

## **FFI RAPPORT**

### **GLYSIN SOM DEL AV DET AKUTTE RESUSCITERINGSREGIMET ETTER SKUDDSKADER HOS GRIS. Modulering av den tidlige inflammatoriske responsen**

GUNDERSEN Yngvar, VAAGENES Per, MØRCH ANDERSEN  
Jannike, DREIEM Anne, HAUGEN Ann Helen, MYHRE Oddvar,  
REISTAD Trine, STERRI Sigrun, THRANE Ingjerd

**FFI/RAPPORT-2003/00615**



FFIBM/827/159

Godkjent  
Kjeller 12. februar 2003

Bjørn Arne Johnsen  
Forskningsjef

**GLYSIN SOM DEL AV DET AKUTTE  
RESUSCITERINGSREGIMET ETTER  
SKUDDSKADER HOS GRIS. Modulering av den  
tidlige inflammatoriske responsen**

GUNDERSEN Y, VAAGENES P, MØRCH ANDERSEN  
J, DREIEM A, HAUGEN A H, MYHRE O, REISTAD T,  
STERRI S, THRANE I

FFI/RAPPORT-2003/00615

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



P O BOX 25  
 NO-2027 KJELLER, NORWAY  
**REPORT DOCUMENTATION PAGE**

**SECURITY CLASSIFICATION OF THIS PAGE**  
 (when data entered)

1) PUBL/REPORT NUMBER FFI/RAPPORT-2003/00615	2) SECURITY CLASSIFICATION UNCLASSIFIED	3) NUMBER OF PAGES 20
1a) PROJECT REFERENCE FFIBM/827/159	2a) DECLASSIFICATION/DOWNGRADING SCHEDULE -	
4) TITLE GLYSIN SOM DEL AV DET AKUTTE RESUSCITERINGSREGIMET ETTER SKUDDSKADER HOS GRIS. Modulering av den tidlige inflammatoriske responsen  GLYCINE AS PART OF THE IMMEDIATE RESUCITATION REGIME AFTER GUNSHOT INJURIES IN THE PIG: Modulation of the early inflammatory response		
5) NAMES OF AUTHOR(S) IN FULL (surname first) GUNDERSEN Yngvar, VAAGENES Per, MØRCH ANDERSEN Jannike, DREIEM Anne, HAUGEN Ann Helen, MYHRE Oddvar, REISTAD Trine, STERRI Sigrun, THRANE Ingjerd		
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>Glycine</u> c) <u>Glycine</u> d) <u>Reactive oxygen species</u> d) <u>Frie oksygenradikaler</u> e) _____ e) _____		
THESAURUS REFERENCE:		
8) ABSTRACT As part of a training course in Traumatology and War Surgery organised by the Norwegian Defence Medical Headquarter at Lahaugmoen camp we have used glycine as part of the immediate resuscitation regime after gunshot injuries in the pig. Effects on the early inflammatory response, using the synthesis of reactive oxygen species (ROS) as immune function marker, were investigated. 22 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=13) received an iv infusion of Glycine 7.5 g over 30 min, group 2 (n=9) a similar infusion of normal saline. The infusions were started 5 min after the last shot. Blood samples were drawn before trauma and 75 min after shooting. Circulating granulocytes were isolated and the production of ROS measured. The granulocytes were <i>in vitro</i> treated with SB203580, U0126, FK506, or Wortmannin. Glycine moderately depressed ROS production. U-0126 and Wortmannin further reduced the synthesis of ROS, and to about the same extent. SB203580 was least effective. No positive synergy appeared to exist between glycine and the individual inhibitors. We conclude that glycine inhibits ROS synthesis after trauma. Wortmannin and U0126 proved to be the most potent inhibitors. The p38 branch of the MAPK cascade appears to be less important as a signalling pathway after trauma than the ERK branch.		
9) DATE 12. February 2003	AUTHORIZED BY This page only Bjørn Arne Johnsen	POSITION Director of Research

ISBN 82-464-0696-5

**UNCLASSIFIED**

**SECURITY CLASSIFICATION OF THIS PAGE**  
 (when data entered)



**INNHOLD**

	<b>Side</b>	
1	INNLEDNING	7
2	METODER	9
2.1	Dyremodell	9
2.2	Eksperimentell prosedyre	9
2.3	Prøvetaking	10
2.4	Overvåking	10
2.5	Måling av DCF fluorescens	10
2.6	Statistisk analyse	10
3	RESULTATER	11
3.1	Basalverdier	11
3.2	Glysin	11
3.3	Klinikk og overlevelse	11
3.4	Fysiologiske variabler	11
3.5	Fluorescensspektroskopi	12
4	DISKUSJON	13
4.1	Viktigste funn	13
4.2	Dyremodell	13
4.3	Glysin	14
4.4	"Respiratory burst"	14
4.5	Hemmere	15
4.5.1	p38-hemmeren SB203580	15
4.5.2	ERK-hemmeren U0126.	15
4.5.3	NFAT-hemmeren FK506 (tacrolimus)	16
4.5.4	PI3-K-hemmeren Wortmannin	17
4.6	Oppsummering	17
5	REFERANSER	18
	Fordelingsliste	20





## GLYSIN SOM DEL AV DET AKUTTE RESUSCITERINGSREGIMET ETTER SKUDDSKADER HOS GRIS. Modulering av den tidlige inflammatoriske responsen

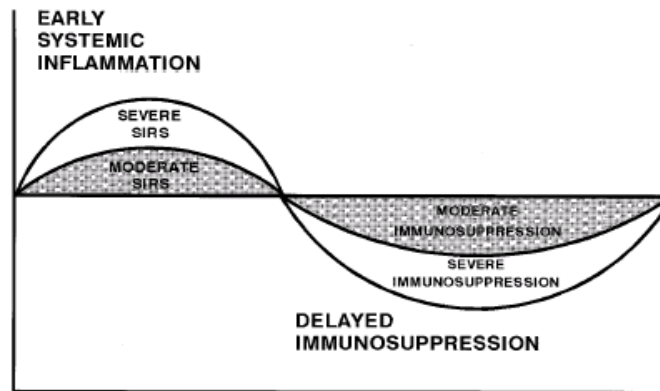
### 1 INNLEDNING

Pasienter med omfattende skader er en stor terapeutisk utfordring både for sivil og militær medisin. Selv i tilfeller der hjelpemannskapene kommer raskt til skadestedet og straks får satt i gang optimal og tilsynelatende vellykket behandling, vil en urovekkende høy andel av pasientene (opptil 30 %) etter få dager utvikle nedsatt funksjon eller svikt i flere organer (1,2). En årsak til dette er ubalanse mellom den totale vevsdestruksjon og organismens evne til å gjenopprette et normalt ”indre miljø” (3,4). Posttraumatisk systemisk inflammatorisk responssyndrom med flerorganssvikt er en livstruende komplikasjon. Den krever behandling på intensivavdeling og legger beslag på store ressurser. 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 (5).

