

**Tidlige funksjonsendringer i sirkulerende hvite blodlegemer
etter skuddskader hos gris**
En kartlegging av tidsforløpet i ex vivo fullblod

Yngvar Gundersen, Per Vaagenes, Ingjerd Thrane og Per-Kristian Opstad

Forsvarets forskningsinstitutt (FFI)

04.01.2008

FFI-rapport 2008/00135

109301

ISBN 978-82-464-1328-0

Emneord

Skuddskader

Leukocytffunksjon

Immunologi

Cytokiner

Godkjent av

Per-Kristian Opstad

Prosjektleder

Jan Ivar Botnan

Avdelingssjef

Sammendrag

Innledning: Store ytre påkjenninger (skader, store operasjoner, infeksjoner, alvorlige ikke-infeksiøse betennelsesreaksjoner, ekstreme fysiske belastninger) påvirker funksjonen i immunforsvaret. Den umiddelbare effekten på sirkulerende hvite blodlegemer kan enkelt måles etter stimulering av cellene i en *ex vivo* fullblodmodell. Metoden har dermed potensial i seg til å kunne anvendes klinisk. Målet med denne studien var å kartlegge tidsforløpet for ulike funksjonsparametre etter stimulering med to forskjellige bakterietoksiner, lipopolysakkarid (LPS) fra Gram-negative og peptidoglykan (PepG) fra Gram-positive bakterier. **Materiale og metoder:** Tolv griser ble utsatt for et standardisert traume: ett rifleskudd mot høyre lår og ett pistolskudd mot øvre venstre del av magen. Blodprøver ble tatt før skaden (kontroll) og etter 10, 30, 60 og 90 minutter. *Ex vivo* fullblod fra de ulike tidspunktene ble stimulert i 3 timer i 37 °C med enten 10 ng/ml LPS, 1 µg/ml PepG eller fysiologisk saltvann (kontroller). Virkningen på leukocytffunksjonen ble undersøkt ved å måle konsentrasjonen av utvalgte cytokiner (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 og IL-10) i supernatanten. **Resultater:** Målt med TNF- α førte skuddskadene til en redusert *ex vivo* reaksjon på LPS, synlig alt etter 10 minutter og statistisk signifikant etter 30 minutter. De laveste nivåene ble funnet etter 90 minutter. Etter stimulering med PepG var det bare små og ikke-signifikante endringer. Skadene påvirket ikke IL-1 β -nivåene, mens IL-8 først begynte å stige etter 60 og 90 minutter. **Konklusjoner:** Store skader reprogrammerer de sirkulerende hvite blodlegemene nesten momentant. TNF- α viste seg som den mest sensitive markøren, og vi fant en markert toleranse overfor LPS (men ikke overfor PepG). IL-8 var også følsom, men først noe seinere i forløpet. Avhengig av tidspunktet for blodprøvetaking vil sannsynligvis begge kunne gi et grovt mål på hvordan en større skade akutt påvirker det medfødte immunforsvaret.

English summary

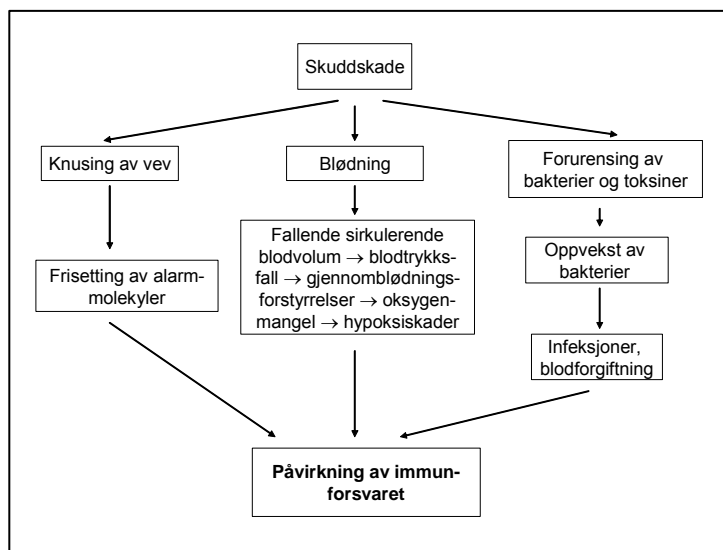
Introduction: Heavy external stressors (trauma, extensive surgery, invasive infections, serious non-infectious inflammatory states, extreme physical exertion) importantly influence immune function. The immediate effects on circulating white blood cells may be measured in a simple way after stimulation in an *ex vivo* whole blood model. This method therefore may be useful even in ordinary clinical practice. The aim of the present study was to map the post-traumatic time pattern of selected parameters of leukocyte function after *ex vivo* stimulation with bacterial toxins from Gram-negative (lipopolysaccharide, LPS) or predominantly Gram-positive (peptidoglycan, PepG) micro-organisms. **Materials and Methods:** Twelve juvenile Norwegian landrace pigs were exposed to a standardised trauma: one rifle shot against the right femur and one pistol shot hitting the left upper quadrant of the abdomen. Blood samples were drawn before shooting (controls) and after 10, 30, 60, and 90 min. Blood from the different time points were stimulated for 3 h at 37 °C with either LPS 10 ng/ml, PepG 1 µg/ml, or normal saline (controls) in an *ex vivo* whole blood model. The influence of the gunshot injuries on leukocyte function was evaluated after measuring the concentrations of selected cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10) in the supernatant. **Results:** As assessed from TNF- α values, an almost immediate effect on circulating leukocyte was induced. A reduced *ex vivo* reaction to LPS was evident already after 10 min and statistically significant after 30 min. The lowest values were measured after 90 min. IL-1 β - levels were unaltered, while IL-8 started to increase only after 60 and 90 min. **Conclusions:** Serious injuries almost immediately reprogram circulating leukocytes. TNF- α turned out to be the most sensitive marker, and we found a marked tolerance against LPS (but not against PepG). IL-8 was also sensitive, but only somewhat later in the course. Depending on the time of blood sampling relative to injury, both cytokines are probably useful as early crude measures of post-traumatic changes in innate immunity.

