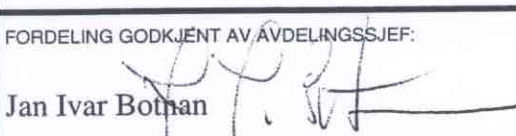
Store skader og blødning kan utløse en akutt forstyrrelse i kroppens immunforsvar og starte en svær og generalisert inflammatorisk reaksjon som ikke skiller mellom eget og fremmed vev. Ved forbigående å modulere denne reaksjonen håper en å hindre eller hemme et ugunstig forløp som forholdsvis raskt fører til nedsatt funksjon i livsviktige organer, ofte etterfulgt av senere immunsvikt som legger organismen åpen for lokale infeksjoner, sepsis og septisk sjokk. ROS spiller en sentral rolle i denne utviklingen. Resultatene antyder at steroider kan virke gunstig på denne indikasjonen. Det samme gjelder kanskje i enda høyere grad ERK-hemmeren U0126. Fremdeles mangler forsøk med U0126 på intakte dyremodeller. Ved FFI/BM har vi for kort tid siden satt i gang et pilotprosjekt for å undersøke effekten av U0126 på den akutte inflammasjonsprosessen etter blødningssjokk i en etablert rottemodell.

5 LITTERATUR

- Brattebø J, Wisborg T, Lønn R, Pillgram-Larsen J, Brønstad A. Hvordan øve kirurgiske team i skadebegrensende kirurgi? Tidsskr Nor Lægeforen 2001;121:1513-1515.
- Dallegri F, Ottonello L. Tissue injury in neutrophilic inflammation. Inflamm Res 1997;46:382-391.
- Dandona P, Aljada A, Ghanim H, Mohanty P, Hamouda W, Al-Haddad W. Acute suppressive effect of hydrocortisone on p47phox subunit of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. Metabolism 2001;50:548-552.
- 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;27:2442-2444.
- Duncia JV, Santella III JB, Higley AH, Pitts WJ, Wityak J et al. MEK inhibitors: The chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products. Bioorg Med Chem Lett 1998;8:2839-2844.
- Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. Multiple actions of steroid hormones - a focus on rapid, nongenomic effects. Pharmacol Rev 2000;52:513-556.
- Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, et al. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. J Biol Chem 1998;273:18623-18632.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase. Role in cardiovascular biology and disease. Circ Res 2000;86:494-501.
- Gundersen Y, Vaagenes P, Pharo A, Valø ET: Mild/moderat hypotermi hemmer den akutte inflammatoriske responsen etter akutt blødning. FFI/Rapport-2000/05069.
- Jaeschke H, Smith CW. Mechanism of neutrophil-induced parenchymal damage. J Leukoc Biol 1997;61:647-653.
- Jaffee BD, Manos EJ, Collins RJ, Czerniak PM, Favata MF, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM. Inhibition of MAP kinase kinase (MEK) results in an anti-inflammatory response *in vivo*. Biochem Biophys Res Comm 2000;268:647-651.
- Napolitano LM, Ferrer T, McCarter RJ, Scalea TM. Systemic inflammatory response syndrome score at admission independently predicts mortality and length of stay in trauma patients. J Trauma 2000;49:647-653.
- Pillgram-Larsen J. Traumemottak ved norske sykehus. Tidsskr Nor Lægeforen 2001;20:121.
- Rose S, Marzi I. Mediators in polytrauma - pathophysiological significance and clinical relevance. Langenbeck`s Arch Surg 1998;383:199-208.
- Svennevig JL, Pillgram-larsen J, Fjerld NB, Birkeland S, Semb G. Early use of corticosteroids in severe closed chest injuries: a 10-year experience. Injury 1987;18:309-312.
- Tidemann CF. Krigskirurgi. Tidsskr Nor Lægeforen 1992;17:112.
- Toft P, Christiansen K, Tonnesen 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;31:283-288.
- Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. N Engl J Med 1989;320:365-376.
- Yao Y-M, Redl H, Bahrami S, Schlag. The inflammatory basis of trauma/shock-associated multiple organ failure. Inflamm Res 1998;47:201-210.

FORDELINGSLISTE

FFIBM
Dato: 14 februar 2002

RAPPORTTYPE (KRYSS AV) <input checked="" type="checkbox"/> RAPP <input type="checkbox"/> NOTAT <input type="checkbox"/> RR	RAPPORT NR. 2002/00579	REFERANSE FFIBM/827/159	RAPPORTENS DATO 14 februar 2002
RAPPORTENS BESKYTTELSESGRAD UGRADERT		ANTALL EKS UTSTEDT 58	ANTALL SIDER 16
RAPPORTENS TITTEL TIDLIG BEHANDLING MED HYDROKORTISON OG/ELLER U-0126 HEMMER SYNTESSEN AV FRIE OKSYGENRADIKALER ETTER SKUDDSKADER HOS GRIS		FORFATTER(E) GUNDERSEN Y, VAAGENES P, HAUGEN A H, PHARO A, VALØ E Try, MYHRE O, ANDERSEN J Mørch, SUNDNES K O, OS Ø, PILLGRAM-LARSEN J	
FORDELING GODKJENT AV FORSKNINGSSJEF  Bjørn Arne Johnsen		FORDELING GODKJENT AV AVDELINGSSJEF:  Jan Ivar Botnan	

EKSTERN FORDELING
INTERN FORDELING

ANTALL	EKS NR	TIL	ANTALL	EKS NR	TIL
1		Sjef FO/SAN	14		FFI-Bibl
1		Sjef med Avd FO/SAN	1		Adm direktør/stabssjef
1		Forsvarets overlege i kirurgi	1		FFIE
		J Pillgram- Larsen	1		FFISYS
1		Forsvarets overlege i anestesi	1		FFIBM
		Ole Sundnes	1		FFIN
1		SANINSP/Hæren, Svein Ødegården	5		Yngvar Gundersen, FFIBM
1		SANINSP/Sjøforsvaret,	5		Per Vaagenes, FFIBM
		Jan Sommerfeldt Pettersen	1		Sigrun Sterri, FFIBM
1		Stabslegen Luftforsvaret, Røsjø	1		Ann Helen Haugen, FFIBM
1		Lege FMI, Jan Ove Owe	1		Bjørnar Hassel, FFIBM
1		Sjef FML Bjørn Berdal	1		Else Marie Fykse, FFIBM
1		Akershus regiment, Per Egil Hesla	1		Bjørn Johnsen, FFIBM
1		DK-legen, Hamar	1		Jan Ivar Botnan, FFIBM
1		Krigsskolen, Harald Jodalen	1		Arne Bøyum, FFIBM
1		Professor Per Lelleaasen,	1		Knut Kristian Skrede, FFIBM
		Kleivvn 16 d, 1340 Bekkestua	1		Jannike Mørch Andersen, FFIBM
1		Veterinær SANREG Øystein Os	1		Oddvar Myhre, FFIBM
					FFI-veven

FFI-K1

Retningslinjer for fordeling og forsendelse er gitt i Oraklet, Bind I, Bestemmelser om publikasjoner for Forsvarets forskningsinstitutt, pkt 2 og 5. Benytt ny side om nødvendig.