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. Ved aktivering frigjøres en rekke potensielt toksiske produkter, blant annet frie oksygenradikaler og proteaser (7,8). 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” granulocytene slik at de reagerer ekstra kraftig på en ny ytre påvirkning, eksempelvis et nødvendig kirurgisk inngrep (”second hit”). Korrekt akuttbehandling på skadested, under transport og i forbindelse med foreløpig kirurgi er derfor også en nøkkel til å kontrollere det posttraumatiske sykdomsforløpet.

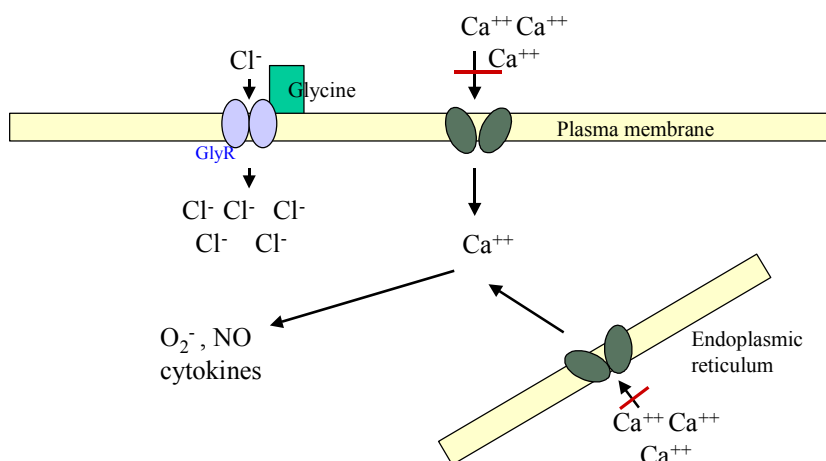
I behandlingen står en altså her overfor et tosidig problem. Den øyeblikkelige overaktiveringen av kroppens kaskadereaksjoner fører til akutte skader på celler og vev. Etter hvert (få dager) vil disse reaksjonene ”brenne ut” og bli erstattet av en tilstand med nedsatt aktivering. Multitraumatiserte pasienter er i denne siste perioden svært utsatt for infeksjoner av alle slag. Ikke bare er evnen til å bekjempe invaderende mikrober nedsatt; i tillegg er forholdene for uhemmet bakterieinnvekst ekstra store. Nekrotisk vev er et ypperlig oppvekstmedium og nesten umulig å fjerne fullstendig, selv med den mest omhyggelige kirurgi. Problemet forsterkes ved at blodtilførselen til omkringliggende vev ofte er så marginal at de nekrotiske områdene har en tendens til å øke i utstrekning.

Så langt har det ikke vært mulig å fastslå en sikker sammenheng mellom intensiteten på den akutte inflammatoriske responsen og den påfølgende svikten i immunforsvaret. Mange mener imidlertid at en slik sammenheng eksisterer og at en ved å hemme den umiddelbare proinflammatoriske responsen også vil redusere styrken på den senere kompensatoriske anti-inflammatoriske tilstanden (fig 1). På denne måten vil det i teorien være mulig både å minske inflammatoriske vevsskader og å bevare funksjoner som er livsviktige for infeksjonsforsvaret.



Figur 1. Teoretisk forhold mellom den akutte systemiske inflammasjonen og den påfølgende antiinflammatoriske tilstanden (fra 9).

Den ikke-essensielle aminosyren glysin har virkninger som kan være av interesse i denne sammenhengen. Eksempelvis er det vist at glysin beskytter proksimale tubuli og hepatocytter mot hypoksi, bedrer funksjon og overlevelse av transplantat etter levertransplantasjon, hemmer økningen i plasma  $\text{TNF-}\alpha$  etter endotoksininjeksjon og hemmer aktiveringen av  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  ved blødningssjokk. Alle disse effektene skyldes påvirkning av glysinstyrte klorkanaler (fig 2). Når glysin binder seg til reseptoren, strømmer klorioner lettere gjennom klorkanalene både i ytre og indre membraner i cellen. Membranene blir derved hyperpolariserte. Kalsium er en sentral mediator for ytre stimuli. Sekundær påvirkning av de spenningsavhengige kalsiumkanalene hemmer influks av kalsium, noe som gjør cellene mindre sensitive overfor inflammatoriske stimuli. Glysinstyrte klorkanaler ble først påvist i nerveceller, men er etter hvert funnet i flere typer leukocytter, deriblant nøytrofile granulocytter (10).



Figur 2. Skjematisert framstilling av virkningsmekanismen til glysin. Når glysin binder seg til reseptorene, strømmer  $\text{Cl}^-$  -ioner inn cellen og hyperpolariserer alle membraner. Dette hemmer influks av  $\text{Ca}^{++}$ -ioner til cytoplasma, både fra det endoplasmatiske retikulum og fra det ekstracellulære rom.

Når et enkelt og lett tilgjengelig stoff som glysin viser seg å ha så kraftige antiinflammatoriske egenskaper, ble det naturlig å spørre om det også kunne brukes til å redusere den akutte og ofte overdrevne aktiveringen av den inflammatoriske responsen etter større skader og blødninger.

Alvorlige bivirkningene eksisterer knapt, samtidig som effektene er kortvarige og forbigående. Det er derfor lite sannsynlig at immunforsvaret vil bli negativt påvirket i den påfølgende fasen, som vanligvis er dominert av generell immunoparalyse.

Det finnes en lang rekke andre stoffer som kan tenkes å påvirke den inflammatoriske responsen. I tillegg til *in vivo*-forsøkene med glysin, testet vi også effektene av U0126 (hemmer ERK-grenen i MAPK-kaskaden), SB203580 (hemmer p38-grenen i MAPK-kaskaden), FK506/Tacrolimus (hemmer translokasjon av transkripsjonsfaktorer, først og fremst "nuclear factor of activated T-cells" (NFAT), samt p38 og JNK) og Wortmannin (hemmer fosfatidyl-inositol-3-kinasen). Disse forsøkene ble gjort *in vitro* på granulocytter etter forutgående *in vivo*-aktivering som følge av skuddskader/kirurgi.

Formålet med studien var altså først og fremst å undersøke hvordan glysin, brukt som del av det akutte resusciteringsregimet, kan påvirke den umiddelbare posttraumatiske inflammatoriske aktiveringen av sirkulerende granulocytter. Produksjonen av frie oksygenradikaler ble brukt som målestokk. Dessuten ønsket vi å undersøke effekten av et utvalg blokkere på samme parameter. Denne rapporten omtaler de foreløpige resultatene.

## 2 METODER

### 2.1 Dyremodell

Undersøkelsen ble utført på en etablert grisemodell brukt ved Forsvarets "Kurs i krigskirurgi og traumatologi" på Lahaugmoen. Til de aktuelle eksperimentene ble det benyttet 22 griser med vekt 40-55 kg. Etter ankomst til forsøksområdet la veterinæren dyrene i narkose. De ble oralintubert og spontanventilerte deretter på tuben. Assistert håndventilasjon ble gitt etter behov. For å sikre fullstendig smertefrihet ble det også 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). Venflon ble lagt inn i to ørevener 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.