Innhold

1	Innledning	7
2	Materiale og metoder	8
2.1	Forsøksdyr	8
2.2	Blodprøver og analyser	8
2.3	Fullblodmodellen	8
2.4	Cytokiner	9
2.5	Stimulatorer	9
2.6	Hematologiske og biokjemiske målinger	10
2.7	Måling av cytokiner	11
2.8	Statistisk analyse	11
3	Resultater	11
3.1	Skader	11
3.2	Hematologiske variabler	12
3.3	Cytokinverdier	12
3.3.1	Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) og interleukin-6 (IL-6)	12
3.3.2	Interleukin-1 β (IL-1 β)	14
3.3.3	Interleukin-8 (IL-8) og interleukin-10 (IL-10)	14
4	Diskusjon	15
5	Konklusjoner	16
	Referanser	17

1 Innledning

Alvorlige skuddskader er en type traume som stiller både offer og behandlingsapparat overfor store utfordringer. Et prosjektil fra et høyhastighetsvåpen har stor bevegelsesenergi som delvis blir overført til vevene når det rammer. Resultatet er omfattende knusnings- og til dels varmeskader, og signalmolekyler fra ødelagte celler (eks. High Mobility Group Box 1, HMGB1) eller bindevev (eks. hyaluronan) blir frisatt i store mengder (se figur 1).



Figur 1. Skjematisk oversikt over enkelte følger av en alvorlig skuddskade

Samtidig vil såret vanligvis bli forurenset av bakterier. Både mengde og type er sterkt avhengig av hvor skuddet treffer. Bukskudd skader som regel tarmene og sprer både bakterier og bakterietoksiner (eks. lipopolysakkarid, LPS) til områder der de ikke hører hjemme og dermed kan gjøre stor skade. Gram-negative stavbakterier er tallrike i tarmsystemet, og infeksjoner med slike bakterier vil derfor være vanligst. Skudd mot armer eller bein fører regelmessig til betydelige muskelskader og kan også splintre knoklene fullstendig ved direkte treff. Bakterier fra huden, der Gram-positive kokker (kuleformede bakterier) dominerer, blir revet med og deponert i det knuste vevet. Ettersom blodtilførselen ofte er nedsatt eller fullstendig ødelagt, blir vekstvilkårene gode. Den mangelfulle sirkulasjonen fører blant annet til at organismen ikke får transportert sitt forsvar mot patogene mikrober fram til infeksjonsstedet.

Det medfødte immunforsvaret er en del av førstelinjeforsvaret mot bakterielle inntrengere. Molekylære strukturer som er bevart gjennom utviklingshistorien, og dermed er felles for alle (eller de aller fleste) mikrober, blir gjenkjent av spesifikke reseptorer. De fleste av disse sitter i membranen på leukocytene (Toll-reseptorer, TLR). Hos menneske finnes 10 ulike Toll-reseptorer. TLR-4 gjenkjenner LPS (og dermed Gram-negativ infeksjon), andre Toll-reseptorer reagerer på flagellin, nukleinsyrer i virus og deler av DNA. Peptidoglykan registreres derimot sannsynligvis primært av to intracellulære reseptorer (NOD1 og NOD2) (1). Når bakterietoksinene forbinder seg med reseptorene, aktiveres signalveiene inn til cellekjernen.

Gener i immunforsvaret (som koder for hvert sitt protein) skrur på og gir signal til å starte produksjonen av en rekke molekyler (eks. cytokiner) som er sentrale for den inflammatoriske reaksjonen. De siste årene er det blitt klart at flere Toll-reseptorer (spesielt TLR-2 og TLR-4) også fungerer som reseptorer for endogene molekulære strukturer ("alarminer") som blir frisatt i store mengder fra skadd vev (eks. HMGB1 og hyaluronan), (2,3). Det medfødte immunforsvaret kan således bli aktivert av molekyler som er kroppsfremmede (eks. fra bakterier) eller kroppsegne (eks. fra ødelagt vev). Ved penetrerende skuddskader skjer sannsynligvis begge deler samtidig.

Vevstraumer påvirker immunforsvaret uavhengig av om de er sterile eller ikke. En balansert aktivering er en forutsetning for å unngå alvorlige seinkomplikasjoner som flerorgansvikt og blodforgiftning (sepsis). Graden av aktivering kan måles i blod ved hjelp av en rekke biomarkører, f.eks. cytokiner, og muligheten for å bruke enkelte av disse som tidlige prognostiske hjelpemidler er under utredning.

På denne bakgrunn ønsket vi å kartlegge hvor raskt og hvor uttalt funksjonen i sirkulerende hvite blodlegemer forandrer seg etter en alvorlig skuddskade. Aktivering i *ex vivo* fullblod er en enkel modell som også kan egne seg for klinisk bruk. Vi brukte to bakterielle celleveggskomponenter (lipopolysakkarid og peptidoglykan) som aktivatorer; som biomarkører valgte vi ut cytokiner som alle er sentrale i den inflammatoriske responsen.

2 Materiale og metoder

2.1 Forsøksdyr

Tolv griser ($43,9 \pm 6,0$ kg) ble inkludert i studien.

2.2 Blodprøver og analyser

Grisene ble først lagt i narkose og intubert. Deretter ble venstre lårarterie fripreparert slik at en enkelt kunne legge inn et sentralvenekateter av typen Secalon-T (se figur 4). Dette ble brukt til å kontrollere blodtrykket og til blodprøvetaking. Analyse og videre behandling av blodet ble gjort umiddelbart.

2.3 Fullblodmodellen

De hvite blodlegemenes (leukocyttenes) evne til å reagere på stimulering med LPS og PepG ble undersøkt i en fullblodmodell. LPS er en vital bestanddel i cellemembranen til alle Gram-negative bakterier. PepG finnes først og fremst i cellemembranen til Gram-positive bakterier, i mindre mengder også hos Gram-negative. Prøvene fra hvert tidspunkt ble fordelt i reagensglass á 3 ml og inkubert i 3 timer ved 37 °C sammen med LPS 10 ng/ml, PepG 1 µg/ml eller tilsvarende volum isotont saltvann (kontroller). LPS 10 ng/ml er antatt å føre til bortimot maksimal aktivering av leukocyttenes. PepG er kjent for å være mindre potent, og dosen ble derfor økt til 1000 ng/ml (1 µg/ml). Ved slutten av forsøket ble rørene sentrifugert, den cellefrie delen

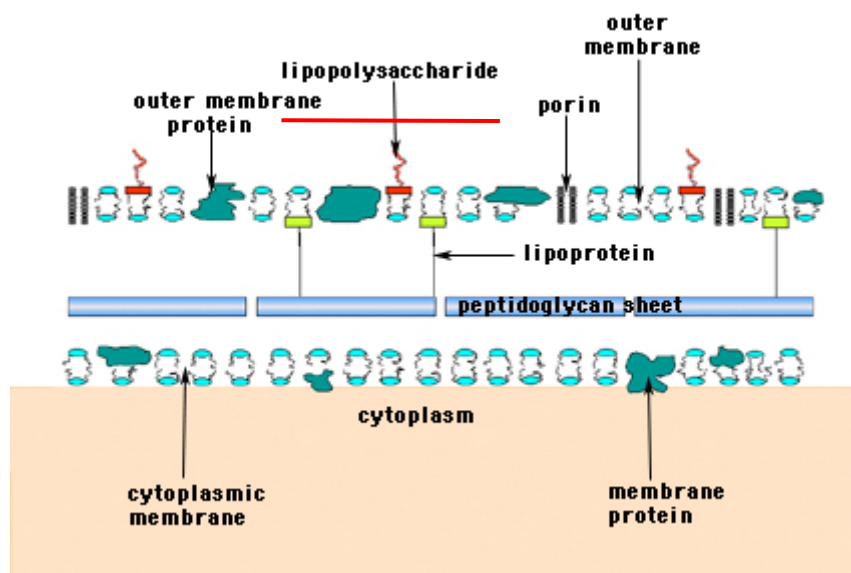
(supernatanten) avpipettert og øyeblikkelig plassert i $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Traumets innvirkning på funksjonen i de hvite blodlegemene ble undersøkt ved å måle konsentrasjonen av utvalgte cytokiner (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 og IL-10).

2.4 Cytokiner

Cytokiner er små molekyler som en rekke forskjellige cellyper (inklusive hvite blodlegemer) produserer og frigjør for å kommunisere seg imellom. Cytokinene består hovedsakelig av vannløselige proteiner og glykoproteiner (proteiner som er festet til en sukkerkjede) med en masse mellom 8 og 30 kDa. De spiller en viktig rolle både i det medfødte og i det adaptive immunforsvaret. Når cytokinene binder seg til spesifikke overflatemolekyler på de hvite blodlegemene, aktiveres en kaskade av signaler fra overflaten og inn til cellekjernen. Cellenes funksjon endres ved at gener og transkripsjonsfaktorer opp- eller nedreguleres. Cytokinene klassifiseres ofte som pro- (TNF- α , IL-1 β) eller anti-inflammatoriske (IL-10) avhengig av om de stimulerer eller hemmer en inflammasjonsreaksjon. Kjemokiner (IL-8) er cytokiner som leder cellenes vandring mot et fokus (infeksjon, skade o.l.).