### 2.2 Eksperimentell prosedyre

Dyrene ble i narkose overført til skytebanen, 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 3). Skuddretning og profil var avmerket av Forsvarets veterinærer. For å unngå akutt utblødning unngikk en bevisst å skade de store abdominalkarene. Sanitetssoldater ga umiddelbart førstehjelp. Respirasjonen ble kontrollert, sårene pakket og komprimert, og intravenøs væsketilførsel påbegynt. Grisene var på forhånd tilfeldig inndelt i to grupper som enten fikk glysin 7,5 g oppløst i 500 ml NaCl 0,2 % (tilsvarende omtrent 150 mg/kg) intravenøst over 30 minutter eller tilsvarende mengde 0,9 % NaCl. Dyrene ble deretter transportert til feltsykehuset for akutt kirurgi. Skadeomfanget ble evaluert ved hjelp av "Abbreviated Injury Scale". Blodtrykk, temperatur og arteriell oksygenmetning ble kontinuerlig overvåket under operasjonen. Væskebehandling (0,9% NaCl og dekstran 70/Ringeracetat) ble gitt etter behov for å kompensere for blødning og opprettholde et akseptabelt blodtrykk. Studien ble avsluttet etter 75 minutter.



Figur 3. Anestisert forsøksgris opphengt i galge. Innskuddene på høyre lår og abdomen er avmerket med kryss. Skuddbanen gjennom øvre del av abdomen er også antydnet.

### 2.3 Prøvetaking

Blodprøver ble tatt umiddelbart etter at arteriekateteret var på plass (normalprøve, tidspunkt 0) og 75 minutter etter skyting (sluttprøve). EDTA ble brukt som antikoagulant. Prøvene ble straks satt på is og transportert til laboratoriet ved FFI/BM hvor plasma ble separert og nedfrosset ved  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Plasmaverdiene for laktat, samt markører for organskade i lever (ALAT og ASAT) og nyre (kreatinin og karbamid) ble målt ved tidspunkt 0 og 75 min, IL-6 ved tidspunkt 75. Glysin ble bestemt med HPLC på tidspunkt 0 og 75.

### 2.4 Overvåking

Systolisk og diastolisk blodtrykk, oksygenmetning og øsofagustemperatur ble kontinuerlig overvåket etter at dyrene var ankommet til feltsykehuset.

### 2.5 Måling av DCF fluorescens

Syntesen av reaktive oksygenforbindelser (ROS) ble målt i granulocytter tappet ved tidspunktene 0 og 75 minutter. Granulocytene ble isolert fra fullblod etter Bøyums metode. Produksjonen av ROS ble målt ved hjelp av den fluorescerende proben 2,7-diklorofluorescindiacetat (DCFH-DA). DCFH-DA diffunderer fritt over cellemembranen. Intracellulært avspaltes acetatgruppene 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 ( $\text{PMA } 10^{-7}\text{ M}$ ).

*In vitro* testet vi på samme måte produksjonen av ROS etter behandling med ERK-hemmeren U0126 ( $10\text{ }\mu\text{M}$ ), p38-hemmeren SB203580 ( $1\text{ }\mu\text{M}$ ), den kombinerte p38- og JNK, og NFAT-hemmeren FK506 ( $10\text{ }\mu\text{M}$ ) og fosfatidylinositol-3-kinase (PI3-K)-hemmeren Wortmannin ( $25\text{ nM}$ ).

### 2.6 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 hvert 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).

#### 3.2 Glysin

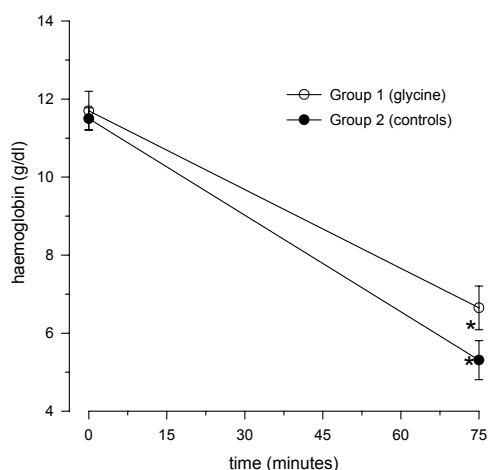
For å kontrollere at alle dyrene i glysingruppa virkelig fikk den behandling som var foreskrevet, ble glysinverdiene i serum bestemt. Ved tidspunkt 75 min (tre kvarter etter at infusjonen var avsluttet) hadde glysinverdiene økt fra  $607 \pm 14$  til  $2022 \pm 120$   $\mu\text{mol/l}$  ( $p < 0,05$ ), sammenliknet med  $631 \pm 35$  og  $735 \pm 39$   $\mu\text{mol/l}$  ( $p < 0,05$ ) hos kontrollene. Som ventet var forskjellen mellom gruppene ved 75 min også statistisk signifikant.

#### 3.3 Klinikk og overlevelse

Alle dyrene fikk sammenlignbare skader som ved hjelp av Abbreviated Injury Scale ble vurdert til AIS 2. Samtlige dyr overlevde de første 75 minuttene.

#### 3.4 Fysiologiske variabler

Skuddskadene førte til alvorlig blødning med raskt blodtap hos alle dyrene. I løpet av 75 minutter falt hemoglobin fra  $11,5 \pm 0,3$  (glysingruppa) og  $11,7 \pm 0,5$  g/dl (kontrollene) til henholdsvis  $6,6 \pm 0,6$  og  $5,3 \pm 0$ , (fig 4). Det var et tilsvarende fall i hvite blodlegemer.



Figur 4. Fall i hemoglobin etter skuddskadene. \*  $p < 0,05$  sammenliknet med utgangsverdien.

Systolisk blodtrykk hadde en tendens til å falle hos de fleste dyrene, men betydelig spredning gjorde at resultatene ikke ble signifikante. Jevnt over ble likevel systolisk trykk opprettholdt på akseptable nivåer, det vil si  $>90$  mm Hg (kfr. tab 1). Dette skyldtes ikke minst liberal tilførsel av væske, som var ganske lik mellom gruppene. Til sammen fikk Gruppe 1 NaCl/Ringeracetat  $2,7 \pm 0,3$  l og Dextran/Ringer  $1,4 \pm 0,3$  l, mens de tilsvarende tallene for gruppe 2 var  $2,8 \pm 0,4$  og  $1,5 \pm 0,2$  l. Verdiene for laktat steg fra basalnivåene, uten statistisk signifikant forskjell mellom gruppene. Det ble også gjort analyser for å undersøke eventuelle skader på lever og nyre (transaminasene ASAT og ALAT som mål for levercelleintegritet, kreatinin/urea for nyrefunksjon). Ingen av dem økte fra utgangsverdiene. Det var heller ingen økning av IL-6.

Tabell 1.

Haemodynamics and blood biochemistry (mean±SEM)

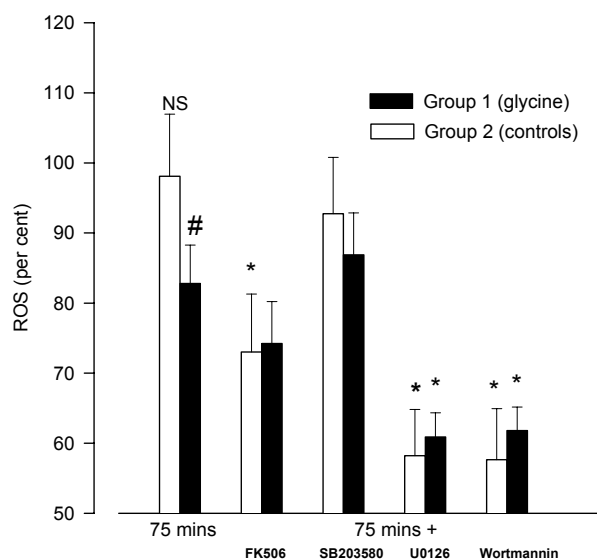
Group	controls (n=18)	glycine (n=17)	controls	glycine
Time	0 min	0 min	75 min	75 min
Body weight (kg)	40.5 ± 1.5	39.8 ± 1.3		
S <sub>a</sub> O <sub>2</sub> (%)	93 ± 2	90 ± 2	93 ± 3	89 ± 3
Systolic arterial pressure (mm Hg)	121 ± 11	104 ± 11	104 ± 11	91 ± 9
Haemoglobin (g/dl)	11.7 ± 0.5	11.5 ± 0.3	5.3 ± 0.6*	6.6 ± 0.6*
White blood cells (10 <sup>9</sup> /l)	18.8 ± 0.7	19.6 ± 1.5	7.0 ± 1.1*	9.1 ± 1.3
pCO <sub>2</sub> (kPa)	6.6 ± 0.7	7.0 ± 0.4	7.4 ± 0.4	6.7 ± 0.6
pH	7.39 ± 0.01	7.38 ± 0.03	7.33 ± 0.05*	7.28 ± 0.04*
Base excess (BE)	5.2 ± 1.9	4.0 ± 1.5	-5.4 ± 2.2*	-5.1 ± 1.1*

\*  $p < 0.05$  compared to baseline

### 3.5 Fluorescensspektroskopi

Den spontane produksjonen av ROS fra granulocytene er vist på figur 5. Etter 75 minutter holdt syntesen av ROS i kontrollgrisene seg nærmest uforandret på  $98,1 \pm 8,8$  % av utgangsverdiene (NS), mens tilsvarende tall for dyrene som hadde fått glysin, var  $86,1 \pm 5,3$  % ( $p < 0,05$ ). Det var ingen statistisk signifikant forskjell mellom gruppene

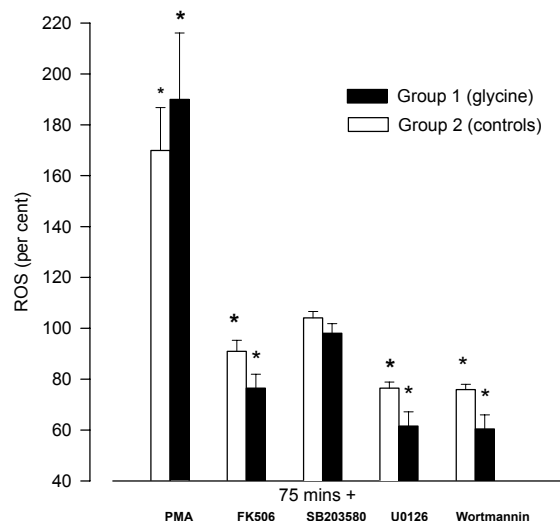
Ekstra postoperativ *in vitro*-behandling med U0126 førte i glysingruppa til at ROS falt ytterligere (fra  $86,1 \pm 5,3$  % til  $65,9 \pm 4,7$  % av utgangsverdien før skade ( $p < 0,05$ )). De tilsvarende tallene for kontrollene var  $98,1 \pm 8,8$  versus  $58,2 \pm 6,6$  % ( $p < 0,05$ ). Begge deler var mindre uttalt enn målingene fra forsøkene i 2001 (fig 5 og referanse 11). Sammenliknet med U0126 var det bare behandling med Wortmannin som viste seg tilsvarende effektiv (fall til  $64,7 \pm 3,5$  versus  $57,7 \pm 7,3$  %,  $p < 0,05$  for begge grupper). Blokade av p38-grenen med SB203580 var minst effektiv ( $89,1 \pm 5,3$  % versus  $92,8 \pm 8,0$  %). Med FK506, som sannsynligvis blokkerer både p38 og JNK, målte vi verdier mellom disse ytterpunktene ( $73,0 \pm 8,3$  versus  $78,0 \pm 5,7$  %).



Figur 5. Figur 6. Relativ produksjon (tidspunkt 0 er satt til 100%) av frie oksygen-radikaler (ROS) i sirkulerende granulocytter uten (til venstre) og med etterfølgende *in vitro*-behandling med FK506, SB203580, U0126 og Wortmannin. Figuren viser de relative verdiene 75 minutter etter skyting. #  $p < 0,05$  sammenliknet med utgangsverdien. \*  $p < 0,05$  sammenliknet med verdien etter 75 minutter uten ytterligere behandling.

Figur 5 kan kanskje gi inntrykk av at det er en negativ synergi mellom glysin og FK506, U0126 og Wortmannin. Behandling med disse hemmerne førte til at ROS-produksjonen tenderte til å falle til et lavere nivå i de cellene som ikke var forbehandlet med glysin. Dersom produksjonen av ROS etter 75 minutter settes til 100, blir denne effekten enklere å tyde (figur 6). Hvis en tar behandling med 10  $\mu$ M U0126 som eksempel, falt ROS-produksjonen helt ned til  $61,6 \pm 5,6$  % i glysin-gruppa, mens de dyrene som ikke hadde fått behandling, bare ble redusert til  $76,5 \pm 2,4$  %. Forskjellene var ikke statistisk signifikante ( $p = 0,3$ ). Som det framgår av figuren, var tendensen nokså lik også for de andre hemmerne. Resultatene tyder derfor på at det ikke eksisterer noen form for synergi mellom glysin og de inhibitorene vi har brukt. Behandling med PKC-stimulatoren PMA økte produksjonen sterkt.