2.5 Stimulatorer

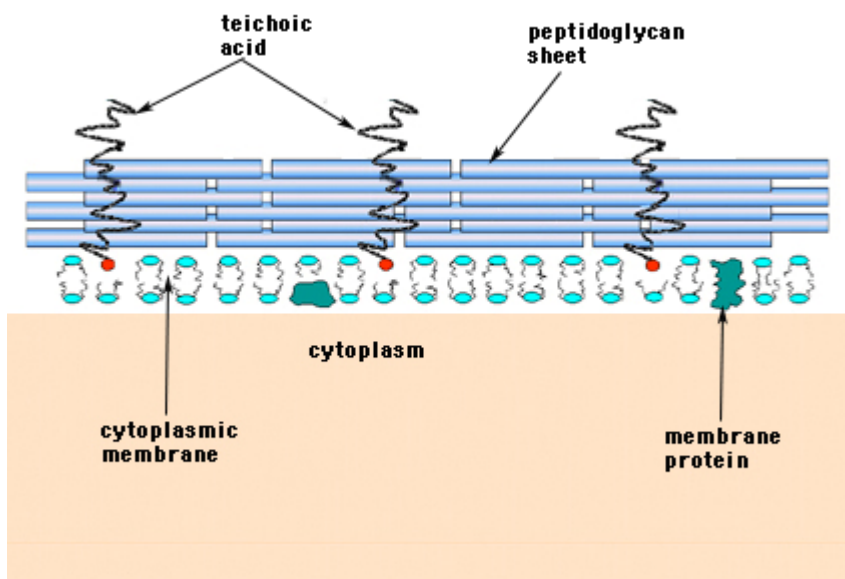
Som nevnt kan en rekke ytre påkjenninger utløse produksjon av cytokiner, bl.a. skader, kjemiske substanser og bakterieprodukter. Den danske legen ans Christian Gram fant i 1884 en metode til å farge bakterier med en løsning som inneholdt krystallfiolett og jodid. Bakterier som raskt ble avfarget med alkohol eller aceton, ble kalt Gram-negative. De som beholdt fargen, ble kalt Gram-positive.



Figur 2. Den Gram-negative celledmembranen. Veggen består av tre deler. Den ytre fosfolipidmembranen gjør at en kan skille mellom Gram-positive og Gram-negative bakterier. I yttermembranen finnes også lipopolysakkaridmolekylene. Veggen er relativt tynn og inneholder langt mindre peptidoglykan enn hos Gram-positive bakterier. Det finnes heller ikke teikoinesyre i Gram-negative bakterier. (Fra Ken Todars Microbial World).

Det er strukturen i den ytre celleveggen som avgjør hvor lett fargen beholdes eller vaskes bort. Celleveggen i Gram-negative bakterier består av tre lag: et indre fosfolipidlag, et tynt mellomlag bestående av peptidoglykan, og et ytre lag som blant annet inneholder LPS (se figur 2). LPS er et relativt stort molekyl og varierer i struktur mellom ulike bakterietyper. Men enkelte deler er konstante og felles for alle bakterier. På overflaten av de hvite blodlegemene sitter det egne reseptorer som fanger opp disse konstante strukturene i LPS-molekylet (Toll-reseptor 4, TLR 4).

Celleveggen i Gram-positive bakterier er enklere (se figur 3). Den ytterste delen består av et tykkere lag PepG, som primært gjenkjennes av de intracellulære NOD-reseptorene. Sannsynligvis skiller NOD1 og NOD2 mellom Gram-positivt og Gram-negativt peptidoglykan. Når bakteriene dør, f.eks. når de blir utsatt for kraftige doser antibiotika som ødelegger cellemembranen (eks. penicillin), blir det frigjort store mengder av disse toksinene.



Figur 3. Strukturen i den Gram-positive celleveggen. Veggen er forholdsvis tykk og inneholder teikoinsyremolekyler som ligger loddrett på peptidoglykanlaget. Gram-positive bakterier har ikke lipopolysakkarid. (Fra Ken Todars *Microbial World*).

Stimulering med celleveggskomponenter fra bakterier (spesielt LPS) *in vitro* er mye brukt for å få et mål på cellenes funksjonsnivå. En viss tid etter påbegynt stimulering (i vårt tilfelle 3 timer) kan en tallfeste cellenes evne til å respondere på et ytre stimulus ved å måle den ekstracellulære konsentrasjonen av spesifikke stoffer produsert og utskilt av cellene (eks. cytokiner).