Figur 6. Relativ produksjon av frie oksygen-radikaler (ROS) 75 minutter etter skyting (tidspunkt 75 min er satt til 100%) i sirkulerende granulocytter med etterfølgende *in vitro*-behandling med PMA, FK506, SB203580, U0126 og Wortmannin. \*  $p < 0,05$  sammenliknet med ROS-produksjon uten ekstra behandling



## 4 DISKUSJON

### 4.1 Viktigste funn

Glysin ble i denne studien infundert som en del av det akutte væskeresusciteringsregimet etter skade. Behandlingen ga ingen komplikasjoner. Vi brukte frie

oksygenradikaler i sirkulerende granulocytter som markører for aktivering. Det var en overraskelse å finne at granulocytterne bedømt ut fra denne parameteren ikke lot til å være aktivert utover kontrollnivåene, trass i en meget kraftig ytre påvirkning. Tilførsel av glysin reduserte likevel ROS-syntesen signifikant, noe som understreker at dette regimet har en antiinflammatorisk effekt. ERK-hemmeren U0126 og PI3-K-hemmeren Wortmannin viste seg ved påfølgende behandling *in vitro* å gi ytterligere hemning. Det var ingen tegn til synergi mellom glysin og de ulike hemmerne.

### 4.2 Dyremodell

Undersøkelsen ble gjennomført i tilslutning til Forsvarets årlige ”Kurs i krigskirurgi og traumatologi” på Lahaugmoen. Dyrene kom denne gang fra en vanlig besetning med større variasjon mellom enkeltindividene enn det vi så i 2001 (11), og flere dyr hadde klare tegn på sykdom (cyanose). Ved operasjonen ble det hos disse påvist uttalt perikarditt. Sammenliknet med grisene fra 2001 var det også påfallende at leukocyt-tallet hos årets dyr var signifikant høyere. Flere av dyrene kan derfor ha hatt en pågående infeksjon. Alt i alt har nok ikke hygien i besetningen vært optimal for vår type forskning. Etter som kurset først og fremst skal være en øvelse i praktiske ferdigheter (førstehjelp, anestesi, kirurgi), vil en kunne hevde at slike forhold ikke spiller stor rolle. Men også et slikt formål blir skadelidende når patologien hos enkelte griser er så uttalt at de har problemer med å overleve selve skytingen.

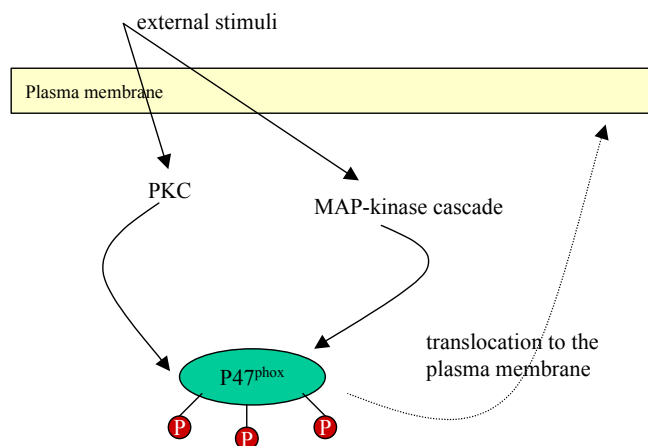
### 4.3 Glysin

Glysin (aminoeddiksyre) er en ikke-essensiell og svært enkel aminosyre ( $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$ ) og ble lenge ansett for å være lite viktig i ernæringen. Glysinstyrte klorkanaler ble først påvist i hjerneceller, men er senere funnet i de fleste typer leukocytter. Sannsynligvis er disse kanalene generelt utbredt (10). Ved å hyperpolarisere membranen hindrer glysin influks av  $\text{Ca}^{++}$ , og dermed svekkes responsen på ytre stimuli. Glysin har etter hvert også vist seg å bedre mikrosirkulasjonen, samt ha betydelige antiinflammatoriske, antineoplastiske og cytoprotektive egenskaper (12-14). En rekke studier har vist at tilsetning av glysin til enteral ernæring (immunonutrisjon) kan redusere den immunologiske responsen og dermed også redusere faren for flerorgansvikt. Så langt vi har oversikt over, er det ingen som har brukt infusjon av glysin som del av det umiddelbare væskeresusciteringsregimet etter større skader. Glysinnivåene faller forholdsvis raskt etter at tilførselen er avsluttet. Intravenøs infusjon sikrer adekvate plasmanivåer i den tidlige fasen etter skade, mens langvarige og senere muligens uheldige effekter av immunosuppresjon unngås. Tre kvarter etter at infusjonen var avsluttet, hadde konsentrasjonen av glysin steget til et nivå omkring 3,3 ganger høyere enn utgangspunktet. Vi fant også en liten økning hos kontrollene (1,2 ganger utgangsverdien), trass i betydelig fortynning som følge av blødning og væsketilførsel. Også disse spontane postoperative forandringene kan tenkes å være av betydning for den umiddelbare inflammatoriske reaksjonen.

### 4.4 "Respiratory burst"

Nøytrofile granulocytter spiller en sentral rolle i forsvaret mot invaderende patogener. Samtidig er de også hovedansvarlige for den akutte generelle inflammatoriske responsen som kroppen svarer med etter omfattende ødeleggelse av vev (eksempelvis som følge av skuddskader).

Figur 7. Forenklet skjema som viser hvordan  $\text{p47}^{\text{phox}}$  ved ytre stimuli blir fosforylert via protein kinase C (PKC) og MAP-kinase-kaskaden (vesentlig ERK-grenen). Etter aktivering translokerer  $\text{p47}^{\text{phox}}$  fra cytoplasma til cellemembranen der den blir en del av det aktive NADPH-oksidasekomplekset.



Aktiverede granulocytter frigjør store mengder av det frie radikalet superoksid ( $\text{O}_2^-$ ) i en prosess som gjerne omtales som "the respiratory burst". Superoksid blir raskt omdannet til andre frie oksygenradikaler som er essensielle både for å uskadeliggjøre bakterier og for å forsterke den inflammatoriske responsen. Produksjonen av ROS kan også brukes som et mål på graden av granulocyttaktivering. På forhånd antok vi at granulocytene ble aktivert av skuddskadene og den etterfølgende omfattende kirurgiske behandlingen. Til sammen skulle dette gi kraftige og vedvarende ytre stimuli til immunkompetente celler, men i praksis viste det seg at ROS-produksjonen holdt seg uforandret. Andre forklaringer på den manglende effekten kan være at granulocytene allerede var aktiverte på grunn av infeksjon, eller at vi ikke fanget opp den forventede virkningen av skade og kirurgi da vi tok våre blodprøver (75 minutter etter skade). Det er også usikkert hvordan bruk av EDTA som antikoagulasjonsmiddel påvirker aktiveringsprosessen. Generelt vil et traume øke konsentrasjonen av kjemotaksiner, som i sin tur forandrer signalering og funksjonelle responser i granulocytene. Dette skjer via G-protein-koblede 7-TMD (7-



transmembrane domain)-reseptorer, og det er kjent at disse systemene nesten utelukkende bruker  $\text{Ca}^{++}$  som "second messengers".