2.6 Hematologiske og biokjemiske målinger

Hemoglobin, hematokrit og totalt leukocyt-tall ble undersøkt i EDTA-blod på en automatisk hematologimaskin (Advia 60, Bayer HealthCare, Tarrytown, NY, USA). Målingene ble utført umiddelbart etter blodprøvetaking.

2.7 Måling av cytokiner

Kommersielle kit fra R & D Systems ble brukt for å bestemme cytokinnivåene.

2.8 Statistisk analyse

Resultatene er angitt som middelværdier \pm standardfeil. Under bearbeidelsen ble resultatene først testet for normalfordeling, deretter med enveis RM ANOVA, eventuelt enveis RM ANOVA on ranks, etterfulgt av Dunns *post hoc*-test. *P*-verdier mindre enn 0,05 er ansett som statistisk signifikante.

3 Resultater

3.1 Skader

Innskuddspunktene var avmerket på forhånd, og skadene på de enkelte dyr som inngikk i studien, ble derfor nokså like. Rifleskuddet mot innsiden av høyre lår førte til rikelig blødning. Røntgenbilde tatt umiddelbart etter skaden, avslørte betydelige bløtdelsforandringer og et fragmentert høyre lårbein (se figur 4). Pistolskuddet gjennom buken inneholdt mindre energi, men alle dyrene fikk tarmskader og buken tilsølt av tarminnhold. Skuddene ble lagt slik at de ikke skulle ramme vitale indre organer (lever, milt) eller blodkar (livpulsåren, store hulvene). Det siste ville ført til at grisene i løpet av kort tid ville strøket med på grunn av massivt blodtap. Samtlige dyr som ble innrullert i studien, overlevde de første 90 minuttene.



Figur 4. Røntgenbilde som viser forholdene umiddelbart etter at skuddene har rammet. Legg merke til den store vevsskaden i høyre lår (hvit pil). Skadene på selve lårbeinet er også uttalte. Sml. med de normale forholdene på venstre side. Den svarte pila peker mot kateteret i venstre lårpulsåre.

3.2 Hematologiske variabler

Utvalgte hematologiske verdier er vist i tabell 1. Som det framgår, falt blodprosenten ganske raskt som følge av pågående blødning og infusjon av blanke væsker for å erstatte tapet.

Konsentrasjonen av blodplater og hvite blodlegemer varierte av samme grunn. Blodgassverdiene tyder på at den akutte væskebehandlingen var tilstrekkelig til at væskevolumet i blodkarene ble opprettholdt og adekvat sirkulasjon bevart.

Tabell 1

Utvalgte hematologiske variabler (gjennomsnitt ± standardfeil)

Tid	0 min	10 min	30 min	60 min	90 min
Hemoglobin (g/dl)	10.8 ± 0.1	10.1 ± 0.3	9.9 ± 0.4*	8.0 ± 0.6*	7.2 ± 0.7*
Hematokrit (%)	32.6 ± 0.5	30.2 ± 1.1	29.3 ± 1.2	23.4 ± 1.9*	21.0 ± 2.1*
Blodplater (10 ⁹ celler/l)	544 ± 57	530 ± 71	501 ± 47	394 ± 51*	322 ± 36*
Hvite blodlegemer (10 ⁹ celler/l)	28.9 ± 1.6	26.4 ± 1.6	20.1 ± 1.5*	12.1 ± 1.1*	12.9 ± 1.7*
pCO ₂ (kPa)	6.7 ± 0.2			5.1 ± 0.4*	
pH	7.41 ± 0.01			7.41 ± 0.04	
Base excess (BE)	6.0 ± 0.5			-1.6 ± 1.2*	

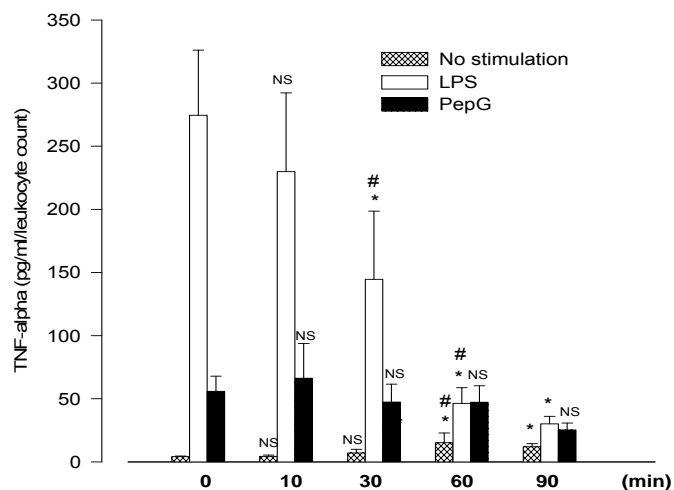
* p < 0.05 sammenliknet med utgangsverdiene.

3.3 Cytokinverdier

3.3.1 Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) og interleukin-6 (IL-6)

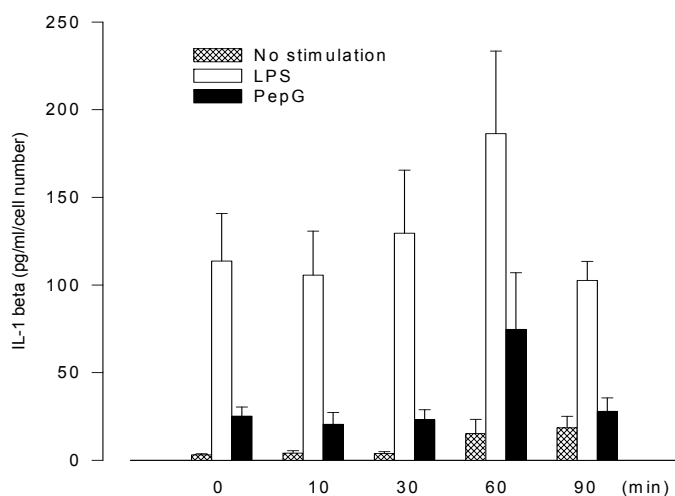
Cytokinverdiene ble målt i supernatanten etter stimulering i *ex vivo* fullblod med enten 10 ng/ml LPS, 1 µg/ml PepG eller en tilsvarende mengde fysiologisk saltvann (kontroll). På grunn av pågående blødning og infusjon av erstatningsvæsker ble alle komponenter i blodet etter hvert svært fortynnet. Alle cytokinverdier er derfor korrigert ut fra det totale antall leukocytter i prøven. Av de utvalgte markørene viste TNF-α de raskeste og mest markante utslagene (se figur 5). I kontrollprøven, som ble tatt før skade og inkubert i 3 timer uten videre stimulering, var TNF-α-verdiene 4,2 ± 0,4 pg/ml/leukocyt-tall. De tilsvarende verdiene etter stimulering med LPS var 274,5 ± 51,6 pg/ml/leukocyt-tall (p < 0,05). En må gå ut fra at dette tallet er et uttrykk for den bortimot maksimale evnen til å produsere TNF-α i en normalsituasjon. Evnen til å reagere på LPS dalte meget raskt etter at skuddene var avfyrt. Ti minutter etter skaden var verdiene nede i 230,0 ± 62,4 (NS sammenliknet med utgangsverdiene), etter 30 minutter 144,5 ± 54,1 (p < 0,05 sml. med foregående verdi), etter 60 minutter 46,4 ± 12,4 (p < 0,05 sml. med foregående verdi) og sluttelig 30,2 ± 5,9 pg/ml/leukocyt-tall etter 90 min (NS sammenliknet med foregående verdi). Stimulering med PepG etter 10 minutter ga en konsentrasjon av TNF-α på 55,9 ± 12,1 pg/ml/leukocyt-tall. Ved de følgende målepunktene var det en tendens til noe fallende verdier (lavest etter 90 min med 25,3 ± 5,4 pg/ml/leukocyt-tall), dog uten at statistisk signifikans ble oppnådd på noe tidspunkt.

Konsentrasjonen av IL-6 viste et liknende mønster. De ustimulerte kontrollverdiene var bare målbare for tre dyr. Etter stimulering med LPS steg IL-6 til $10,4 \pm 1,3$ pg/ml/leukocyt-tall. Denne verdien sank kontinuerlig ved hvert eneste av de neste målepunktene og nådde til slutt $1,7 \pm 1,3$ pg/ml/leukocyt-tall etter 90 minutter ($p < 0,05$ sammenliknet med utgangsverdiene). Stimulering med PepG ga ingen målbare utslag for IL-6. Produksjonen av IL-6 starter vanligvis noe seinere enn hva som er tilfelle for TNF- α eller IL-1 β , og verdiene ville derfor sannsynligvis ha vært høyere dersom *in vitro*-delen av forsøkene hadde blitt utvidet noe, f.eks. fra 3 til 6 timer.



Figur 5. Konsentrasjon av TNF- α i supernatanten i *ex vivo* fullblod fra angitte tidspunkter etter skuddskaden. Prøvene ble inkubert i 3 timer med enten lipopolysakkarid (LPS 10 ng/ml), peptidoglykan (PepG 1 μ g/ml) eller 0,9 % NaCl (kontroller). Figuren viser en sterk og nesten øyeblikkelig toleranse etter stimulering med LPS, men ikke med PepG. * $p < 0.05$ sammenliknet med utgangsverdiene. # $p < 0.05$ sammenliknet med foregående verdi. NS – ikke signifikant sammenliknet med utgangsverdiene.