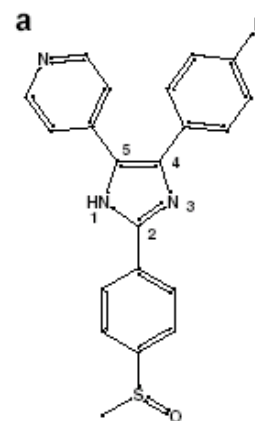
Enzymet NADPH-oksidasen er hovedansvarlig for syntesen av  $\text{O}_2^-$  i aktiverte granulocytter. Det består av en rekke komponenter som i sin aktive form er samlet og bundet til cellemembranen. Ved ytre stimuli utløses biokjemiske kaskader som fører til at flere proteiner i NADPH-oksidasen blir fosforylert. Av disse er  $\text{p47}^{\text{phox}}$  et nøkkelelement (se fig 7). Flere forfattere har vist at både protein kinase C (PKC) og MAP-kinase-kaskaden deltar i fosforyleringen av  $\text{p47}^{\text{phox}}$ . Men syntesen av ROS fra NADPH-oksidasen er kompleks. Den kan ganske sikkert aktiveres via andre signalveier og er også avhengig av en rekke andre faktorer (for eksempel arakidonsyre).

## 4.5 Hemmere

Vi har i denne studien brukt forskjellige typer hemmere for å undersøke effekten på produksjonen av ROS i granulocytene både med og uten forutgående behandling med glysin. De enkelte hemmerne er antatt å være svært selektive, og effekten vil derfor gi en pekepinn på hvilke signalveier som dominerer i denne delen av kroppens reaksjon på større skader.

### 4.5.1 p38-hemmeren SB203580

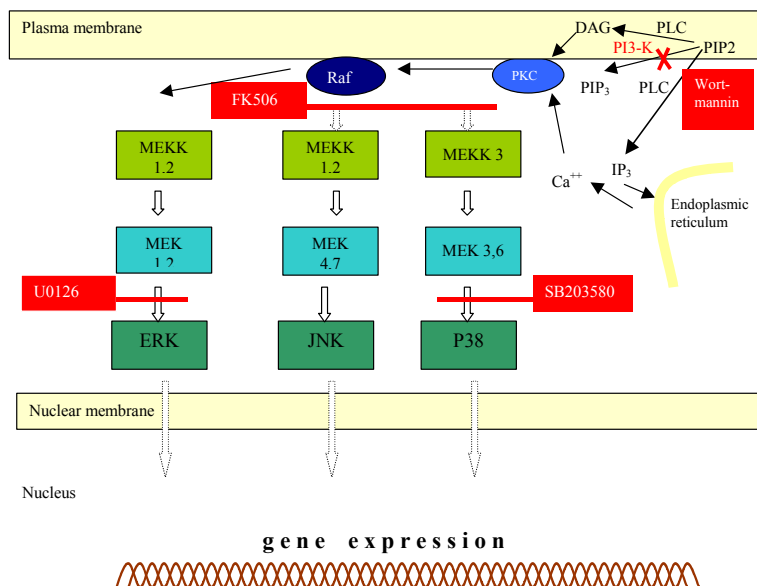
SB203580 [(4-(4-fluorofenyl)-2-(4-metylsulfinylfenyl)-5-(4-pyridyl)-imidazol] er en kompetitiv inhibitor som binder seg til  $\text{p38}\alpha$ ,  $\text{p38}\beta$  og  $\text{p38}\beta 2$ . Den har ingen effekt på ERK, JNK,  $\text{p38}\gamma$  eller  $\text{p38}\delta$ .  $\text{IC}_{50}$  ligger omkring  $0,6 \mu\text{M}$  (16). Flere studier har vist at inhibitorer av p38 MAPK, deriblant SB203580, hemmer "respiratory burst". Det er uklart om SB203580 påvirker fosforyleringen av  $\text{p47}^{\text{phox}}$  på samme måte som U0126. Ulike forfattere har fått forskjellige resultater, og virkningen må derfor antas å være mindre uttalt enn det som er tilfellet med U0126 (17,18). I stedet kan SB203580 tenkes å gripe inn i andre reaksjoner som er nødvendige for at NADPH-oksidasen skal bli aktivert (fosforylering av øvrige oksidasekomponenter eller essensielle proteiner). I vår studie var effekten av SB203580 beskjedent. En hovedårsak kan være den forholdsvis lave konsentrasjonen i forhold til  $\text{IC}_{50}$  ( $1 \mu\text{M}$ ), eller at p38 er av underordnet betydning som signalvei i forbindelse med skader.



SB203580

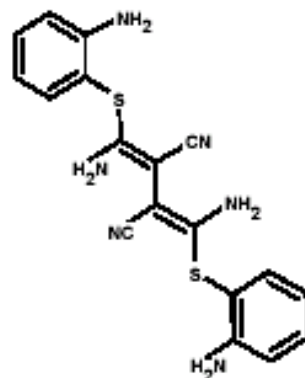
### 4.5.2 ERK-hemmeren U0126.

U0126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminofenyltio) butadien) binder seg selektivt til MEK1 og MEK2 i MAP-kinase-kaskaden med en  $\text{IC}_{50}$  på omkring  $0,07 \mu\text{M}$  (12). På denne måten hemmes videre signalering gjennom ERK-grenen av MAP-kinase-systemet (fig. 8). I laboratorieundersøkelser er det vist at ERK 1/2 regulerer  $\text{p47}^{\text{phox}}$  enten direkte eller indirekte via



Figur 8. Skjematiske oversikt over virkningspunkter for U0126, FK506 og SB203580 i MAP-kinase-systemet. Figuren antyder også hvordan Wortmannin hemmer PI3-kinase og dermed hindrer omdannelsen av PIP<sub>2</sub> til PIP<sub>3</sub>.

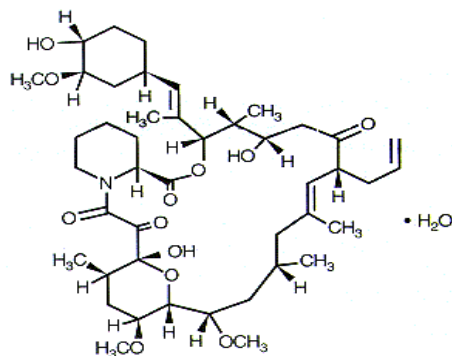
andre kinaser og derved spiller en sentral rolle for å utløse effektorfunksjonene i nøytrofile granulocytter. Virkningene ser ut til å være reversible. På samme måte som ved tilsvarende kurs i 2001, fant vi også denne gang at U0126 hemmet ROS-produksjonen meget effektivt, selv om resultatene nå var noe mindre uttalte. Fremdeles finnes det få eller ingen studier der U0126 er brukt i intakte dyremodeller etter traume, men enkeltrapporter tyder på at ERK-veien er sentral for den inflammatoriske responsen også *in vivo* (15).



U0126

#### 4.5.3 NFAT-hemmeren FK506 (tacrolimus)

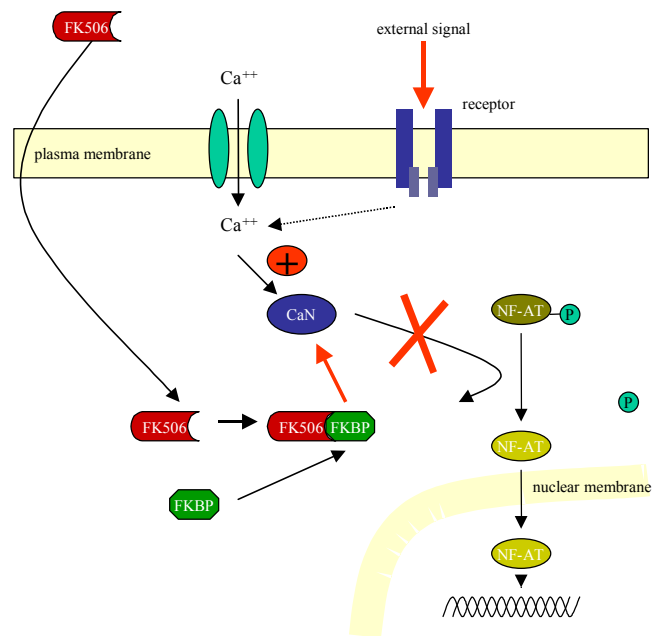
FK506 (Tacrolimus) (C<sub>44</sub>H<sub>69</sub>NO<sub>12</sub>·H<sub>2</sub>O) er klassifisert som et makrolid med kraftig immunosuppressiv aktivitet (omkring 100 ganger Cyclosporin A). Utgangspunktet er *Streptomyces Tsukubaensis*. Det har vist seg som et meget effektivt hjelpemiddel i transplantasjonskirurgien for å hindre avstøtning og er også brukt på andre områder der det er ønskelig å undertrykke immunreaksjonen (eksempelvis innen dermatologien). FK506 er først og fremst en kraftig hemmer av T-celle og undertrykker både aktivering og proliferasjon. Den antatte virknings-mekanismen er vist på figur 9. I tillegg hemmer den signalering gjennom JNK og p38 i MAPK-kaskaden (19). Videre kan FK506 påvirke aktiviteten til transkripsjons-



faktoren NF $\kappa$ B ved å hemme nedbrytningen av I $\kappa$ B og øke translokasjon av glukokortikoidreseptoren til cellekjernen. Selv om effektene på T-celle har vært mest undersøkt, er det vist at FK506 kan nedregulere aktivering og funksjon av sirkulerende granulocytter, spesielt etter forutgående ”priming” (20,21). I vår studie var effekten på ROS-produksjonen noe svakere enn de tilsvarende tall for U0126 og Wortmannin (fig 5 og 6).

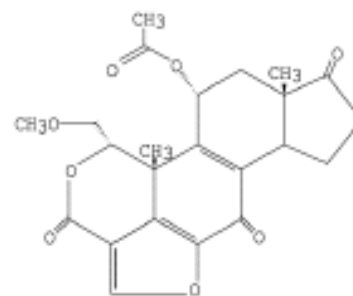
Andre studier har ikke funnet effekt av FK506 på ROS-produksjon fra granulocytter, muligens på grunn av manglende forutgående stimulering (20). Vi fant ingen økning av ROS-produksjonen i granulocytter etter 75 minutter, og det kan derfor tenkes at ”primingen” fra skuddskadene i våre forsøk ikke har vært tilstrekkelig til å få full effekt av FK506

Figur 9. Klassisk virkningsmekanisme for FK506 (tacrolimus). FK506 binder seg til FK506-bindende protein (FKBP) og danner FK506-FKBP-komplekset som blokkerer calcineurin (CaN). Calcineurin fungerer normalt som en serin/threonin fosfatase som defosforer transkripsjonsfaktoren NFAT (nuclear factor of activated T-cells) slik at den kan translokere til kjernen. Det er vist at FK506 også kan hindre translokasjon av NF- $\kappa$ B ved en liknende mekanisme. Cyklosporin A virker på omtrent samme måte.



#### 4.5.4 PI3-K-hemmeren Wortmannin

Wortmannin (C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>O<sub>8</sub>) utvinnes fra *Penicillium fumiculosus* og er en irreversibel inhibitor av fosfatidyl-inositol-3-kinase (PI3-K). Produktet av PI3-K, fosfatidylinositol(3,4,5)-trifosfat, har vist seg å være et nøkkelsignal ved aktivering av leukocytene (22). Hos nøytrofile granulocytter er det essensielt for å utløse ”respiratory burst” (23). Det er vist at *ras* kan binde seg til og aktivere PI3-K, og siden *ras* deltar i aktiveringen av MAP-kinase-kaskaden, er det mulig at PI3-K aktiverer leukocyttenes effektorfunksjoner via denne signalveien (24). I store konsentrasjoner hemmes også PI4-K. IC<sub>50</sub> oppgis til omkring 5 nM, men varierer sterkt, for eksempel avhengig av hvilken effektorfunksjon som blir studert (24). Wortmannin viste seg i vår studie å være en meget effektiv hemmer av ROS-produksjonen; omtrent på samme nivå som U0126.



Wortmannin

## 4.6 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. Det blir ofte etterfulgt av senere immunsvikt som legger

organismen åpen for lokale infeksjoner, sepsis og septisk sjokk. ROS er vist å spille en sentral rolle i denne utviklingen. Studien antyder at reaksjonen kan påvirkes på en enkel måte ved å tilsette glysin til resusciteringsvæsken som blir brukt i det akutte stadiet. Påfølgende *in vitro*-forsøk med ulike typer hemmere (U0126, SB203580, FK506 (Tacrolimus) og Wortmannin) brukt på sirkulerende granulocytter, viste mest overbevisende effekt med ERK-hemmeren U0126 og PI-3-kinase-hemmeren Wortmannin. Fremdeles mangler forsøk på intakte dyremodeller for disse stoffene etter traumer. P38-hemmeren SB203580 viste seg minst effektiv, noe som kan tyde på at signaler via p38 MAPK spiller en mindre rolle ved skader.