3.3.2 Interleukin-1 β (IL-1 β)



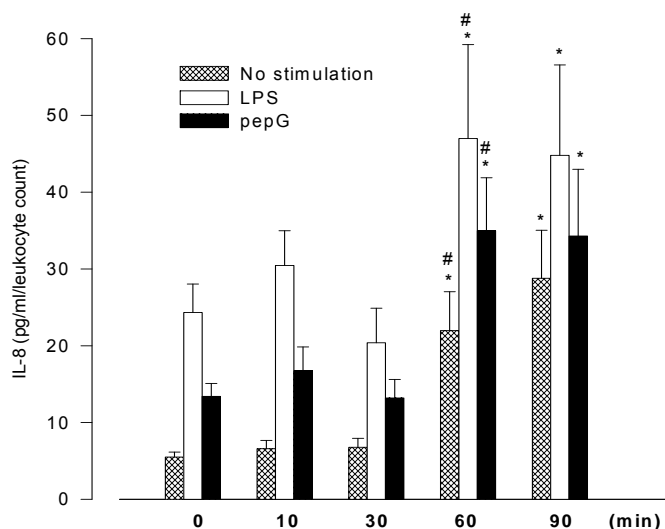
Figur 6. Konsentrasjon av IL-1 β i supernatanten i ex vivo fullblod fra angitte tidspunkter etter skuddskaden. Prøvene ble inkubert i 3 timer med enten lipopolysakkarid (LPS 10 ng/ml), peptidoglykan (PepG 1 μ g/ml) eller 0,9 % NaCl (kontroller). Figuren viser at skuddskadene ikke hadde noen innvirkning på produksjonen av IL-1 β .

Skuddskadene så ikke ut til å påvirke evnen til å produsere IL-1 β , verken etter stimulering med LPS eller PepG. Det var ingen statistisk signifikante forskjeller ved noe tidspunkt (se figur 6).

3.3.3 Interleukin-8 (IL-8) og interleukin-10 (IL-10)

Konsentrasjonen av kjemokinet IL-8 utviklet seg motsatt av TNF- α , men begynte først å øke etter en forsinkelse på 60 minutter (se figur 7). Fra utgangsverdiene på $24,3 \pm 3,7$ ($13,4 \pm 1,7$) pg/ml/leukocyt-tall etter stimulering med LPS (PepG i parentes), økte verdiene til $47,0 \pm 12,2$ ($35,0 \pm 6,9$) etter 60 minutter ($p < 0,05$ sammenliknet med utgangsverdiene) og endelig til $44,8 \pm 11,8$ ($34,3 \pm 8,7$) pg/ml/leukocyt-tall etter 90 minutter ($p < 0,05$ sammenliknet med utgangsverdiene).

IL-10 var under den nedre deteksjonsgrensen ved alle måletidspunkter.



Figur 7. Konsentrasjon av IL-8 i supernatanten i *ex vivo* fullblod fra angitte tidspunkter etter skuddskaden. Prøvene ble inkubert i 3 timer med enten lipopolysakkarid (LPS 10 ng/ml), peptidoglykan (PepG 1 µg/ml) eller 0,9 % NaCl (kontroller). I blodprøvene tatt 60 og 90 minutter etter skuddskadene, er det en parallell økning i IL-8 etter stimulering med LPS eller PepG. * $p < 0.05$ sammenliknet med utgangsverdiene. # $p < 0.05$ sammenliknet med foregående verdi. NS – ikke signifikant sammenliknet med utgangsverdiene.

4 Diskusjon

Vi har i denne studien vist at store skader i en stordyrmodell nærmest umiddelbart påvirker funksjonen i sirkulerende hvite blodlegemer. Endringene var svært heterogene, både med hensyn til hvordan cellene reagerte på de to ulike *ex vivo* aktivatorene (LPS og PepG) og hvordan produksjonen av de enkelte faktorene ble påvirket. Særlig markant og konsistent var utviklingen for TNF- α etter stimulering med LPS. Nedgangen var synlig allerede etter 10 minutter, statistisk signifikant etter 30 minutter, med utflating av fallet mellom 60 og 90 minutter (tap av statistisk signifikant endring). Derimot så det ikke ut til at produksjonen av IL-1 β ble synbart påvirket. Disse to cytokinene er kjent for å være tidlige regulatorer av den inflammatoriske responsen og kan også være med på å øke frigjøringen av sekundære cytokiner som IL-6 og IL-8. IL-8 begynte således å stige etter 60 og 90 minutter ($p < 0,05$), men denne stigningen ville sannsynligvis vært enda høyere dersom cellene hadde vært i stand til å opprettholde sin normale maksimale produksjonskapasitet for TNF- α .

Skuddskader (og andre penetrerende skader) fører jevnlig til at store mengder mikroorganismer finner veien inn i knust vev med redusert eller ingen sirkulasjon (4). Avhengig av hvor skuddene treffer, vil Gram-negative eller Gram-positive bakterier dominere. Toksiner fra cellemembranen (LPS og PepG) vil etter hvert, med økende styrke, påvirke immunforsvaret og den inflammatoriske reaksjonen. Ut fra våre resultater ser det ut til at evnen til å reagere på PepG er

bedre bevart enn for LPS. For TNF- α og IL-1 β så vi ingen forandringer etter inkubasjon med PepG, mens IL-8-verdiene økte parallelt både med LPS og PepG. Den inflammatoriske responsen påvirkes altså kvalitativt (og kvantitativt) forskjellig avhengig av hvilket bakterietoksin som dominerer, noe som kan ha sammenheng med at reseptorene for disse to toksinene i det første tilfelle er lokalisert i membranen, i det andre intracellulært. Det er grunn til å anta at dette ulike reaksjonsmønsteret også vil virke inn på det kliniske forløpet etter en større skade.