## 5 REFERANSER

1. Jarrar D, Chaudry IH, Wang P. Organ dysfunction following hemorrhage and sepsis: mechanisms and therapeutic approaches. *Int J Mol Med* 1999; 4: 575-83.
2. Rose S, Marzi I. Mediators in polytrauma – pathophysiological significance and clinical relevance. *Langenbeck's Arch Surg* 1998;383:199-208.
3. Strecker W, Gebhard F, Rager J, Brückner U, Steinbach G, Kinzl L. Early biochemical characterization of soft-tissue trauma and fracture trauma. *J Trauma* 199;47:358-364.
4. Roumen RMH, Redl H, Schlag G, Zilow G, Sandtner W, Koller W, Hendriks T, Goris RJA. Inflammatory mediators in relation to the development of multiple organ failure in patients after severe blunt trauma. *Crit Care Med* 1995;23:474-480.
5. Deitch EA. Multiple organ failure: pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg* 1992;216:117-134
6. Sauaia A, Moore FA, Moore EE, Lezotte DC. Early risk factors for postinjury multiple organ failure. *World J Surg* 1996;20:392-400.
7. Jaeschke H, Smith CW. Mechanism of neutrophil-induced parenchymal damage. *J Leukoc Biol* 1997;61:647-653.
8. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320:356-376.
9. Sauaia A, Moore FA, Moore EE, Lezotte DC. Early risk factors for postinjury multiple organ failure. *World J Surg* 1996;20:392-400.
10. Wheeler MD, Ikejima K, Enomoto N, Stacklewitz RF, Seabra V, Zhong Z, Yin M, Schemmer P, Rose ML, Rusyn I, Bradford B, Thurman RG. Glycine: a new anti-inflammatory immunonutrient. *Cell Mol Life Sci* 1999;56:843-856.
11. Gundersen Y, Vaagenes P, Haugen AH, Pharo A, Valø ET, Myhre O, Andersen JM, Sundnes KO, Os Ø, Pillgram-Larsen J. Tidlig behandling med hydrokortison og/eller U-0126 hemmer syntesen av frie oksygenradikaler etter skuddskader hos gris. FFI/Rapport-2002/00579.
12. Rose ML, Germolec D, Arteel GE, Schoonhoven R, Thurman RG. Dietary glycine prevents increases in hepatocyte proliferation caused by the peroxisome proliferator WY-14.643. *Chem Res Toxicol* 1997;10:1198-1204.
13. Ikejima K, Iimuro Y, Forman DT, Thurman RG. A diet containing glycine improves survival in endotoxin shock rats. *Am J Physiol* 1996;270:G97-G103.
14. Grotz MRW, Pape H-C, van Grinsveen M, Stalp M, Rohde F, Bock D, Krettek C. Glycine reduces the inflammatory response and organ damage in a two-hit sepsis model in rats. *Shock* 2001;16:116-121.
15. Duncia JV, Santella JB, Higley CA et al. MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products. *Bioorg Med Chem Lett* 1998;8:2839-2844.
16. Cuenda A, Rouse J, Doza et al. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett* 1995;364:229-233.
17. Dewas C, Fay M, Gougerot-Pocidallo M-A, El-Benna J. The mitogen-activated protein kinase extracellular-regulated kinase 1/2 pathway is involved in formyl-methionyl-leucyl-

- phenylalanine-induced p47<sup>phox</sup> phosphorylation in human neutrophils. *J Immunol* 2000;165:5238-5244.
18. Yamamori T, Inanami O, Nagahata H, Cui Y-D, Kuwabara M. Roles of p38 MAPK, PKC and PI3-K in the signaling pathways of NADPH oxidase activation and phagocytosis in bovine polymorphonuclear leukocytes. *FEBS Lett* 2000;467:253-258.
  19. Matsuda S, Shibasaki F, Takehana K, Mori H, Nishida E, Koyasu S. Two distinct action mechanisms of immunophilin-ligand complexes for the blockade of T-cell activation. *EMBO Rep* 2000;1(5):428-434.
  20. Goto Y, Kono T, Ishii M, Sato EF. Suppressive effects of cyclosporin A and FK-506 on superoxide generation in human polymorphonuclear leukocytes primed by tumor necrosis factor alpha. *J Invest Dermatol* 2000;115(6):986-989.
  21. Garcia-Criado FJ, Palma-Vargas JM, Valdinciel-Garcia JJ, Toledo AH, Misawa , Gomez-Alonso A, Toledo-Pereyra LH. Tacrolimus (FK506) down-regulates free radical tissue levels, serum cytokines, and neutrophil infiltration after severe liver ischemia. *Transplantation* 1997;64(4):594-598.
  22. Wymann MP, Sozzani S, Altruda F, Mantovani A, Hirsch E. Lipids on the move: phosphoinositide 3-kinases in leukocyte function. *Immunol Today* 2000;21(6):260-264.
  23. Arcaro A, Wymann MP. Wortmannin is a potent phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphate in neutrophil responses. *Biochem J* 1993;296:297-301.
  24. Sue-A-Quan AK, Fialkow L, Vlahos CJ, Schelm JA, Grinstein S, Butler J, Downey GP. Inhibition of neutrophil oxidative burst and granule secretion by Wortmannin: potential role of MAP kinase and renaturable kinases. *J Cell Physiol* 1997;172:94-108.

## FORDELINGSLISTE

**FFIBM**
**Dato:** 12. februar 2003

RAPPORTTYPE (KRYSS AV) <input checked="" type="checkbox"/> RAPP <input type="checkbox"/> NOTAT <input type="checkbox"/> RR	RAPPORT NR. 2003/00615	REFERANSE FFIBM/827/159	RAPPORTENS DATO 12. februar 2003
RAPPORTENS BESKYTTELSESGRAD  UGRADERT		ANTALL TRYKTE UTSTEDT  44	ANTALL SIDER  20
RAPPORTENS TITTEL GLYSIN SOM DEL AV DET AKUTTE RESUSCITERINGSREGIMET ETTER SKUDDSKADER HOS GRIS. Modulering av den tidlige inflammatoriske responsen		FORFATTER(E) GUNDERSEN Yngvar, VAAGENES Per, MØRCH ANDERSEN Jannike, DREIEM Anne, HAUGEN Ann Helen, MYHRE Oddvar, REISTAD Trine, STERRI Sigrun, THRANE Ingjerd	
FORDELING GODKJENT AV FORSKNINGSSJEFFORDELING 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 Leif Rosén	9		FFI-Bibl
		Sjef med. avd. FO/San	1		FFI-ledelse
1		Forsvarets overlege i kirurgi, J.	1		FFIE
		Pillgram-Larsen	1		FFISYS
1		Forsvarets overlege i anestesi, Knut Ole	1		FFIBM
		Sundnes	1		FFIN
1		Veterinær san.reg. Øystein Os	9		Forfattereksemplar(er)
1		San.insp. Sjøforsvaret,	5		Restopplag til Biblioteket
		Jan Sommerfeldt Pettersen			
1		Stabslegen Luftforvaret, Røsjø			<b>Elektronisk fordeling:</b>
1		Lege FMI, Jan Ove Owe			FFI-veven
1		Ann Helen Haugen, IFE			Anne Dreiem (AnD)
1		Sjef FML, Bjørn Berdal			Trine Reistad (TrR)
1		Akershus regiment, Per Egil Hesla			S Ødegaarden (SOD)
1		DK-legen Hamar			Trond Myhrer (Tmy)
					Frode Fonnum, FFo
1		Krigsskolelegen, Harald Jodalen			
1		Professor Ansgar Aasen, Institutt for			
		kirurgisk forskning, Rikshospitalet			
1		Professor Per Lilleaasen, Kleivvn. 16d,			
		1340 Bekkestua			
1		Lars Wik, NAKOS, Institutt for			
		eksperimentell medisinsk forskning,			
		Ullevål sykehus, 0407 Oslo			
1		Professor Petter Andreas Steen,			
		Kirurgisk divisjon, Ullevål sykehus,			
		0407 Oslo			

Benytt ny side om nødvendig.