Mekanismene som styrer de umiddelbare forandringene i immunforsvaret etter større skader, er bare delvis kartlagt. Det er velkjent at utstrakt knusning av vev frigjør store mengder kroppsegne molekyler. De siste årene er det blitt klart at disse stoffene kan fungere som alternative ligander for sentrale overflatereseptorer i det medfødte immunforsvaret. Forskningen har særlig vært konsentrert om fragmenter av hyluronan fra bindevevet og HMGB1 fra kjernen i nekrotiske celler. LPS inneholder molekulære strukturer som gjenkjennes av Toll-reseptor 4, og både hyluronan og HMGB1 er vist å kunne binde seg til den samme reseptoren. Det er mulig at evnen til å reagere med den primære liganden (LPS) kan bli påvirket når reseptorene (som ved en stor skade) utsettes for en storm av kroppsegne ligander. Dermed påvirkes også de signaler som sendes inn til kjernen. Sannsynligvis er det også et samspill mellom TLR og NOD slik at TLR-agonister på den måten kan påvirke signalering gjennom NOD-reseptorene. Dette vil i sin tur også være med på å regulere funksjonen i det adaptive immunforsvaret (5).

Store skader er kjent for å kunne utløse en ukontrollert og generalisert betennelsesreaksjon, som er en viktig årsak til tidlig organsvikt (6). Seinere i forløpet vil hemning av det adaptive immunforsvaret, og derav følgende opportunistiske infeksjoner, dominere (7). En rekke grupper har studert disse mønstrene. Målet har først og fremst vært å gjenopprette normalsituasjonen ved å modulere den inflammatoriske reaksjonen, men det vil også være av stor interesse å kunne bruke disse målingene for å si noe om prognosen. Det har vist seg at de umiddelbare forandringene, slik som vist i denne studien, ser ut til å vare ved i relativt lang tid; flere grupper har observert nedsatt leukocyttfunksjon i minst 7 dager. I teorien kan stimulerte cytokinverdier fra blod tatt så tidlig som 60-90 minutter etter skade, derfor kunne gi en pekepinn om det videre forløpet. Tidlig produksjon av TNF- α etter *ex vivo* stimulering med LPS er således vist å være signifikant lavere hos dem som overlevde sepsis etter skade, sammenliknet med dem som ikke gjorde det (8). Vi kan ikke konkludere noe på dette punktet, men bare antyde at blant de markørene vi undersøkte, så TNF- α ut til å være best egnet til et slikt formål. Videre er sannsynligvis LPS en bedre aktivator enn PepG. Bruk av *ex vivo* fullblod er i denne forbindelse så enkelt at metoden også burde kunne benyttes i klinisk arbeid.

5 Konklusjoner

Et av hovedmålene med denne studien var å kartlegge det tidlige tidsforløpet til utvalgte inflammatoriske markører etter en omfattende vevsskade. Resultatene viser at verdiene av TNF- α etter aktivering med LPS gir de klareste utslagene. Med denne kombinasjonen fant vi et svært konsistent og markant fall som sannsynligvis stabiliserer seg så tidlig som etter 60-90 minutter. Studier fra andre grupper har antydnet at det er en sammenheng mellom disse forandringene og

dødelighet etter skader, og muligheten for å bruke dem som tidlige prognostiske markører i klinisk praksis fortjener derfor nærmere undersøkelse.

Referanser

1. Mitchell JA, Paul-Clark MJ, Clarke GW, McMaster SK, Cartwright N. Critical role of Toll-like receptors and nucleotide oligomerisation domain in the regulation of health and disease. *J Endocrinol* 2007; 193: 323-330.
2. Wang H, Yang H, Tracey KJ. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *J Intern Med* 2004; 255: 320-331.
3. Taylor KR, Trowbridge JM, Rudisill JA, et al. Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR 4. *J Biol Chem* 2004; 279: 17079-84.
4. Murray CK, Roop SA, Hospenthal DR, Dooley DP, Wenner K, Hommock J, Taufen N, Gourdine E. Bacteriology of war wounds at the time of injury. *Mil Med* 2006; 171: 826-829.
5. Zedler S, Faist E. The impact of endogenous triggers on trauma-associated inflammation. *Curr Opin Crit Care* 2006;12:595-601.
6. Jarrar D, Chaudry IH, Wang P. Organ dysfunction following hemorrhage and sepsis: mechanisms and therapeutic approaches. *Int J Mol Med* 1999; 4: 575-82.
7. Angele MK, Faist E. Clinical review: Immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care* 2002; 6: 298-305.
8. Ploder M, Pelinka L, Schmuckenschlager C, Wessner B, Ankersmit HJ, Fuerst W, Redl H, Roth E, Spittler A. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α production and not monocyte human leukocyte antigen-DR expression is correlated with survival in septic trauma patients. *Shock* 2006;25:129-134.